



УДК 57.042+57.084

## Применение нового инструментального метода для оценки функционального состояния клеток *Francisella tularensis* в стрессовых условиях



С. В. Борисова, Е. М. Кузнецова, П. С. Ерохин, О. А. Волох

Борисова Светлана Владимировна, магистр кафедры биохимии и биофизики, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, Svetlana.Borisova@yandex.ru

Кузнецова Екатерина Михайловна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории холерных вакцин ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов, lhv@microbe.ru

Ерохин Павел Сергеевич, научный сотрудник лаборатории диагностики инфекционных болезней ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов, lhv@microbe.ru

Волох Оксана Александровна, кандидат биологических наук, заведующий лаборатории холерных вакцин ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов, lhv@microbe.ru

Строение поверхности клетки отражает функциональное состояние бактерии в целом. Наличие специфических признаков клеток сказывается на биофизических характеристиках их поверхности – заряде, свободной энергии и гидрофобности. Взаимодействие бактерий с биомолекулами и частицами также связано с этими характеристиками поверхности. Целью нашей работы было изучение функционального состояния клеток *F. tularensis* 15 НИИЭГ при культивировании в условиях стресса с помощью электрооптического (ЭО) мониторинга. Было показано, что при воздействии повышенной температуры в сочетании с перекисным стрессом изменяются показатели жизнеспособности клеток, а также поверхность клеточной стенки. Вместе с этим стресс стимулирует у бактерии экспрессию иммунореактивных стрессовых белков. Производилось изучение воздействия малых доз антибиотика на биофизические параметры клеток *F. tularensis* в течение короткого времени – 1 ч. В эксперименте были использованы антибиотики, применяемые при лечении туляремии, – стрептомицин, канамицин и ампициллин в концентрации 0,5 г/л. Было выявлено, что наибольшим повреждающим действием на клетку в данной концентрации обладает ампициллин. При воздействии канамицина и стрептомицина также наблюдаются изменения жизнеспособности клеток *F. tularensis*, но в меньшей степени. Таким образом, условия культивирования *F. tularensis* влияют на жизненные показатели клеток и уровень экспрессии антигенов. Электрооптический анализ успешно регистрирует различные типы воздействия на клетки микроорганизма и является перспективным методом контроля при разработке профилактических и диагностических препаратов.

**Ключевые слова:** *Francisella tularensis*, электрооптический анализ, стресс, атомно-силовая микроскопия.

DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2019-19-3-326-330>

### Введение

Туляремия – зоонозная природно-очаговая инфекция, возбудитель которой *Francisella tularensis*, грамотрицательная факультативно-анаэробная внутриклеточная бактерия, может вызывать вспышки заболевания среди широкого круга хозяев, включая человека, что представляет проблему для практического здравоохранения [1].

В процессе адаптации клетки к определенным условиям изменяется строение клеточной поверхности, что отражает также и ее функциональное состояние. Наличие специфических признаков клеток сказывается на биофизических характеристиках их поверхности – заряде, свободной энергии и гидрофобности. Взаимодействие бактерий с биомолекулами и частицами также связано с этими характеристиками поверхности [2].

Целью нашей работы было изучение функционального состояния клеток *F. tularensis* 15 НИИЭГ при культивировании в условиях стресса с помощью электрооптического (ЭО) мониторинга.

### Материалы и методы

Объектом изучения были бактерии *F. tularensis* subsp. *holarctica* штамм 15 НИИЭГ (получен из Государственной коллекции патогенных коллекций «Микроб»). Штамм выращивали на пластинках FT агара (пр-ва ГНЦ ПМБ, Оболенск) при 37° С в течение 48 ч. Затем бактерии инокулировали в бульоне Мюллера – Хинтона с Т-добавкой рН 7,4 и культивировали в колбах Эрленмейера на термостатируемой качалке (MULTITRON II, Infors) при 200 об/мин в течение 16 ч при (37 ± 2)° С до достижения экспоненциальной фазы роста. Полученную ночную культуру подвергали следующему воздействию: температурному стрессу – повышению температуры до 42° С; сочетанию температурного стресса с перекисным окислением; воздействию антибиотиков.



## Результаты и их обсуждение

### 1. Воздействие перекисного и температурного стресса на клетки *F. tularensis*

Для изучения перекисного и температурного стресса добавляли  $H_2O_2$  до конечной концентрации 5 мМ, повышали температуру выращивания до 42° С и культивировали еще в течение 2 ч. Контрольные образцы выращивали без перекиси водорода при 37° С. В ходе эксперимента

было показано: выращивание *F. tularensis* в стрессовых условиях приводит к изменению электрооптического (ЭО) эффекта (рис. 1), что свидетельствует об изменении ориентационного спектра клеток. Нами установлено, что стрессовые условия (42° С,  $H_2O_2$ ) незначительно снижали жизнеспособность *F. tularensis*, но приводили к значительному увеличению экспрессии белков теплового шока, и это согласуется с литературными данными [3].

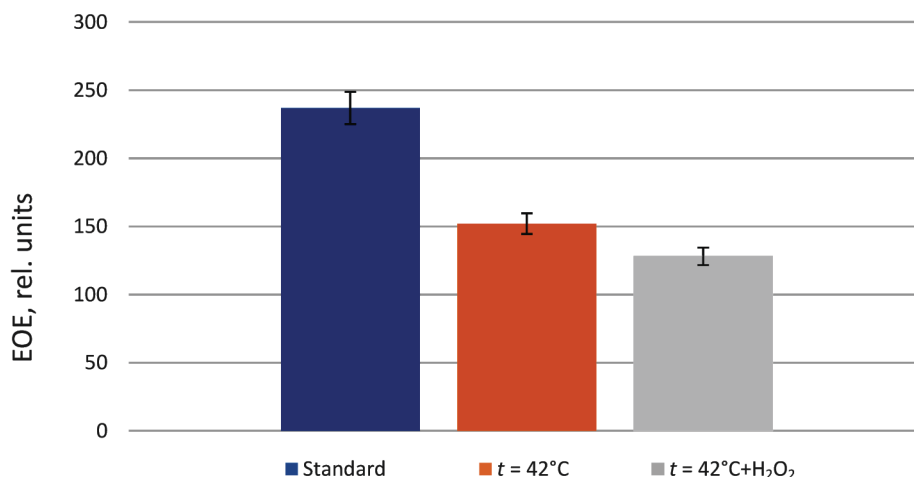


Рис. 1. Изменение показателя электрооптического эффекта при частоте 900 кГц  
Fig. 1. The change of the electro-optical effect at a frequency of 900 kHz

Интерес представляет также изменение показателей поверхности клетки – ригидности и шероховатости клеточной стенки, которые оценивались с помощью метода атомно-силовой микроскопии.

Изменение условий сказывается на шероховатости клеточной поверхности (рис. 2). Таким образом, чем более жесткими становятся условия для бактерии, тем более отчетливо видны данные изменения.

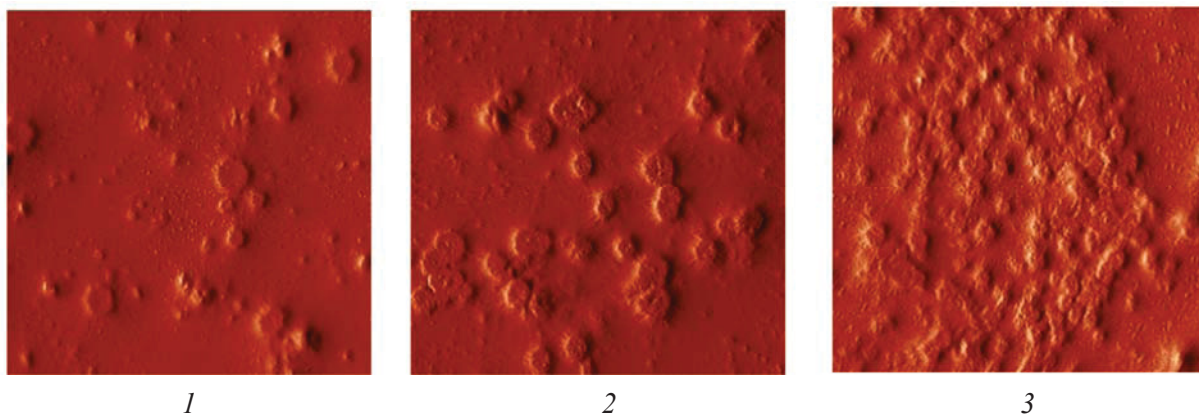


Рис. 2. Атомно-силовая микроскопия клеток *F. tularensis*, выращенных в различных условиях: 1 – контроль; 2 –  $t = 42^\circ C$ ; 3 –  $42^\circ C + H_2O_2$

Fig. 2. Atomic force microscopy of *F. tularensis* cells grown under different conditions: 1 – control; 2 –  $t = 42^\circ C$ ; 3 –  $42^\circ C + H_2O_2$

Методами электрофореза в полиакриламидном геле (SDS-PAGE) [4] и иммуноблоттинга [5] был проведен анализ выделенных фракций

белков *F. tularensis* 15НИИЭГ, секретируемых в культуральную жидкость при выращивании без стрессового воздействия и под действием



стресса. Было показано увеличение экспрессии иммунореактивных стрессовых белков *F. tularensis*, в частности одного из белков шаперо-

нов – GroEL (60 кДа), под действием перекисного и температурного стресса по сравнению с контрольным вариантом опыта (рис. 3).

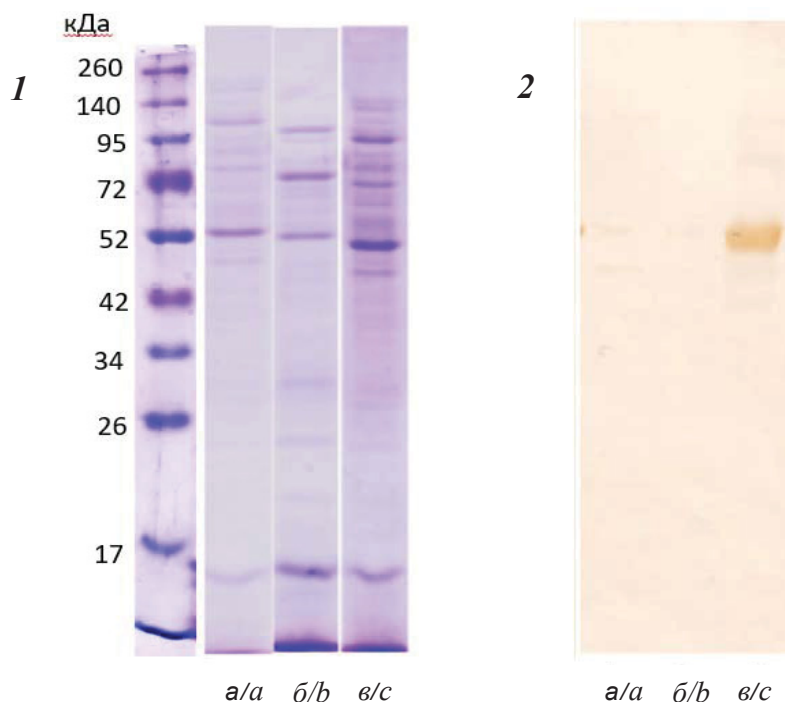


Рис. 3. Результаты SDS-PAGE и иммуноблоттинга белков, секретируемых бактериями *F. tularensis* 15НИИЭГ при выращивании в течение 16 ч на жидких средах: 1 – белковый профиль, полиакриламидный гель окрашен кумасси синим R-250; 2 – иммуноблоттинг с сывороткой б/м, вакцинированной *F. tularensis* 15НИИЭГ; а – контроль, без стрессового воздействия, б – на 2 ч повышение температуры выращивания до 42° С; в – на 2 ч повышение температуры выращивания до 42° С и добавление 5 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Fig. 3. The results of SDS-PAGE and immunoblotting of proteins secreted by bacteria *F. tularensis* 15NIIEG when grown for 16 hours in liquid media: 1 – protein profile, polyacrylamide gel, colored with Kumassi blue R-250; 2 – immunoblot with serum b/m vaccinated with *F. tularensis* 15NIIEG; a – control, without stress, b – for two hours raising the temperature of growing to 42° C; c – for two hours, raising the cultivation temperature to 42° C and adding 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

## 2. Воздействие антибиотиков как стресс-фактора

Производилось изучение воздействия малых доз антибиотика на биофизические параметры клеток *F. tularensis*. В эксперименте были использованы антибиотики, применяемые при лечении туляремии, – стрептомицин, канамицин и ампициллин в концентрации 0,5 г/л.

Было выявлено, что наибольшим повреждающим действием на клетку в данной концентрации обладает ампициллин. Уже на начальном этапе взаимодействия антибиотика с клеткой сопротивляемость была снижена в два раза. Это говорит о сорбировании частиц антибиотика на мембране. Через 15 мин сопротивляемость

клетки резко возрастает. По-видимому, в данный момент происходит активная стабилизация мембраны клетки с целью защиты от повреждающего фактора. Спустя 45 мин снова наблюдается снижение сопротивляемости клетки, что связано с нарушением целостности мембран (рис. 4).

При воздействии канамицина и стрептомицина также наблюдаются похожие показатели, но в меньшей степени.

### Заключение

Таким образом, условия культивирования *F. tularensis* влияют на жизненные показатели клеток и уровень экспрессии антигенов. Электрооптический анализ успешно регистрирует разные

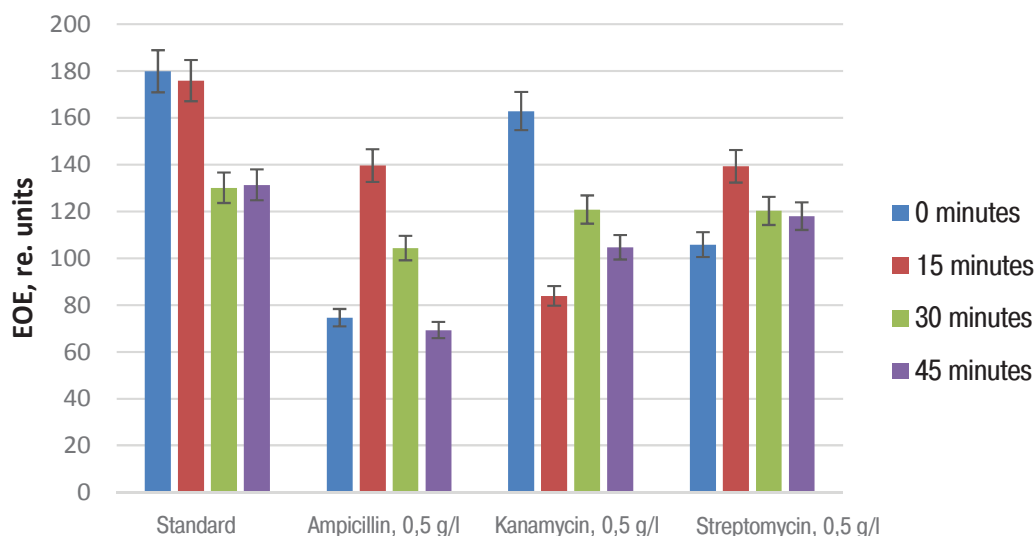


Рис. 4. Изменение электрооптического эффекта клеток *F. tularensis* под действием антибиотиков при частоте ориентирующего поля 900 кГц

Fig. 4. Changes in the electro-optical effect of *F. tularensis* cells at a frequency of the orienting field of 900 kHz

типы воздействия на клетки микроорганизма. ЭО мониторинг функционального состояния микробных клеток в режиме реального времени является перспективным методом контроля при разработке профилактических и диагностических препаратов.

#### Список литературы

1. Дунаева Т. Н., Емельянова О. С., Майский И. Н., Мясников Ю. А., Олсуфьев Н. Г., Руднев Г. П., Савельева Р. А., Сильченко В. С. Туляремия / под ред. Н. Г. Олсуфьева и Г. П. Руднева. М.: Медгиз, 1960. 460 с.
2. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K.,

Walter P. Molecular Biology of the Cell. 5<sup>th</sup> ed. N.Y.: Garland Science, 2007. 1392 p.

3. Erisson E., Ericsson M., Tärnvik A., Kuoppa K., Sandström G., Sjöstedt A. Increased Synthesis of DnaK, GroEL, and GroES Homologs by *Francisella tularensis* LVS in Response to Heat and Hydrogen Peroxide // Infection and Immunity. 1994. Jan. P. 178–183.
4. Laemmli U. K. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4 // Nature. 1970. Vol. 227. P. 680–685.
5. Towbin H., Staehelin T., Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1979. Vol. 76, iss. 9. P. 4350–4354.

#### Образец для цитирования:

Борисова С. В., Кузнецова Е. М., Ерохин П. С., Волох О. А. Применение нового инструментального метода для оценки функционального состояния клеток *Francisella tularensis* в стрессовых условиях // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2019. Т. 19, вып. 3. С. 326–330. DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2019-19-3-326-330>

#### Application of New Instrumental Methods for Evaluation of the Functional State of Cells of *Francisella Tularensis* in a Stressful Environment

S. V. Borisova, E. M. Kuznetsova,  
P. S. Erokhin, O. A. Volokh

Svetlana V. Borisova, <https://orcid.org/0000-0003-3793-6526>, Saratov State University, 83 Astrakhanskaya St., Saratov 410012, Russia, Svetlana.Borisova@yandex.ru

Ekaterina M. Kuznetsova, <https://orcid.org/0000-0002-2128-5426>, Institute "Microbe" of Rospotrebnadzor, 46 Universitetskaya St., Saratov 410005, Russia, lhv@microbe.ru

Pavel S. Erokhin, <https://orcid.org/0000-0003-2175-5333>, Institute "Microbe" of Rospotrebnadzor, 46 Universitetskaya St., Saratov 410005, Russia, lhv@microbe.ru

Oksana A. Volokh, <https://orcid.org/0000-0002-3044-971X>, Institute "Microbe" of Rospotrebnadzor, 46 Universitetskaya St., Saratov 410005, Russia, lhv@microbe.ru

The structure of the cell surface reflects the functional state of the bacterium as a whole. The presence of specific features of cells affects the biophysical characteristics of their surface: charge, free energy and hydrophobicity. The interaction of bacteria with biomolecules and particles is also related to these surface characteristics. The aim of our work was to study the function of *F. tularensis*



15 NIIEG cells under cultivation under stress using electro-optical (EO) monitoring. It was shown that under the influence of elevated temperature in combination with peroxide stress, the cell viability indices, as well as the surface of the cell wall, change. At the same time, stress stimulates expression of immunoreactive stress proteins in bacteria. The effect of small doses of antibiotic on the biophysical parameters of *F. tularensis* cells was studied for a short time – 1 hour. In the experiment, antibiotics used in the treatment of tularemia – streptomycin, kanamycin and ampicillin at a concentration of 0.5 g/l were used. It was found that the greatest damaging effect on the cell in this concentration was by ampicillin. When exposed to kanamycin and streptomycin, changes in the viability of *F. tularensis* cells were also observed, but to a lesser extent. Thus, the conditions of cultivation *F. tularensis* affect the vital signs of cells and the level of antigen expression. Electro-optical analysis successfully registers various types of exposure to microbial cells and is a promising method of control in the development of preventive and diagnostic medications.

**Keywords:** *Francisella tularensis*, electro-optical analysis, stress, atomic force microscopy.

## References

1. Dunaeva T. N., Emelyanova O. S., May I. N., Myasnikov Y. A., Olsufiev N. G., Rudnev G. P., Saveliev R. A., Silchenko V. S. *Tularemia*. Eds. G. Olsufyev, G. P. Rudnev. Moscow, Medgiz Publ., 1960. 460 p.
2. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. *Molecular Biology of the Cell*. 5th ed. New York, Garland Science, 2007. 1392 p.
3. Erisson E., Ericsson M., Tärnvik A., Kuoppa K., Sandström G., Sjöstedt A. Increased Synthesis of DnaK, GroEL, and GroES Homologs by *Francisella tularensis* LVS in Response to Heat and Hydrogen Peroxide. *Infection and Immunity*, 1994, Jan, pp. 178–183.
4. Laemmli U. K. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 1970, vol. 227, pp. 680–685.
5. Towbin H., Staehelin T., Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1979, vol. 76, iss. 9, pp. 4350–4354.

---

### Cite this article as:

Borisova S. V., Kuznetsova E. M., Erokhin P. S., Volokh O. A. Application of New Instrumental Methods for Evaluation of the Functional State of Cells of *Francisella tularensis* in a Stressful Environment. *Izv. Saratov Univ. (N. S.), Ser. Chemistry. Biology. Ecology*, 2019, vol. 19, iss. 3, pp. 326–330 (in Russian). DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2019-19-3-326-330>

---