

Влияние криоконсервирования и лиофилизации на процессы внутриклеточного размножения бактериофага Т4 в бактериях *Escherichia coli*

UDC 57.043.086.132:579.83.88:576.8

L.V. STEPANYUK*, I.P. VYSEKANTSEV, L.G. CHERNYSHENKO

Influence of Cryopreservation and Freeze-Drying on Processes of Endocellular Reproduction of Bacteriophage T4 in Bacteria *Escherichia coli*

Установлено, что криоконсервирование и лиофилизация бактериофага Т4 вызывают нелетальные повреждения, вследствие чего увеличивается продолжительность латентного периода развития фага и снижается выход фага. Изменения внутриклеточного цикла развития фага более выражены после лиофилизации. Криоконсервирование вызывает повреждения бактериальных клеток, приводящие к изменению морфогенеза фага и нарушению внутриклеточного цикла развития фага, в том числе биосинтетических процессов.

Ключевые слова: криоконсервирование, лиофилизация, бактерии, бактериофаги, внутриклеточный цикл развития.

Встановлено, що кріоконсервування та ліофілізація бактеріофага Т4 викликають нелетальні пошкодження, внаслідок чого збільшується тривалість латентного періоду та зменшується вихід фага. Зміна внутрішньоклітинного циклу розвитку фага більш виражена після ліофілізації. Кріоконсервування бактеріальних клітин викликає їх пошкодження, які приводять до зміни морфогенезу та порушення внутрішньоклітинного циклу розвитку фага, у тому числі біосинтетичних процесів.

Ключові слова: кріоконсервування, ліофілізація, бактерії, бактеріофаги, внутрішньоклітинний цикл розвитку.

It is established, that cryopreservation and freeze-drying of bacteriophage T4 cause non-lethal damages owing to that the duration of latent period of phage development increases and the output of a phage decreases. Changes of endocellular cycle development of a phage are more expressed after freeze-drying. Cryopreservation causes the damages of bacterial cells leading to the change of a phage morphogenesis and impairment of an endocellular cycle of phage development, including biosynthetic processes.

Key-words: cryopreservation, freeze-drying, bacteria, bacteriophage, endocellular, development cycle.

В настоящее время общие механизмы реакции генома, белоксинтезирующего аппарата ЦПМ и клеточной стенки на воздействие низких температур и сублимации исследованы недостаточно. Понимание этих реакций клеток необходимо для расшифровки механизмов перевода клеток в состояние анабиоза. Удачной моделью для изучения влияния низких температур и сублимации на биологические объекты являются инфицированные бактериофагами бактерии на разных стадиях морфогенеза. Ранее было проведено сравнительное изучение влияния криоконсервирования и субнулевых температур на инфицированные бактериофагом Т4 бактерии *Escherichia coli* [9].

Цель работы – изучение влияния низких температур и лиофилизации на инфицированные бактериофагами бактерии.

Материалы и методы

Объектами исследования были бактерии *E. coli* В (штамм предоставлен НИИ эпидемиоло-

гии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи РАМН) и бактериофаг Т4 (предоставлен ВНИИ генетики, г. Москва).

Количество жизнеспособных бактериальных клеток определяли чашечным методом Коха [7]. Лизат с бактериофагом Т4 получали и очищали по методу Альбертсона [2]. Количество жизнеспособных фаговых частиц определяли стандартным методом агаровых слоев по Грациа [1], одиночные циклы размножения фага – по методу Дельбрюка и Эллисона [1, 8]. Образцы замораживали погружением в жидкий азот в металлических контейнерах, отогревали на водяной бане при 41°C. Лиофилизацию проводили на опытной установке замораживания-высушивания УЗВ-4 (ОП ИПКиК НАНУ). В пенициллиновые флаконы разливали по 1 мл суспензии и замораживали со скоростью 2°C/мин до –20°C в камере лиофилизации. Сублимацию проводили в камере при остаточном давлении $1,3 \times 10^{-2}$ – $1,8 \times 10^{-2}$ Па. Регидратацию осуществляли дистиллированной водой до исходного объема образца.

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию: ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 373-31-26, факс: +38 (057) 373-30-84, электронная почта: cryo@online.kharkov.ua

* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 3126, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Биосинтез белка и нуклеиновых кислот определяли по активности включения радиоактивных предшественников. Использовали среду М-9 с добавлением DL-триптофана [6]. Культуру заражали фагом с множественностью инфекции 2. Через 10, 30 и 60 мин отбирали пробы и инкубировали в течение 10 мин с ^3H -тимидином, ^3H -уридином и ^{14}C -лейцином (из расчета 2,5 мкКи/мл). Включение предшественников останавливали добавлением 10%-го раствора трихлоруксусной кислоты. Интенсивность включения меток определяли по методу Д. Кеннела [4]. Активность фильтров измеряли на жидкостном сцинтиляционном счетчике SL-40 ("Intertechnique", Франция).

Полученные результаты обрабатывали статистически [3]. Достоверность расчетов составляла 95%.

Результаты и обсуждение

При сравнительном изучении жизнеспособности и одиночных циклов развития криоконсервированного и лиофилизированного бактериофага Т4 было выявлено, что жизнеспособными после криоконсервирования по оптимальной программе сохранялось 70–80% фаговых частиц [10], а после лиофилизации 10–20%. Кроме повреждений, приводящих к гибели фаговых частиц, установлены нелетальные повреждения вирионов, изменяющие динамику процессов внутриклеточного развития фага [11]. Это проявлялось в увеличении продолжительности латентного периода внутриклеточного развития фага и снижении его выхода. При заражении бактерий лиофилизированными вирионами эти изменения были более выраженными (рис. 1).

При заражении криоконсервированных клеток *E. coli B* нативным бактериофагом Т4 установлено,

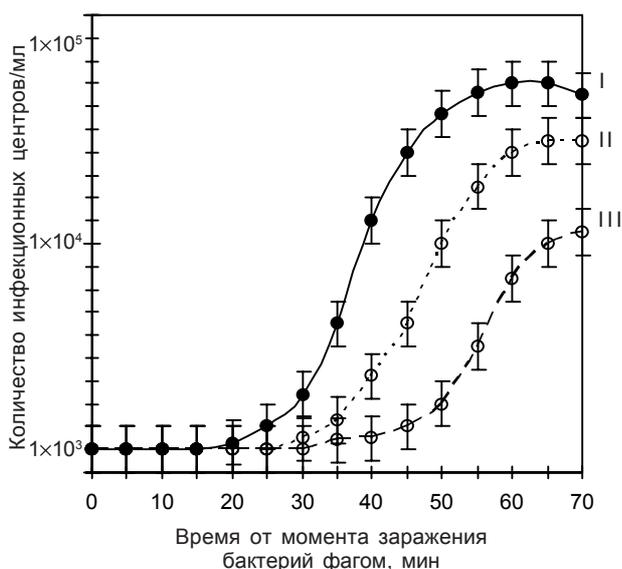


Рис. 1. Кривые одиночного цикла размножения бактериофага Т4 до (I) и после криоконсервирования (II), после лиофилизации (III).

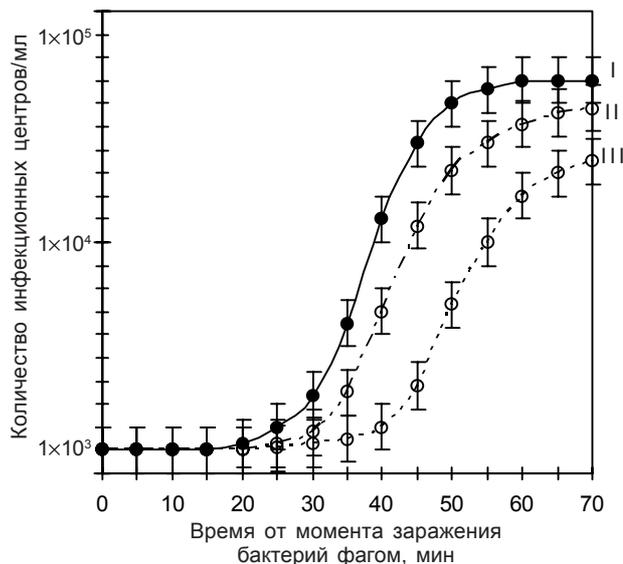


Рис. 2. Кривые одиночного цикла размножения бактериофага Т4 в криоконсервированных клетках *E. coli B* до замораживания (I), сразу после отогрева (II), через 60 мин после отогрева (III).

что при заражении бактерий в первые минуты после отогрева увеличивалась продолжительность латентного периода и снижался выход фага (рис. 2). Если клетки заражали фагом через 60 мин после отогрева, то интенсивность и длительность внутриклеточного развития фага достоверно не отличались от контроля. При культивировании бактерий при 37°C в течение 60 мин после замораживания-отогрева их деления не наблюдали, что свидетельствует о репарации нелетальных повреждений. Полученные данные соответствуют результатам исследований [5, 12], согласно которым установлено, что в криоконсервированных бактериях непосредственно после отогрева происходит синтез "стресс-белков", который достигает максимума к 30-й минуте после отогрева и снижается к 60-й.

После криоконсервирования интенсивность всех биосинтетических процессов в неинфицированных бактериях *E. coli* снижалась: ДНК – на 14%, РНК – 52%, белка – 80% (рис. 3–5). При заражении бактериофагом Т4 криоконсервированных клеток *E. coli B* синтез ДНК незначительно снижался на начальных этапах и восстанавливался после 40 мин инкубации, но не достигал уровня синтеза ДНК в контрольных инфицированных клетках. Уровень синтеза РНК после заражения криоконсервированных клеток также был достоверно ниже по сравнению с зараженными клетками до замораживания. Аналогичные результаты получены при изучении синтеза белка.

Выводы

1. Показано, что криоконсервирование и лиофилизация вызывают повреждения бактериальных частиц, приводящие к их гибели или изменению

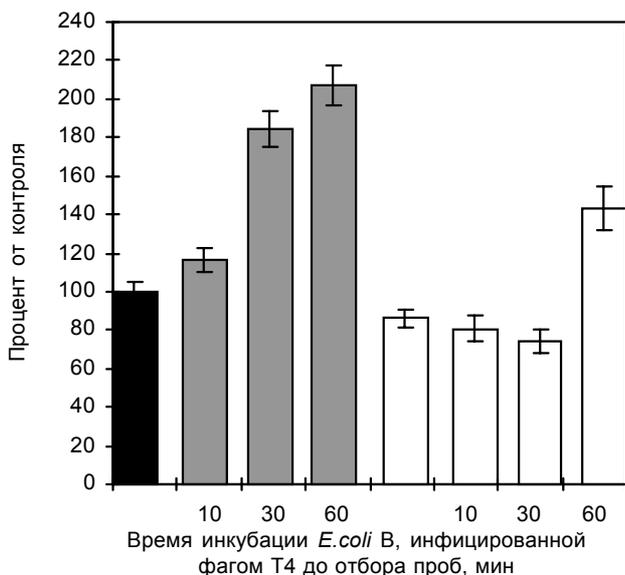


Рис. 3. Синтез ДНК. ■ – *E. coli* B; ▒ – *E. coli* B, инфицированная фагом T4; □ – *E. coli* B криоконсервированная; ▣ – *E. coli* B криоконсервированная, инфицированная фагом T4.

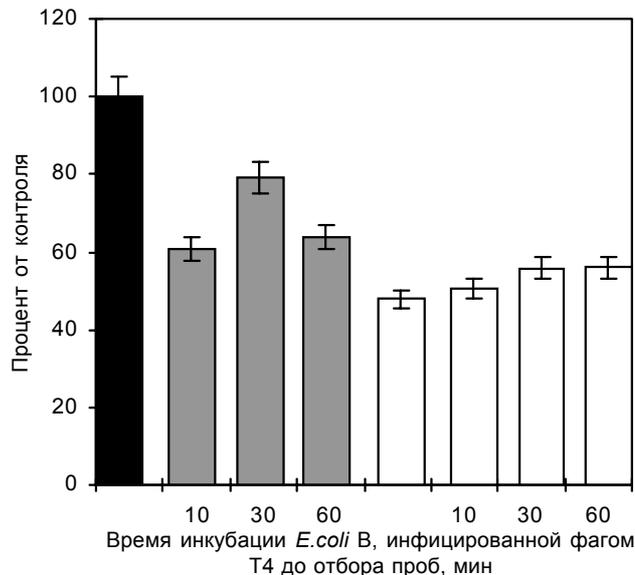


Рис. 4. Синтез РНК. ■ – *E. coli* B; ▒ – *E. coli* B, инфицированная фагом T4; □ – *E. coli* B криоконсервированная; ▣ – *E. coli* B криоконсервированная, инфицированная фагом T4.

внутриклеточного цикла развития фага (увеличение продолжительности латентного периода и снижение выхода фага). Изменения внутриклеточного цикла развития фага были больше выражены после лиофилизации.

2. В процессе криоконсервирования в бактериальных клетках также возникали летальные и нелетальные повреждения, приводящие к изменению процессов внутриклеточного развития нативного фага.

3. Бактерии, инфицированные фагом, могут служить моделью исследования влияния криоконсер-

вирования и лиофилизации на геном и клеточные структуры.

Литература

1. Адамс М. Бактериофаги. – М.: Изд-во иностр. лит., 1961. – С. 527.
2. Альбертсон П. О. Разделение клеточных частиц и макромолекул. – М.: Мир, 1974. – С. 267.
3. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. – Л.: Гос. изд-во мед. лит., 1962. – 180 с.
4. Кеннел Д. Использование фильтров для разделения радиоактивных РНК, ДНК, белка / Методы исследования нуклеиновых кислот. – М.: Мир, 1970. – С.138–144.
5. Микулинский Ю.Е., Высеканцев И.П., Котляров А.О. Влияние криоконсервирования на синтез белков в бактериях // Влияние охлаждения на биологические объекты. – Харьков, 1990. – С. 97.
6. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике. – М.: Мир, 1976. – 415 с.
7. Практикум по микробиологии / Под ред. Н.С. Егорова. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1976. – С. 61–62.
8. Стент Г. Молекулярная генетика. – М.: Мир, 1981. – С. 257.
9. Цуцаева А.А., Высеканцев И.П., Микулинский Ю.Е. Внутриклеточное развитие бактериофагов *E. coli* после пребывания инфицированных фагами бактерий в условиях анабиоза и гипотермии // Микробиология, 1986. – Т. 55, Вып. 6. – С. 1009-1012.
10. Цуцаева А.А., Высеканцев И.П., Исерович П.Г. и др. Влияние режимов замораживания на выживаемость бактериофагов *E. coli* // Микробиология. – 1982. – Т. 51, Вып. 4. – С. 632.
11. Цуцаева А.А., Высеканцев И.П., Микулинский Ю.Е. и др. Влияние низких температур на выживаемость и внутриклеточное размножение бактериофагов *E. coli* // Микробиология. – 1981. – Т. 50, Вып. 2. – С. 292.
12. Цуцаева А.А. Холодовой стресс и биологические системы. – Киев: Наук. думка, 1991. – С. 48.

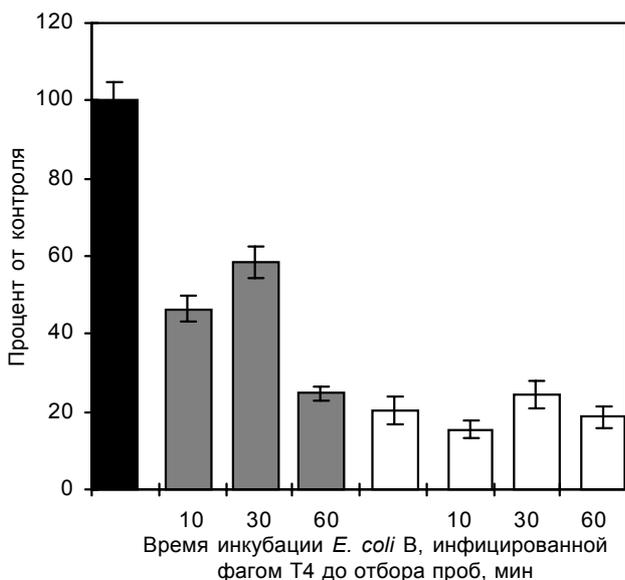


Рис. 5. Синтез белка. ■ – *E. coli* B; ▒ – *E. coli* B, инфицированная фагом T4; □ – *E. coli* B криоконсервированная; ▣ – *E. coli* B криоконсервированная, инфицированная фагом T4.

Поступила 1.07.2008