

Галина Семчишин

ВПЛИВ РІЗНИХ РІВНІВ КИСНЮ НА РІСТ *ESCHERICHIA COLI*

Активні форми кисню (АФК) є невід'ємним атрибутом життя організмів, що використовують кисень як кінцевий акцептор електронів у дихальному ланцюгу [1, 2]. Порушення балансу між утворенням та знешкодженням АФК призводить до оксидативного стресу [3]. Підвищене генерування в клітині супероксидного аніону, пероксиду водню, гідроксильного радикалу спостерігається внаслідок впливу факторів зовнішнього середовища: ультрафіолетового та γ -випромінювання, хімічних реагентів, деяких лікарських середників [1, 4, 5]. Кишкова паличка, для якої анаеробні умови є природними, крім того, зазнає оксидативного стресу при різкому переході її в кисневе середовище [6-8]. Метою роботи було проведення порівняльних досліджень впливу різних рівнів кисню в середовищі культивування на ріст двох штамів кишкової палички, що відрізняються за генетичними характеристиками.

Матеріали і методи.

В роботі використовували бактерії *Escherichia coli* K12 штамів KS400 (*met B*) та AB1157 (*F' thr-1 leuB6 proA2 his-4 thi-1 argE2 lacY1 galK2 rpsL supE44 ara-14 xyl-15 mlt-1 tsx-33*), отримані з Інституту епідеміології і мікробіології ім. Гамалеї РАН (Росія). Бактерії вирощували в живильному середовищі для культивування бактерій виробництва НДІ живильних середовищ (м. Махачкала, Росія), яке містило 10,05 г/л панкреатичного гідролізату ківки і 4,95 г/л хлориду натрію (рН 7,0). Середовище стерилізували автоклавуванням за допомогою парового стерилізатора при температурі 121°C протягом 20 хв. Для експерименту відповідні об'єми нічної культури, вирощеної в умовах глибинного культивування (стаціонарна фаза) розводили 1:100 стерильним бульйоном та інкубували при 37°C протягом відповідного часу. Для досліджень клітини вирощували за таких умов

- глибинне культивування (умови наближені до анаеробних);
- культивування в середовищі, барбігованому стерильним повітрям, з використанням мікрокомпресора (аеробні умови);
- культивування в середовищі, барбігованому медичним киснем (умови оксигенації).

Аліквоти культури відбирали та спектрофотометрували при довжині хвилі 600 нм за допомогою спектрофотометра СФ-46 (ЛОМО, СРСР).

Статистичну обробку проводили за допомогою комп'ютерної програми MYNOVA [9].

Результати та обговорення.

Анаеробні умови є екологічною нішею для ентеробактерій, в тому числі і для кишкової палички [6-8]. Тому було доречно з'ясувати як кисень впливає на ріст цих бактерій. Рис. 1 демонструє криві росту штаму KS400 з нього видно, що культури, вирощувані в умовах глибинного культивування (крива 1) та аерації (крива 2), після 2,5 год розвитку входять в експоненційну фазу розвитку. В той же час лаг-фаза оксигенованої культури продовжена до 3 год. Досліджувані культури значно відрізняються за швидкістю експоненційного росту. Про це свідчить час подвоєння числа клітин за різних умов культивування: 102 хв (глибинне культивування), 57 хв (аерація), 44 хв (оксигенація), а також достовірні відмінності, виявлені у продуктивності досліджуваних культур, мірою якої є оптична густина суспензії клітин на стаціонарній фазі розвитку (табл. 1)

Нами було виявлено, що чутливість штаму AB1157 (рис. 2) до наявності кисню в середовищі відрізняється від чутливості KS400. Так, в середовищі з підвищеним вмістом кисню культура AB1157 не виявляла жодних ознак розвитку. Оптична густина вихідної культури за цих умов не змінювалась протягом всього дослідження (крива 3). Ріст штаму AB1157 в умовах глибинного культивування (крива 1) та аерації (крива 2) характеризувався лаг-фазою, продовженою до 3 та 4 год відповідно. Після виходу культури на стадію експоненційного розвитку кут нахилу кривих росту обох штамів значно відрізнявся. Час подвоєння кількості клітин становить 173 та 79 хв для бактерій, що росли в умовах обмеженого доступу кисню та аеробних умовах відповідно. Отже, як і в попередньому штамі, барбітація повітря через середовище культивування є причиною більшої швидкості росту бактерій, ніж глибинне культивування. Цей висновок підтверджується також при порівнянні оптичних густин суспензій у стаціонарній фазі розвитку, які були отримані в різних умовах культивування. Зокрема продуктивність аерованої культури є вдвічі вищою, ніж культури, що росла в умовах обмеженого доступу кисню (табл. 1). Цікавим є те, що, як при глибинному культивуванні, так і в аеробних умовах, кількість клітин в середині стаціонарної фази штаму

Таблиця 1 Продуктивність культур *E. coli* K12 штамів KS400 та AB1157 в експоненційній та стаціонарній фазах розвитку за різних умов культивування.

Фаза розвитку культури	Оптична густина при 600 нм		
	Глибинне культивування	Аерація	Оксигенація
KS400			
Експоненційна			
Стаціонарна	0,268±0,008	0,483±0,054 ^Г	0,353±0,022 ^Г
AB1157			
Експоненційна	0,576±0,055*	1,475±0,085* ^Г	1,995±0,033* ^{Г,а}
Стаціонарна	0,266±0,061	0,373±0,076	НР
	0,893±0,05* ^а	1,887±0,038* ^{Г,а}	НР

Примітки:

*Достовірно відмінне від значень для експоненційної фази та від значень для відповідної фази розвитку культури в умовах глибинного культивування (^Г) та аерації (^а).

^аДостовірно відмінне від відповідних значень для штаму KS400. Достовірність визначали з рівнем значимості $P < 0,05$. Результати представлені як середнє ± стандартна похибка, $n = 3-4$. Скорочення: НР – не ростуть

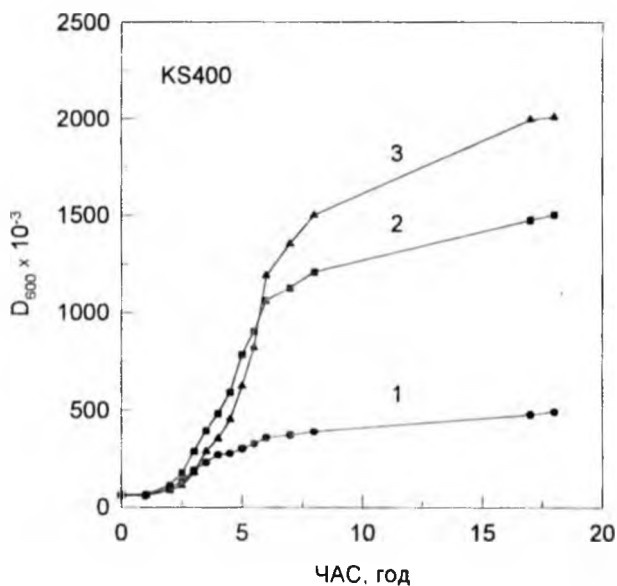


Рис. 1. Криві росту бактерій *E. coli* K12 KS400, які росли за наступних умов 1 – глибинне культивування, 2 – аерація, 3 – оксигенація. Представлені результати типового дослідю.

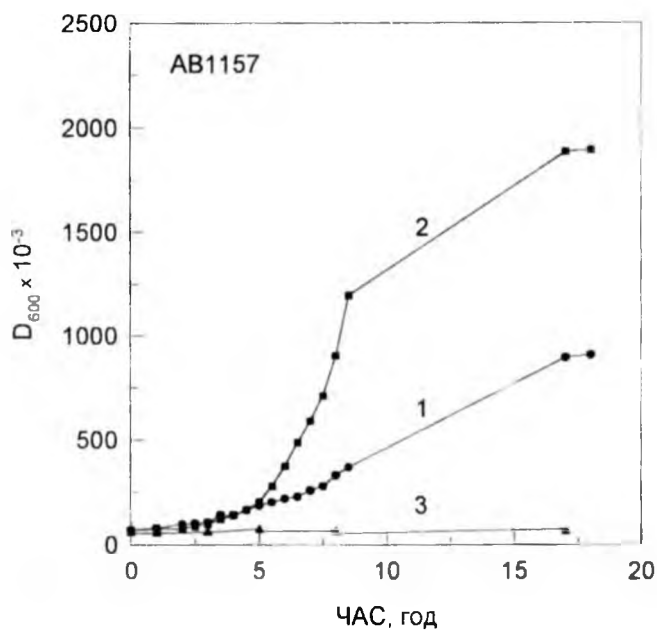


Рис. 2. Криві росту бактерій *E. coli* K12 AB1157, які росли за наступних умов: 1 – глибинне культивування; 2 – аерація; 3 – окигенація. Представлені результати типового досліду.

AB1157 була більшою від кількості клітин штаму KS400 на тій же фазі розвитку. Таким чином, аналіз представлених результатів показує, що розвиток культури залежить не тільки від кількості кисню в середовищі культивування, але і від особливостей штаму.

Отже, досліджені штами *E.coli* KS400 та AB1157 відрізняються за толерантністю до кисню. Штам AB1157 не виявив ознак росту за умов оксигенації на відміну від KS400, для якого ці умови є найбільш сприятливими для розвитку. Це дозволяє зробити припущення про те, що штам *E.coli* KS400 характеризується більш потужною системою антиоксидантного захисту від АФК, які є результатом підвищених рівнів кисню [1, 6, 10]. Це має стати предметом подальших досліджень. Генетичні дефекти штаму AB1157 не дають нам ніяких вказівок для пояснення неможливості його розвитку за умов оксигенації.

- 1 Demple B. (1991) Annu. Rev. Genet. **25**, 315-337.
2. Gonzalez-Flecha B., and B. Demple. (1997) J. Bacteriol. 179, 382-388
3. Sies H. (1993) Eur. J. Biochem. **215**, 213-219.
4. Hassett D J., Britigan B E., Svendsen T., Rosen G M., Cohen M.S. (1987) J. Biol Chem. **262**, 13404-13408
- 5 Kappus H., Sies H. (1981) Experientia. **37**, 1233-1244.
6. Beyer W., Imlay J., Fridovich I. (1991) Prog. Nucl. Acid Res. 40, 121-126.
7. Storz G , Tartagila L A , and Ames B N. (1990) Science. 248, 189-194.
- 8 Demple B (1999) Clin Exp. Pharm. Physiol. **26**, 64-68.
9. Lushchak V.I., Bahnjukova T V., and Storey K.B. (1998) Braz. J. Biol Med. Res. 31, 1059-1067.
10. Benov L., Fridovich I (1996) Mutation Res. 231-236.

Halyna Semchyshyn

EFFECT OF DIFFERENT OXYGEN LEVELS ON *ESCHERICHIA COLI* GROWTH

In present work we investigated growth of two *E. coli* K12 strains KS400 and AB1157. The strains are different in their genetic characteristics. It is possible that this fact causes the distinction of two strains in their sensitivities to oxygen. *E. coli* AB1157 is not able to grow under oxygenation conditions in opposite to KS400 which demonstrates highest productivity in the same circumstances. These results suggested that generation of reactive oxygen species under conditions of high oxygen level and powerfull of antioxidant system are the key factors controlling ability of bacteria *E. coli* to grow under oxygenation conditions.