

**МИКРОБИОЛОГИЯ**

Научная статья

УДК 579.22

doi: 10.17072/1994-9952-2022-1-35-41

**Real-time мониторинг физиологических параметров  
для изучения раннего ответа бактерий *Escherichia coli*  
на пероксидный стресс**

**А. В. Тюленев<sup>1✉</sup>, Г. В. Смирнова<sup>2</sup>, А. О. Габова<sup>3</sup>, Г. А. Триандафилова<sup>4</sup>,  
О. Н. Октябрьский<sup>5</sup>**

<sup>1,2,4,5</sup> Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь, Россия

<sup>3</sup> Пермский национальный исследовательский политехнический университет, Пермь, Россия

Автор, ответственный за переписку: Алексей Валерьевич Тюленев, Leksey333@yandex.ru

**Аннотация.** Исследовался ответ аэробно растущих культур *Escherichia coli* на пероксидный стресс с применением синхронного мониторинга в реальном времени таких параметров, как  $pO_2$  (парциальное давление кислорода), pH, Eh (редокс-потенциал культуры), экстраклеточные уровни ионов  $K^+$  и  $S^{2-}$ , в комбинации с традиционными физиолого-биохимическими и генетическими методами. Установлено, что при раннем ответе на пероксидный стресс наблюдается резкое повышение  $pO_2$  в среде, вызванное деградацией  $H_2O_2$  эндогенными каталазами. При действии  $100 \mu M H_2O_2$  обратимое падение скорости роста сопровождалось возрастанием экстра- и внутриклеточного глутатиона и кратковременным увеличением продукции сульфида. Обработка высокой дозой  $H_2O_2$  ( $10 mM$ ) приводила к ингибированию роста и снижению колониеобразующей способности (CFU), наиболее выраженных у мутантов по синтезу глутатиона. Одновременно у 8% клеток снижался мембранный потенциал, наблюдался выход части калия в среду, и возрастала экспрессия гена *sulA*, входящего в состав SOS-регулона. В совокупности, применение комплексного подхода позволило выявить тесную связь между ростовыми параметрами (удельная скорость роста и выживаемость), дыхательной активностью, продукцией сульфида, а также способностью бактерий к поддержанию мембранного потенциала и градиента ионов калия.

**Ключевые слова:** физиологические (интегральные) параметры культуры, электрохимические сенсоры, мониторинг в реальном времени, бактерии *Escherichia coli*, пероксидный стресс

**Для цитирования:** Real-time мониторинг физиологических параметров для изучения раннего ответа бактерий *Escherichia coli* на пероксидный стресс / А. В. Тюленев, Г. В. Смирнова, А. О. Габова, Г. А. Триандафилова, О. Н. Октябрьский // Вестник Пермского университета. Сер. Биология. 2022. Вып. 1. С. 35–41. <http://dx.doi.org/10.17072/1994-9952-2022-1-35-41>.

**Благодарности:** работа выполнена в рамках государственного задания, номер госрегистрации темы: АААА-А19-119112290009-1, грантов президента РФ МК-420.2020.4, РФФИ-Урал 19-44-590009, РФФИ 20-34-90016.

**MICROBIOLOGY**

Original article

**Real-time monitoring of physiological parameters in the study  
of *Escherichia coli* early response to peroxide stress**

**A. V. Tyulenev<sup>1✉</sup>, G. V. Smirnova<sup>2</sup>, A. O. Gabova<sup>3</sup>, G. A. Triandafilova<sup>4</sup>,  
O. N. Oktyabrsky<sup>5</sup>**

<sup>1,2,4,5</sup> Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch of RAS, Perm, Russia

<sup>3</sup> Perm National Research Polytechnic University, Perm, Russia

Corresponding author: Aleksey V. Tyulenev, Leksey333@yandex.ru

**Abstract.** The response of aerobically growing *Escherichia coli* cultures to peroxide stress was studied using synchronous real-time monitoring of parameters  $pO_2$  (oxygen partial pressure), pH, Eh (redox potential of the culture), extracellular levels of  $K^+$  and  $S^{2-}$ , in combination with traditional physiological, biochemical and genetic methods. A sharp increase in  $pO_2$  level in the medium caused by the destruction of  $H_2O_2$  by endogenous catalases was observed in the early response to peroxide stress. The addition of  $100 \mu M H_2O_2$  provoked a reversible

decrease in the specific growth rate, accompanied by an increase of extra- and intracellular glutathione and a short-term increase in sulfide production. Treatment with a high dose of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 mM) led to growth inhibition and a CFU loss, most pronounced in glutathione synthesis mutants. Simultaneously, in 8% of cells, the membrane potential decreased, a part of potassium was released into the medium, and the expression of the *sulA* gene, which is part of the SOS-regulon, increased. Application of an integrated approach to the study of stress revealed a close relationship between growth parameters (specific growth rate and survival), respiratory activity, sulfide production, and the ability of *E. coli* cells to maintain the membrane potential and K<sup>+</sup> gradient.

**Keywords:** physiological parameters, integral parameters of bacterial culture, electrochemical sensors, real-time monitoring, *Escherichia coli*, peroxide stress

**For citation:** Tyulenev A. V., Smirnova G. V., Gabova A. O., Triandafilova G. A., Oktyabrsky O. N. [Real-time monitoring of physiological parameters in the study of *Escherichia coli* early response to peroxide stress]. *Bulletin of Perm University. Biology*. Iss. 1 (2022): pp. 35-41. (In Russ.). <http://dx.doi.org/10.17072/1994-9952-2022-1-35-41>.

**Acknowledgments:** the research was supported by the state assignment AAAA-A19-119112290009-1, and by the grants MK-420.2020.4, Russian Foundation of Basic Research RFBR-Ural 19-44-590009, RFBR-20-34-90016.

## Введение

Окислительный стресс, как неизбежное следствие аэробной жизни, является результатом воздействия активных форм кислорода (АФК) на живые организмы. АФК оказывают токсическое и мутагенное действие на все виды клеток вследствие окислительного повреждения мембранных липидов, белков и ДНК. В ходе эволюции бактерии, как и другие организмы, выработали защитные механизмы, позволяющие адаптироваться к различным типам окислительного стресса, одним из которых является пероксидный стресс. При действии на бактерии *Escherichia coli* пероксида водорода, адаптивный ответ связан, в первую очередь, с индуцированным синтезом большого числа белков, включая каталазы. Синтез этих белков кодируется генами, часть которых находится под контролем регулонов *oxyR* и SOS-ответа.

Окислительный стресс может быть следствием прямого действия экзогенных АФК, а также побочным результатом метаболической активности самих бактерий. Известно, что одним из основных внутриклеточных источников АФК является дыхательная цепь. В нормальных условиях эти АФК, благодаря активности компонентов антиоксидантной защиты, присутствуют в безопасных количествах. Однако при различных стрессовых ситуациях АФК могут накапливаться в высоких концентрациях, создающих потенциальную угрозу для выживаемости бактериальной клетки. Следует отметить, что, хотя повышение АФК при стрессах показано во многих работах, вопрос об их вкладе в стресс-индуцируемые повреждения клеточных структур остается открытым, что, во многом, связано с наличием противоречивых данных [Zhao et al., 2015]. Источниками расхождений в результатах могут быть такие факторы, как использование разных питательных сред или условий культивирования, способов отбора биоматериала, а также отсутствие контроля за изменениями таких физико-химических параметров, как условия аэрации, редокс-состояние (Eh) культуры, pH и ионный баланс. Одним из способов решения этой проблемы может быть применение системы непрерывной и синхронной регистрации указанных параметров в растущих культурах бактерий в комбинации с традиционными физиолого-биохимическими методами. Это позволяет отследить изменения параметров, происходящие в течение нескольких секунд, без отбора биоматериала – непосредственно в бактериальной культуре, что приближает получаемые данные к условиям *in vivo*. Ранее этот подход применялся нами при изучении ответа растущих *E. coli* на стрессы, индуцируемые голоданием по питательным субстратам и антибиотиками [Smirnova et al., 2017, 2018, 2019; Tyulenev et al., 2018].

Цель исследования – изучить ранний ответ аэробно растущих штаммов *E. coli* на пероксидный стресс с помощью системы мониторинга физиологических параметров в реальном времени на основе электрохимических сенсоров, в комплексе с традиционными физиолого-биохимическими и генетическими методами.

## Материалы и методы исследования

**Объект исследований.** Грамотрицательные энтеробактерии *Escherichia coli* BW25113 (родительский тип, wt), JW2663 (*AgshA*), дефектный по синтезу глутатиона (GSH) из коллекции Keio (Coli Genetic Stock Center) [Baba et al., 2006]. NM3011, несущий слияние промотора гена *sulA* со структурным геном *lacZ*, сконструирован в лаборатории физиологии и генетики микроорганизмов (ЛФГМ) на основе BW25113. Бактерии культивировали на минимальной среде M9 [Miller, 1972] с добавлением 0,15% глюкозы в аэробных условиях при 37°C в термостатируемом орбитальном шейкере при 150 об/мин в колбах на 250 мл.

Под ранним ответом («early response») мы указываем период от момента индукции стресса до некоторой стабилизации исследуемых параметров, продолжительностью около 120 мин. Исследование проводили в середине экспоненциальной фазы роста, в диапазоне  $OD_{600}$  0.4–0.8 и  $pO_2$  60–40%.

**Ростовые характеристики.** Оптическую плотность культуры определяли на фотометре КФК-3 («ЗОМЗ», Россия) при длине волны 600 нм. Удельную скорость роста ( $\mu$ ) рассчитывали по формуле

$$\mu = \frac{\ln OD_{600}(t_2) - \ln OD_{600}(t_1)}{t_2 - t_1},$$

где  $OD_{600}(t_2)$  и  $OD_{600}(t_1)$  – оптическая плотность культуры во время  $t_2$  и  $t_1$ . Определение способности к образованию колоний (КОЕ, CFU) выполняли общепринятым методом, подсчитывая число колоний, выросших на чашках Петри с твердым LB-агаром через 24 ч. после высева на агар. Образцы для определения КОЕ и других анализов отбирали без остановки перемешивания культуральной жидкости.

**Real-time мониторинг с применением электрохимических сенсоров.** Регистрацию изменений физиологических параметров растущих культур *E. coli* проводили с помощью установленных непосредственно в колбах электрохимических сенсоров. Информация, поступающая от отдельных блоков регистрации, непрерывно и синхронно обрабатывалась в режиме реального времени с применением единого аппаратно-программного комплекса. Парциальное давление кислорода ( $pO_2$ ) в среде определяли полярографическим методом с помощью электрода Кларка InPro 6800 (Mettler Toledo) на модифицированном контроллере BioFlo 110 (New Brunswick Scientific Co., USA). Чувствительную регистрацию pH осуществляли комбинированным pH-электродом ЭСК-10301 («Измерительные Технологии», РФ) на том же контроллере. Концентрацию экстраклеточного сульфид-иона определяли, применяя сульфид-специфичный ионоселективный сенсор XC-S2--001 (Sensor Systems Company, РФ) с рабочим диапазоном pH 6–12. Редокс-потенциал (Eh) регистрировали платиновым электродом ЭРП-105 («Измерительные Технологии», РФ), уровень экстраклеточных ионов калия ( $K^+$ ) регистрировали  $K^+$ -селективным сенсором ELIS-121K («Измерительные Технологии», РФ). Потенциометрические сигналы с указанных электродов обрабатывались цифровыми рХ-метрами срХ-2 (ИБП, Пушино, РФ). Синхронная обработка первичных данных, получаемых от системы сенсоров, осуществлялась по протоколам RS-232 и Modbus, с дальнейшей визуализацией на программном комплексе Advantech OPC Server v3.0 [Tyulenev et al., 2018].

**Определение изменений мембранного потенциала (МП).** Применяли  $\Delta\psi$ -чувствительный флуоресцентный краситель DiBAC4(3), бис-(1,3-дибутилбарбитуратовая кислота)-триметиноксонол). Образцы клеток, иммобилизованные на агаризованной питательной среде, исследовали на флуоресцентном микроскопе Leica DM2000 (фильтр-система I3, возбуждение 450–490 нм, эмиссия 515 нм). Общее количество клеток, в том числе флуоресцирующих, подсчитывалось на определенной площади и обрабатывалось с помощью программных пакетов Leica Application Suite (v.3.4.0) и ImageJ.

**Определение концентрации внутри- и экстраклеточного глутатиона (GSH).** Внеклеточный глутатион определяли в образцах объемом 2.5 мл, отобранных методом быстрой фильтрации через фильтры с размером пор 0.45 мкм. Пробы для определения внутриклеточного глутатиона отбирали путем центрифугирования ( $8000 \times g$  в течение 5 мин). Концентрацию GSH измеряли с использованием высокочувствительного и высокоспецифичного метода рециркуляции DTNB-глутатионредуктазы [Tietze, 1969], модифицированного, как описано ранее [Smirnova et al., 2012].

**Определение активности  $\beta$ -галактозидазы.** Активность  $\beta$ -галактозидазы в клетках *E. coli*, несущих слияние *sulA::lacZ*, определяли по методу Миллера [Miller, 1972].

**Статистический анализ данных.** Каждый результат указывается как среднее значение не менее трех независимых экспериментов  $\pm$  стандартная ошибка среднего (SEM). Достоверность разницы анализировали с помощью  $t$ -критерия Стьюдента. Значение  $P$ , равное 0.05, использовалось в качестве порога статистической значимости. Результаты анализировали с помощью пакета программ Statistica 6 (StatSoft Inc. 2001). Профили непрерывной записи представлены в виде типичных кривых из серии экспериментов.

## Результаты и их обсуждение

Ответ растущих бактерий *E. coli* на действие пероксида водорода прослеживался в течение 2–3 ч. от начала обработки культуры оксидантом.

В течение первых 90 мин. в не обработанных оксидантом культурах (контроль) удельная скорость роста ( $\mu$ ) составляла  $0.65 \pm 0.01$  у родительского штамма BW25113 и  $0.67 \pm 0.02$  – у штамма JW2663 ( $\Delta gshA$ ), дефицитного по синтезу глутатиона (GSH). Последующее снижение  $\mu$  до  $0.58 \pm 0.01$  и  $0.53 \pm 0.03$  час<sup>-1</sup>, соответственно, совпадало с моментом исчерпания растворенного кислорода в среде у обоих штаммов.

Обработка растущих *E. coli* микромолярными дозами (100  $\mu M$ )  $H_2O_2$  приводила к быстрому и обратимому снижению скорости роста в 1.5 раза (до  $0.42 \pm 0.03$  час<sup>-1</sup>) у обоих испытуемых штаммов. Восстанов-

ление  $\mu$  до значений, наблюдаемых в необработанных оксидантом культурах, наступало через 30 мин. у родительского штамма и через 45 мин. – у мутантов  $\Delta gshA$ . Добавление 2 mM  $H_2O_2$  вызывало снижение  $\mu$  в 5 раз (до  $0.13 \pm 0.02$ ) у BW25113 и в 15 раз (до  $0.04 \pm 0.006$ ) у  $\Delta gshA$ . У обоих штаммов полное восстановление скорости роста отмечалось к 100-й мин. Добавление 100  $\mu M$  и 2 mM  $H_2O_2$  пероксида водорода не оказывало значительного воздействия на выживаемость (CFU) обоих штаммов по сравнению с контролем. Действие 10 mM  $H_2O_2$  вызывало полную остановку роста у обоих штаммов. Снижение оптической плотности культуры указывало на возможную гибель клеток. Действительно, через 180 мин. после воздействия данной концентрацией у родителя отмечалось снижение выживаемости (CFU) в 18 раз, тогда как у мутантов  $\Delta gshA$  – на 4 порядка (в 9 550 раза) в сравнении с условиями без обработок (контролем).

Внесение пероксида водорода в среду, не содержащую клеток, не вызывало значительного отклонения от базового уровня  $pO_2$  (100%). Однако после добавления каталазы (50 U/ml) в среду с 10 mM  $H_2O_2$ , в результате ее ферментативной деструкции, уровень растворенного  $O_2$  в среде резко повышался более чем в 4 раза. По мере снижения концентрации оксиданта количество растворенного кислорода в среде возвращалось к базовому значению.

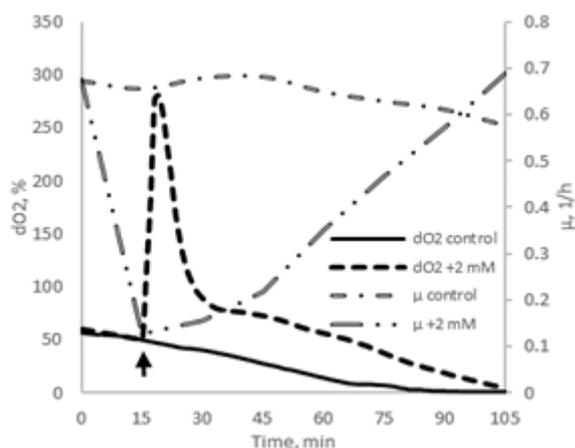


Рис. 1. Изменение парциального давления кислорода в среде ( $dO_2$ ) и удельной скорости роста ( $\mu$ ) при раннем ответе бактерий *E. coli* BW25113 на добавление 2 mM  $H_2O_2$ . Стрелкой обозначено время индукции стресса

[Changes in the partial pressure of oxygen in the medium ( $dO_2$ ) and specific growth rate ( $\mu$ ) during the early response of *E. coli* BW25113 to the addition of 2 mM  $H_2O_2$ . The arrow indicates the stress-induction time]

жение pH среды на 0.19 единиц (с 6.99 до 6.8). При росте в присутствии 100  $\mu M$   $H_2O_2$  регистрировалось снижение pH среды у родительского штамма и мутанта  $\Delta gshA$  на 0.25 и 0.27 единиц, соответственно. При обработке 10 mM  $H_2O_2$  значение pH среды оставалось неизменным в течение всего периода наблюдения, что является следствием ингибирования роста и, соответственно, метаболизма глюкозы.

Ранее было показано, что при некоторых стрессах, сопровождаемых быстрой остановкой роста *E. coli*, растущих аэробно на минеральных средах, наблюдаются скачки редокс-потенциала (Eh) в область отрицательных значений [Oktyabrskii, Smirnova, 2012]. Показано, что этот скачок сопряжен с обратимым увеличением уровня сульфида или цистеина в культуральной среде [Tyulenev et al., 2018]. Выброс  $H_2S$  клетками связан с поддержанием гомеостаза цистеина в стрессовых условиях как часть защитного механизма *E. coli* от эндогенного окислительного стресса и может рассматриваться в качестве еще одного параметра физиологического состояния культуры [Smirnova et al., 2019].

В процессе роста обоих штаммов *E. coli* в отсутствие окислительного стресса Eh среды постепенно снижался от +190 мВ до -350 мВ. Переход Eh в область отрицательных значений совпадал с моментом полного исчерпания кислорода. В этих условиях уровень сульфида в среде поддерживался на низком уровне. Внесение 100  $\mu M$   $H_2O_2$  в растущую культуру вызывало быстрое обратимое падение потенциала сульфид-специфичного сенсора ( $pS^2$ ), что указывает на усиление продукции  $H_2S$  клетками. Через 2 мин. после добавления  $H_2O_2$  в культуру родительского штамма концентрация сульфида в среде составляла

В культуре *E. coli*, несмотря на интенсивное перемешивание среды, дыхательная активность растущих клеток приводила к постепенному снижению уровня растворенного  $O_2$  до нуля (рис. 1). Добавление 100  $\mu M$   $H_2O_2$  вызывало кратковременное увеличение  $pO_2$  на 20% у родительского штамма и на 30% – у  $\Delta gshA$ , что указывало на ингибирование дыхательной активности клеток. Это подтверждается результатами измерения  $pO_2$  в бесклеточной среде с добавлением каталазы. У обоих штаммов добавление 2 mM  $H_2O_2$  вызывало переходящее повышение  $pO_2$  в 5.6 раза (с 50 до 280%), с последующим снижением до базового уровня, что отражено на рис. 1 в виде кривой непрерывной регистрации этого параметра в реальном времени. В этих условиях у мутанта  $\Delta gshA$  ингибирование дыхания было выражено в большей степени, чем у родительского штамма. У обоих штаммов обработка растущих культур 10 mM  $H_2O_2$  приводила к полному ингибированию дыхания.

Известно, что рост *E. coli* на минимальных средах с глюкозой сопровождается закислением среды вследствие накопления продуктов неполного окисления глюкозы. Степень снижения pH культуральной среды может косвенно указывать на интенсивность углеводного метаболизма и применяться как один из интегральных показателей физиологического состояния культуры. В наших условиях при нормальном росте у обоих штаммов регистрировалось постепенное снижение

13.8±0.12 nM. Повышенная концентрация сульфидов в среде сохранялась в течение 8 мин. У мутантов *ΔgshA* продукция сульфидов начиналась сразу после индукции окислительного стресса и длилась в течение 10 мин. Максимальная концентрация сульфидов в среде у *ΔgshA* была в 4 раза выше (58.8±5 nM), чем в культуре родительского штамма. При действии 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> обратимая аккумуляция экстраклеточного сульфидов достигала 380±41 nM в клетках родительского штамма и 701±70 nM – в культуре *ΔgshA* (рис. 2). Обработка 10 mM пероксида не вызывала значительных изменений продукции сульфидов у обоих штаммов. Следует отметить, что наблюдается соответствие между изменениями Eh, концентрации экстраклеточного сульфидов и pO<sub>2</sub> в среде на раннем этапе ответа на пероксидный стресс.

Рост *E. coli* в отсутствие окислительного стресса сопровождался непрерывным поглощением из среды ионов калия в количестве, пропорциональном числу клеток, о чем свидетельствовало постепенное снижение потенциала K<sup>+</sup>-специфичного электрода. Добавление 100 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> не влияло на накопление калия у родительского штамма, а у мутантов *ΔgshA* вызывало кратковременное торможение в течение 3 мин. Обработка 2 mM пероксида водорода приводила к значительному ингибированию входа K<sup>+</sup>, длившемуся 10 мин. у родительского штамма, и 45 мин. – у *ΔgshA*. Следует отметить, что при данной концентрации окислителя оба штамма сохраняли способность к удержанию калия. После добавления 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> полное ингибирование роста и снижение CFU у обоих штаммов сопровождалось утратой части внутриклеточного калия. В нашей работе наблюдение за изменениями мембранного потенциала (МП) в растущей культуре оценивали с помощью флуоресцентного проникающего красителя DiBAC4(3). Повышение доли флуоресцирующих клеток соответствует снижению МП. В нормальных условиях количество окрашенных DiBAC4(3) клеток не превышало 1%. При действии 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> отмечено незначительное увеличение доли флуоресцирующих бактерий не более чем у 3% клеток. Существенное снижение МП наблюдалось только при обработке 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, о чем свидетельствует увеличение доли флуоресцирующих клеток до 8±2%.

Ранее было обнаружено, что аэробно-растущие культуры *E. coli* содержат микромолярные количества глутатиона [Owens, Hartman, 1986]. В нормальных условиях у аэробно растущих *E. coli* на среде M9 с сульфатом, уровень экстраклеточного (GSH<sub>out</sub>) и внутриклеточного (GSH<sub>in</sub>) глутатиона находится в динамическом равновесии. При различных стрессах наблюдаются обратимые изменения соотношения GSH<sub>out</sub>/GSH<sub>in</sub>. Также известно, что присутствие глутатиона в среде и его изменения при стрессах связаны с циркуляцией глутатиона между цитоплазмой клеток и средой [Smirnova et al., 2012].

В наших условиях по мере накопления биомассы наблюдалось постепенное накопление внутриклеточного GSH и некоторое его снижение в среде. При действии 100 μM перекиси водорода на *E. coli* BW25113, количество экстраклеточного глутатиона в течение 15–30 мин. возрастало в 1.5 раза, после чего постепенно снижалось до базового уровня. При обработке клеток 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, также отмечалось повышение уровня GSH<sub>out</sub> в 1.8 раза, с максимумом на 45–60 мин. после индукции стресса, после чего происходило снижение до базового значения. Интересно, что в этих же условиях, уровень GSH<sub>in</sub>, напротив, возрастал в 2.1 раза в первые 15 мин., а затем поддерживался на постоянном уровне до конца эксперимента. Таким образом, при окислительном стрессе, вызванном действием H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, наблюдается усиление как экспорта глутатиона в среду, так и его аккумуляции в цитоплазме.

Известно, что при воздействии на бактерии *E. coli* пероксидом водорода адаптивный ответ связан с экспрессией SOS-регулона. Ген *sulA* является его частью и индуцируется при повреждении ДНК. В контрольных условиях, у *E. coli* NM3011, несущих слияние *sulA::lacZ*, экспрессия *sulA* находилась на постоянном уровне 170.2±9.5 ед. Миллера. Обработка 100 μM и 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> растущих клеток повышала экспрессию *sulA* в 1.3 и 4 раза, соответственно, по сравнению с базовым значением. Следует отметить, что снижение экспрессии *sulA* по времени совпадало со снижением уровня экстраклеточного глутатиона, возобновлением поглощения калия и скорости роста, что может указывать на адаптацию и восстановление нормальной жизнедеятельности клеток после воздействия данной концентрации пероксида водорода.

В настоящей работе, с использованием электрохимических сенсоров, был осуществлен комплексный *real-time* мониторинг важных параметров растущих культур *E. coli*, подвергнутых пероксидному стрессу:

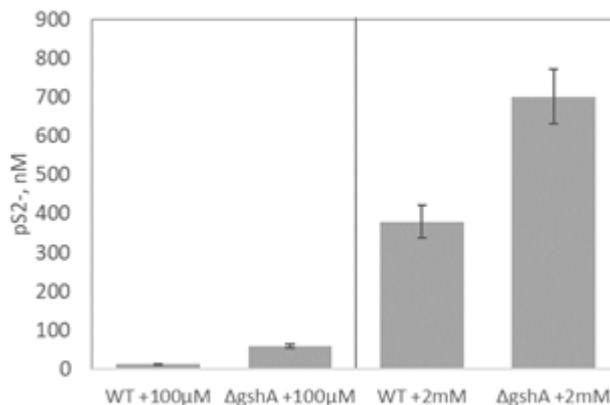


Рис. 2. Продукция сульфидов штаммами *E. coli* BW25113 (wt) и JW2663 (*ΔgshA*) после обработки 100 μM и 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

[Sulfide production of *E. coli* BW25113 (WT) and JW2663 (*ΔgshA*) strains after treatment with 100 μM and 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]

дыхательной активности, редокс-потенциала культуры, продукции сульфида водорода и изменения уровня экстраклеточных ионов  $K^+$ . Измерения этих параметров осуществляли непрерывно в растущих культурах. Одновременно использовались традиционные микробиологические методы, предусматривающие отбор проб для определения ростовых характеристик, уровней GSH и экспрессии гена *sulA*.

Разработанная нами система непрерывного синхронного мониторинга позволила проследить изменения параметров, происходящие в течение нескольких секунд без отбора биоматериала, непосредственно в бактериальной культуре, что важно при исследовании быстрого ответа на пероксидный стресс. В совокупности, применение комплексного подхода позволило выявить тесную связь между такими физиологическими параметрами, как удельная скорость роста, дыхательная активность, продукция сульфида и динамика рН, с одной стороны, и способностью бактерий к поддержанию мембранного потенциала, градиента ионов калия и выживаемости, с другой.

Показано, что микромолярные количества пероксида водорода, не влияя на выживаемость как родителя, так и мутантов по синтезу глутатиона, способны вызывать кратковременное снижение скорости роста и дыхательной активности, сопровождаемые продукцией сульфида. Аналогичный феномен был ранее обнаружен при других стрессах [Smirnova et al., 2017, 2018, 2019]. Обработка 10 mM  $H_2O_2$  оказывала острый токсичный эффект, приводя к полному ингибированию дыхательной активности, необратимой остановке роста и снижению CFU. Показано, что внесение высоких концентраций  $H_2O_2$  может приводить к значительному изменению содержания кислорода в культуре, что, вероятно, является дополнительным стрессовым фактором на раннем этапе развития окислительного стресса.

Одновременно показано, что трипептид глутатион может выполнять важную роль в защите клеток от окислительного стресса, о чем свидетельствует снижение выживаемости мутанта  $\Delta gshA$  на 4 порядка по сравнению с родительским штаммом, а также повышенный уровень внутриклеточного и наружного GSH в условиях окислительного стресса. Повышенная продукция эндогенного сульфида мутантами  $\Delta gshA$  позволяет предположить, что эту роль глутатион может осуществлять, участвуя в поддержании гомеостаза цистеина. В целом, штамм JW2663, лишенный способности синтезировать глутатион, по всем исследуемым параметрам оказался более восприимчивым к действию всех испытываемых концентраций  $H_2O_2$ .

## Заключение

Real-time мониторинг раннего ответа аэробно растущих культур *E. coli* на пероксидный стресс выявил тесную связь между изменениями таких параметров, как удельная скорость роста, выживаемость, дыхательная активность и рН, с одной стороны, и продукция сульфида, мембранный потенциал и градиент  $K^+$ , с другой. Комбинирование традиционных физиолого-биохимических методов и электрохимических сенсоров позволило выявить новые аспекты адаптации *E. coli* к пероксидному стрессу.

## Список источников

1. Baba T. et al. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection // Mol. Syst. Biol. 2006. Vol. 2. P. 1–11. DOI:10.1038/msb4100050
2. Miller J.H. Experiments in molecular genetics // Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1972. 466 p.
3. Oktyabrskii O.N., Smirnova G.V. Redox potential changes in bacterial cultures under stress conditions // Microbiology (Moscow). 2012. Vol. 81, № 2. P. 131–142. DOI:10.1134/s0026261712020099
4. Owens R.A., Hartman P.E. Export of glutathione by some widely used *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* strains // J. Bacteriol. 1986. Vol. 168. P. 109–114. DOI:10.1128/jb.168.1.109-114.1986
5. Smirnova G.V. et al. Transmembrane glutathione cycling in growing *Escherichia coli* cells // Microbiol. Res. 2012. Vol. 167. P. 166–172. DOI:10.1016/j.micres.2011.05.005
6. Smirnova G.V. et al. Ciprofloxacin provokes SOS-dependent changes in respiration and membrane potential and causes alterations in redox status of *Escherichia coli*. // Res. Microbiol. 2017. Vol. 168. P. 64–73. DOI:10.1016/j.resmic.2016.07.008.
7. Smirnova G.V. et al. The sharp phase of respiratory inhibition during amino acid starvation in *Escherichia coli* is *RelA*-dependent and associated with the regulation of ATP synthase activity. // Res. Microbiol. 2018. Vol. 169. P. 157–165. DOI:10.1016/j.resmic.2018.02.003
8. Smirnova G.V. et al. Cysteine homeostasis under inhibition of protein synthesis in *Escherichia coli* cells. // Amino Acids. 2019. Vol. 51. P. 1577–1592. DOI:10.1007/s00726-019-02795-2
9. Tietze F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues // Anal. Biochem. 1969. Vol. 27. P. 502–522. DOI: 10.1016/0003-2697(69)90064-5
10. Tyulenev A.V. et al. The role of sulfides in stress-induced changes of Eh in *Escherichia coli* cultures. // Bioelectrochemistry. 2018. Vol. 121. P. 11–17. DOI: 10.1016/j.bioelechem.2017.12.012
11. Zhao X. et al. Moving forward with reactive oxygen species involvement in antimicrobial lethality. // J. Antimicrob. Chemother. 2015. Vol. 70. P. 639–642. DOI:10.1093/jac/dku463

## References

1. Baba T., Ara T., Hasegawa M., Takai Yu., Okumura Yo., Baba M., Datsenko K.A., Tomita M., Wanner B. L., Mori H. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol. Syst. Biol.* V. 2 (2006): Epub. 2006 Feb 21. DOI:10.1038/msb4100050
2. Miller J.H. Experiments in molecular genetics. *Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.* (1972): p. 466.
3. Oktyabrskii O. N., Smirnova G. V. Redox potential changes in bacterial cultures under stress conditions. *Microbiology (Moscow).* Vol. 81. No 2. (2012): pp. 131-142. DOI:10.1134/s0026261712020099
4. Owens R.A., Hartman P.E. Export of glutathione by some widely used *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* strains. *J. Bacteriol.* V. 168 (1986): pp. 109-114. DOI: 10.1128/jb.168.1.109-114.1986
5. Smirnova G.V., Muzyka N.G., Oktyabrsky O.N. Transmembrane glutathione cycling in growing *Escherichia coli* cells. *Microbiol. Res.* V. 167 (2012): pp. 166-72. DOI: 10.1016/j.micres.2011.05.005
6. Smirnova G.V., Tyulenev A.V., Muzyka N.G., Peters M.A., Oktyabrsky O.N. Ciprofloxacin provokes SOS-dependent changes in respiration and membrane potential and causes alterations in the redox status of *Escherichia coli*. *Res. Microbiol.* V.168 (2017): pp. 64-73. DOI:10.1016/j.resmic.2016.07.008
7. Smirnova G.V., Tyulenev A.V., Muzyka N.G., Oktyabrsky O.N. The sharp phase of respiratory inhibition during amino acid starvation in *Escherichia coli* is *RelA*-dependent and associated with the regulation of ATP synthase activity. *Res. Microbiol.* V.169 (2018): pp. 157-165. DOI:10.1016/j.resmic.2018.02.003
8. Smirnova G.V., Tyulenev A.V., Bezmaternykh K.V., Muzyka N.G., Ushakov V.Yu., Oktyabrsky O. N. Cysteine homeostasis under inhibition of protein synthesis in *Escherichia coli* cells. *Amino Acids.* V. 51 (2019): pp. 1577-1592. DOI: 10.1007/s00726-019-02795-2
9. Tietze F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal. Biochem.* V. 27 (1969): pp. 502-522. DOI:10.1016/0003-2697(69)90064-5.
10. Tyulenev A.V., Smirnova G.V., Muzyka N.G., Ushakov V. Yu., Oktyabrsky O.N. The role of sulfides in stress-induced changes of Eh in *Escherichia coli* cultures. *Bioelectrochemistry.* V. 121 (2018): pp. 11-17. DOI: 10.1016/j.bioelechem.2017.12.012
11. Zhao X., Hong Y., Karl Drlica. Moving forward with reactive oxygen species involvement in antimicrobial lethality. *J. Antimicrob. Chemother.* V. 70 (2015): pp. 639-642. DOI:10.1093/jac/dku463

Статья поступила в редакцию 24.01.2022; одобрена после рецензирования 07.02.2022; принята к публикации 14.03.2022.

The article was submitted 24.01.2022; approved after reviewing 07.02.2022; accepted for publication 14.03.2022.

### Информация об авторах

Алексей Валерьевич Тюленев – [Leksey333@yandex.ru](mailto:Leksey333@yandex.ru), <https://orcid.org/0000-0002-0312-0409>, канд. биол. наук.;  
Галина Васильевна Смирнова – [smirnova@iegm.ru](mailto:smirnova@iegm.ru), <https://orcid.org/0000-0001-6116-8147>, д-р биол. наук.;  
Анна Олеговна Габова – [ms.anya.05@mail.ru](mailto:ms.anya.05@mail.ru), <https://orcid.org/0000-0002-8672-5744>, студент;  
Галина Андреевна Триандафилова – [lindick@yandex.ru](mailto:lindick@yandex.ru), <https://orcid.org/0000-0001-5536-8214>, аспирант, лаборант;  
Олег Николаевич Октябрьский – [oktyabr@iegm.ru](mailto:oktyabr@iegm.ru), <https://orcid.org/0000-0002-9864-209x>, д-р биол. наук, профессор.

### Information about the authors

Aleksey V. Tyulenev – [Leksey333@yandex.ru](mailto:Leksey333@yandex.ru), <https://orcid.org/0000-0002-0312-0409>, Cand.biol.sci.;  
Galina V. Smirnova – [smirnova@iegm.ru](mailto:smirnova@iegm.ru), <https://orcid.org/0000-0001-6116-8147>, PhD, Dr.biol.sci.;  
Anna O. Gabova – [ms.anya.05@mail.ru](mailto:ms.anya.05@mail.ru), <https://orcid.org/0000-0002-8672-5744>, student;  
Galina A. Triandafilova – [lindick@yandex.ru](mailto:lindick@yandex.ru), <https://orcid.org/0000-0001-5536-8214>, postgraduate, laboratory assistant;  
Oleg N. Oktyabrsky – [oktyabr@iegm.ru](mailto:oktyabr@iegm.ru), <https://orcid.org/0000-0002-9864-209x>, PhD, Dr.biol.sci, professor.

### Вклад авторов:

Тюленев А. В. – анализ литературы; выполнение исследования; обработка результатов; написание исходного текста.  
Смирнова Г. В. – научный консультант; концепция исследования; итоговые выводы.  
Габова А. О. – выполнение исследования; обработка результатов.  
Триандафилова Г. А. – обработка результатов; написание исходного текста.  
Октябрьский О. Н. – научное руководство; доработка текста; итоговые выв.

### Contribution of the authors:

Tyulenev A. V. – literature analysis; research execution; processing of results; writing the draft.  
Smirnova G. V. – scientific consultant; research concept; final conclusions.  
Gabova A. O. – research execution; processing of results.  
Triandafilova G. A. – processing of results; writing the draft.  
Oktyabrsky O. N. – scientific management; revision of the text; final conclusions.