

ISSN: 2219-8229

E-ISSN: 2224-0136

Founder: Academic Publishing House *Researcher*

DOI: 10.13187/issn.2219-8229

Has been issued since 2010.

European Researcher. International Multidisciplinary Journal



UDC 579.69

## Time-dependent Toxicity in Long-term Analysis of Luminescence Inhibition with Recombinant *Escherichia coli* Strain

<sup>1</sup> Tatiana Yudina

<sup>2</sup> Elena Sorokina

<sup>3</sup> Vadim Danilov

<sup>1</sup> M. V. Lomonosov Moscow State University, Russian Federation  
119899 Moscow, Leninskie Gory, 1-12  
PhD, research associate

E-mail: sorokina\_ev77@mail.ru

<sup>2</sup> M. V. Lomonosov Moscow State University, Russian Federation  
119899 Moscow, Leninskie Gory, 1-12  
PhD, research associate

E-mail: tp-yudina@mail.ru

<sup>3</sup> M. V. Lomonosov Moscow State University, Russian Federation  
119899 Moscow, Leninskie Gory, 1-12

Doctor of Biology, Professor, main research associate

E-mail: vsdanil@mail.ru

**Abstract.** We have investigated the effect of streptomycin simultaneously on the luminescence and the growth of bacteria of luminescent recombinant *Escherichia coli* strain with the operon *luxCDABE* from *Vibrio fischeri*. Experiments were performed to determine the toxicity in the 30-minute experiment and in the chronic 24-hour variant. The level of toxicity in the tested concentration range was determined judging by the change of intensity of bioluminescence and by the growth of cells in the presence of antibiotic. Toxicity parameter  $EC_{50}$  was 26.44 mg / l at 30 min exposure, and 0.30 mg / l during 8 hours of growth of bacteria. Dynamics of changes in toxicity, depending on the concentration of streptomycin in the long-term experiment, shows the difficulty in the choice of the end point of the experiment.

**Keywords:** bioluminescence; streptomycin; acute and chronic toxicity; reproduction of the *E. coli* bacteria with *lux*- operon.

**Введение.** Микроорганизмы широко применяются в исследованиях действия существующих и новых антибиотиков из-за легкости и относительно низкой стоимости их культивирования, а также отсутствия этических вопросов, часто сопровождающих при использовании высших организмов. Среди бактериальных тестов в настоящее время наиболее используемым в силу многих преимуществ является люминесцентный бактериальный тест определения химической токсичности веществ и их смесей [1, 2].

Стандартный краткосрочный тест химической токсичности объектов окружающей среды получил распространение во многих развитых странах. Метод основан на измерении ингибирования биoluminesценции с морскими люминесцентными бактериями *Vibrio fischeri* и генноинженерными штамми со встроенными *lux*-операми за 30 минут. Этот биотест прошел многолетнюю проверку при исследовании безопасности образцов питьевой и

поверхностных вод, почвы, воздуха, материалов и изделий [3-5]. Показана корреляция люминесцентного бактериального теста с другими биотестами и культурами тканей человека.

Целый ряд работ посвящен изучению действия различных антибиотиков на свечение как бактерий *V. fischeri*, так и биолюминесцентного фенотипа *Escherichia coli* [6-10]. Однако было замечено, что токсичность некоторых специфически действующих соединений и в том числе антибиотиков сильно приуменьшена в этом быстром (остром) анализе или даже порой не измеряется [8]. Токсичность веществ, которые влияют на биосинтетические пути обеспечивающие рост и репродукцию может быть достоверно определена в биотесте, который включает адекватный период клеточного цикла. Время инкубации 30 минут в стандартном биолюминесцентном тесте слишком мало для охвата репродукции *V. fischeri* или других бактерий с биолюминесцентным выводом сигнала. Поэтому появились работы по модификации биолюминесцентного теста с пролонгированным временем инкубации измеряемого объекта в растущей культуре бактерий *V. fischeri* до 24 часов [6,8]. Показано для целого ряда соединений и в том числе стрептомицина, что измерение токсичности на 24 часа роста бактерий *V. fischeri* многократно увеличивается по чувствительности [11].

Целью настоящего исследования было определение токсичности стрептомицина по изменению интенсивности свечения и росту бактерий *E. coli* с опероном *luxCDABE* из *V. fischeri* в долгосрочном (хроническом) тесте в течение 24 часов и сопоставление результатов с острым 30 минутным тестом. Оценка преимуществ и недостатков долговременного опыта по сравнению с быстрым стандартным тестом.

#### **Материалы и методы.**

**Объект исследования.** В качестве тест организма использовали бактерии *E. coli* K12 TG1(pF1) со встроенными генами полного *CDABE lux*-операона люминесцентной системы из бактерий *V. fischeri* 6 МГУ [10, 12].

**Проведение стандартного 30 минутного опыта.** Использовали препарат «Эколлом» (ЗАО «Иммунотек», Москва) - лиофильно высушенные клетки *E. coli* K12 TG1(pF1). Регидратацию лиофилизированных клеток проводили в дистиллированной воде в течение 30 минут при комнатной температуре. Далее готовили «рабочую суспензию» бактерий разбавлением маточного раствора до концентрации  $2-3 \times 10^7$  кл/мл. Измерение интенсивности свечения проводилось на 30 минуте инкубации антибиотика с бактериями.

**Проведение долговременного опыта.** Бактерии *E. coli* выращивали в течение 24 часов на питательной среде LB, по 100 мл в колбах при перемешивании на качалке (200 об/мин) при 25°C до достижения максимума свечения. После этого бактерии разбавляли средой LB до концентрации  $10^4$  кл/мл, добавляли растворы стрептомицина в разных концентрациях и затем разливали по 1,5 мл во флаконы (высота флакона - 5,0 см, диаметр - 1,8 см). Клетки росли в стационарных условиях при 25°C в течение 24 часов, часть объёма пробы использовали на определение роста бактерий, а часть шла на измерение биолюминесценции. На каждую экспериментальную точку бралось не менее 3 флаконов.

**Интенсивность биолюминесценции бактерий** измеряли на люминометрах Luminometer 1251 BioOrbit (Финляндия) и «Биотокс-10М» (Россия) в течение 30 минут в краткосрочном опыте и в различное время образцах, отобранных в долгосрочном эксперименте. Для измерения интенсивности свечения клеток формировали пробу, которая содержала 0.1 мл суспензии бактерий и 0.9 мл дистиллированной воды (контроль) и такой же объём раствора антибиотика (опыт) с различными концентрациями [13]. Интенсивность свечения измеряли в имп/сек. Индекс токсичности определяли по формуле:

$$T = 100(I_0 - I_t) / I_0$$

-где  $I_0$  и  $I_t$  соответственно интенсивность биолюминесценции в определенный момент времени «t» в контроле и в присутствии токсиканта. Кроме того вычисляли общепринятые для данного метода токсикологические параметры ЕС - эффективная концентрация: ЕС<sub>10</sub> - нижний предел достоверного измерения токсичности, ЕС<sub>20</sub> - концентрации, вызывающие токсичность, ЕС<sub>50</sub> - концентрации, вызывающие острую токсичность, ЕС<sub>90</sub> - верхний предел достоверного определения токсичности. Эти величины рассчитывали из широко используемой в данном тесте гамма-функции [14].

$$G = (I_0 - I_t) / I_t$$

Погрешность в измерении интенсивности биолюминесценции во всех экспериментах не превышала 10 % .

**Определение роста клеток.** Число бактериальных клеток определяли по показателю оптической плотности суспензии при  $\lambda=590$  нм на фотоэлектроколориметре («KF77», Польша) и рассчитывали по калибровочной кривой.

**Антибиотик** стрептомицин растворяли в дистиллированной воде (рН 7.0) для стандартного метода и в питательной среде для хронического опыта.

**Реактивы:** использовали антибиотик стрептомицин сульфат фирмы «Sigma»; соли для сред марки х.ч. и ч.д.а.; дрожжевой экстракт, триптон фирмы «BD».

**Результаты и их обсуждение.** В быстром 30 минутном опыте с *E.coli* была обнаружена очевидная зависимость индекса токсичности от действия различных концентраций стрептомицина. Данные представлены на рисунке 1.

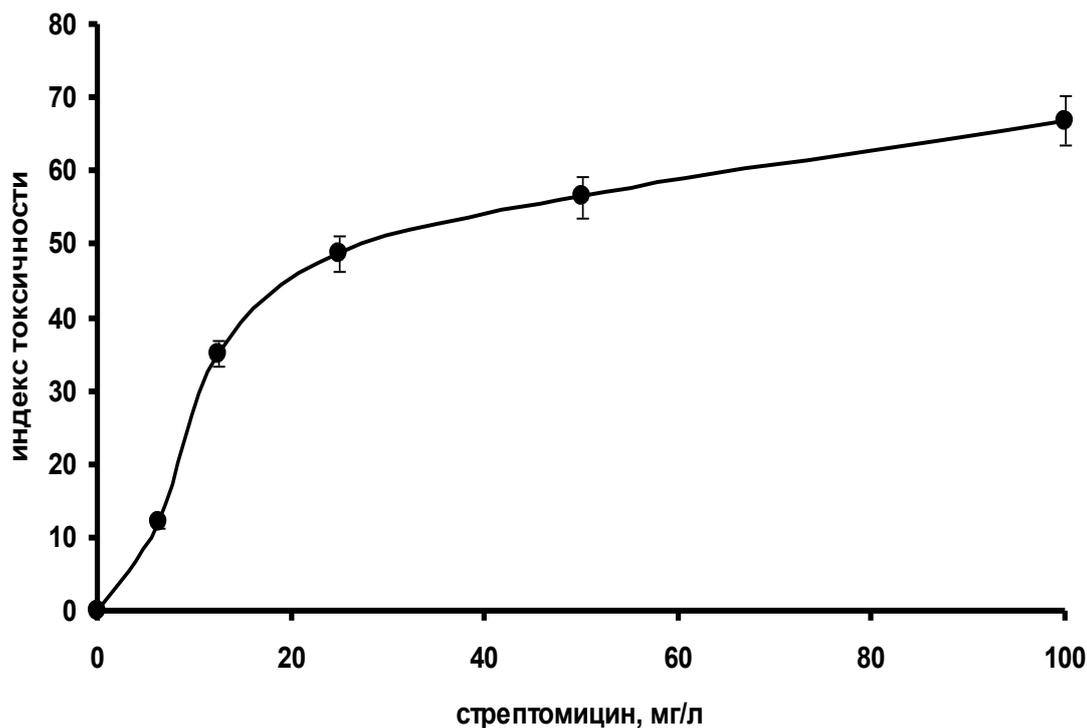


Рис. 1. Зависимость величины индекса токсичности от концентрации стрептомицина в краткосрочном 30 минутном опыте

Наблюдали плавное снижение интенсивности биолюминесценции бактерий после добавления к ним раствора стрептомицина. Достоверное тушение свечения происходило, если концентрация антибиотика была не менее 12,5 мг/л. Параметры ингибирования биолюминесценции  $EC_{10}$ ,  $EC_{20}$  и  $EC_{50}$  в остром опыте были равны следующим величинам 5,1 мг/л, 9,8 мг/л и 26,4 мг/л соответственно. Достигнуть параметра  $EC_{90}$  даже при концентрации стрептомицина в 100 мг/л не удалось, поскольку через 30 минут ингибирование свечения составляло лишь 57% от контроля. Расчетная величина посредством Г-функции составляла 121 мг/л. Следует отметить, что ранее на морских люминесцентных бактериях *V. fischeri* в краткосрочном эксперименте не было обнаружено влияния стрептомицина на биолюминесценцию даже при концентрации 100 мг/л [11].

При проведении долгосрочных 24 часовых экспериментов сначала нами были использованы концентрации стрептомицина от 1 до 10 мг/л. Оказалось, что в течение всего временного промежутка свечение опытных проб практически отсутствовало, индекс токсичности был равен максимальной величине 100. Поэтому в следующих опытах концентрация стрептомицина была снижена от 1 до 0,1 мг/мл. Результаты измерений представлены на рисунке 2.

Если анализировать динамику изменения величины индекса токсичности при росте бактерий, то можно выделить три фазы. До 8 часов происходит резкое увеличение токсического действия стрептомицина. Далее, для концентрации больше 0,1 мг/л наблюдается плато максимальной токсичности, которое тем длительнее во времени, чем выше концентрация антибиотика. И, наконец, при концентрациях стрептомицина 0,2 и 0,4 мг/л после 12 часов идет довольно резкое снижение индекса токсичности. Почему происходит снижение величины индекса токсичности во второй половине опыта однозначно сказать сложно. Известно, что стрептомицин подавляет рост многих видов микроорганизмов и к нему довольно легко появляется устойчивость, возникают резистентные к стрептомицину формы бактерий. Возможен и вариант торможения антибиотиком утилизации субстратов люциферазы, что может приводить к большей пролонгации свечения в опытных образцах по сравнению с контролем.

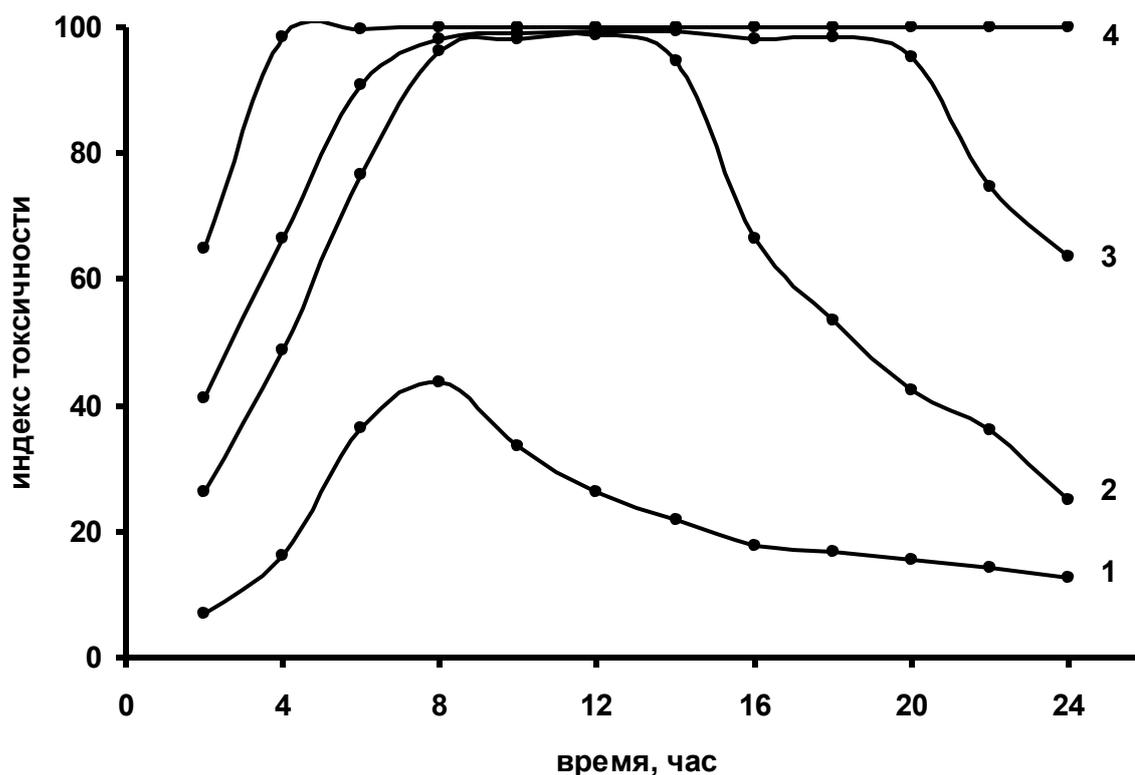


Рис. 2. Изменение величины индекса токсичности в долговременном хроническом опыте в зависимости от концентрации стрептомицина.

Кривая 1 - 0,1; кривая 2 - 0,2; кривая 3 - 0,4; кривая 4 - 0,8 и 1,0 мг/л.

Параллельно в опытах было исследован рост бактерий в присутствии разных концентраций стрептомицина. Концентрации от 1 до 10 мг/л полностью предотвращали рост клеток. На рисунке 3 показано ингибирование роста концентрациями антибиотика от 0,1 до 1 мг/л. Меньшая концентрация приводила к небольшому и можно сказать недостоверному торможению роста. С увеличением концентрации стрептомицина увеличивалось ингибирование и требовалось определенное время культивирования, чтобы можно было измерить плотность клеток.

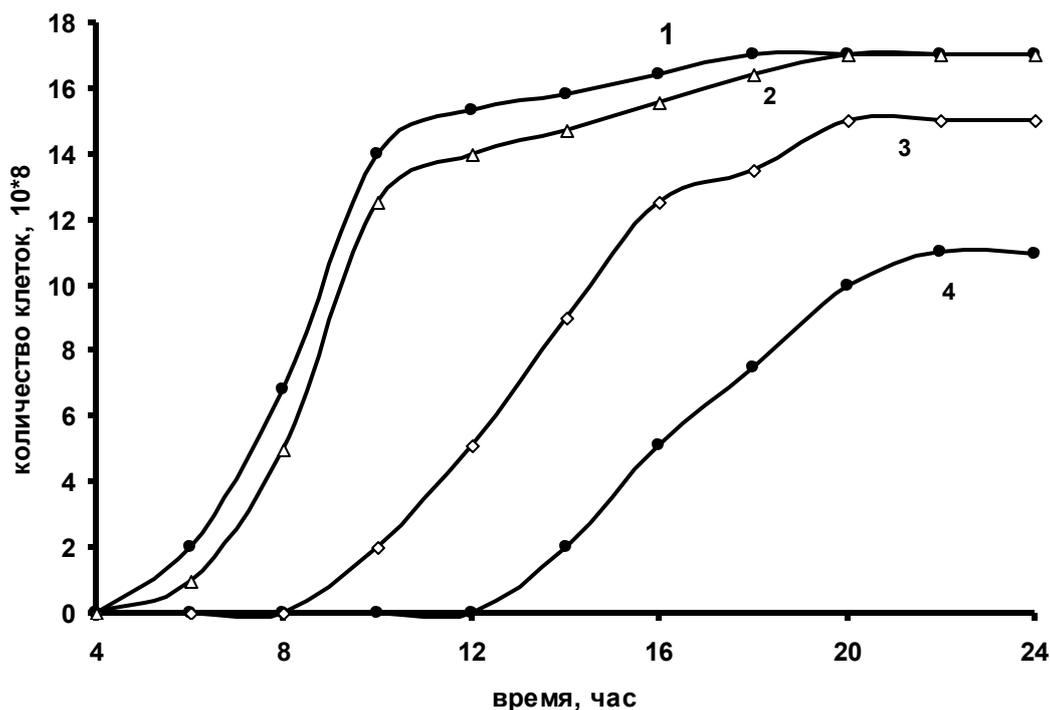


Рис. 3. Влияние различных концентраций стрептомицина на рост бактерий *E.coli*.  
Кривая 1 – 0; кривая 2 – 0,1; кривая 3 – 0,2; кривая 4 – 0,4 мг/л.

Используя способы подсчета параметров ЕС для люминесцентного теста, и применив их для обработки данных по росту, мы получили результаты, представленные в таблице.

Из представленных результатов видно, что эффективность действия низких концентраций стрептомицина на рост бактерий чуть меньше, чем их влияние на интенсивность биолюминесценции. Вместе с тем можно с большой уверенностью сделать вывод, что этот диапазон концентраций сильно влияет на процессы биосинтеза белка и репродукцию клеток. Динамика изменения свечения и как следствие индекса токсичности отражает этот процесс и, следовательно, люминесцентный бактериальный тест при долговременном опыте очень перспективен для определения соединений с задержанной токсичностью. Более того, он гораздо более чувствителен, нежели быстрый стандартный тест.

Таблица 1

#### Величины параметров ЕС различных опытов

Опыты и время измерения	Параметры ЕС, мг/л			
	ЕС <sub>10</sub>	ЕС <sub>20</sub>	ЕС <sub>50</sub>	ЕС <sub>90</sub>
Острый опыт - свечение, 30 мин	5,12	9,83	26,44	121
Хронический опыт - свечение, 24 часа	0,09	0,12	0,31	0,73
Хронический опыт - свечение, 8 часов	0,04	0,19	0,30	0,91
Хронический опыт - рост, 24 часа	0,29	0,42	0,85	2,62

В хроническом тесте пока общепринято за точку отсчета брать измерение при 24 часах [6-8]. Из наших данных это можно поставить под сомнение, поскольку как видно из рисунка 2 индекс токсичности после 12 часов имеет тенденцию к резкому снижению к 24 часам. Как видно из

таблицы величины ЕС на 8 часов никак не выше, чем на 24 часа. Следовательно, долговременный тест можно сократить до 6-8 часов. Следует отметить, что в долгосрочном опыте по действию стрептомицина на бактериях *V. fischeri* [11] получена гораздо большая величина ЕС<sub>50</sub>, равная 20,59 мг/л относительно острого опыта. Следовательно, вещества, которые активно влияют на биосинтетические пути обеспечивающие рост и репродукцию, могут быть с успехом определены в хроническом тесте. При этом совершенно не обязательна длительность эксперимента в течение 24 часов, поскольку адекватные результаты можно получать и в более ранние сроки. Время хронического опыта можно сильно сократить до 8 часов.

Таким образом, комбинация быстрого стандартного биоломинесцентного бактериального анализа с долговременным тестом обеспечивает более надежное определение токсичности веществ с задержанной токсичностью. И это вполне справедливо для стрептомицина, который проникая внутрь микробной клетки, связывается со специфическими белками-рецепторами на 30s субъединице рибосом, нарушая образование иницирующего комплекса - матричная РНК-30s субъединица рибосомы, что приводит к распаду полирибосом, и как следствие этого возникают дефекты при считывании информации с ДНК, синтезируются неполноценные белки, что приводит к остановке роста и развития микробной клетки.

### Примечания:

1. Danilov V. S., Ismailov A. D. (1989) Bacterial luciferase as a biosensor of biologically active compounds. In: Applied biosensor, Butterworths, Doston-London, pp. 39-78.
2. Girotti S., Ferri E., Grazia F. M., Maiolini E. (2008) Monitoring of environmental pollutants by bioluminescent bacteria. 608(1), pp. 2-29.
3. Bulich A. A, Bailey G. (1995) Environmental toxicity assessment using luminescent bacteria. In: Environmental toxicology assessment (Richardson M, editor). London: Taylor and Francis. pp. 29-40.
4. Burton S. A., Petersen R. V., Dickman S. N., Nelson J.R. (1986) Comparison of in-vitro bacterial bioluminescence and tissue culture bioassays and in-vitro tests for evaluating acute toxicity of biomaterials. J. Biomedical Materials Res., 20, pp. 827-838.
5. Dutka B., Kwan K. K. (1988) Battery of screening tests approach applied to sediment extracts. Toxic.Assess. 3, pp. 303-314.
6. Froehner K., Backhaus T., Grimme L. H. (2000) Bioassay with *Vibrio fischeri* for the assessment of delayed toxicity. Chemosphere. 40, pp. 821-828.
7. Froehner K., Meyer W., Grimme L. H. (2002) Time-dependent toxicity in long-term inhibition assay with *Vibrio fischeri*. Chemosphere, 46, pp. 987-997.
8. Backhaus T., Froehner K., Altenburger R., Grimme L. H. (1997) Toxicity testing with *Vibrio fischeri*: A comparison between the long term (24 h) and the short term (30 min) bioassay. Chemosphere, 35 (12), pp. 2925-2938.
9. Nybond S., Karp M., Tammela P. (2013) Antimicrobial assay optimization and validation for HTS in 384-well format using a bioluminescent *E. coli* K-12 strain. Eur J Pharm Sci., 49(4), pp. 782-789.
10. Vlasova I. I., Asrieli T. V., Gavrilova E. M., Danilov V.S. (2004) New approach for specific determination of antibiotics by use of luminescent *Escherichia coli* and immune serum // Applied and Environmental Microbiology. 70 (2), pp. 1245-1248.
11. Backhaus T., Grimme L. H. (1999) The toxicity of antibiotic agents to the luminescent bacterium *Vibrio fischeri*. Chemosphere. 38 (14), pp. 3291-3301.
12. Данилов В. С., Зарубина А. П., Ерошников Г. Е., Соловьева Л. Н., Каргашев Ф.В., Завильгельский Г.Б. (2002) Сенсорные биоломинесцентные системы на основе lux-оперонов разных видов люминесцентных бактерий. Вестн. Моск. университета, сер. биология, 3, с. 20-24.
13. Ревазова Ю. А., Севостьянова Е. М., Данилов В. С.. (2007) Методика определения токсичности химических веществ, полимеров, материалов и изделий с помощью биотеста «Эколюм». М. ФГУЗ «Федеральный центр гигиены и эпидемиологии» Роспотребнадзора, 17 с.
14. Johnson B. T. (1998) Microtox toxicity test systems - New developments and applications. In: Microscale testing in aquatic toxicology: Advances, techniques and practice. Wells PG, Lee K, Blaise C. (eds). CRC Press, Washington, D.C., pp. 201-218.

УДК 579.69

**Зависимая от времени токсичность в долговременном анализе ингибирования свечения с рекомбинантным штаммом *Escherichia coli*.**

<sup>1</sup> Татьяна Петровна Юдина

<sup>2</sup> Елена Владимировна Сорокина

<sup>3</sup> Вадим Степанович Данилов

<sup>1</sup> Московский Государственный Университет имени М.В. Ломоносова, Российская Федерация  
119991, г. Москва, ул. Ленинские горы, д.1, стр. 12

Кандидат биологических наук, научный сотрудник

E-mail: tp-yudina@mail.ru

<sup>2</sup> Московский Государственный Университет имени М.В. Ломоносова, Российская Федерация  
119991, г. Москва, ул. Ленинские горы, д.1, стр. 12

Кандидат биологических наук, научный сотрудник

E-mail: sorokina\_ev77@mail.ru

<sup>3</sup> Московский Государственный Университет имени М.В. Ломоносова, Российская Федерация  
119991, г. Москва, ул. Ленинские горы, д.1, стр. 12

Доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник

E-mail: vsdanil@mail.ru

**Аннотация.** Исследовали действие стрептомицина одновременно на свечение и рост бактерий рекомбинантного люминесцентного штамма *Escherichia coli* с опероном luxCDABE из *Vibrio fischeri*. Эксперименты проводили, определяя токсичность как в 30-минутном опыте, так и в хроническом 24-часовом варианте. По изменению интенсивности биолюминесценции и роста клеток в присутствии антибиотика судили об его токсичности в исследуемом интервале концентраций. Параметр токсичности ЕС<sub>50</sub> составлял 26,44 мг/л при 30 минутной экспозиции и 0,30 мг/л на 8 часов роста бактерий. Динамика изменения токсичности в зависимости от концентрации стрептомицина в долговременном опыте показывает сложность выбора конечной точки эксперимента.

**Ключевые слова:** биолюминесценция; стрептомицин; острая и хроническая токсичность, репродукция бактерий *E.coli* с lux-опероном.