

УДК 577.15

ЕДИНЫЙ ПОДХОД ДЛЯ РАСЧЕТА СКОРОСТИ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ЛИЗИСА ЖИВЫХ БАКТЕРИАЛЬНЫХ КЛЕТОЧНЫХ СУБСТРАТОВ ТУРБИДИМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

Д.А. Матолыгина, Н.С. Душутина, Е.Д. Овчинникова, Н.Л. Еремеев,
Н.Г. Белогурова, Д.Л. Атрошенко, С.А. Смирнов, С.С. Савин, В.И. Тишков,
А.В. Левашов, П.А. Левашов*

(кафедра химической энзимологии химического факультета МГУ
имени М.В. Ломоносова; *e-mail: levashov@yahoo.com)

Проанализированы данные турбидиметрического определения бактериолитической активности по отношению к разным бактериям. Предложен метод корректного пересчета турбидиметрически определяемых величин скорости изменения оптического поглощения ($-\Delta A/\Delta t$) в абсолютные величины скорости изменения числа живых колониеобразующих клеток ($-\Delta \text{КОЕ}/\Delta t$) и в эффективность лизиса клеток $-(1/\text{КОЕ}_0) \cdot \Delta \text{КОЕ}/\Delta t$ для различных клеточных субстратов, что позволяет адекватно сравнивать между собой эффективность действия разных бактериолитических факторов на различные бактериальные клетки.

Ключевые слова: бактериолитическая активность, турбидиметрия, лизоцим, интерлейкин-2, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum*.

Несмотря на долгую историю изучения бактериолитических ферментов, до сих пор остается много вопросов для интерпретации экспериментальных данных, полученных при лизисе живых бактериальных клеток. Корректное сравнение результатов, полученных для разных бактериальных субстратов, представляет собой сложную методическую задачу, которая на сегодняшний день окончательно не решена. Исследования на искусственных субстратах не дают возможности полноценно оценивать эффективность действия ферментов в отношении живых бактериальных клеток. Бактериолитические ферменты уже широко используются в медицине и биотехнологии, поэтому правильная оценка эффективности их действия на реальные живые клетки – весьма актуальная задача. Бактериолитические ферменты в настоящее время рассматриваются как одна из альтернатив традиционным антибиотикам в связи с появлением новых устойчивых штаммов бактерий [1, 2]. Кроме того, сравнительно недавно были обнаружены бактериолитические свойства у интерлейкина-2 [3, 4], который используется при лечении онкологических заболеваний и сепсиса. Исследование бактериолитических свойств интерлейкина-2 также требует разработки единого методического подхода.

Бактериолитические ферменты вызывают лизис бактериальных клеток в результате расщепления пептидогликана – основного структурного компо-

нента клеточной стенки [5]. Для определения терапевтического потенциала новых бактериолитических агентов требуется количественное описание процесса ферментативного лизиса [6]. На сегодняшний день наиболее простым в инструментальном и методическом исполнении является турбидиметрический метод, основанный на просветлении клеточной суспензии в результате разрушения клеток под действием бактериолитических ферментов при длине волны 500–650 нм [7].

Прямые микробиологические методы подсчета живых клеток более трудоемкие и менее точные [8]. Важное преимущество турбидиметрического метода определения скорости ферментативного лизиса бактериальных клеток – возможность непрерывной регистрации процесса, что облегчает расчет начальной скорости лизиса. Именно этот параметр (уменьшение оптической плотности суспензии $\Delta A/\Delta t$ в начальный момент времени) чаще всего и используют для оценки активности ферментов при работе с клеточными субстратами [9–17]. Получаемые таким образом экспериментальные результаты позволяют проводить сравнение специфичности различных бактериолитических ферментов по отношению к одним и тем же клеткам, а также изучать влияние разных добавок на эффективность процесса лизиса [14, 16, 18–20]. Однако сравнительный анализ определенной турбидиметрическим методом бактериолитической активности одного и того же фермента по

отношению к клеткам различных микроорганизмов весьма затруднен по ряду причин. Во-первых, турбидиметрия базируется не на поглощении, а на рассеянии светового потока. Это обуславливает зависимость определяемой величины поглощения клеточной суспензии от размеров и формы клеток, которые в широких пределах варьируются для различных микроорганизмов. Таким образом, при одной и той же величине оптического поглощения (A_0) суспензии концентрация клеточного субстрата (количество клеток в 1 мл, для живых клеток КОЕ/мл) для бактерий разных видов может различаться на несколько порядков [15]. Даже в случае одинаковой эффективности фермента по отношению к тем или иным клеткам различия в начальной концентрации субстрата могут приводить к тому, что начальные скорости ферментативной реакции будут различаться. Во-вторых, определение бактериолитической активности как изменение поглощения в единицу времени $\Delta A/\Delta t$ в начальный момент времени в неявном виде подразумевает полное просветление суспензии после окончания лизиса ($A_\infty = 0$). Однако для различных клеточных субстратов при одинаковом начальном поглощении A_0 конечная величина поглощения A_∞ сильно различается, что подтверждается прямым микробиологическим методом [13, 15, 17]. Иными словами, полное изменение поглощения в ходе процесса ($A_0 - A_\infty$) зависит от используемого субстрата. Данный факт также требует корректировки при определении начальной скорости ферментативного лизиса. Следовательно, для корректного сравнения бактериолитической активности одного и того же фермента по отношению к клеткам разных микроорганизмов требуется количественный переход от определяемой турбидиметрически величины $\Delta A/\Delta t$ к изменению степени лизиса или к скорости лизиса клеток (число лизированных клеток на 1 мл в единицу времени).

Цель настоящей работы – сравнение результатов определения бактериолитической активности ферментов турбидиметрическим и микробиологическим методами на примере модельного фермента лизоцима и менее изученного бактериолитического фактора интерлейкина-2, а также клеточных субстратов разной природы. На основании количественной взаимосвязи результатов разных методов должна быть выработана единая система пересчета данных турбидиметрии для корректного сравнения активности на разных субстратах.

Материалы и методы

В работе использованы следующие реагенты и материалы: Ронколейкин (раствор интерлейкина-2

(0,25 мг/мл) для внутривенного и подкожного введения; «Биотех», Россия); MES, TRIS («Amresco», США); NaOH, NaCl («Applichem», Германия); лиофилизированный куриный яичный лизоцим («Sigma Aldrich», США); Tween-85 («Ferak», Германия); уксусная кислота («Реахим», Россия); HCl («Germed», Германия). В работе применяли дистиллированную воду двойной перегонки.

Нами использован штамм *B. subtilis* 168trpC2, любезно предоставленный музеем ВНИИ Генетики. Клетки *E. coli* JM109 были любезно предоставлены Дж. Мессингом (Waksman Institute, New Jersey, США). В качестве источника *L. plantarum* использовали препарат лиофилизированных бактерий («Микроген», Россия). Выращивали клетки *B. subtilis* и *E. coli* в течение 50 и 20 ч соответственно в одинаковых условиях на 1%-й твердой агаризованной среде LB при температуре 37 °C [21]. Культуру клеток *L. plantarum* растили 36 ч при 37 °C, используя среду MRS (de Man–Rogose–Sharpe [22]) с модификацией в виде замены Tween-80 на Tween-85. Суспензию свежеразведенных клеток (разведенную при необходимости раствором 0,9% NaCl) помещали в пробирки по 1,5 мл, замораживали опусканием в жидкий азот и хранили при –70 °C не больше месяца. Размораживали препараты бактериальных клеток непосредственно перед экспериментом. Перед началом опыта все препараты клеток *B. subtilis*, *E. coli* и *L. plantarum* промывали и переводили в изотонический раствор NaCl с помощью двукратного центрифугирования суспензии в течение 5 мин при 5000g с последующим ресуспендированием в свежем растворе. Использовали центрифугу «Eppendorf Minispin».

Раствор яичного куриного лизоцима готовили перед экспериментом, используя буферную смесь для измерения активности. Для работы в день эксперимента вскрывали новую ампулу готового раствора интерлейкина-2, который использовали без дополнительной обработки.

Турбидиметрический анализ. Для измерений светопоглощения использовали спектрофотометр «UV-1800» («Shimadzu», Япония) с термостатируемым кюветным отделением при температуре 37 °C. Измерения проводили при длине волны 650 нм в кюветках с длиной оптического пути 1 см и объемом 0,5 мл. В кювету вносили буферный раствор и суспензию клеток (либо *E. coli*, либо *L. plantarum*, либо *B. subtilis*) в таком количестве, чтобы оптическая плотность составляла 0,4–0,5 при 650 нм. Затем смесь помещали в термостатируемое (37 °C) кюветное отделение спектрофотометра, выдерживали 5 мин, регистрировали в течение 5 мин фоновое значе-

ние скорости лизиса клеток. После этого в кювету вносили раствор фермента и прописывали либо начальные скорости, либо полную кинетическую кривую лизиса. Измерение скорости лизиса клеток проводили, соблюдая следующие условия: для *B. subtilis* в буферной смеси 0,02 М ТРИС-НСl с 0,04 М NaCl (pH 8,1) при концентрации лизоцима 0,3 мкг/мл; для *E. coli* в буферной смеси 0,01 М ТРИС-MES-CH₃COOH с 0,05 М NaCl (pH 8,5) с концентрацией лизоцима или интерлейкина-2 (0,1 или 15 мкг/мл соответственно); для *L. plantarum* в буферной смеси 0,01 М ТРИС-MES-CH₃COOH с 0,05 М NaCl (pH 7,0) при концентрации лизоцима или интерлейкина-2 (2,5 или 30 мкг/мл).

Микробиологический анализ. В определенные промежутки времени после начала процесса лизиса отбирали пробы (30 мкл) из реакционной смеси. Готовили различные разведения и проводили высеv клеточной суспензии на чашки Петри с соответствующей агаризованной средой. Подсчет числа КОЕ проводили после 36 ч инкубации в термостате при температуре 37 °С.

Результаты и обсуждение

Полные турбидиметрические кривые лизиса бактериальных клеток под действием лизоцима и интерлейкина-2 представлены на рис. 1, А. Для *B. subtilis* зависимость дана только для лизоцима, так как интерлейкин-2 на данный микроорганизм не действует. Начальные концентрации фермента подобраны так, чтобы скорости лизиса различных бактерий были соизмеримы по величине. Для *L. plantarum* и *B. subtilis* требуются боль-

шие концентрации лизоцима в сравнении с *E. coli*, что в дальнейшем можно дополнительно учесть в расчетах, так как в наших условиях скорость лизиса прямо пропорциональна концентрации фермента. На рис. 2 показано, как различается ферментативный лизис разных бактериальных клеток. Если суспензии *E. coli* и *B. subtilis* практически полностью просветляются после полутора часов протекания процесса, то суспензия *L. plantarum* демонстрирует сравнительно высокую остаточную оптическую плотность, не выходящую на плато после 100 мин реакции.

Результаты микробиологического анализа клеточных суспензий в ходе лизиса приведены в табл. 1. После 100 мин лизиса клеток *B. subtilis* и *E. coli* конечное содержимое реакционной смеси характеризуется практически нулевым поглощением при использованной нами длине волны в 650 нм, живых клеток при этом также не остается. Для *L. plantarum* число живых клеток к трем часам реакции падает практически на порядок, однако оптическое поглощение к этому времени падает только до 43% от исходной величины. Можно предположить, что для *L. plantarum* нежизнеспособные клетки обладают ненулевой величиной поглощения раствора. Таким образом, фрагменты клеток после лизиса могут и не обладать нулевым поглощением при данной длине волны. Подобная разница может быть также объяснена специфическими особенностями процесса лизиса использованных нами клеточных субстратов. Известно, что литические ферменты сорбируются на клеточной стенке бактерий и гидролизуют пептидогликан согласно своей специфичности (эндопептидазой,

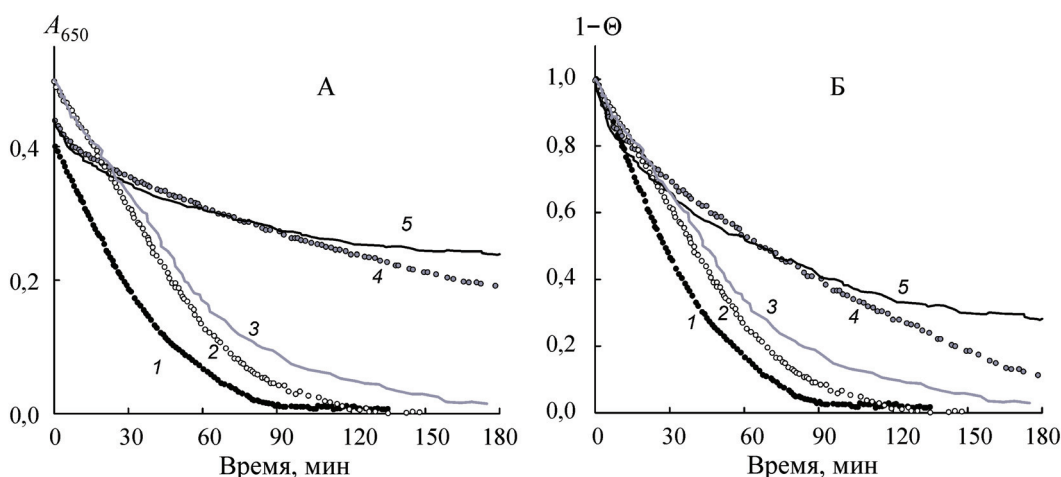


Рис. 1. Турбидиметрические кривые лизиса клеток (А); относительное изменение концентрации клеток (Б): 1 – *B. subtilis* под действием лизоцима, 2 – *E. coli* под действием лизоцима, 3 – *E. coli* под действием интерлейкина-2, 4 – *L. plantarum* под действием лизоцима, 5 – *L. plantarum* под действием интерлейкина-2

Т а б л и ц а 1

Изменение числа клеток в бактериальной суспензии в ходе лизиса, 10^7 КОЕ/мл

Время, мин	<i>B. subtilis</i> + лизоцим	<i>E. coli</i> + лизоцим	<i>E. coli</i> + интерлейкин-2	<i>L. plantarum</i> + лизоцим	<i>L. plantarum</i> + интерлейкин-2
0	4,0	37	37	8,8	8,8
30	1,8	22	23	6,1	5,7
60	0,6	10	12	4,5	4,4
90	0,1	3,0	6,0	3,3	3,2
120	0,0	0,4	1,0	2,1	2,7
150	0,0	0,0	0,0	1,6	2,0
180	0,0	0,0	0,0	1,0	1,7

амидазной или гликозидазной [23]), вызывая образование пор. При достижении критического размера пор цитоплазма вытекает из клеток в результате осмотического шока [24]. Однако этот сложный и до сих пор не вполне понятый процесс является функцией многих переменных, в том числе толщины клеточной стенки, числа гидролизуемых связей, размера самих клеток и т.д. В ряде случаев в ходе лизиса наблюдается прямая корреляция между поглощением клеточной суспензии, количеством лизированных клеток и числом гидролизованных связей [25], т.е. клеточная стенка распадается сразу на небольшие осколки, не имеющие поглощения на используемой длине волны. Подобное поведение демонстрируют в нашем случае клетки *E. coli* и *B. subtilis*. Для клеток *L. plantarum* потеря жизнеспособности происходит, вероятно, уже при небольшом количестве быстро гидролизующихся связей пептидогликана. Образующиеся крупные клеточные осколки способны к светорассеянию и в дальнейшем постепенно медленно расщепляются (в частности, мы наблюдали слабое падение оптической плотности клеток *L. plantarum* за время, превышающее четыре часа лизиса).

Рассмотрим взаимосвязь между реальной скоростью лизиса клеток (определяемую прямым микробиологическим методом) и турбидиметрическими данными. Доля нелизированных клеток ($[КОЕ]_t$) к моменту времени t равна:

$$[КОЕ]_t / [КОЕ]_0 = \Theta_t, \quad (1)$$

где $[КОЕ]_0$ – начальная концентрация клеток.

Доля лизированных клеток ($[КОЕ]_{л,t}$) к этому моменту времени составляет:

$$([КОЕ]_{л,t} / [КОЕ]_0 = 1 - \Theta_t. \quad (2)$$

Таким образом, количество лизированных клеток ($[КОЕ]_{л,t}$) к этому моменту времени составит:

$$[КОЕ]_{л,t} = [КОЕ]_0 (1 - \Theta_t). \quad (3)$$

Соответственно, скорость лизиса клеток $V_{л}$ будет определяться уравнением:

$$V_{л} = d([КОЕ]_{л,t} / dt = -[КОЕ]_0 (d\Theta / dt). \quad (4)$$

Как было показано ранее [13], доля нелизированных клеток Θ_t с высокой точностью может быть выражена также через величину оптического поглощения бактериальной суспензии в ходе ферментативного лизиса с помощью уравнения

$$1 - \Theta_t = (A_0 - A_t) / (A_0 - A_{\infty}), \quad (5)$$

откуда получаем

$$-d\Theta_t / dt = -[1 / (A_0 - A_{\infty})] \times (dA / dt), \quad (6)$$

где A_0 – начальное поглощение реакционной смеси, а A_{∞} – конечное поглощение при практически законченном процессе лизиса согласно микробиологическим данным. Данная формула была выведена из предположения, что есть только два основных состояния клеток (целые или разрушенные), при этом каждое из двух состояний характеризуется определенными оптическими свойствами. Как показывает практика, формула (6) дает весьма хорошее согласование с данными, полученными при прямом микробиологическом подсчете клеток. Рассчитанные по этой формуле значения Θ_t практически совпадают с экспериментальными значениями, полученными микробиологическим методом. На рис. 1, Б приведен пересчет значений A_t в Θ_t .

Для *B. subtilis* и *E. coli* величину A_∞ принимаем равной нулю. Для *L. plantarum* A_∞ вычисляем по формуле, полученной преобразованием (5):

$$A_\infty = [A_t - \Theta_t A_0] / (1 - \Theta_t), \quad (7)$$

куда подставляем значение

$$\Theta_{180 \text{ мин}} = [\text{КОЕ}]_{180} / [\text{КОЕ}]_0 = 0,114,$$

полученное для лизоцима экспериментально по микробиологическим данным для времени 180 мин. Подставляя также значения $A_0 = 0,44$ и $A_{180} = 0,19$, получаем $A_\infty = 0,16$.

Взаимосвязь между турбидиметрическими и микробиологическими данными при лизисе лизоцимом клеток представлена на рис. 2, где показано, что величина поглощения суспензии линейно коррелирует с концентрацией жизнеспособных клеток. Зависимости для *B. subtilis* и *E. coli* проходят через нулевое значение. Зависимость для *L. plantarum* не проходит через нулевое значение, отсекая от оси ординат величину, приблизительно равную A_∞ .

Комбинируя уравнения, получаем взаимосвязь между реальной скоростью лизиса клеток (как уменьшения количества колониеобразующих единиц) и оптическим поглощением суспензии:

$$V_{\text{л}} = - \frac{[\text{КОЕ}]_0 dA}{(A_0 - A_\infty) dt}. \quad (8)$$

Из уравнения (8) видно, что традиционно используемая величина эффективности ферментативного лизиса ($\Delta A/\Delta t$ в начальный момент времени) не вполне адекватно отражает реальную

скорость лизиса клеток. Для перехода к скорости, выражающей изменение концентрации клеток, необходимо знать еще как минимум два параметра – начальную концентрацию клеток и нормировочный коэффициент разницы поглощения суспензии с учетом ненулевого поглощения разрушенных клеток при практически законченном процессе лизиса.

Известно, что при примерно равной начальной величине поглощения суспензий ($A_0 \approx 0,4-0,5$) начальная концентрация клеток ($[\text{КОЕ}]_0$) существенно различаются для разных клеток: для *B. subtilis* $4,0 \cdot 10^7$ КОЕ/мл, для *E. coli* $3,7 \cdot 10^8$ КОЕ/мл, для *L. plantarum* $8,8 \cdot 10^7$ КОЕ/мл. Поэтому при сравнении эффективности лизиса для разных клеток с разной начальной концентрацией лучше использовать величину:

$$\begin{aligned} - \frac{d\Theta}{dt} &= - \frac{1}{[\text{КОЕ}]_0} \frac{d[\text{КОЕ}]}{dt} = \\ &= \frac{V_{\text{макс.}}}{K_M + [\text{КОЕ}]_0} = - \frac{1}{(A_0 - A_\infty)} \frac{dA}{dt}, \end{aligned} \quad (9)$$

которую мы назовем эффективностью лизиса.

В наших условиях скорость лизиса линейно зависит от концентрации бактериолитических факторов. Чтобы учесть разницу в концентрации ферментов, перейдем к величине удельной эффективности лизиса.

$$\Lambda = - \frac{1}{[E]} \frac{d\Theta}{dt} = - \frac{1}{[E]} \frac{1}{(A_0 - A_\infty)} \frac{dA}{dt}. \quad (10)$$

Полученные нами в данных условиях истинные значения скорости лизиса и величины удельной эффективности приведены в табл. 2.

Таким образом, настоящая работа показывает, что в случае, когда сравнивается активность одного бактериолитического фермента для определенных клеток в разных условиях, то можно пользоваться условной величиной $-dA/dt$, которая может быть пересчитана в истинную величину $-d[\text{КОЕ}]/dt$ с помощью нормировочного множителя. В случае использования разных клеток и разных концентраций различных бактериолитических факторов целесообразнее сравнивать величины удельной эффективности лизиса (Λ).

Как показано в табл. 2, для клеток *E. coli* эффективность лизиса (Λ) лизоцимом в 141 раз выше, чем эффективность лизиса интерлейкином-2. Для клеток *L. plantarum* эффективность лизиса лизоцимом в 13,5 раз выше, чем эффективность лизиса

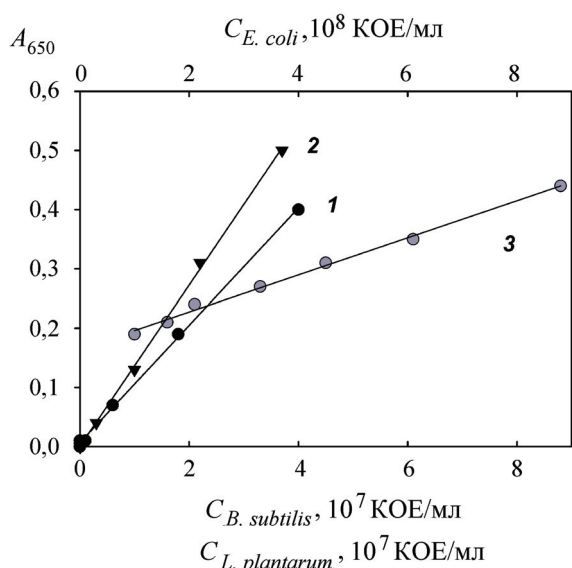


Рис. 2. Взаимосвязь между концентрацией жизнеспособных клеток и величиной поглощения суспензии в ходе лизиса лизоцимом: 1 – *B. subtilis*, 2 – *E. coli*, 3 – *L. plantarum*

Т а б л и ц а 2

Сводные данные по сравнению эффективности лизиса различных клеток лизоцимом и интерлейкином-2

Параметр	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>L. plantarum</i>
A_0	0,4	0,49	0,44
A_∞	0	0	0,16
$[KOE]_0$, КОЕ/мл	$4,0 \cdot 10^7$	$3,7 \cdot 10^8$	$8,8 \cdot 10^7$
Лизис в присутствии лизоцима			
$-dA/dt$, $10^{-4} \cdot c^{-1}$	1,5	2,0	1,9
$-dKOE/dt$, 10^5 КОЕ·мл ⁻¹ ·с ⁻¹	0,15	1,5	0,60
$-d\Theta/dt$, $10^{-4} \cdot c^{-1}$	3,75	4,08	6,8
$[E]$, 10^{-3} г/л	0,4	0,1	2,5
$\Lambda_{\text{лизоцим}} = -(1/[E]) d\Theta/dt$, л · г ⁻¹ · с ⁻¹	0,94	4,08	0,27
Лизис в присутствии интерлейкина-2			
$-dA/dt$, $10^{-4} \cdot c^{-1}$	–	2,1	1,7
$-dKOE/dt$, 10^5 КОЕ мл ⁻¹ ·с ⁻¹	–	1,6	0,54
$-d\Theta/dt$, $10^{-4} \cdot c^{-1}$	–	4,3	6,1
$[E]$, 10^{-3} г/л	–	15	30
$\Lambda_{\text{интерлейкин-2}} = -(1/[E]) d\Theta/dt$, л · г ⁻¹ · с ⁻¹	–	0,029	0,020
Сопоставление эффективности лизиса лизоцимом и интерлейкином-2			
$\Lambda_{\text{лизоцим}}/\Lambda_{\text{интерлейкин-2}}$	–	141	13,5
$\Lambda_{\text{лизоцим}}/\Lambda'_{\text{лизоцим}}$	–	$\Lambda_{\text{лизоцим}}(E. coli) / \Lambda_{\text{лизоцим}}(L. plantarum) = 15,1$	
$\Lambda_{\text{интерлейкин-2}}/\Lambda'_{\text{интерлейкин-2}}$	–	$\Lambda_{\text{интерлейкин-2}}(E. coli) / \Lambda_{\text{интерлейкин-2}}(L. plantarum) = 1,45$	

интерлейкином-2. Эффективность лизиса лизоцимом в 15,1 раз выше для клеток *E. coli* по сравнению с клетками *L. plantarum*. Эффективность лизиса интерлейкином-2 только в 1,45 раз выше для клеток *E. coli* по сравнению с клетками *L. plantarum*.

Таким образом, предложен метод корректного пересчета турбидиметрически определяемых величин $-dA/dt$ ($\Delta A/\Delta t$) в эффективность лизиса $-d\Theta/dt$ и в абсолютные величины $-dKOE/dt$ для разных клеточных субстратов, что позволяет сравнивать между собой эффективность их лизиса.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 15-14-00012 «Исследование бактериолитической активности интерлейкина-2»).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Donovan D.M. // Recent Pat. Biotechnol. 2007. Vol. 1. P. 113.
2. Fischetti V.A. // Curr. Opin. Microbiol. 2008. Vol. 11. P. 393.
3. Левашов П.А., Седов С.А., Белогурова Н.Г., Шиповсков С.В., Левашов А.В. // Биохимия. 2012. Т. 77. № 11. С. 1567.
4. Седов С.А., Белогурова Н.Г., Шиповсков С.В., Семенова М.В., Гитинов М.М., Левашов А.В., Левашов П.А. // Биоорг. химия. 2012. Т. 38. № 3. С. 315.
5. Salazar O., Asenjo J.A. // Biotechnol. Lett. 2007. Vol. 29. P. 985.
6. Kusuma C., Kokai-Kun J. // Antimicrob. Agents Chemother. 2005. Vol. 49. P. 3256.
7. Ensign J.C., Wolfe R.S. // J. Bacteriol. 1965. Vol. 90. P. 395.
8. Dias R., Vilas-Boas E., Campos F.M., Hogg T., Couto J.A. // Food Microbiol. 2015. Vol. 49. P. 6.
9. Chipman D.M. // Biochem., 1971. Vol. 10. P. 1714.
10. Fischetti V.A., Gotschlich E.C., Bernheimer A.W. // J. Exp. Med. 1971. Vol. 133. P. 1105.
11. Loeffler J.M., Nelson D., Fischetti V.A. // Science. 2001. Vol. 294. P. 2170.

12. Mitchell G.J., Nelson D.C., Weitz J.S. // Phys. Biol. 2010. Vol. 7(4). 046002. P. 1.
13. Levashov P.A., Sedov S.A., Shipovskov S., Belogurova N.G., Levashov A.V. // Anal. Chem. 2010. Vol. 82. P. 2161.
14. Sedov S.A., Belogurova N.G., Shipovskov S., Levashov A.V., Levashov P.A. // Coll. Surf. B: Biointerfaces. 2011. Vol. 88. P. 131.
15. Diez-Martinez R., de Paz H.D., Bustamante N., Garcia E., Menendez M., Garcia P. // Antimicrob. Agents Chemother. 2013. Vol. 57. P. 5355.
16. Becker S.C., Swift S., Korobova O., Schischkova N., Kopylov P., Donovan D.M., Abaev I. // FEMS Microbiol. Lett. 2015. Vol. 362. P. 1.
17. Матолыгина Д.А., Осипова Е.Э., Смирнов С.А., Белогурова Н.Г., Еремеев Н.Л., Тишков В.И., Левашов А.В., Левашов П.А. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2015. Т. 56. № 6. С. 365.
18. Brown W.C., Sandine W.E., Elliker P.R. // J. Bacteriol. 1962. Vol. 83. N 3. P. 697.
19. Иванов Р.А., Соболева О.А., Смирнов С.А., Левашов П.А. // Биоорг. химия. 2015. Т. 41. № 3. С. 292.
20. Левашов П.А., Матолыгина Д.А., Овчинникова Е.Д., Атрошенко Д.Л., Савин С.С., Белогурова Н.Г., Смирнов С.А., Тишков В.И., Левашов А.В. // Acta Naturae. 2017. Т. 9. № 2(33). С. 87.
21. Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. // Molecular Cloning: A Laboratory Manual. N.Y., 1982.
22. Man J.D. de, Rogosa M., Sharpe M.E. // J. Appl. Bacteriol. 1960. Vol. 23. P. 130.
23. Loessner M.J. // Curr. Opin. Microbiol. 2005. Vol. 8. P. 480.
24. Poolman B., Glaesker E. // Mol. Microbiol. 1998. Vol. 29. P. 397.
25. Schurch R., Nelson D., Fischetti A.V. // Nature. 2002. Vol. 418. P. 884.

Поступила в редакцию 23.11.17

ENZYMATIC LYSIS OF LIVING MICROBAL CELLS: UNIVERSAL APPROACH FOR CELL LYSIS RATE CALCULATION IN TURBIDIMETRIC MEASUREMENTS

D.A. Matolygina, N.S. Dushutina, E.D. Ovchinnikova, N.L. Eremeev, N.G. Belogurova, D.L. Atroshenko, S.A. Smirnov, S.S. Savin, V.I. Tishkov, A.V. Levashov, P.A. Levashov*

(Department of Chemical Enzymology, Faculty of Chemistry, M.V.Lomonosov Moscow State University; *e-mail: levashov@yahoo.com)

Turbidimetric measurement data for enzymatic lysis of various living bacteria cells are analyzed. A method for the correct recalculation of turbidimetric data ($-\Delta A/\Delta t$) into absolute values of living cells concentration change ($-\Delta \text{CFU}/\Delta t$) is proposed. Dimensionless efficiency of cell lysis $-(1/\text{CFU}_0) \cdot \Delta \text{CFU}/\Delta t$ for various bacteria cells is calculated to correctly compare the efficacy of different bacteriolytic factors on various bacterial cells.

Key words: bacteriolytic activity, turbidimetry, lysozyme, interleukin-2, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum*.

Сведения об авторах: Матолыгина Дарья Андреевна – аспирантка химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (dashunehka.m@yandex.ru); Душутина Наталья Сергеевна – студентка химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (dushut@gmail.com); Овчинникова Екатерина Дмитриевна – мл. науч. сотр. Института экспериментальной кардиологии Кардиологического научного центра Министерства здравоохранения Российской Федерации (k.ovchinnikova@gmail.com); Еремеев Николай Леонидович – вед. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, докт. хим. наук, профессор (nleremeev@gmail.com); Белогурова Наталья Георгиевна – доцент кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, канд. хим. наук (nbelog@mail.ru); Атрошенко Денис Леонидович – аспирант кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (atrdenis@gmail.com); Смирнов Сергей Александрович – науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (sergik-2001@yandex.ru); Савин Святослав Сергеевич – науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, канд. биол. наук (savin-slava@gmail.com); Тишков Владимир Иванович – профессор кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, зав. лабораторией молекулярной инженерии Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, докт. хим. наук (vitishkov@gmail.com); Левашов Андрей Вадимович – профессор кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, докт. хим. наук (a_levashov@bk.ru); Левашов Павел Андреевич – ст. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, канд. хим. наук (levashov@yahoo.com).