



10. *Артемьева С. А., Артемьева Т. Н.* Справочник по микробиологическому контролю мяса, животных, птицы, яиц и продуктов их переработки. М., 2002. 282 с.
11. *Хоулт Д.* Определитель бактерий Берджи. М., 1997. С. 574–577.
12. *Воробьев В. Я., Елсуков А. И.* Теория и эксперимент. Минск, 1989. 109 с.
13. *Эверли Дж. С., Резенфельд Р.* Стресс: природа и лечение. М., 1981. 185 с.
14. *Коцеев В. С.* Физиология и гигиена индивидуальной защиты человека от холода. М., 1981. 287 с.
15. *Кориунов В. М.* Нормальная микрофлора кишечника. Диагностика, профилактика и лечение дисбактериозов кишечника : учеб. пособие для врачей и студентов. М., 1997. 40 с.

УДК 579.841.11

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА ЭЛЕКТРООПТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА МИКРОБНЫХ СУСПЕНЗИЙ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СПЕЦИФИЧНОСТИ БАКТЕРИОФАГА

О. А. Караваяева, О. И. Гулий, С. А. Павлий¹, Д. Ю. Володин¹, О. В. Игнатов

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов

¹Саратовский государственный университет

E-mail: karavaeva@ibppm.sgu.ru; gulyi_olga@mail.ru



Изучена возможность использования метода электрооптического анализа клеточных суспензий для определения специфичности бактериофага, выделенного из клеток *Azospirillum brasilense* Sp7, в отношении клеток хозяина и близкородственных штаммов. Для определения селективности также был использован стандартный метод стекающей капли. Эксперименты проводились с клетками бактериальных штаммов *Azospirillum brasilense* Sp7, *Azospirillum brasilense* Sr75, *Azospirillum brasilense* Cd, *Azospirillum brasilense* Sp245, *Azospirillum lipoferum* Sp59b и *Azospirillum brasilense* Sr65. Была установлена корреляция экспериментальных данных, полученных методом электрооптического анализа микробных суспензий и стандартным методом стекающей капли. Сделан вывод о возможности применения метода электрооптического анализа микробных суспензий для определения селективности инфицирования бактериофагами микробных клеток.

Ключевые слова: *Azospirillum brasilense*, бактериофаг, селективность, электрооптический анализ микробных суспензий.

Application of Electrooptical Analysis of Microbial Suspensions Method for Bacteriophage Specificity Determination

O. A. Karavaeva, O. I. Gulyi, S. A. Pavliy, D. Yu. Volodin, O. V. Ignatov

The possibility of using electro-optical analysis of microbial suspensions for determining the specificity of bacteriophage isolated from cells of *Azospirillum brasilense* Sp7 infection of microbial cells was investigated. To determine the selectivity was also used a standard method of falling drops. Method of «falling drops» also was applied for determination of selectivity of the bacteriophage infection of microbial cells. The experiments were conducted with cells of bacterial strains *Azospirillum brasilense* Sp7, *Azospirillum brasilense* Sr75, *Azospirillum brasilense* Cd, *Azospirillum brasilense* Sp245 *Azospirillum lipoferum* Sp59b and *Azospirillum brasilense* Sr65. There was a correlation of experimental data obtained by electro-optical analysis of microbial suspensions and the standard method of «falling drops». The conclusion about possibility of applying the method of electro-optical analysis of microbial suspensions for determining the selectivity of the bacteriophage infection of microbial cells was made.

Key words: *Azospirillum brasilense*, bacteriophages, specificity, electro-optical analysis of microbial suspensions.

Введение

Спектр литического действия бактериофагов – одно из основных биологических свойств. Поэтому при выделении и описании новых фагов определение диапазона их специфического связывания с бактериальными клетками является необходимым этапом исследования [1]. Процедура определения фагочувствительности культуры клеток достаточно длительна. В связи с этим появление метода экспресс-анализа чувствительности микробных клеток к данному бактериофагу является чрезвычайно важным. В настоящее время для этого в большинстве случаев используется метод «стекающей капли» или его модификации [2, 3]. Ранее нами было показано, что в результате действия бактериофага на чувствительные к нему микробы наблюдаются изменения электрооптических (ЭО) параметров суспензий клеток [4].

Цель данной работы – изучение возможности использования метода ЭО анализа клеточных суспензий для определения специфичности бактериофага, выделенного из клеток *Azospirillum brasilense* Sp7, в отношении клеток хозяина и близкородственных штаммов.

Материалы и методы исследования

Микроорганизмы

В работе использовали клетки штаммов *Azospirillum brasilense* Sp7, *A. brasilense* Sr75, *A. brasilense* Sr65, *A. brasilense* Sr55, *A. brasilense* Sp245, *A. lipoferum* Sp59b, *A. brasilense* Cd, полученные из коллекции культур ИБФРМ РАН.

Условия культивирования микробных клеток. Культуры клеток *A. brasilense* Sp7, *Azospirillum*



brasilense Sp7, *A. brasilense* Sr75, *A. brasilense* Sr65, *A. brasilense* Sp245, *A. lipoferum* Sp59b, *A. brasilense* Cd хранили на чашках Петри с твердой агаризованной средой. Суточную культуру получали путем пересева с чашек Петри в колбу с жидкой LB-средой. Выращивание клеток осуществляли на круговой качалке при интенсивности перемешивания 160 об/мин при 30 ± 1 °C в течение 18–20 ч.

Выделение бактериофагов. Суточную культуру клеток *Azospirillum brasilense* Sp7 подвергали охлаждению в течение 2 ч при температуре +4 °C. После чего клетки осаждали центрифугированием при 6000 об/мин в течение 20 мин. К супернатанту, помещенному в стерильную посуду, добавляли полиэтиленгликоль (ПЭГ) 6000, NaCl (г/л): NaCl – 93.5 (1.6M), ПЭГ-6000 Panreac – 130 (2.5M); в количестве 1/5 объема супернатанта, затем колбу с супернатантом обкладывали льдом и помещали в холодильник при 4 °C на 18–20 ч. Через указанное время суспензию центрифугировали при 13 400 об/мин в течение 30 мин. Полученный осадок ресуспендировали в 1 мл ТЕ-буфера (Трис HCl, pH 8,0 – 10мM, EDTA – 1мM).

Морфологию негативных колоний бактерий, зараженных фагами, изучали при посевах методом агаровых слоев (метод Грация) [2].

Диапазон литической активности и специфичность селективированных фагов определяли методом нанесения фага на газон гомологичных или гетерологичных бактериальных культур [2].

Результат считали положительным, если на месте нанесения фага на газоне сплошного роста культуры образовывалась прозрачная зона лизиса с вторичным ростом фагорезистентных микроорганизмов или без него.

Подготовка клеток к электрооптическому анализу. Перед проведением анализа клетки отмывали трехкратным центрифугированием при $2800 \times g$ в течение 5 мин, затем ресуспендировали в небольшом количестве деионизованной воды. Для устранения конгломератов суспензию клеток вновь центрифугировали при $110 \times g$ в течение 1 мин и использовали оставшуюся суспензию в надосадочной жидкости.

Проведение электрооптического анализа. Измерения проводились на электрооптическом анализаторе ELUS, разработанном в Государственном научном центре прикладной микробиологии (Оболensk, Моск. обл.), при длине волны света 670 нм (относительно вакуума) по методике [4]. Использовали дискретный набор частот ориентирующего электрического поля: 740, 1000, 1450, 2000 и 2800 кГц.

Ориентационный спектр (ОС) представлялся в виде частотной зависимости разности

значений оптической плотности суспензий δOD , измеренных при распространении пучка неполяризованного света вдоль и поперек направления ориентирующего поля. Эта разность была нормирована на значение оптической плотности при хаотической ориентации клеток. Общий вид ОС при подобранных экспериментальных условиях (длина волны света, амплитуда напряженности ориентирующего электрического поля и др.) определяется главным образом частотной зависимостью анизотропии поляризуемости клеток [4, 5].

Результаты и их обсуждение

Спектр литического действия определяли для бактериофага, выделенного из клеток *A. brasilense* Sp7, по отношению к 6 штаммам бактерий рода *Azospirillum*: *A. brasilense* Sp7, *A. brasilense* Sr65, *A. brasilense* Sp245, *A. brasilense* Cd, *A. brasilense* Sr75 и *A. lipoferum* 59b.

Ранее нами было показано [4], что в результате инфекции микробных клеток *E. coli* XL-1 специфическим бактериофагом M13K07 максимальное изменение величины ЭО сигнала происходит через 15 мин от момента инфекции из расчета 20 фагов на 1 бактерию. Поэтому в данной работе использовали те же условия.

В проведенных экспериментах было показано, что в результате инфекции микробных клеток штамма *A. brasilense* Sp7 бактериофагом, выделенным из клеток *A. brasilense* Sp7, происходит изменение величины ЭО сигнала (рисунок, а), т. е. исследуемый бактериофаг инфицирует клетки родительского штамма.

Некоторые штаммы фагов обладают большой специфичностью и поражают лишь определенные штаммы одного вида бактерий, тогда как другие характеризуются множественной вирулентностью. Для определения специфичности бактериофага, выделенного из клеток *A. brasilense* Sp7, в качестве тестируемых культур были использованы штаммы микроорганизмов *A. brasilense* Sr 65 и Sr75, полученные из коллекции микроорганизмов ИБФРМ РАН и выделенные на территории Саратовской области в ходе полевых экспедиций в 1980–1990 гг. У суспензий клеток *A. brasilense* штамма Sr75 (рисунок, б) при их инфекции фагом, выделенным из *A. brasilense* Sp7, не зафиксировано изменений величины ЭО сигнала, т. е. клетки устойчивы к инфекции данным фагом. Было показано, что у суспензий клеток штамма Sr65 при их инфекции изучаемым бактериофагом происходит изменение величины ЭО сигнала (рисунок, в), что может свидетельствовать об инфекции клеток фагом.

Также изучалась специфичность бактериофага в отношении близкородственного штамма *A. brasilense* Sp245. Показано, что величина ЭО

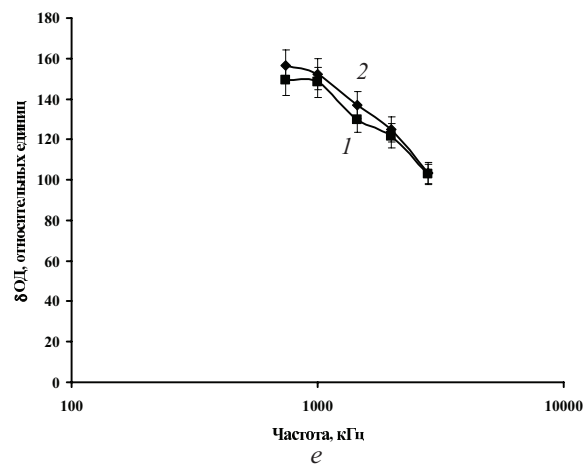
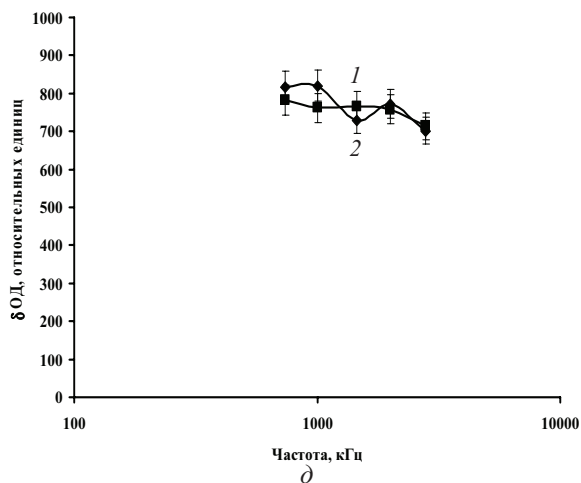
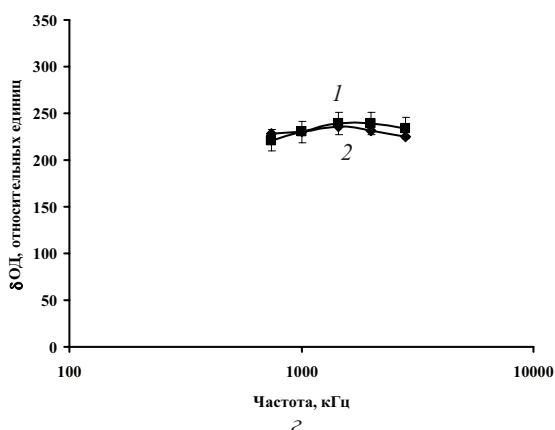
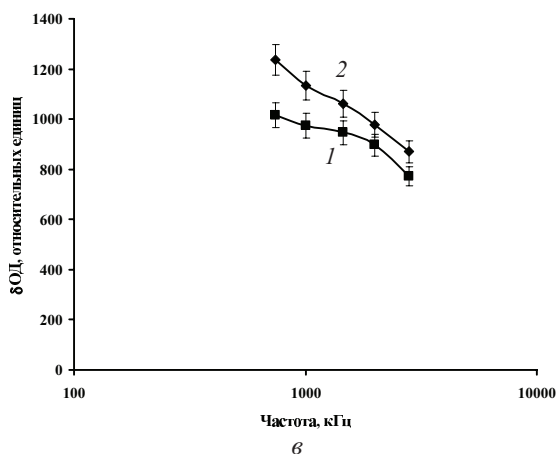
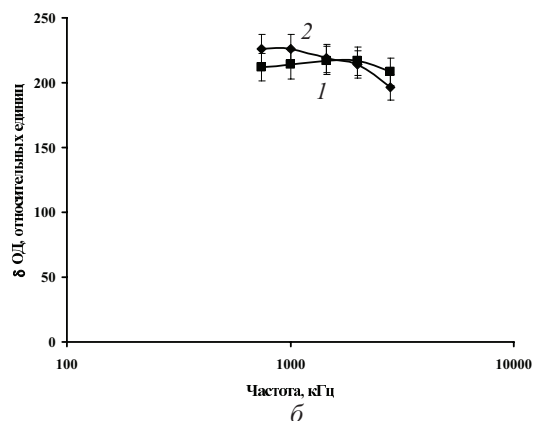
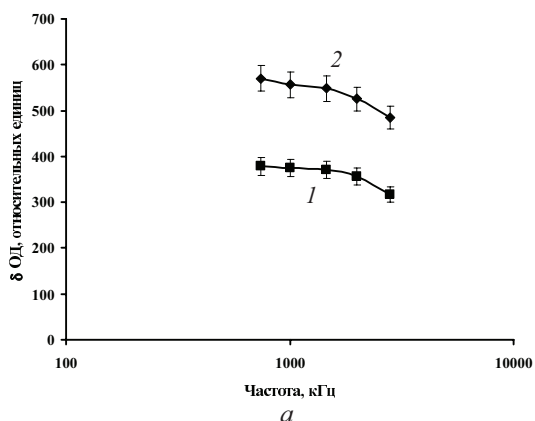


сигнала суспензии клеток при их инфекции исследуемым бактериофагом значительно не изменяется, т. е. клетки данного штамма устойчивы к инфекции исследуемым фагом (рисунок, з).

В качестве тестируемой культуры использовали клетки близкородственного к *A. brasilense* Sp7 штамма Cd, имеющего в составе своего ЛПС только S-O-ПС типового штамма Sp7 [6]. В результате инфекции штамма Cd бактериофагом,

выделенным из клеток Sp7, не зафиксировано изменений величины ЭО сигнала, т. е. клетки устойчивы к инфекции данным фагом (рисунок, д).

Проверялась активность бактериофага, выделенного из клеток *A. brasilense* штамма Sp7, в отношении представителей других видов азоспирилл, при этом в качестве объекта использовались клетки *Azospirillum lipoferum* Sp59b. В результате экспериментов было показано, что после



Ориентационные спектры суспензии клеток *A. brasilense* Sp7 (а), *A. brasilense* Sp245 (б), *A. brasilense* Sr65 (в), *A. brasilense* Sr75 (г), *A. brasilense* Cd (д), *A. lipoferum* 59b (е) после инфекции фагом, выделенным из клеток *A. brasilense* Sp7: (1) – контроль – без фагов; (2) – после 15 мин инфекции фагом



инфекции клеток *Azospirillum lipoferum* Sp59b изучаемым бактериофагом изменений величины ЭО сигнала не зафиксировано (рисунок, е), т. е. клетки являются устойчивыми к бактериофагу.

Одним из важных моментов в развитии метода анализа фагоустойчивости бактерий и определении спектра литической активности фага является получение аналогичных результатов стандартными микробиологическими методами. В таблице представлены сравнительные результаты определения фагоустойчивости микробных клеток с помощью метода ЭО анализа клеточных суспензий и проведенного микробиологического анализа методом «стекающей капли».

Сравнительные результаты определения спектра литического действия бактериофага, выделенного из клеток *A. brasilense* Sp 7

Наименование культур	Результаты ЭО анализа	Результаты микробиологического анализа
<i>A. brasilense</i> Sp7	+	+
<i>A. brasilense</i> Sr75	–	–
<i>A. brasilense</i> Cd	–	–
<i>A. brasilense</i> Sr65	+	+
<i>A. brasilense</i> Sp245	–	–
<i>A. lipoferum</i> Sp59b	–	–

Примечание. «+» – чувствительность исследуемой культуры к бактериофагу; «–» – устойчивость исследуемой культуры к бактериофагу.

Как видно из полученных данных (см. таблицу), бактериофаг, выделенный из клеток *A. brasilense* Sp7, проявляет активность в отношении клеток *A. brasilense* Sp7 и *A. brasilense* Sr65 и неактивен в отношении клеток *A. brasilense* Sp245, *A. brasilense* Cd, *A. brasilense* Sr75, и *A. lipoferum* 59b. Результаты по определению фагочувствительности с помощью ЭО анализа аналогичны данным, полученным при использовании стандартного метода.

Таким образом, изучена специфичность бактериофага, выделенного из клеток *A. brasilense* Sp7, по отношению к 6 штаммам бактерий рода *Azospirillum*. Показана возможность использования метода ЭО анализа клеточных суспензий для определения чувствительности микробных клеток к бактериофагу. Традиционные микробиологические методы определения фагочувствительности микробных клеток путем анализа фагов по способности развиваться на газоне тестируемых бактерий длительны и трудоемки, поэтому использование метода ЭО анализа клеточных суспензий для оперативного решения данного вопроса имеет большие перспективы.

Работа выполнена при частичном финансировании РФФИ (грант №09-02-12442-офи_м).

Список литературы

1. Malek W., Wdowiak-Wróbel S., Bartosik M., Konopa G., Narajczyk M. Characterization of Phages Virulent for *Robinia pseudoacacia* Rhizobia // Curr. Microbiol. 2009. Vol. 59. P. 187–192
2. Адамс М. Бактериофаги. М., 1961. 272 с.
3. Kumar Jaiswal S., Dhar B. Morphology and general characteristics of phages specific to *Lens culinaris* rhizobia // Biol. Fertil. Soils. 2010. Vol. 46. P. 681–687.
4. Bunin V. D., Ignatov O. V., Guliy O. I., Zaitseva I. S., Dykman L. A., O'Neil D., Ivnitcki D. Electro-optical analysis of the *Escherichia coli*-phage interaction // Anal. Biochem. 2004. Vol. 328. P. 181–186.
5. Ignatov O. V., Guliy O. I., Shchyogolev S. Yu., Bunin V. D., Ignatov V. V. Effect of *p*-nitrophenol metabolites on microbial-cell electro-optical characteristics // FEMS Microbiol. Lett. 2002. Vol. 214. P. 81–86.
6. Petrova L. P., Matora L. Yu., Burygin G. L., Borisov I. V., Katsy E. I. Analysis of DNA, Lipopolysaccharide Structure, and Some Cultural and Morphological Properties Closely Related Strains of *Azospirillum brasilense* // Microbiology (Moscow). 2005. Vol. 74, № 2. P. 224–230.