

УДК 579.6

### **Определение спектра литической активности бактериофагов методом электрооптического анализа клеточных суспензий**

Гулий О. И., Павлий С. А., Бунин В. Д., Коннова С. А., Игнатов О. В.

Изучены изменения электрооптических (ЭО) параметров клеточных суспензии *Azospirillum brasilense* штаммов Sp7, Cd, Sp107, Br14, KR77, S27, SR55, SR75, Sp245, Jm6B2, S17, *A. lipoferum* штаммов Sp59b, SR65, RG20am *A. amazonense* Am14, *A. halopraeferans* Au4, *A. irakense* штаммов KBC1 и КА3 при их инфекции бактериофагом ФАб-SR75. Проведены контрольные эксперименты инфицирования клеток бактериофагами с помощью стандартного высева на плотные питательные среды. Впервые показана возможность использования метода ЭО анализа клеточных суспензий для определения спектра литической активности бактериофагов на примере бактериофага ФАб-SR75.

Ключевые слова: чувствительность, спектр литической активности бактериофага, метод электрооптического анализа, микробные клетки

### **Determination of the spectrum of lytic activity of bacteriophages by the electro-optical analysis of cell suspensions**

Guliy O. I., Pavliy S. A., Bunin V. D., Ignatov. V.

Changes in the electrooptical (EO) properties of cell suspensions of the *Azospirillum brasilense* strains Sp7, Cd, Sp107, Br14, KR77, S27, SR55, Sr75, Sp245, Jm6B2, S17, *A. lipoferum* strains Sp59b, Sr65, RG20am *A. amazonense* Am14, *A. halopraeferans* Au4, *A. irakense* strains KBC1 and KA3 d) in their contamination with the bacteriophage ФАб-SR75 were studied depending on the infection. Control experiments were carried out to infect the cells with the bacteriophage, by making a standard inoculation of the dense nutrient media. The fact that the method for EO analysis of cell suspensions may be used to determine the spectrum of lytic activity of bacteriophages is first shown.

Keywords: sensitivity, spectrum of lytic activity of bacteriophages, method of electro-optical analysis

## **Введение**

Литическое действие бактериофагов по отношению к различным штаммам микроорганизмов является одним из основных их биологических свойств. Для определения спектра литического действия бактериофагов традиционно используется ряд стандартных микробиологических методов, таких как: высев на агаризованную среду методом двуслойного агара [1—2], метод «фаговой дорожки» [3—4] и метод реплик [6]. Поскольку процедура определения фагочувствительности культуры клеток достаточно длительна, разработка метода экспрессного анализа чувствительности микробных клеток к бактериофагам является чрезвычайно важной.

Методы электрооптического (ЭО) анализа все чаще находят применение для решения ряда задач микробиологии и биотехнологии. Метод ЭО анализа микробных суспензий основан на регистрации изменения оптических свойств микробной суспензии под влиянием переменного электрического поля. Исследование основано на измерении зарядов, индуцированных электрическим полем, на границе клеточных структур. После взаимодействия зарядов на этой границе с электрическим полем меняется ориентация бактерий в окружающей среде, что приводит к изменению оптических свойств суспензии [7]. Цикл ранних исследований по изучению электрофизических свойств микроорганизмов, выполненный с привлечением бактериальных клеток различной таксономической принадлежности и различных действующих агентов (ксенобиотики, антитела, бактериофаги, антибиотики), убедительно продемонстрировал одну общую закономерность: при отсутствии специфического или неспецифического взаимодействия действующего агента с бактериальными клетками ЭО свойства клеточной суспензии после его добавления остаются неизменными. И наоборот, специфическое взаимодействие вещества с клетками приводит к выраженному изменению величины ЭО свойств клеточных суспензий [8—9].

## **Цель исследования**

Целью работы являлось определение спектра литической активности бактериофагов методом электрооптического анализа клеточных суспензий.

## **Материалы и методы**

### *Микроорганизмы*

В работе использовали штаммы *Azospirillum brasilense* штаммов Sp7, Cd, Sp107, Br14, KR77, S27, SR55, SR75, Sp245, Jm6B2, S17, *A. lipoferum* штаммов Sp59b, SR65, RG20a, *A. amazonense* Am14, *A. halopraeferans* Au4, *A. irakense* KBC1 и KA3, *Escherichia coli* штаммов B-878, XL-1, *Pseudomonas putida* штаммов C-11 и BA-11 и *Acinetobacter calcoaceticum* A-122, полученные из коллекции культур ИБФРМ РАН.

### *Условия культивирования микробных клеток*

Культуры выращивали в 250 мл колбах Эрленмейера на жидкой среде LB следующего состава (г/л): NaCl (Becton, Dickinson and Company, Франция) — 10,0; пептон (Becton, Dickinson and Company, Франция) — 5,0; дрожжевой экстракт (DIFCO, США) — 5,0. Инкубирование клеток осуществляли на круговой качалке при интенсивности перемешивания 160 об/мин при температуре  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  в течение 18 ч.

Определение активности бактериофага методом стекающей капли выполняли путем нанесения бактериофага на газон гомологичных или гетерологичных бактериальных культур методом «фаговой дорожки» или «стекающей капли» [1—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.

Титр бактериофагов определяли методом двухслойного агара по Грациа [1—2].

Подготовка клеток к электрооптическому анализу проводилась, как описано в работе [8].

Электрооптический анализ клеточных суспензий проводили на электрооптическом анализаторе ELOAnalyser (производства EloSystem GbR, Берлин, Германия) при длине волны света 670 нм (относительно вакуума), напряженности электрического поля 93,1 В/см, времени приложения электрического поля 3,0 сек. Объем измерительной ячейки составлял 1 мл, концентрация клеток (в единицах оптической плотности)  $OD_{670} = 0,4\text{—}0,42$ .

Ориентационный спектр был представлен в виде логарифмической зависимости разности значений оптической плотности суспензий  $\delta OD$ , измеренных при распространении пучка неполяризованного света вдоль и поперек направления ориентирующего поля от частоты. Эта разность была нормирована на значение оптической плотности при хаотической ориентации клеток. Для измерений используются относительные единицы, которые с точностью до константы, равной примерно  $1-5 \cdot 10^{-32}$  равны анизотропии поляризуемости частиц с размерностью  $\Phi/m^2$  [7]. Электропроводность воды во всех случаях составляла  $1,6 \mu S/m$ . Для каждой серии проводилось не менее 5 экспериментов. Для статистической обработки экспериментальных данных использовали пакет прикладных программ Microsoft Excel 2000.

### Результаты и их обсуждение

Механизм воздействия бактериофагов на микробные клетки обусловлен адсорбцией фага на клеточной поверхности, последующим проникновением фага в клетку, размножением бактериофагов, разрывом оболочки клетки и выходом фага из клетки. Изменение морфологии клеток и нарушения клеточной стенки у чувствительных к бактериофагу микроорганизмов приводят к изменению их электрофизических (ЭФ) свойств. Мы предположили, что изменение ЭФ параметров клеточных суспензий при их инфекции бактериофагами может быть использовано для определения спектра литической активности бактериофагов с помощью метода ЭО анализа микробных суспензий.

В качестве модельных образцов использовали бактериофаг, выделенный из клеток *A. brasilense* SR75. Основные свойства бактериофага описаны ранее в работе [5]. При изучении селективности исследуемого бактериофага были протестированы следующие виды и штаммы бактерий рода *Azospirillum*: *A. amazonense* Am14, *A. brasilense* штаммы: Sp7, Cd, Sp107, Sp245, Jm6B2, Br14, KR77, S17, S27, SR55, SR75, *A. halopraeferans* Au4, *A. irakense* штаммы: KBC1, KA3, *A. lipoferum* штаммы Sp59b, SR65 и RG20a. Выбор штаммов определялся в соответствии с их таксономическим положением и степенью родства к штамму, из которого был выделен бактериофаг.

Для этого в суспензию клеток, подготовленных для ЭО измерений, вносили бактериофаг из расчета 20 фагов на микробную клетку, при этом время инкубации составляло 10 мин, затем клетки подготавливались и использовались для ЭО анализа.

В результате проведенных исследований было показано, что бактериофаг ФАб-SR75 способен инфицировать клетки *A. brasilense* штаммов SR75 (рисунок 1 (А)), Jm6B2 (рисунок 1 (Б)), SR55 (рисунок 1 (В)) и *A. lipoferum* SR65 (рисунок 1 (Г)), *A. brasilense* штаммов Br14 (рисунок 1 (Д)) и S27 (рисунок 1 (Е)).

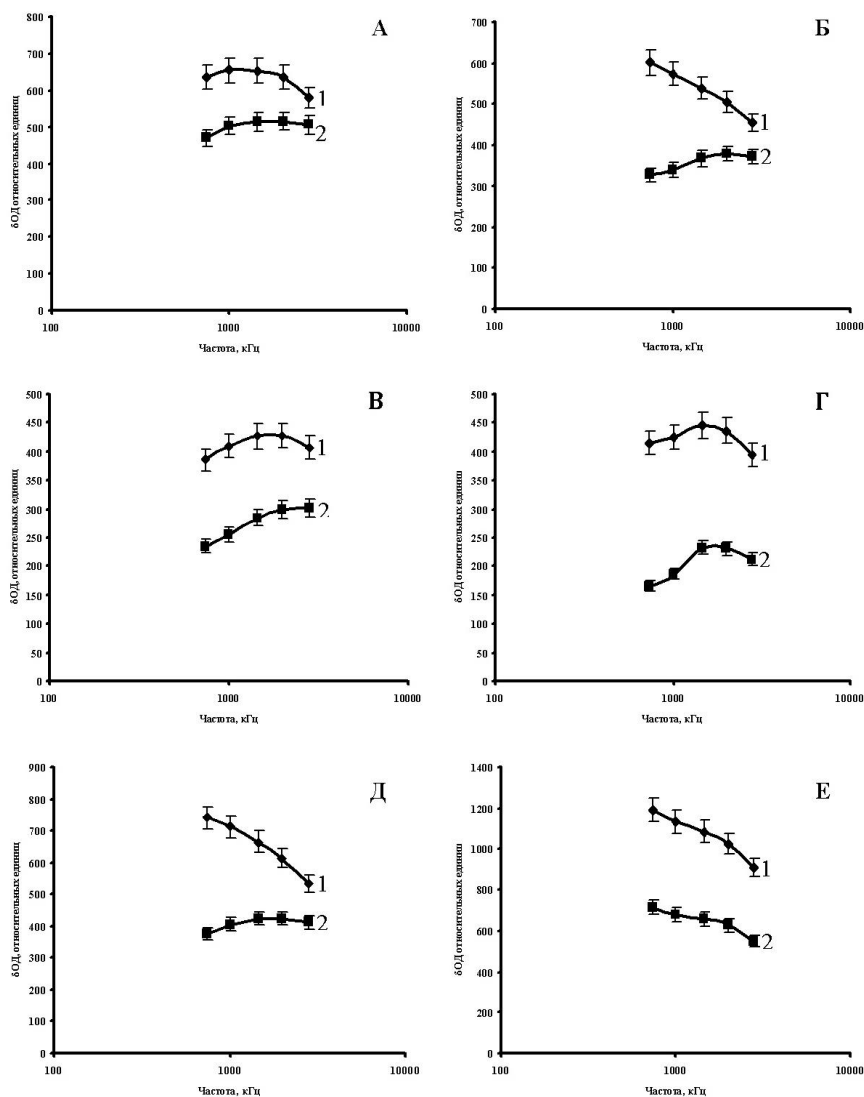


Рис. 1. Изменение величины ЭО сигнала суспензии клеток: (А) – *A. brasilense* SR75; (Б) – *A. brasilense* Jm6B2; (В) – *A. brasilense* SR55; (Г) – *A. lipoferum* SR65; (Д) – *A. brasilense* Br14; (Е) – *A. brasilense* S27 при взаимодействии с бактериофагом ФАб-SR75. (1) – контроль – суспензия клеток без добавления бактериофагов; (2) – суспензия клеток с добавлением бактериофагов

При этом не зафиксировано изменений величины ЭО суспензий клеток *A. brasilense* штаммов Sp7 (рисунок 2 (А)), Cd (рисунок 2 (Б)); Sp107 (рисунок 2 (В)); Sp245 (рисунок 2 (Г)); KR77 (рисунок 2 (Д)), S17(рисунок 2 (Е)).

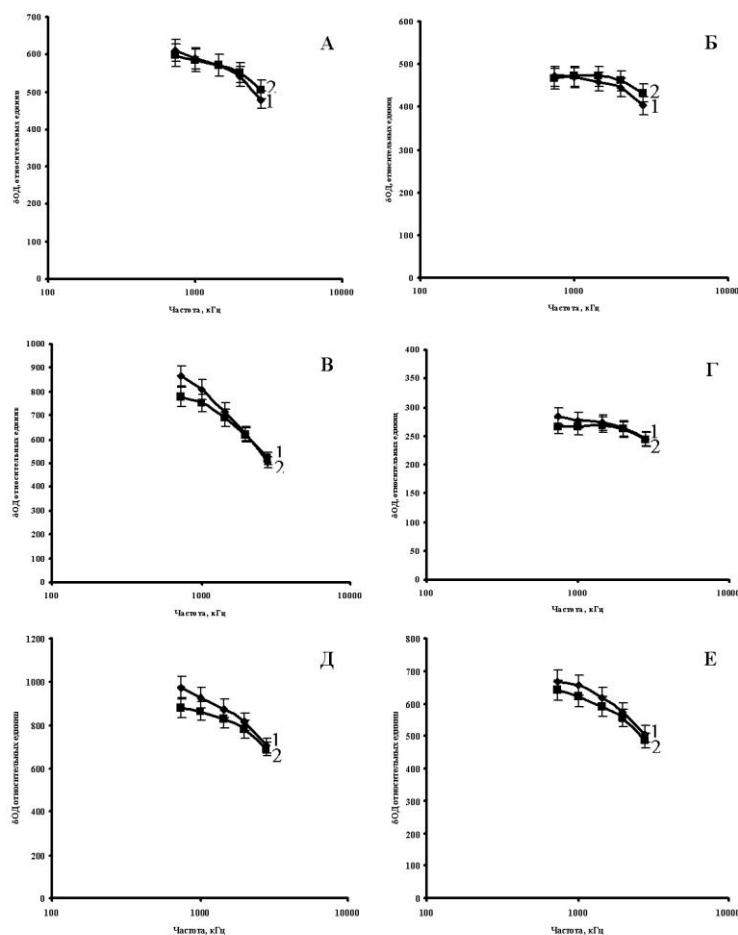


Рис. 2. Изменение величины ЭО сигнала суспензии клеток: (А) – *A. brasilense* Sp7; (Б) – *A. brasilense* Cd; (В) – *A. brasilense* Sp107; (Г) – *A. brasilense* Sp245; (Д) – *A. brasilense* KR77; (Е) – *A. brasilense* S17 при взаимодействии с бактериофагом ΦAb-SR75. (1) – контроль – суспензия клеток без добавления бактериофагов; (2) – суспензия клеток с добавлением бактериофагов

При инфекции клеток *A. irakense* KBC1 (рисунок 3 (А)) и КА3 (рисунок 3 (Б)), *A. amazonense* Am14 (рисунок 3 (В)) и *A. lipoferum* RG20a (рисунок 3

(Г) бактериофагом ФАб-SR75 зафиксировано изменение величины ЭО сигнала, т.е., данные штаммы являются чувствительными к бактериофагу ФАб-SR75.

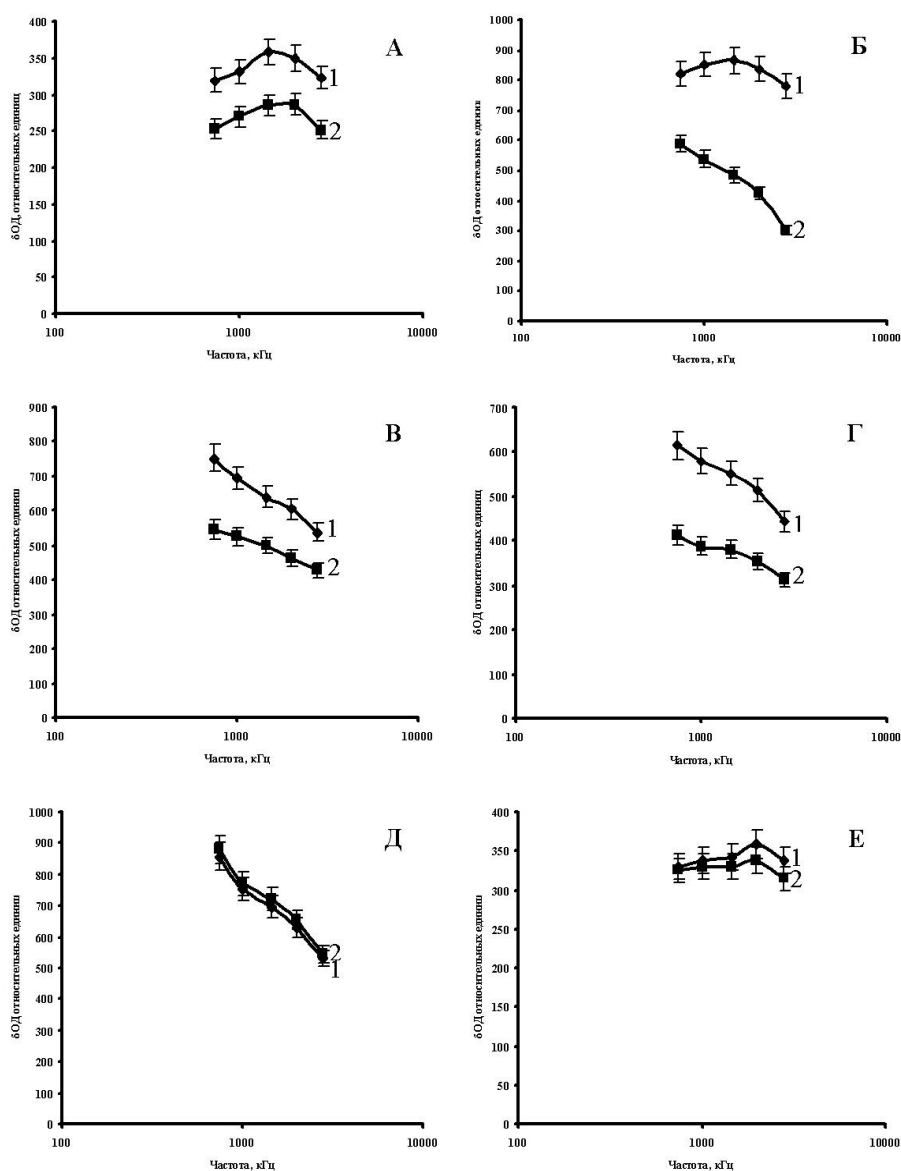


Рис. 3. Изменение величины ЭО сигнала суспензии клеток:  
(А) – *A. irakense* KBC1; (Б) – *A. irakense* KA3; (В) – *A. amazonense* Am14;  
(Г) – *A. lipoferum* RG20a; (Д) – *A. halopraeferans* Au4; (Е) – *A. lipoferum* Sp59b  
(1) – контроль – суспензия клеток без добавления бактериофагов; (2) – суспензия клеток с добавлением бактериофагов

При инфекции клеток *A. halopraeferans* Au4 (рисунок 3 (Д)) и *A. lipoferum* Sp59b (рисунок 3 (Е)) изменений величины ЭО сигнала суспензии клеток не зафиксировано, т.е., можно предположить, что клетки данных штаммов являются устойчивыми к инфекции исследуемым бактериофагом.

На следующем этапе работы представляло интерес сравнить результаты, полученные с помощью метода ЭО анализа микробных суспензий с данными, полученными при помощи стандартного микробиологического метода определения спектра литической активности бактериофагов методом «стекающая капля». При сравнении результатов определения селективности бактериофага ФАб-SR75 по отношению к перечисленным выше штаммам бактерий, полученных с помощью метода ЭО анализа микробных суспензий с данными, полученными с помощью микробиологического метода «стекающая капля», показано, что результаты, полученные двумя независимыми методами, совпадают.

Одним из важных моментов при разработке нового метода является апробация его на нескольких объектах. Поэтому на следующем этапе работы проводились исследования по изучению возможности использования метода ЭО анализа микробных суспензий для определения специфичности действия бактериофага ФАб-SR75 в отношении микробных клеток *Escherichia coli* штаммов В-878, XL-1, *Pseudomonas putida* штаммов С-11 и ВА-11 и *Acinetobacter calcoaceticum* А-122. Условия проведения экспериментов были аналогичны таковым при использовании клеток азоспирилл. Показано, что при инфекции клеток указанных штаммов бактериофагом ФАб-SR75, изменений величины ЭО сигнала не зафиксировано, следовательно, клетки являются устойчивыми к действию изучаемого бактериофага.

## **Выводы**

Таким образом, показано, что изменения ЭО параметров клеточных суспензий, при их инфицировании бактериофагом, значительно отличаются у чувствительных и устойчивых к бактериофагу микроорганизмов. Сравнительные исследования двух подходов определения спектра литического действия бактериофага ФАб-SR75, с помощью метода «стекающей капли» и метода ЭО анализа микробных суспензий показывает полное совпадение полученных результатов. Полученные результаты демонстрируют возможность использование метода ЭО анализа клеточных суспензий для определения чувствительности микробных клеток к бактериофагу и определения специфичности действия бактериофага к



исследуемой культуре. Традиционные микробиологические методы определения спектра литической активности бактериофагов длительны и трудоемки, поэтому использование метода ЭО анализа клеточных суспензий для оперативного решения данного вопроса имеет большие перспективы, поскольку отличается простотой исполнения, и получение результата достигается в течение короткого времени. Полученные результаты в последующем могут быть использованы для развития нового метода определения специфичности действия бактериофагов в отношении микробных клеток.

### Литература

1. Адамс, М. Бактериофаги. М.: Медгиз. 1961. — 521 с.
2. Борисов, Л.Б. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии. 2-е изд., перераб. и доп. М.: Медицина, 1984. — 256 с.
3. Григорьева, Т.М., Кузин, А.И., Азизбемян, Р.Р. Умеренные фаги *Brevibacillus laterosporus* // Биотехнология. 2007. №4. С. 18—24
4. Золотухин, С.Н. Создание и разработка схем применения диагностических биопрепаратов на основе выделенных и изученных бактериофагов энтеробактерий: дис. докт. биол. наук. Ульяновск, 2007. — 322 с.
5. Караваева О.А. Детекция бактерий рода *Azospirillum* с помощью бактериофагов, выделенных из *Azospirillum brasilense* штаммов Sp7 и SR75. дис. ... канд. биол. наук. Саратов, 2012. — 173 с.
6. Манзенюк, О.Ю., Воложанцев, Н.В., Светоч, Э.А. Идентификация бактерий *Pseudomonas mallei* с помощью бактериофагов *Pseudomonas pseudomallei* // Микробиология. 1994. Т. 63, вып. 3. — С. 537—544.
7. Bunin, V.D., Voloshin, A.G. Determination of cell structures, electrophysical parameters, and cell population heterogeneity // J. Colloid Interface Sci. 1996. Vol. 180. P. 122—126.
8. Guliy, O.I., Ignatov, O.V., Markina, L.N., Bunin, V.D., Ignatov, V.V. Action of ampicillin and kanamicin on the electrophysical characteristics of *Escherichia coli* cells // Intern. J. Environ. Anal. Chem. 2005. Vol. 85, No. 12—13. P. 981—992.
9. Ignatov, O.V., Guliy, O.I., Bunin, V.D., Ignatov, V.V. Electrophysical analysis of microbial cells and biosensor technology Intern. J. Environ. Anal. Chem. 2005. Vol. 85, N. 9—11, P. 727—740.

### Literature

1. Adams, M. Bacteriophages. M. Medgiz. 1961. — 521 p.
2. Borisov, LB Guide to laboratory work in microbiology. 2nd ed., Rev. and ext. M.: Medicine, 1984 — 256 p
3. Grigorieva, TM, Kuzin, AI, Azizbekyan, RR Temperate phages *Brevibacillus laterosporus* // Biotechnology. 2007. №4. P. 18—24.
4. Zolotukhin, SN Creation and development of schemes providing diagnostic biologics based on identified and studied bacteriophages enterobacteria: dis. ... doctor. biol. sciences. Ulyanovsk, 2007 — 322 p.
5. Karavayeva OA Detection of bacteria of the genus *Azospirillum* using bacteriophages isolated from *Azospirillum brasilense* strains Sp7 and SR75. dis. ... candidate. biol. sciences. Saratov, 2012 — 173 p.
6. Manzenyuk, OJ, Volozhantsev, NV, Candle, EA Identification of the bacteria *Pseudomonas mallei* using bacteriophages *Pseudomonas pseudomallei* // Microbiology. 1994. T. 63, № 3. P. 537—544.
7. Bunin V.D., Voloshin A.G. Determination of cell structures, electrophysical parameters, and cell population heterogeneity // J. Colloid Interface Sci. — 1996. — Vol. 180. — P. 122—126.
8. Guliy O.I., Ignatov O.V., Markina L.N., Bunin V.D., Ignatov V.V. Action of ampicillin and kanamycin on the electrophysical characteristics of *Escherichia coli* cells // Intern. J. Environ. Anal. Chem. Vol. 85, No. 12—13, 2005. P. 981—992.
9. Ignatov O.V., Guliy O.I., Bunin V.D., Ignatov V.V. Electrophysical analysis of microbial cells and biosensor technology Intern. J. Environ. Anal. Chem. Vol. 85, N. 9—11, 2005. P. 727—740.