



УДК 616.934: 578.233: 53.086

ОЦЕНКА ФАГОЛИЗАБЕЛЬНОСТИ ШТАММОВ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

Д. В. Уткин, П. С. Ерохин, Н. А. Осина, Н. П. Коннов

Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов
E-mail: rusrapl@microbe.ru



В статье представлены экспериментальные данные о применении атомно-силовой микроскопии для определения чувствительности клеток бактерий к специфическим бактериофагам на примере штаммов холерных вибрионов и диагностических холерных фагов. Установлено, что лизис клеток бактерий специфическими фагами происходит в первые 60 мин взаимодействия. Показано, что атомно-силовая микроскопия может быть использована в качестве высокотехнологического инструмента определения фаголизабельности бактерий при внутривидовом типировании штаммов холерных вибрионов.

Ключевые слова: атомно-силовая микроскопия, холера, бактериофаг, диагностика.

Assessment of Phage Lysis of Cholera Vibrios Strains Using Atomic Force Microscopy

D. V. Utkin, P. S. Erokhin, N. A. Osina, N. P. Konnov

The article presents experimental data on the use of atomic force microscopy to determine the sensitivity of bacterial cells to specific bacteriophages, for example, cholera vibrio strains and diagnostic cholera phages. We have determined that lysis of bacterial cells by specific phages occurs during the first 60 minutes of their interaction. It was shown that atomic force microscopy can be used as a high-tech tool for assessment of phage lysis of bacteria for intraspecific typing of cholera vibrios strains.

Key words: atomic force microscopy, cholera, bacteriophage, diagnostic.

В настоящее время атомно-силовая микроскопия (АСМ) используется при разработке новых методических приемов в лабораторной диагностике инфекционных болезней. Одним из практических приложений методов АСМ является определение чувствительности бактерий к литическим фагам путем визуализации процесса лизиса на клеточном уровне. Рядом авторов на модели микроорганизмов I–IV групп патогенности показана возможность использования АСМ для изучения процесса взаимодействия бактериофагов с бактериальной клеткой [1–10].

Лабораторная диагностика холеры предусматривает определение чувствительности выделенной культуры к диагностическим бактериофагам [7]. Чувствительность возбудителя холеры к фагам наряду с другими тестами дифференцирует холерные вибрионы на два биовара: классический и эльтор. Штаммы классического и эльтор биоваров имеют фенотипические и генетические отличия.

Для постановки пробы с бактериофагом используют метод агаровых слоев по Грациа. При этом учет результатов проводят через 3–4 ч и 18–20 ч. В то же время согласно литературным данным, полный цикл внутриклеточного развития вирулентных фагов составляет 35–60 мин [4]. Для сокращения сроков проведения анализа нами изучена потенциальная возможность применения атомно-силовой микроскопии для определения фаголизабельности штаммов холерных вибрионов *Vibrio cholerae*.

Целью данной работы стало изучение взаимодействия холерных бактериофагов со штаммами *V. cholerae* методом атомно-силовой микроскопии.

Материалы и методы

В качестве объектов исследования использовали штаммы *V. cholerae* 33 Дакка классического биовара, В-32 биовара эльтор O1 серогруппы и Р-9741 неO1 (O32) серогруппы, полученные из Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», бактериофаги диагностические холерные классический и эльтор производства ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» (рег. уд. № ФСР 2007/01532).

Штаммы бактерий культивировали в жидкой питательной среде (бульоне Хоттингера pH 7,6) при температуре 37 °C в течение 3 ч.

Клетки бактерий на разных стадиях взаимодействия с фагами фиксировали в 2,5%-ном растворе глутарового альдегида в течение 2 ч при температуре 4 °C в соответствии с методическими рекомендациями «Организация работы при исследовании чистых культур микроорганизмов I–II групп патогенности (возбудителей чумы, холеры, туляремии, бруцеллеза) методами атомно-силовой и электронной микроскопии» (утверждены директором ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» 18.03.2011 г.).

Визуализацию взаимодействия фагов с клетками осуществляли с помощью сканирующего зондового микроскопа Solver P47-PRO (НТ-МДТ, Россия) прерывисто-контактным методом с использованием кремниевых зондов серии NSG01 (НТ-МДТ, Россия) с радиусом кривизны 10 нм, жесткостью 5,1 Н/м, резонансной частотой 150 кГц. Анализ изображений проводили с использованием программы Image Analysis (НТ-МДТ, Россия).



Результаты и их обсуждение

Отбор штаммов *V. cholerae* осуществляли по результатам тестирования методом двухслойных агаровых пластин с использованием холерных диагностических бактериофагов классического и эльтор. В работе использовали штаммы со стабильной чувствительностью к указанным фагам в диагностическом рабочем титре не ниже 1×10^{-2} . В качестве отрицательного контроля использовали штамм неО1 серогруппы, не лизирующийся диагностическими фагами классическим и эльтор.

Для изучения взаимодействия диагностических бактериофагов со штаммами *V. cholerae* 3–4-часовую бульонную культуру бактерий вносили в количестве 100 мкл в четыре микропробирки объемом 1,5 мл «Эппендорф». Затем в каждую пробирку добавляли по 10 мкл препарата бактериофага в рабочем разведении 1×10^{-2} и инкубировали при температуре 37 °С в течение 10, 30, 60, 90 мин (пробирки № 1–4 соответственно). Каждый штамм бактерий изучали в двух повторах – с бактериофагом холерным классическим и бактериофагом холерным эльтор. В качестве контрольного образца использовали взвесь микроорганизмов в отсутствие бактериофагов. После инкубации с бактериофагом пробы

фиксируют раствором глутарового альдегида. Затем пробы центрифугировали со скоростью 6000 об/мин в течение 20 мин для осаждения клеток, удаления несвязавшихся бактериофагов и фиксатора, присутствие которого приводит к залипанию иглы зондового датчика при сканировании методом АСМ. Осадок суспендировали в дистиллированной воде. Процедуру центрифугирования и отмывки препаратов дистиллированной водой повторяли дважды. Полученную суспензию объемом 4 мкл наносили на покровное стекло размером 18 × 18 мм и давали высохнуть на воздухе.

Сканирование образцов осуществляли полуконтактным методом и методом рассогласования при начальной резонансной частоте 190 кГц, разрешении 256 × 256 точек, размере скана 50 × 50 мкм, 25 × 25 мкм, 14 × 14 мкм.

В результате установлено, что при инкубации штамма *V. cholerae* 33 Дакка классического биовара с бактериофагом холерным классическим в течение 10 мин наблюдается адсорбция фаговых частиц на поверхности клеток бактерий (рис. 1, а). Через 30 мин инкубации происходят заметные морфологические изменения клеточной стенки, связанные с максимальной адсорбцией фаговых частиц на поверхности клеток и началом выхода фагов наружу (см. рис. 1, б).

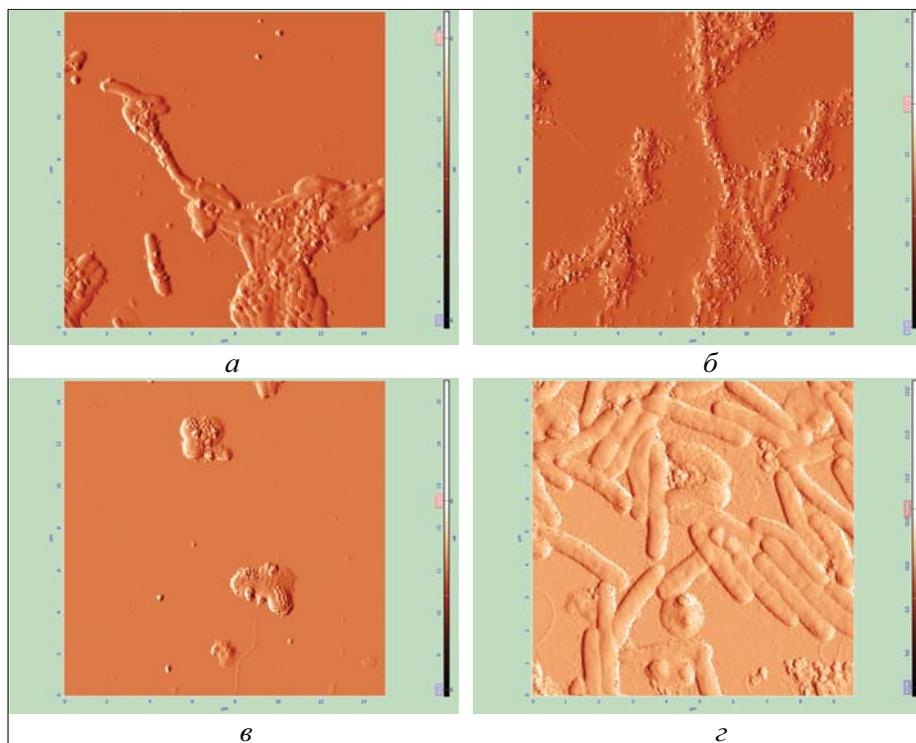


Рис. 1. *V. cholerae* 33 Дакка (классический биовар) при инкубации с бактериофагом холерным классическим в течение: а – 10 мин; б – 30 мин; в – 60 мин; г – в отсутствие бактериофага. Полуконтактный метод рассогласования АСМ. Ув. 3200 × (а–в), 4700 × (г)



Через 60 мин фагового лизиса наблюдали разрушенные клетки бактерий (см. рис. 1, в). Через 90 мин инкубации клетки не обнаруживали. В то же время при инкубации холерных вибрионов классического биовара с бактериофагом холерным эльтор морфологических изменений клеток не обнаруживали. Клетки бактерий даже через 90 мин инкубации с бактериофагом сохраняли мор-

фологию на уровне клеток, культивированных в отсутствие бактериофагов (см.рис. 1, г).

Аналогичные результаты получены при изучении взаимодействия бактериофагов холерных эльтор со штаммом *V. cholerae* эльтор биовара. Клетки бактерий лизировались гомологичным бактериофагом и не взаимодействовали с бактериофагом классическим (рис. 2).

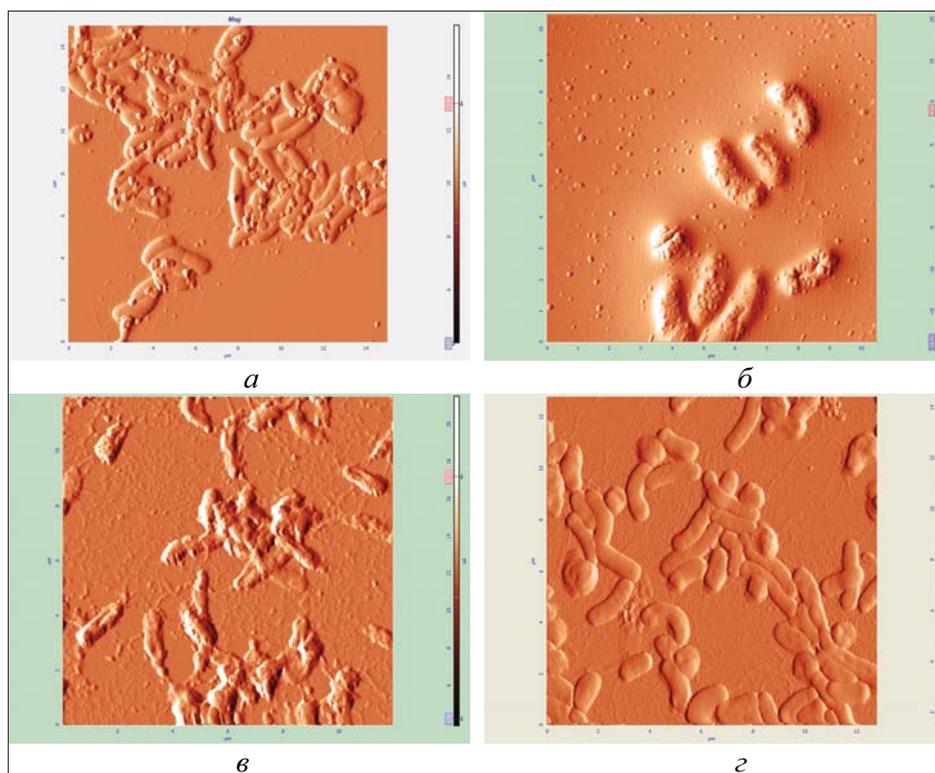


Рис. 2. *V. cholerae* В-23 (биовар эльтор) при инкубации с бактериофагом холерным эльтор в течение: а – 10 мин; б – 30 мин; в – 60 мин; г – в отсутствии бактериофага. Полуcontactный метод рассогласования АСМ. Ув. $3100\times$ (а), $4300\times$ (б), $3800\times$ (в), $3600\times$ (г)

Штамм *V. cholerae* P-9741 неО1 серогруппы не лизировался ни одним из исследуемых бактериофагов (данные не представлены).

Таким образом, методы атомно-силовой микроскопии позволяют на уровне отдельных клеток регистрировать начальные стадии лизиса бактерий специфическими бактериофагами в более короткие сроки, чем традиционные бактериологические методы, время которых лимитировано ростом бактерий в количестве необходимом для визуального учета результата (до 18–24 ч). Это позволяет сократить время фагодиагностики выделенных культур холерного вибриона.

Список литературы

1. Григорьев А. А., Бондарев В. П., Лорисевич И. В., Дармов И. В., Миронин А. В., Золотарев А. Г., По-

горельский И. П., Янов Д. С. Умеренный легионеллезный бактериофаг : обнаружение и свойства // Проблемы особо опасных инфекций. 2007. Вып. 94. С. 46–49.

2. Григорьев А. А., Борисевич И. В., Дармов И. В., Бондарев В. П., Кузнецов С. Л., Миронин А. В., Погорельский И. П., Летаров А. В., Куликов Е. Е., Манькин А. А. Выделение и свойства туляреминого бактериофага ГАЛ // Проблемы особо опасных инфекций. 2008. Вып. 98. С. 33–36.

3. Золотухин С.Н. Электронно-микроскопическое изучение бактериофагов энтеробактерий *Morganella morganii* // Вестн. Рос. академии сельскохоз. наук. 2005. № 6. С. 77–78.

4. Игнатов С. Г. Разработка и применение современных методов изучения и идентификации микроорганизмов с использованием бионанотехнологических подходов : дис. ... д-ра биол. наук. Оболенск, 2010. 229 с.



5. Краевский С. В. Атомно-силовая микроскопия аффинных взаимодействий в микробиологии : дис. ... канд. биол. наук. Оболенск, 2011. 107 с.
6. Кутырев В. В., Коннов Н. П., Волков Ю. П. Возбудитель чумы : ультраструктура и локализация в переносчике. М. : Медицина, 2007. 224 с.
7. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней : практ. руководство / под ред. Г. Г. Онищенко. М. : Медицина, Шико, 2009. 472 с.
8. Campanacci V., Velesler D., Lichière J., Blangy S., Sciarra G., Moineau S., van Sinderen D., Bron P., Cambillau C. Solution and electron microscopy characterization of lactococcal phage baseplates expressed in *Escherichia coli* // J. Struct. Biol. 2010. Vol. 172(1). P. 75–84.
9. Dubrovin E. V., Voloshin A. G., Kraevsky S. V., Ignatyuk T. E., Abramchuk S. S., Yaminsky I. V., Ignatov S. G. Atomic force microscopy investigation of phage infection of bacteria // Langmuir. 2008. Vol. 24(22). P. 13068–13074.
10. Zago M., Scaltriti E., Fornasari M.E., Rivetti C., Grolli S., Giraffa G., Ramoni R. Epifluorescence and atomic force microscopy: Two innovative applications for studying phage-host interactions in *Lactobacillus helveticus* // J. Microbiol. Methods. 2012. Vol. 88 (1). P. 41–46.