

Semenov A.M., Letarov A.V.

Keywords: *enterobacteria, bacteriophages, Hafnia alvei, gafnioz of bee, selection of strains, isolates of phages, lytic activity, specificity, range of lytic activity.*

Hafnia alvei bacteriophages were isolated from sewage of livestock farms and slaughterhouses. We selected 3 strains of specific phages having consistently high-lytic activity, a wide range of lytic activity and the strict species specificity.

УДК 619:616-07

ЭЛЕКТРООПТИЧЕСКИЙ МЕТОД АНАЛИЗА ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ФАГ-БАКТЕРИЯ

Игнатов С.Г., доктор биологических наук, тел. 8(4967)36-07-73, ignatov@obolensk.org

Денисенко Е.А., 8(4967)36-07-73, EgorD1988@gmail.com

*Веревкин В.В., кандидат биологических наук,
8(4967)36-07-73, info@obolensk.org*

*Волошин А.Г., кандидат биологических наук,
8(4967)36-07-73, voloshinag@mail.ru*

ФБУН ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора

Ключевые слова: *Бактериофаги, электрооптика, идентификация микроорганизмов*
Работа посвящена изучению взаимодействия фаг-бактерия с помощью электрооптического метода. Электрооптический метод анализа, основанный на исследовании клеток как электрофизических объектов со слоистой структурой и измерении поляризационных характеристик клеточных структур, представляет собой новый подход к оценке прижизненных физиологических параметров клеток и их гетерогенности. Выявлены электрооптические изменения микробиологических систем, которые могут служить удобным инструментом идентификации микроорганизмов при анализе взаимодействия бактерий с фагами.

Введение. Широкое использование бактериофагов как инструмента в молекулярной биологии, а также их успешное применение в медицине и ветеринарии, биотехнологии и пищевой промышленности требует развития современных методов анализа взаимодействия фаг-бактерия для более успешного понимания и реализации уникальных способностей фагов. С этой точки зрения, весьма привлекательным видится применение электрооптического метода анализа. В основе электрооптического анализа лежит эффект Керра [1]. Суть эффекта состоит в изменении оптических свойств суспензии, в частности суспензии клеток, при воздействии на нее электрического поля. Воздействие электрического поля на суспензию клеток вызывает появление на суспендированных клетках индуцированных зарядов. Их распределение и величина определяются действующим механизмом поляризуемости [2]. В зависимости от частоты электрического поля и электрических свойств клеток, направление преобладающей ориентации клеток может совпадать с направлением вектора электрического поля или быть ортогональным ему. Ориентация клеток длинной осью вдоль светового потока будет приводить к

увеличению сечения рассеяния и уменьшению интенсивности светового потока. Этот метод измерений является прижизненным, он не использует дополнительных меток и не вызывает изменений в исследуемом объекте. Преимуществом данного метода является то, что влияние среды на точность измерения поляризационных параметров является незначительным и предсказуемым. Воздействие на бактериальные клетки измерительной процедуры также незначительно, и при этом микроорганизмы сохраняют свою жизнеспособность. В данной работе было изучено взаимодействие бактериофагов с бактериальными клетками с помощью электрооптического метода.

Материалы и методы исследований. Бактериальные культуры получены из коллекции Государственного Научного Центра Прикладной Микробиологии и Биотехнологии (ГНЦ ПМБ). Лизирующие фаги A157 и 39 для клеток *E. coli* и *S. enteritidis* были любезно предоставлены отделом ГНЦ ПМБ Светоча Э.А.. Рост бактерий осуществляли в жидкой среде – L-бульон (10 г триптона; 5 г дрожжевого экстракта; 5 г хлористого натрия; дистиллированная вода – до 1 л) или на поверхности плотной среды – L-агар (L-бульон с добавлением 18 г сухого агара на 1 л среды). Для получения инокулята из отдельных колоний чистых суточных культур микроорганизмов, выросших на плотной питательной среде (LB-агар), небольшое количество материала с помощью петли переносили в пробирки с жидкой питательной средой. В качестве жидкой среды использовали LB-бульон. Культуру бактерий выращивали на качалке при температуре 37°C и 190 об/мин до плотности 0.6 (длина волны 600 нм, кювета 1 см). Обычно рост осуществляли в течение 20 час, после чего пробирки снимали с качалки и культуру трижды отмывали в физиологическом растворе. Из осадка готовили суспензию клеток с концентрацией 10^9 кл/мл. Измерения проводили при длине волны света 670 нм. Использовали дискретный набор частот ориентирующего электрического поля: 10, 100, 250 и 500 кГц. Электрооптические измерения выполняли на приборе ЭАК (электрооптический анализатор клеток), который обеспечивает непрерывное выполнение четырех базовых операций с минимальным периодом 6 мин. Перед проведением анализа клетки отмывали 20% фосфатным буфером трехкратным центрифугированием при $2800 \times g$ в течение 5 мин, затем ресуспендировали в небольшом количестве деионизированной воды. Для устранения конгломератов суспензию клеток вновь центрифугировали при $1100 \text{ } g$ в течение 1 мин и использовали суспензию, оставшуюся в надосадочной жидкости. Ориентационный спектр (ЧДАП - частотная дисперсия анизотропии поляризуемости) представляли в виде частотной зависимости разности значений оптической плотности суспензий dOD , измеренных при распространении пучка неполяризованного света вдоль и поперек направления ориентирующего поля. Эта разность была нормирована на значение оптической плотности при хаотической ориентации клеток. Есть основания допустить, что общий вид ориентационного спектра при подобранных экспериментальных условиях (длина волны света, амплитуда напряженности ориентирующего электрического поля и др.) определяется, главным образом, частотной зависимостью анизотропии поляризуемости клеток [3].

Результаты исследований и их обсуждение. Была изучена возможность использования электрооптического метода для идентификации микроорганизмов путем анализа специфического взаимодействия микробных клеток с бактериофагом. На рис. 1 представлены ЧДАП контрольной суспензии бактерий *E. coli* и ЧДАП тех же бактерий после 30-минутной инкубации с фагом V18/A157.

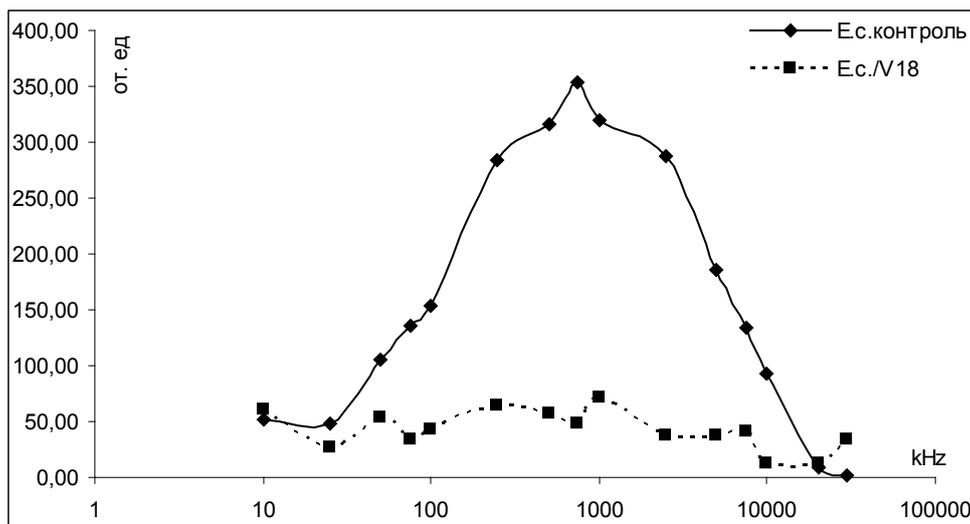


Рис. 1. - ЧДАП после взаимодействия бактериальной суспензии клеток *E. coli* 057 с фагом V18/A157

На рис. 2 показаны ЧДАП контрольной суспензии *S. enteriditis* и суспензии тех же бактерий после 30-минутной инкубации с фагом 39. Здесь же представлена ЧДАП суспензии бактерий *S. enteriditis* после 30-минутной инкубации с фагом V18/A157 – специфичных для *E. coli*, но, очевидно, не взаимодействующих с бактериями *S. enteriditis*. Полученные данные подтверждают идею о возможности использования электрооптического анализатора для идентификации микроорганизмов с использованием специфических фагов.

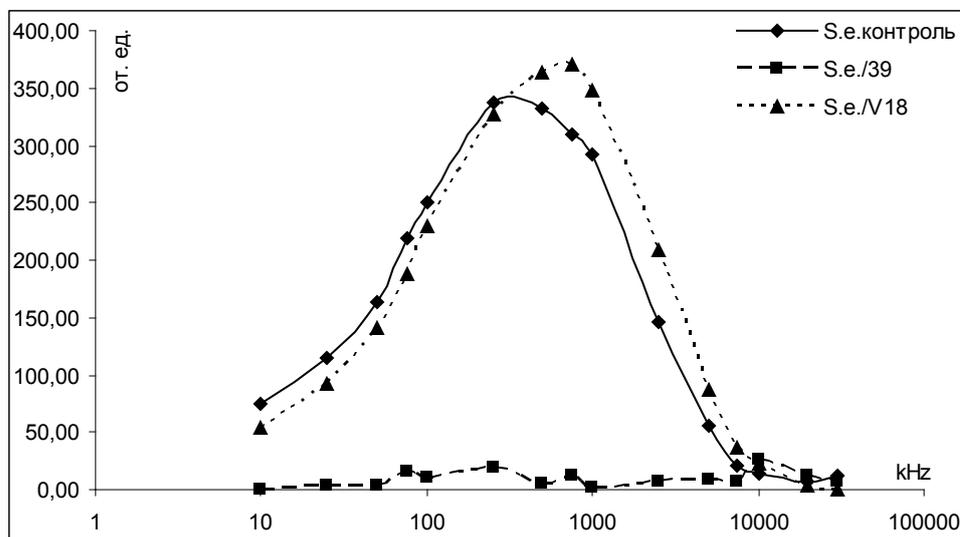


Рис. 2. - ЧДАП после взаимодействия бактериальной суспензии клеток *S. enteriditis* с фагами V18/A157 и 39

Заключение. Проведенные электрооптические исследования показали возможность идентификации микроорганизмов при анализе взаимодействия бактерий с фагами.

Библиографический список

1. Castro-Chacón J.H., Khomenko A.V., Rangel-Rojo R. Phase matched vectorial three-wave mixing in isotropic Kerr media. // Optic. Communcat., 2009, V. 282, N. 7, P. 1422-1426
2. Stoylov S.P., Gyurova A., Georgieva R., Danova S. Do bacteria have an electric permanent dipole moment? // Colloids and Surfaces B, 2008, V. 64, N. 2, P. 255-259.
3. Bunin V. D., Voloshin A. G. Determination of cell structures, electrophysical parameters and cell population heterogeneity. // J. of Colloid and Interface Sci.–1996.–V.180.–P. 122–126.

ELRCTROOPTICAL STUDY OG PHAGE-BACTERIA INTERACTION

Ignatov S.G., Denisenko E.A., Verevkin V.V., Voloshin A.G.

Key words: bacteriophages, electrooptic, identification of bacteria

The electrooptical studies have been used to analyze phage-bacteria interaction. The possibility of electrooptical measurements for identification of bacteria has been investigated.

УДК 579.61

ПОИСК ЛИЗОГЕННЫХ ШТАММОВ ВАГИНАЛЬНЫХ ЛАКТОБАЦИЛЛ

*Исаева А.С. *, Летаров А. В. *, Ильина Е.Н. **,*

*Муравьёва В.В. ***, Анкирская А.С. ****

** ФГБУН Институт микробиологии им. С. Н. Виноградского РАН, Москва, letarov@gmail.com, isaeva_alina@list.ru*

*** ФГУ НИИ Физико-химической медицины, Москва*

**** ФГУ Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И.Кулакова Минздравооцразвития России, Москва*

Ключевый слова: *Лактобактерии, бактериофаги, MALDI-TOF масс-спектрометрия, митомициновая индукция профагов*

В результате проведенных исследований удалось показать высокую степень видовой и внутривидовой гомогенности индивидуальных популяций влагалищных лактобацилл. Кроме того с помощью ПЦР-системы были обнаружены лизогенные изоляты лактобактерий. Детекция свободной фаговой частицы после митомициновой индукции лизогенных культур может говорить в пользу гипотезы о роли фаговой инфекции в развитии бактериального вагиноза.

Введение

С момента первого описания в 1892г. А. Дедерлейном лактобактерий как преобладающего микроба нормального влагалищного биоценоза [1], их значимость в поддержании колонизационной резистентности женской мочеполовой системы и до настоящего времени остается неоспоримой. Известно также, что первыми признаками вагинальных дисбиотических нарушений является снижение концентрации лактофлоры или потеря ею биологических свойств.