

Оценка воздействия бактериофагов на микробные клетки методом электрооптического анализа

*О. И. ГУЛИЙ^{1,2}, О. А. КАРАВАЕВА¹, О. С. ЛАРИОНОВА²,
С. В. ЛАРИОНОВ², Л. Г. ЛОВЦОВА², К. Ю. УСКОВ², В. Д. БУНИН³

¹ Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов

² Саратовский государственный аграрный университет им. Н. И. Вавилова, Саратов

³ EloSystems GbR, Берлин

Electro-optical Analysis of the Effects of Bacteriophages on Microbial Cells

* O. I. GULIY^{1,2}, O. A. KARAVAEVA¹, O. S. LARIONOVA², S. V. LARIONOV², L. G. LOVTSOVA², K. YU. USKOV², V. D. BUNIN³

¹ Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Saratov

² Saratov State Vavilov Agrarian University, Saratov

³ EloSystems GbR, Berlin

Исследовано влияние бактериофага ΦAb-Sp7 на изменение электрооптических (ЭО) параметров суспензий клеток в отношении 14 штаммов бактерий рода *Azospirillum*, 2 штаммов рода *Niveispirillum*, 2 штаммов *Escherichia coli* и 2 штаммов *Pseudomonas putida*, а также клеток *Acinetobacter* и *Nitrospirillum*. Показано, что ЭО анализатор позволяет разграничивать ситуации, когда происходит взаимодействие бактериальных клеток со специфичным бактериофагом от контрольных экспериментов, когда такое взаимодействие отсутствует. Регистрация инфекции микробной клетки бактериофагом методом ЭО анализа служит информативным параметром наличия или отсутствия чувствительности клетки к изучаемому бактериофагу. Полученные результаты позволяют определить критерий специфического взаимодействия, который заключается в изменении величины оптического сигнала не менее ~10%, при добавлении в суспензию микробных клеток определённого количества бактериофагов. Результаты представляют интерес с практической точки зрения, поскольку могут быть использованы для создания метода экспресс-оценки воздействия бактериофагов на микробные клетки.

Ключевые слова: бактериофаги, метод электрооптического анализа клеточных суспензий.

The effect of the ΦAb-Sp7 bacteriophage on the change in the electro-optical (EO) parameters of cell suspensions with respect to 14 strains of bacteria of the genus *Azospirillum*, 2 strains of the genus *Niveispirillum*, 2 strains of *Escherichia coli*, and 2 strains of *Pseudomonas putida*, as well as *Acinetobacter* and *Nitrospirillum* cells was studied. It is shown that the EO analyzer makes it possible to differentiate situations when bacterial cells interact with a specific bacteriophage from control experiments with no such interaction. The registration of a microbial cell infection with a bacteriophage by the EO analysis method serves as an informative parameter of the presence or absence of cell sensitivity to the bacteriophage studied. The obtained results make it possible to determine the criterion for a specific interaction, which consists of a change in the magnitude of the optical signal by not less than ~10% when a certain amount of bacteriophages is added to the suspension of microbial cells. The results are of interest from a practical point of view since they can be used to create a method for rapid assessment of the effects of bacteriophages on microbial cells.

Keywords: bacteriophages, electro-optical analysis of cell suspensions.

Введение

Предположение, что бактериофаги, вызывающие лизис патогенных для человека и животных бактерий, могут быть использованы в качестве терапевтического средства было высказано ещё в 1917 г. Д'Эррелем. Эта гипотеза послужила толчком к развитию фаготерапии [1, 2]. В 1921 г. бактериофаги впервые были применены в терапевтических целях. Р. Брийонг и Д. Майсин в своих отчётах сообщали об успешном применении стафи-

лококкового фага в лечении инфекционных заболеваний кожи. С тех пор препараты бактериофагов активно использовались для лечения заболеваний бактериальной этиологии. Однако с открытием антибиотиков и налаживанием их производства в промышленных масштабах разработка фаговых препаратов отодвинулась на второй план [3]. В бывшем СССР развитие фаготерапии связано с именем Г. Г. Элиава. По его инициативе был создан Институт Бактериофагов (г. Тбилиси, Грузия), где разрабатывались лечебно-профилактические препараты на основе бактериофагов, которые успешно применялись в борьбе с рядом инфекционных заболеваний. Бактериофаги являют-

© Коллектив авторов, 2018

Адрес для корреспонденции: 410049 г. Саратов, проспект Энтузиастов, 13. Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН

ся эффективным средством борьбы с рядом возбудителей (в том числе с теми, которые устойчивы к действию антибиотиков) [4–7]. Эффективность бактериофагов обусловлена их специфичным действием, а также простотой подготовки препаратов и низкой стоимостью по сравнению с разработкой новых антибиотиков против устойчивых штаммов бактерий.

На сегодняшний день из-за увеличения количества штаммов микроорганизмов, устойчивых к антибиотикам, вновь проявляется интерес к фототерапии. При этом понимание особенностей взаимодействия бактериофагов с микробными клетками и определение литической активности бактериофагов является необходимым условием для их успешного применения. Для определения спектра литического действия бактериофагов традиционно используется ряд стандартных микробиологических методов, таких как высеивание на агаризованную среду методом двуслойного агара [8–10], метод «фаговой дорожки» [11–12] и метод реплик [8, 13–14].

Кроме того, для определения литической активности бактериофагов используют современные методы, такие как:

- метод электроориентационной спектроскопии, основанный на регистрации изменения оптических свойств микробной суспензии под влиянием переменного электрического поля [15];

- метод флуоресцентной спектроскопии, основанный на внесении в систему мембранотропного зонда и регистрации интенсивности флуоресценции [16];

- методы с использованием биосенсоров на основе бактериофагов, регистрирующих взаимодействие инфекционных агентов с клетками-мишенями [17–18].

В связи с высокой востребованностью исследования взаимодействия бактериофагов с микробными клетками для определения спектра литической активности бактериофагов, развитие новых и совершенствование используемых методов имеет значительный потенциал. Регистрация инфекции микробной клетки бактериофагом является информативным параметром наличия/или отсутствия чувствительности клетки к изучаемому бактериофагу.

Методы электрооптического (ЭО) анализа все чаще находят применение для решения проблем, возникающих как в биотехнологии, так и в прикладной микробиологии. 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 отсут-

ствии специфичного взаимодействия действующего агента с бактериальными клетками ЭО параметры клеточной суспензии после его добавления остаются неизменными. И наоборот, специфичное взаимодействие вещества с клетками приводит к выраженному изменению величины ЭО сигнала [19–21].

Цель работы — регистрация взаимодействия микробных клеток с бактериофагами методом ЭО анализа для определения спектра литического действия бактериофагов.

Материал и методы

Штаммы бактерий и условия их культивирования. В работе использовали микробные клетки *Azospirillum brasilense* штаммов Br 14, Cd, Jm6B2, KR77, S17, S27, Sp7 (IBPPM 150), Sp107, Sp245, SR55, SR75 (IBPPM 22), *A. halopraeferans* Au4, *A. lipoferum* штаммов SR65 (IBPPM 44), Sp59b (IBPPM 173) и RG20a, *Niveispirillum irakense* штаммов KBC1 и KA3, *Nitrospirillum amazonense* Am14, *Escherichia coli* штаммов B-878, XL-1, полученные из коллекции ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН, а также *Pseudomonas putida* штаммов BA-11, C-11 и *Acinetobacter calcoaceticum* A-122, полученные из коллекции лаборатории Саратовского НИИ «Биокатализа» (г. Саратов).

Штаммы *E. coli*, *P. putida* и *A. calcoaceticum* хранили при 4°C на питательной среде LB, содержащей: агар-агар — 30 г/л, дрожжевой экстракт (DIFCO, США) — 5 г/л; пептон (Becton, Dickinson and Company, Франция) — 10 г/л; NaCl (Becton, Dickinson and Company, Франция) — 5 г/л. Данные штаммы обновляли каждую неделю [22]. Микробные клетки пересеивали один раз в две недели и хранили при 4°C.

Для экспериментов бульонные культуры всех штаммов микроорганизмов получали с использованием жидкой питательной среды LB следующего состава: NaCl — 5 г/л; дрожжевой экстракт — 5 г/л; пептон — 10 г/л. По 50 мл питательной среды разливали в колбы объемом 250 мл и производили стерилизацию в автоклаве в течение 30 мин при давлении 1 атм. Затем при помощи бактериологической петли производили посев культур с чашки Петри на жидкую стерильную LB. Культивирование проводили на шейкере при температуре 30±1°C в течение 18 ч и интенсивности перемешивания 160 об/мин.

Для определения титра бактериофагов методом двухслойного агара по Грациа использовали полужидкую среду LB, содержащую 7 г/л агар-агара и твердую, содержащую 15 г/л или 30 г/л агар-агара [8].

Выделение бактериофагов азоспирилл. Для выхода бактериофагов из клеток азоспирилл на клетки воздействовали индуктирующим фактором (низкой температурой), как описано в работе С. С. Макарихиной с соавт. [23].

Определение количества вирусных частиц. Для определения количества частиц вирусов использовали спектрофотометрический метод. Измерения проводили на спектрофотометре UV-VIS Specord BS 250 (Analytik Jena, Германия) в Центре коллективного пользования научным оборудованием в области физико-химической биологии и нанобиотехнологии «Симбиоз» Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук (ИБФРМ РАН). Исходя из соотношения, что 2×10^{14} фаговых частиц/мл соответствуют 30 опт. ед. [24], для расчетов использовали следующую формулу: $(A_{269} - A_{320}) \times 10^{14} / 15$, где A_{320} — оптическая плотность суспензии фагов при длине волны электромагнитного излучения 320 нм, A_{269} — оптическая плотность суспензии при длине волны 269 нм.

Для подсчета титра бактериофага также использовали метод двухслойного агара, предложенный Грациа [8]. Среду LB,

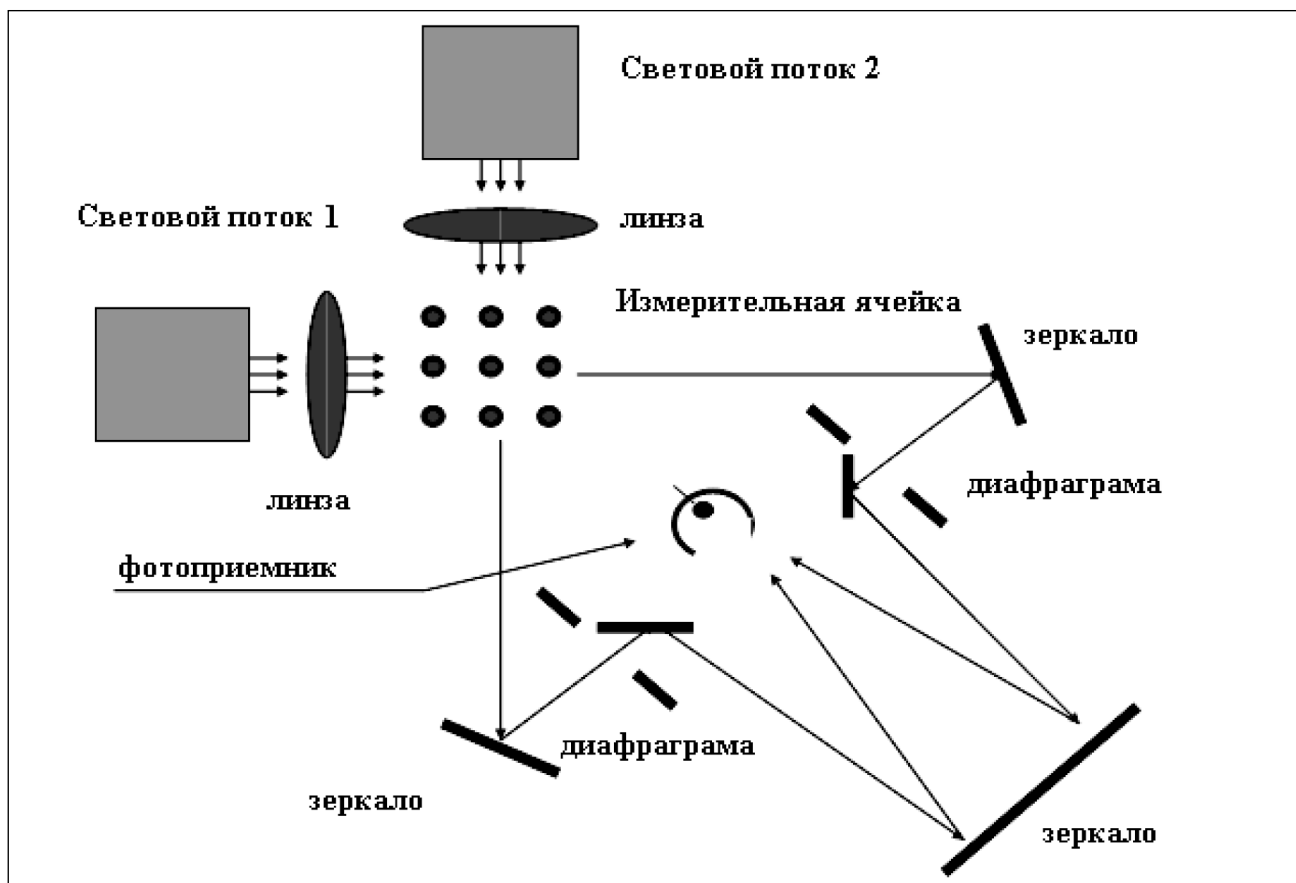


Рис. 1. Схема оптической части электрооптического анализатора ELOAnalyzer.

содержащую 1,5% агара, разливали по чашкам Петри, давали полностью застыть, а затем подсушивали приоткрытые чашки Петри в течение 20 мин под ультрафиолетовой лампой. Пробирки с 2,5 мл стерильной 0,7% агаризованной средой нагревали до температуры 90°C, а затем охлаждали до 45–48°C. Затем добавляли в них 500 мкл фаговой суспензии и 200 мкл 18-часовой бульонной культуры. После тщательного и быстрого перемешивания смесь выливали на поверхность питательной LB- среды с 1,5% агаром и равномерно распределяли её по всей поверхности чашки. Инкубацию проводили в течение 18–20 ч при температуре 32°C. Далее выполняли подсчёт негативных колоний, умножая при этом получившееся число на степень разведения суспензии фага. Таким образом, получали титр бактериофага, выраженный в количестве фаговых частиц в 1 мл жидкости [8].

Определение спектра литической активности бактериофагов. Выращенные в жидких питательных средах бактериальные культуры наносили на поверхность 1,5% агаризованной LB-среды. Стерильным шпателем распределяли по всей поверхности питательной среды бактериальную взвесь и подсушивали чашки Петри в термостате 15–20 мин. На наклонную поверхность засеянной таким образом питательной среды наносили каплю бактериофага так, чтобы она стекла на противоположную сторону чашки Петри. Инкубировали засеянные чашки Петри при 32°C в течение 18–20 ч. В качестве контроля использовали чашки Петри с культурами без нанесения бактериофага.

Результат считали положительным в случае образования прозрачной зоны лизиса на бактериальном газоне в том месте, куда наносили суспензию бактериофага [8, 25].

Проведение ЭО анализа клеточных суспензий. Перед проведением электрооптического анализа осуществляли трехкратную отмывку центрифугированием клеток всех используемых штаммов от культуральной среды в течение 5 мин при 2800 g. Для отмывки микробных клеток использовали дистиллированную воду с электропроводностью 1,6 мС/см. Электропроводность определяли с помощью кондуктометра HANNA HI 8733 (Румыния). Полученную суспензию вновь центрифугировали в течение 1 мин при 110 g для устранения конгломератов. Оптическую плотность полученного супернатанта доводили дистиллированной водой до значения $OD_{670}=0,42–0,45$, что соответствовало $4,5 \times 10^8$ клеток/мл. Ориентационные спектры клеток измеряли на электрооптическом анализаторе ELOAnalyser (EloSystem GbR, Германия). Параметры измерения: напряженность электрического поля 93,1 В/см, длина волны света 670 нм (относительно вакуума), время приложения электрического поля 3,0 сек. На рис. 1 приведено схематическое изображение оптической части анализатора.

Объём измерительной ячейки составлял 1 мл, концентрация клеток (в единицах оптической плотности) — $OD_{670}=0,42–0,45$. Количество клеток определяли стандартным методом подсчёта с использованием прямой световой микроскопии. В экспериментах оперировали дискретным набором частот ориентирующего электрического поля: 740, 1000, 1450, 2000 и 2800 кГц.

Логарифмическая зависимость разности значений оптической плотности суспензий OD, измеренной при распространении пучка неполяризованного света вдоль и поперек направления ориентирующего поля, от частоты представлялась в виде ориентационных спектров. Эта разность была нормирована на значение оптической плотности при хаотической ориентации клеток [26, 27].

Для каждой серии экспериментов проводили не менее пяти измерений. Анализ и представление данных осуществляли при помощи программы Microsoft Excel 2010 и стандартных методов статистической обработки.

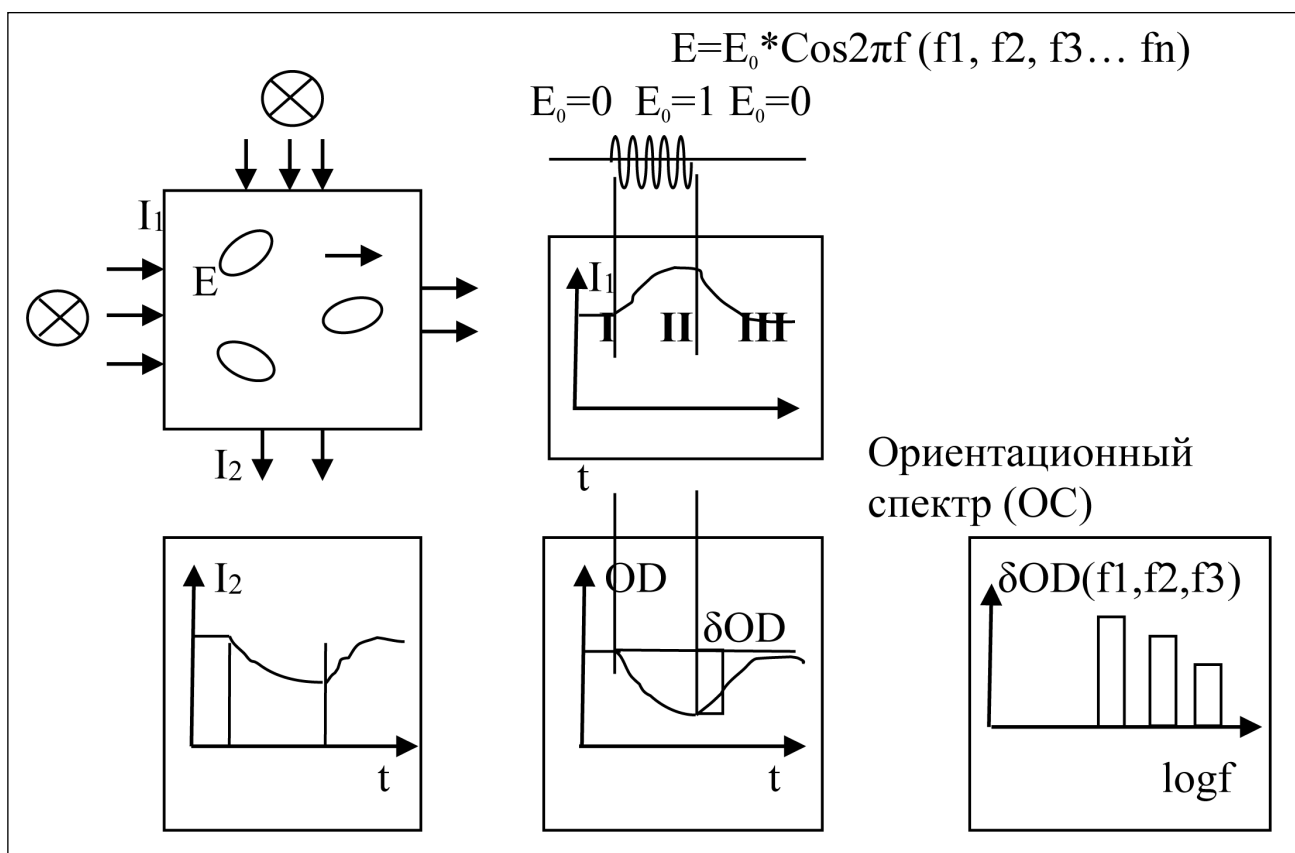


Рис. 2. Схема изменения оптической плотности микробной суспензии в процессе ЭО эксперимента.

Примечание. I — момент приложения электрического поля (хаотическая ориентация клеток); II — момент выключения поля (клетки в ориентированном состоянии); III — момент возвращения клеток в состояние с хаотической ориентацией.

Результаты и обсуждение

Известно, что некоторые виды бактериофагов обладают широким спектром литической активности и инфицируют лишь определённые штаммы одного вида бактерий, тогда как другие характеризуются множественной вирулентностью [28]. Основная идея экспериментов заключалась в демонстрации возможности использования метода ЭО анализа для регистрации инфекции микробных клеток бактериофагами и определения спектра литической активности бактериофагов.

Принцип метода ЭО анализа микробных суспензий заключается в том, что изменения оптических свойств микробной суспензии регистрируются под влиянием переменного электрического поля. Измерение зарядов, индуцированных электрическим полем, происходит 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 [29]. Схема изменения оптической плотности микробной суспензии в процессе ЭО эксперимента представлена на рис. 2.

Необходимо отметить, что все разрабатываемые методы регистрации взаимодействия микроб-

ных клеток с бактериофагами универсальны и могут быть использованы для определения активности вирусов, относящихся к различным группам.

В качестве исследуемого бактериофага в работе использовали бактериофаг ФAb-Sp7, который ранее был выделен авторами из микробных клеток *A. brasiliense* Sp7, основные свойства бактериофага описаны в работе [30].

Оценку воздействия бактериофага ФAb-Sp7 с помощью метода ЭО анализа определяли в отношении микробных клеток, полученных из коллекции ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН: *Azospirillum brasilense* штаммов Cd, Sp107, Sp245, Jm6B2, Br14, KR77, S17, S27, SR55, SR75; *A. lipoferum* штаммов Sp59b, SR65 и RG20a; *A. halopraeferans* Au4; *Nitrospirillum amazonense* Am14; *Niveispirillum irakense* штаммов KBC1 и KA3, а также бактерий: *Escherichia coli* штаммов XL-1 и B-878; *Pseudomonas putida* штаммов C-11 и BA-11; *Acinetobacter calcoaceticum* A-122.

Выбор клеток *Niveispirillum irakense* штаммов KBC1 и KA3 и *Nitrospirillum amazonense* Am14 обусловлен их близкородственностью с клетками азоспирилл. До недавнего момента они относились к роду *Azospirillum*, но были переклассифицированы [31]. Выбор клеток *Escherichia*,

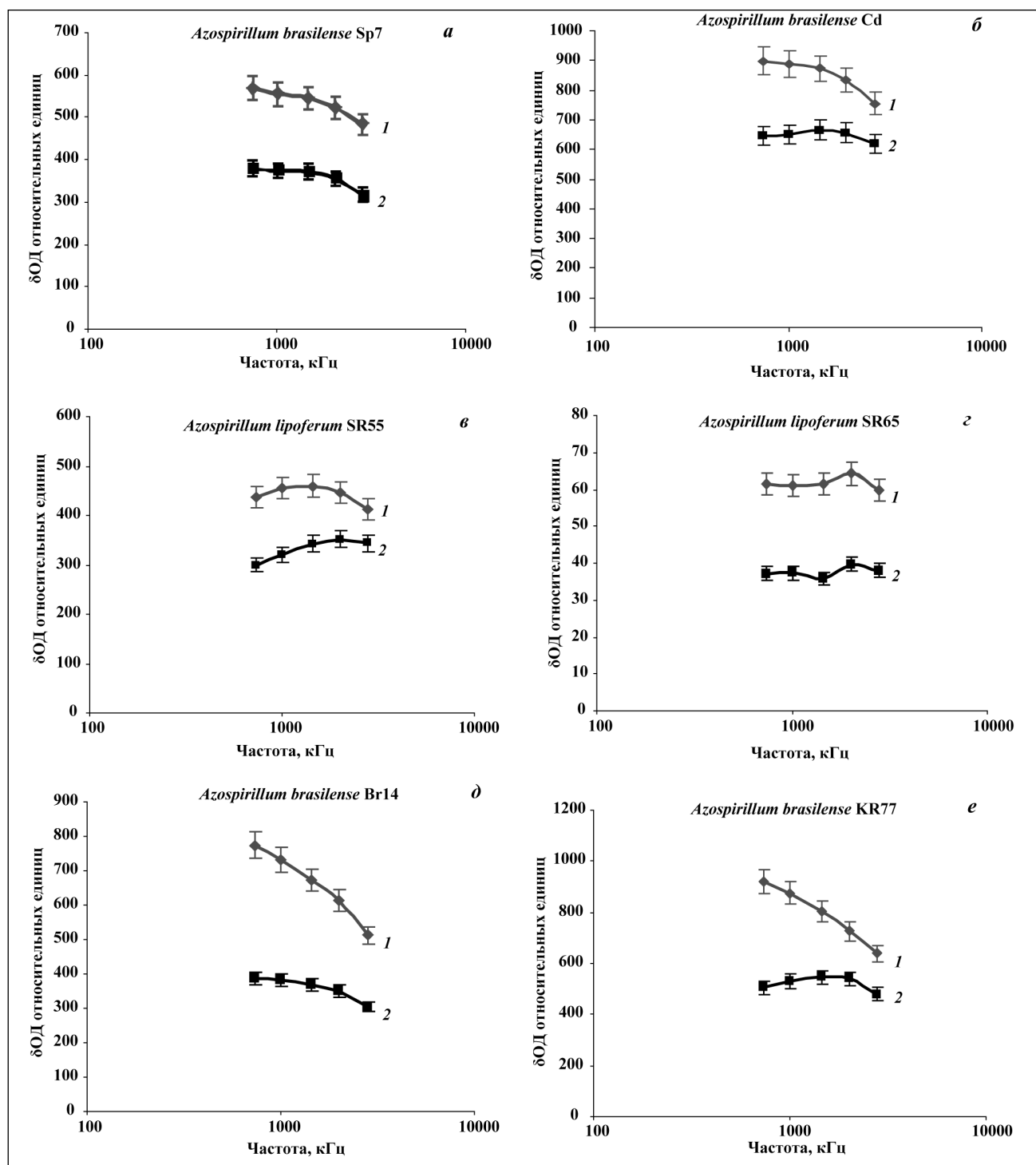


Рис. 3. Изменение величины ЭО сигнала суспензии клеток.

а – *A. brasilense* Sp7; б – *A. brasilense* Cd; в – *A. brasilense* SR55; г – *A. lipoferum* SR65; д – *A. brasilense* Br14; е – *A. brasilense* KR77 при их инфекции бактериофагом ФAb-Sp7: 1 – контроль – суспензия клеток без добавления бактериофагов; 2 – суспензия клеток с добавлением бактериофага.

Pseudomonas и *Acinetobacter* обусловлен иным таксономическим положением.

Согласно предварительным экспериментам по оптимизации условий проведения анализа (выбор частоты измерения, времени взаимодействия, количества микробных клеток в измерительной ячейке) были выбраны следующие условия

измерений: напряженность электрического поля 17 В/см при времени приложения электрического поля 16 сек и проведение измерений на частотах 740, 1000, 1450, 2000 и 2800 кГц. Поскольку ранее нами было установлено, что значительные изменения ЭО параметров суспензии клеток происходят при внесении в неё бактериофагов из расчёта

20 фагов на бактерию, в данной серии экспериментов применялись те же условия.

С помощью ЭО датчика исследовали суспензии клеток при их инфекции бактериофагом ФАб-Sp7. Для этого в измерительную ячейку вносили микробные клетки и регистрировали аналитический сигнал. Затем в суспензию вносили исследуемый бакте-

риофаг и регистрировали соответствующие изменения ЭО сигнала. Показано, что при инфекции микробных клеток *A. brasilense* штаммов Sp7 (рис. 3, а), Cd (рис. 3, б), SR55 (рис. 3, в), Br14 (рис. 3, д), KR77 (рис. 3, е), Sp107 (рис. 4, а) и S27 (рис. 4, б) и *A. lipoferrum* SR65 (рис. 3, з) бактериофагом ФАб-Sp7 происходит изменение величины ЭО сигнала.

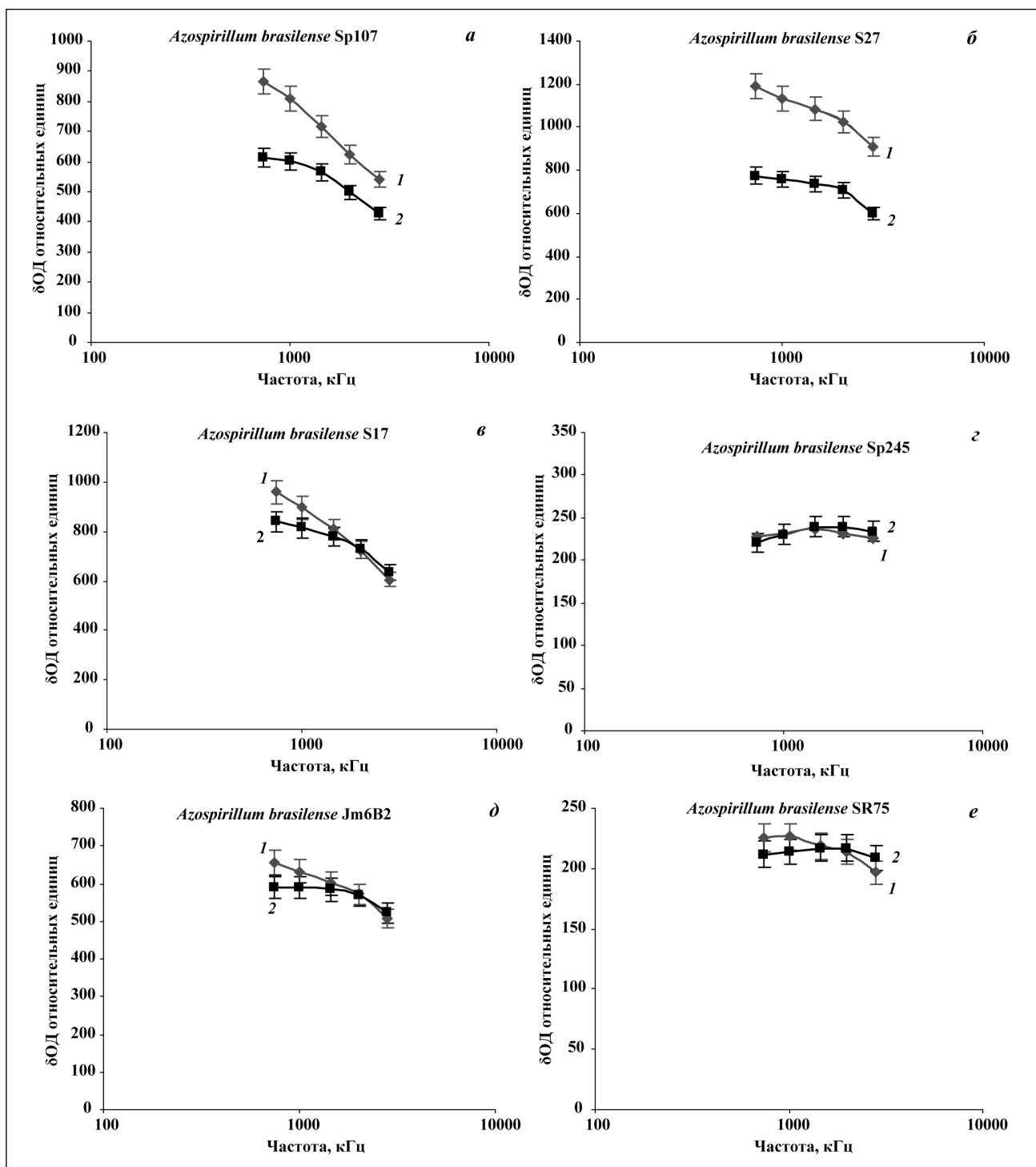


Рис. 4. Изменение величины ЭО сигнала суспензии клеток.

а – *A. brasilense* Sp107; б – *A. brasilense* S27; в – *A. brasilense* S17; г – *A. brasilense* Sp245; д – *A. brasilense* Jm6B2; е – *A. brasilense* SR75 при их инфекции бактериофагом ФАб-Sp7: 1 – контроль – суспензия клеток без добавления бактериофагов; 2 – суспензия клеток с добавлением бактериофагов.

При изучении воздействия бактериофага ФАb-Sp7 на бактерии *A. brasilense* штаммов S17 (рис. 4, в), Sp245 (рис. 4, г), Jm6B2 (рис. 4, д), SR75 (рис. 4, е) показано, что величина ЭО сигнала суспензии клеток значительно не изменяется.

На следующем этапе проверялась активность бактериофага ФАb-Sp7 в отношении представи-

телей других видов азоспирилл, при этом в качестве объектов использовались клетки *A. amazonense* Am14, *A. halopraeferans* Au4, *Niveispirillum irakense* штаммов KBC1 и KA3, *A. lipoferum* штаммов Sp59b и RG20a.

Специфичные изменения ЭО параметров клеточных суспензий под действием бактериофага

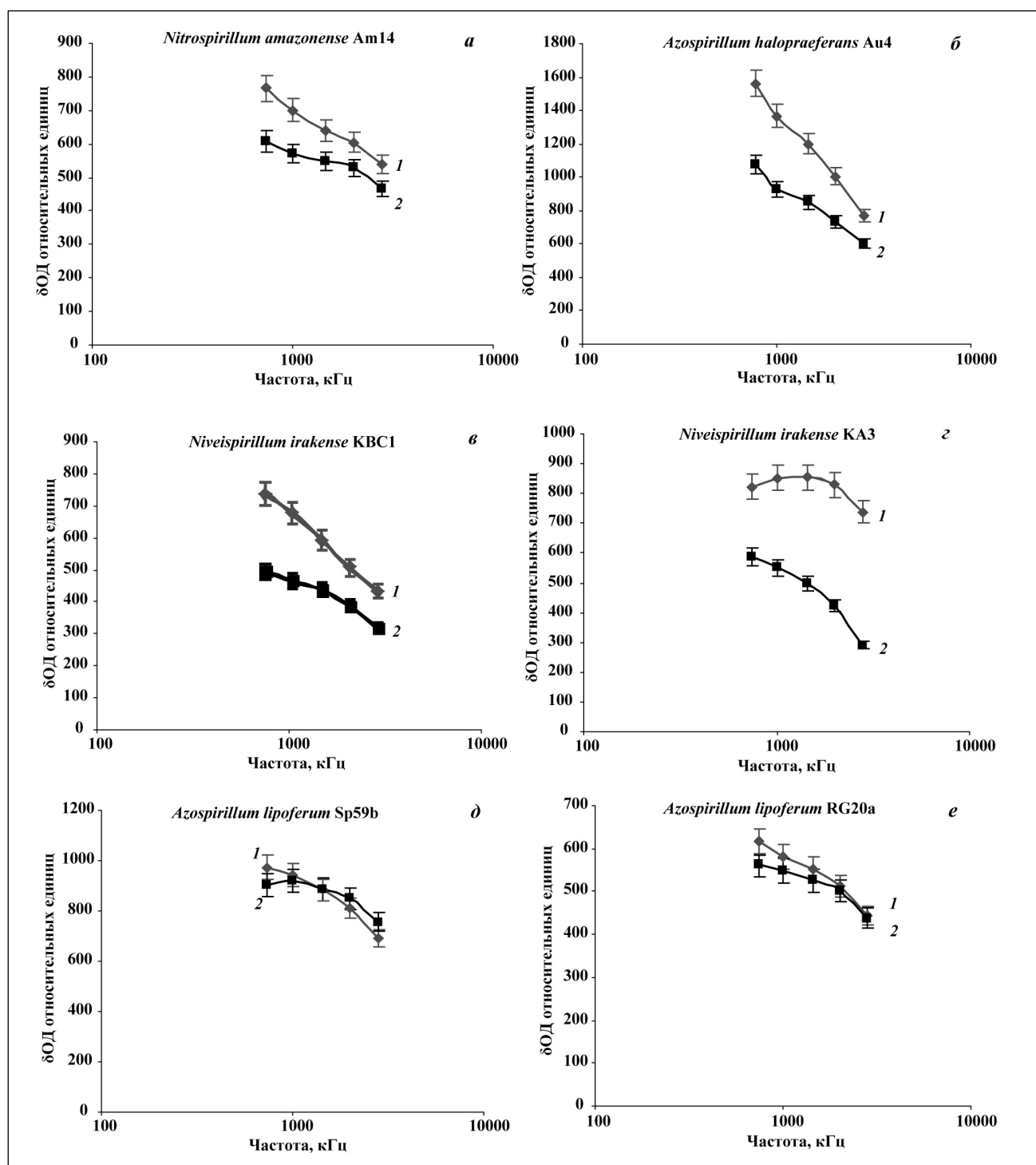


Рис. 5. Изменение величины ЭО сигнала суспензии клеток.

а – *Nitrospirillum amazonense* Am14; б – *A. halopraeferans* Au4; в – *Niveispirillum irakense* KBC1; г – *N. irakense* KA3; д – *A. lipoferum* Sp59b; е – *A. lipoferum* RG20a при взаимодействии с бактериофагом ФАb-Sp7: 1 – контроль – суспензия клеток без добавления бактериофагов; 2 – суспензия клеток с добавлением бактериофагов

ΦAb-Sp7 происходят у микробных клеток *Nitrospirillum amazonense* Am14 (рис. 5, а), *A.halopraeferans* штамма Au4 (рис. 5, б), *Niveispirillum irakense* штаммов KBC1 (рис. 5, в) и КА3 (рис. 5, г).

Показано, что у суспензий клеток *A.lipoferum* штаммов Sp59b (рис. 5, д) и RG20a (рис. 5, е) изменений ЭО параметров при их воздействии исследуемого бактериофага не происходит.

Проведённые исследования продемонстрировали отсутствие активности бактериофага ΦAb-Sp7 по отношению к бактериям гетерологичных родов: *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*.

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» (таблица). Как видно из представленных данных результаты, полученные двумя независимыми методами, совпадают.

Поскольку данные ЭО анализа микробных суспензий подтверждены стандартным микробиологическим методом определения селективности действия бактериофага, можно утверждать, что микробные клетки *A.brasilense* Sp7, Cd, Br14, SR55, Sp107, S27, *Nitrospirillum amazonense* Am14, *A.halopraeferans* Au4, *A.lipoferum* SR65, *Niveispirillum irakense* штаммов KBC1 и КА3 являются чувствительными к изучаемому бактериофагу. Бактерии *A.brasilense* штаммов Sp245, Jm6B2, SR75, S17, *A.lipoferum* штаммов Sp59b и RG20a, *Escherichia coli* штаммов XL-1 и B-878, *Pseudomonas putida* C-11 и BA-11, *Acinetobacter calcoaceticum* A-122, устойчивы к фагу ΦAb-Sp7.

Полученные данные согласуются с результатами группы Е. Л. Жиленкова [16]. Авторами при помощи электро-ориентационной спектроскопии показано, что при взаимодействии микобактериофага МТРН11 с клеткой-хозяином происходит уменьшение величины ЭО эффекта, что связано с изменением электрофизических свойств суспензии клеток. Было установлено, что регистрируемые датчиком изменения ЭО параметров, значительно отличаются у суспензий клеток устойчивых и чувствительных штаммов.

Таким образом, в результате исследований на примере бактериофага ΦAb-Sp7 показана возможность использования метода ЭО анализа для оценки воздействия бактериофагов на микробные клетки. Показано, что специфичные изменения ЭО параметров клеточных суспензий под действием бактериофага происходят только у микробных клеток, чувствительных к изучаемому бактериофагу, т. е. ЭО анализатор позволяет разграничивать ситуации, когда происходит взаимодействие бактериальных клеток со

Сравнение данных по определению литической активности бактериофага ΦAb-Sp7, полученных методами «стекающая капля» и электрооптического анализа микробных суспензий

Микроорганизмы	Определение литической активности бактериофага ΦAb-Sp7	
	метод «стекающая капля»	метод ЭО анализа микробных суспензий
<i>A.brasilense</i> Sp7	+	+
<i>A.brasilense</i> Cd	+	+
<i>A.brasilense</i> Sp107	+	+
<i>A.brasilense</i> Sp245	—	—
<i>A.brasilense</i> Jm6B2	—	—
<i>A.brasilense</i> Br14	+	+
<i>A.brasilense</i> KR77	+	+
<i>A.brasilense</i> S17	—	—
<i>A.brasilense</i> S27	+	+
<i>A.brasilense</i> SR55	+	+
<i>A.brasilense</i> SR75	—	—
<i>A.halopraeferans</i> Au4	+	+
<i>A.lipoferum</i> Sp59b	—	—
<i>A.lipoferum</i> RG20a	—	—
<i>A.lipoferum</i> SR65	+	+
<i>Nitrospirillum amazonense</i> Am14	+	+
<i>Niveispirillum irakense</i> KBC1	+	+
<i>Niveispirillum irakense</i> КА3	+	+
<i>P.putida</i> C-11	—	—
<i>P.putida</i> BA-11	—	—
<i>E.coli</i> XL-1	—	—
<i>E.coli</i> B-878	—	—
<i>Acinetobacter calcoaceticum</i>	—	—

Примечание. «+» — наличие лизиса бактериальной культуры для метода «стекающая капля» / наличие разницы в сигнале между контролем и экспериментом для метода ЭО анализа; «—» — отсутствие лизиса бактериальной культуры для метода «стекающая капля» / отсутствие разницы в сигнале между контролем и экспериментом для метода ЭО анализа.

специфичным бактериофагом от контрольных экспериментов, когда такое взаимодействие отсутствует. Зафиксированные изменения ЭО параметров клеток, чувствительных к действию бактериофага, вероятно, связаны с различными повреждениями внутриклеточных структур, обусловленными адсорбцией бактериофага на поверхности микробной клетки, выходом вирусной ДНК в цитоплазму клеток-хозяина и процессами, происходящими в цитоплазме [32]. Регистрация инфекции микробной клетки бактериофагом с помощью метода ЭО анализа может служить информативным параметром наличия или отсутствия чувствительности клетки к изучаемому бактериофагу. Полученные данные позволяют определить критерий специфичного взаимодействия, который заключается в изменении величины оптического сигнала не менее ~10%, при добавлении в суспензию клеток определённого количества бактериофагов. С

практической точки зрения, результаты могут быть использованы для создания метода экс-

пресс-оценки воздействия бактериофагов на микробные клетки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Фильчиков М.В., Осмаков Д.И., Логовская Л.В., Сыквилда Н.Н., Кадыхов В.А., Курочкина Л.П., Месянжинов В.В., Бернал Р.А., Мирошников К.А. Пространственная реконструкция капсида и идентификация поверхностных белков бактериофага SN *Pseudomonas aeruginosa* электронно-микроскопическими методами. Биоорганическая химия 2009; 35: 6: 808—815. / Fil'chikov M.V., Osmakov D.I., Logovskaja L.V., Sykvilinda N.N., Kadykov V.A., Kurochkina L.P., Mesjanzhinov V.V., Bernal R.A., Miroshnikov K.A. Prostranstvennaja rekonstrukcija kapsida i identifikacija poverkhnostnykh belkov bakteriofaga SN *Pseudomonas aeruginosa* jelektronno-mikroskopicheskimi metodami. Bioorganicheskaja khimija 2009; 35: 6: 808—815. [In Russian]
2. Abedon S.T., Thomas-Abedon C., Thomas A., Mazure H. Bacteriophage prehistory. Bacteriophage 2011; 1: 3: 174—178.
3. Phage therapy: bacteriophages as antibiotics. Elizabeth Kutter, Evergreen State College, Olympia, WA 98505. Nov. 15, 1997.
4. Летапов А.В., Голомидова А.К., Тарасян К.К. Экологические основы рациональной фаговой терапии. Acta naturae 2010; 2: 1: 66—79. / Letarov A.V., Golomidova A.K., Tarasjan K.K. Jekologicheskie osnovy racional'noj fagovoj terapii. Acta naturae 2010; 2: 1: 66—79. [In Russian]
5. Пименов Н.В., Субботин В.В., Данилевская Н.В. Лечение и профилактика сальмонеллеза голубей и животных зоопарков с использованием фаготерапии и пробиотика. Российский ветеринарный журнал. Мелкие домашние и дикие животные 2013; 6: 6—8. / Pimenov N.V., Subbotin V.V., Danilevskaja N.V. Lechenie i profilaktika sal'monelleza golubej i zhivotnykh zooparkov s ispol'zovaniem fagoterapii i probiotika. Rossijskij veterinarnyj zhurnal. Melkie domashnie i dikiye zhivotnye 2013; 6: 6—8. [In Russian]
6. Jones J.B., Jackson L.E., Balogh B., Obradovic A., Iriarte F.B., Momol M.T. Bacteriophages for plant disease control. Annual Review of Phytopathology 2007; 45: 245—262.
7. Wittebole X., De Roock S., Opal S.M. A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens. Virulence 2014; 5: 1: 209—218.
8. Бактериофаги / М.Адамс М.: Медгиз, 1961; 521. / Bakteriofagi / M. Adams M.: Medgiz, 1961; 521. [In Russian]
9. Григорьева Т.М., Кузин А.И., Азизбекян Р.Р. Умеренные фаги *Brevibacillus laterosporus*. Биотехнология 2007; 4: 18—24. / Grigor'eva T.M., Kuzin A.I., Azizbekjan R.R. Umerennye fagi *Brevibacillus laterosporus*. Biotekhnologija 2007; 4: 18—24. [In Russian]
10. Мурадов М., Черкасов Г.В., Ахмедова Д.У., Халмуратов А.Г. Новый умеренный цианофаг NP-1T, лизогенизирующий культуры циано-бактерий рода *Nostoc* и *Plectonema*. Микробиология. 1990; 59: 6: 1038—1045. / Muradov M., Cherkasov G.V., Akhmedova D.U., Khalmuradov A.G. Novyj umerennyj cianofag NP-1T, lizogenirujushhij kul'tury cianobakterij roda *Nostoc* i *Plectonema*. Mikrobiologija. 1990; 59: 6: 1038—1045. [In Russian]
11. Практическое пособие по бактериофагии / И.М.Габрилович. Мн.: Высшая школа. 1968; 178. / Prakticheskoe posobie po bakteriofagii / I.M.Gabrilovich. Mn.: Vysshaja shkola. 1968; 178. [In Russian]
12. Васильев Д.А., Семанина Е.Н., Золотухин С.Н., Хайруллин И.Н., Васильева Ю.Б., Шестаков А.Г. Изучение основных биологических свойств бактериофагов *Bordetella bronchiseptica*, выделенных методом индукции. Вестник Уральской государственной сельскохозяйственной академии. Научно-теоретический журнал. 2011; 1 (13): 59—62. / Vasil'ev D.A., Semanina E.N., Zolotukhin S.N., Khajrullin I.N., Vasil'eva Ju.B., Shestakov A.G. Izuchenie osnovnykh biologicheskikh svojstv bakteriofagov *Bordetella bronchiseptica*, vydelennykh metodom indukcii. Vestnik Ural'skoj gosudarstvennoj sel'skokhozjajstvennoj akademii. Nauchno-teoreticheskij zhurnal. 2011; 1 (13): 59—62. [In Russian]
13. Манзенюк О.Ю., Воложанцев Н.В., Светоч Э.А. Идентификация бактерий *Pseudomonas mallei* с помощью бактериофагов *Pseudomonas pseudomallei*. Микробиология 1994; 63: 3: 537—544. / Manzenjuk O.Ju., Volozhancev N.V., Svetoch Je.A. Identifikacija bakterij *Pseudomonas mallei* s pomoshh'ju bakteriofagov *Pseudomonas pseudomallei*. Mikrobiologija 1994; 63: 3: 537—544. [In Russian]
14. Kumar J.S., Dhar B. Morphology and general characteristics of phages specific to *Lens culinaris* rhizobia. Biol. Fertil. Soils. 2010; 46: 681—687.
15. Гремякова Т.А., Жиленков Е.А., Новиков И.А., Оборотов М.В., Сазонов В.З., Фомченков В.М. Изучение взаимодействия фагов и микроорганизмов с использованием методов флуориметрии и электроориентационной спектроскопии. Вестник Российской Академии наук 1999; 2: 24—25. / Gremjakova T.A., Zhilenkov E.A., Novikov I.A., Oborotov M.V., Sazonov V.Z., Fomchenkov V.M. Izuchenie vzaimodejstvija fagov i mikroorganizmov s ispol'zovaniem metodov fljorimetrii i jelektroorientacionnoj spektroskopii. Vestnik Rossijskoj Akademii nauk 1999; 2: 24—25. [In Russian]
16. Жиленков Е.Л., Шемякин И.Г., Фомченков В.М., Иванов А.Ю., Гаврюшкин А.В., Оборотов М.В. Изучение взаимодействия микобактериофага МТРН11 с клеткой-хозяином на основе электронной микроскопии, флуориметрии и электро-ориентационной спектроскопии. Микробиология 1998; 67: 5: 666—671. / Zhilenkov E.L., Shemjakin I.G., Fomchenkov V.M., Ivanov A.Ju., Gavryushkin A.V., Oborotov M.V. Izuchenie vzaimodejstvija mikobakteriofaga MTRN11 s kletkoj-khozjainom na osnove jelektronnoj mikroskopii, fluorimetrii i jelektro-orientacionnoj spektroskopii. Mikrobiologija 1998; 67: 5: 666—671. [In Russian]
17. Balasubramanian S., Sorokulova I., Vodyanov V., Simonian A. Lytic phage as a specific and selective probe for detection of *Staphylococcus aureus* — a surface plasmon resonance spectroscopic study. Biosens Bioelectron 2007; 22: 6: 948—955.
18. Li S., Lib Y., Chenb H., Horikawaa S., Shena W., Simoniana A., Bryan A. China. Direct detection of *Salmonella typhimurium* on fresh produce using phage-based magneto elastic biosensors. Biosens Bioelectron 2010; 26: 4: 1313—1319.
19. Guliy O.I., Ignatov O.V., Shchyogolev S.Yu., Bunin V.D., Ignatov V.V. Quantitative determination of organophosphorus aromatic nitro insecticides by using electric-field cell orientation in microbial suspensions. Anal Chem Acta 2002; 462: 2: 165—177.
20. Гулий О.И., Матора Л.Ю., Бурьгин Г.Л., Дыкман Л.А., Игнатов В.В., Игнатов О.В. Электрооптические свойства микробных суспензий при взаимодействии клеток с антителами различной специфичности. Прикладная биохимия и микробиология 2010; 46: 1: 69—72. / Gulij O.I., Matora L.Ju., Burygin G.L., Dykman L.A., Ignatov V.V., Ignatov O.V. Jelektroopticheskie svojstva mikrobnykh suspenzij pri vzaimodejstvii kletok s antitelami razlichnoj specifichnosti. Prikladnaja biokhimiya i mikrobiologija 2010; 46: 1: 69—72. [In Russian]
21. Гулий О.И., Бунин В.Д., Игнатов О.В. Метод электрооптического анализа для регистрации воздействия антибиотиков на микробные клетки. Антибиотики и химиотерапия 2016; 61: 3—4: 3—13. / Gulij O. I., Bunin V. D., Ignatov O. V. Metod jelektroopticheskogo analiza dlja registracii vozdejstvija antibiotikov na mikrobnye kletki. Antibiotiki i khimioter 2016; 61: 3—4: 3—13. [In Russian]
22. Bertani G. Studies on lysogenesis. The mode of phage liberation by lyso-genic *Escherichia coli*. J Bactertol 1951; 62: 293—300.
23. Макарихина С.С., Гулий О.И., Соколов О.И., Буров А.М., Павлий С.А., Сивко О.Н., Володин Д.Ю., Игнатов О.В. Выделение и характеристика бактериофага *Azospirillum lipoferum* штамма Sp 59b. Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия Химия. Биология. Экология. 2013; 13: 2: 56—61. / Makarikhina S.S., Gulij O.I., Sokolov O.I., Burov A.M., Pavlij S.A., Sivko O.N., Volodin D.Ju., Ignatov O.V. Vydelenie i kharakteristika bakteriofaga *Azospirillum lipoferum* shtamma Sp 59b. Izvestija Saratovskogo universiteta. Novaja serija. Serija Khimija. Biologija. Jekologija. 2013; 13: 2: 56—61. [In Russian]
24. Smith G.P., Scott J.K. Libraries of peptides and proteins displayed on filamentous phage. Methods in enzymology 1993; 217: 228.
25. Золотухин С.Н. Создание и разработка схем применения диагностических биопрепаратов на основе выделенных и изученных бактериофагов энтеробактерий: дис. ... докт. биол. наук. Ульяновск, 2007; 322. / Zolotukhin S.N. Sozdanie i razrabotka skhem primeneniya diagnosticheskikh biopreparatov na osnove vydelennykh i izuchennykh bakteriofagov jenterobakterij: dis. ... dokt. biol. nauk. Ul'janovsk, 2007; 322. [In Russian]
26. Электрофизический анализ и разделение клеток / А.И.Мирошников, В.М.Фомченков, А.Ю.Иванов. М.: Наука, 1986; 185. / Jelektrofizicheskij analiz i razdelenie kletok / A.I.Miroshnikov, V.M.Fomchenkov, A.Ju.Ivanov. M.: Nauka, 1986; 185. [In Russian]
27. Bunin V.D., Voloshin A.G. Determination of cell structures, electrophysical parameters, and cell population heterogeneity. Journal Colloid Interface Science 1996; 180: 1: 122—126.
28. Микробиология с техникой микробиологических исследований / А.С.Лабинская М.: Медицина, 1978; 394. / Mikrobiologija s tehnikoj mikrobiologicheskikh issledovanij / A.S.Labinskaja M.: Medicina, 1978; 394. [In Russian]
29. Shchyogolev S.Yu., Khlebtsov N.G., Bunin V.D., Sirota A.I., Bogatyryov V.A. Inverse problems in spectroturbidimetry of biological disperse systems with random and ordered particle orientation. Proc SPIE 1994; 2082: 167—176.
30. Гулий О.И., Караваяева О.А., Великов В.А., Соколов О.И., Павлий С.А., Ларионова О.С., Буров А.М., Игнатов О.В. Исследование адсорбции бактериофага ФАб-Sp7 на клеточной поверхности *Azospirillum brasilense* Sp7. Вопросы вирусологии 2016; 1: 45—48. / Gulij O.I., Karavaeva O.A., Velikov V.A., Sokolov O.I., Pavlij S.A., Larioanova O.S., Burov A.M., Ignatov O.V. Issledovanie adsorbicii bakteriofaga FAb-Sp7 na kletочноj poverkhnosti *Azospirillum brasilense* Sp7. Voprosy virusologii 2016; 1: 45—48. [In Russian]

31. Lin S.Y., Hameed A., Shen F.T., Liu Y.C., Hsu Y.H., Shahina M., Lai W.A., Young C.C. Description of *Niveispirillum fermenti* gen. nov., sp. nov., isolated from a fermentor in Taiwan, transfer of *Azospirillum irakense* (1989) as *Niveispirillum irakense* comb. nov., and reclassification of *Azospirillum amazonense* (1983) as *Nitrospirillum amazonense* gen. nov. Antonie van Leeuwenhoek 2014; 105: 6: 1149—1162.
32. Click E.M., Webster R.E. Filamentous phage infection: required interactions with the TolA protein. J Bacteriol 1997; 179: 20: 6464—6471.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Гулий Ольга Ивановна — д. б. н., ведущий научный сотрудник лаборатории биохимии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук; профессор кафедры микробиологии, биотехнологии и химии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И.Вавилова, Саратов

Караваева Ольга Александровна — к. б. н., младший научный сотрудник лаборатории биохимии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук, Саратов

Ларионова Ольга Сергеевна — д. б. н., заведующий кафедрой микробиологии, биотехнологии и химии ФГБОУ ВО Саратовский государственный аграрный университет им. Н. И. Вавилова, Саратов

Ларионов Сергей Васильевич — д. вет. н., профессор, член-корреспондент РАН, зав. кафедрой «Болезни животных и ветеринарно-санитарная экспертиза», проректор по учебной работе ФГБОУ ВО Саратовский государственный аграрный университет им. Н. И. Вавилова, Саратов

Ловцова Лариса Геннадиевна — к. тех. н., доцент кафедры микробиологии, биотехнологии и химии ФГБОУ ВО Саратовский государственный аграрный университет им. Н. И. Вавилова, Саратов

Усков Кирилл Юрьевич — магистрант 1 года обучения направления подготовки 19.04.01 Биотехнология кафедры микробиологии биотехнологии и химии ФГБОУ ВО Саратовский государственный аграрный университет им. Н. И. Вавилова, Саратов

Бунин Виктор Дмитриевич — д. т. н., научный руководитель фирмы EloSystem GbR, Берлин, Германия