

А.В.Чернядьев¹, Л.Г.Дудина^{1,2}, С.Г.Литвинец¹, В.П.Черников³, А.А.Бывалов^{1,2}

ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ КЛЕТОК *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS* И *YERSINIA PESTIS* СО СПЕЦИФИЧЕСКИМИ БАКТЕРИОФАГАМИ

¹Вятский государственный университет, Киров, Российская Федерация; ²Институт физиологии Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар, Российская Федерация; ³ФГБУ НИИ морфологии человека, Москва, Российская Федерация

Проведено электронно-микроскопическое изучение динамики взаимодействия бактерий *Yersinia pseudotuberculosis* и *Yersinia pestis* со специфическими бактериофагами в условиях *in vitro*. Выявлены особенности в морфологических проявлениях указанных взаимодействий между исследованными видами микроорганизмов. Определены морфометрические характеристики использованных в опыте бактериофагов. Показано, что через 40 мин совместной инкубации бактерий *Y. pseudotuberculosis* со специфическим бактериофагом наблюдается появление персистирующих форм микробных клеток, в то время как при инфицировании клеток штамма EV бактериофагом Покровской это явление не обнаружено.

Ключевые слова: *Yersinia pseudotuberculosis*, *Yersinia pestis*, бактериофаг, электронная микроскопия.

A.V.Chernyad'ev¹, L.G.Dudina^{1,2}, S.G.Litvinets¹, V.P.Chernikov³, A.A.Byvalov^{1,2}

Electron-Microscopic Investigation of Interactions between *Yersinia pseudotuberculosis*, *Yersinia pestis* Cells and Specific Bacteriophages

¹Vyatka State University, Kirov, Russian Federation; ²Komi Institute of Physiology at the Scientific Center of Ural Branch of RAS, Syktyvkar, Russian Federation; ³Research Institute of Human Morphology, Moscow, Russian Federation

Carried out has been electron-microscopic investigation of dynamics of interactions between *Yersinia pseudotuberculosis*, *Yersinia pestis* cells and specific bacteriophages *in vitro*. Identified have been peculiarities in morphological manifestation of the interactions. Determined are morphometric characteristics of the bacteriophages utilized in the experiment. It is demonstrated that after 40 minutes of co-incubation of *Y. pseudotuberculosis* with specific bacteriophage emergence of persisting forms of microbial cells is observed, while in case of EV strain infecting with Pokrovskaya bacteriophage, this phenomenon is not detected.

Key words: *Yersinia pseudotuberculosis*, *Yersinia pestis*, bacteriophage, electron-microscopy.

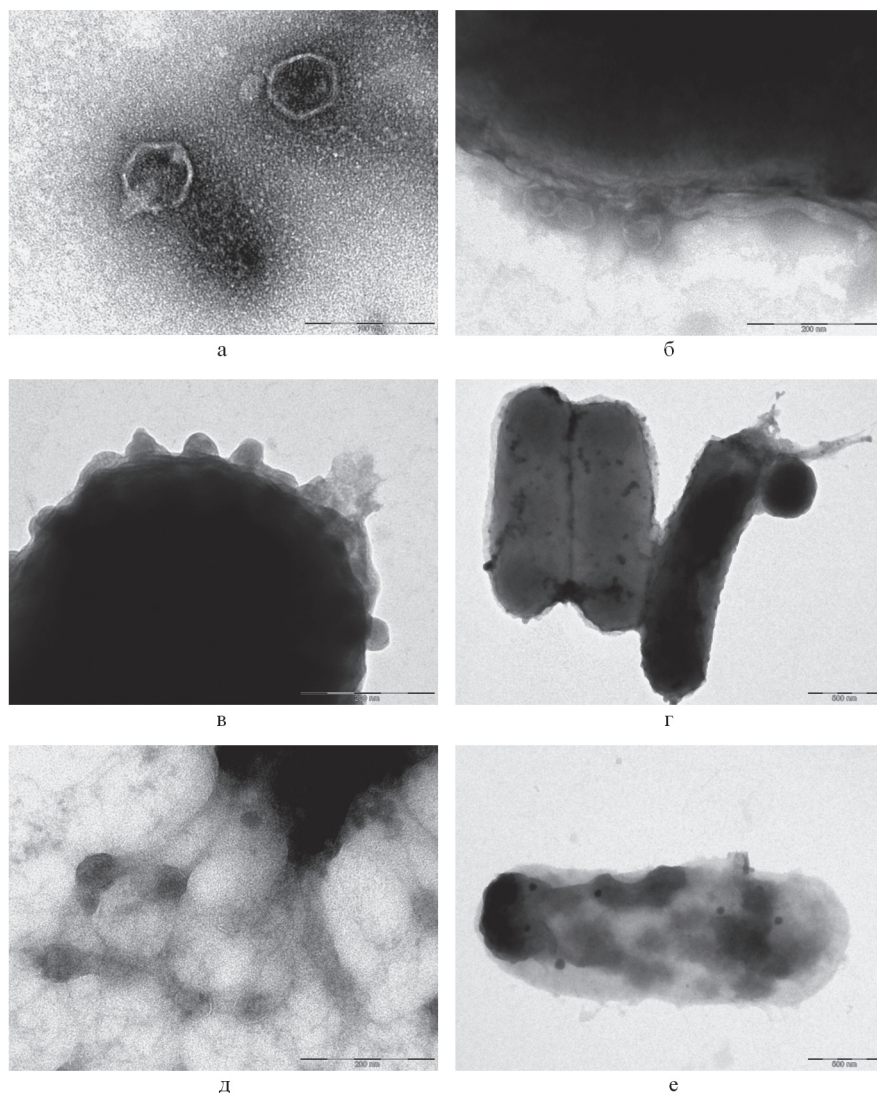
В последние годы в связи с резким обострением проблемы возрастания антибиотикорезистентности циркулирующих в природе штаммов возбудителей многих заболеваний бактериальной природы вновь возрастает интерес к применению в медицинской практике альтернативных подходов, основанных на принципах фаготерапии. Это относится и к инфекциям, вызываемым бактериями рода *Yersinia*. Для отработки схем и методов лечения этих заболеваний с помощью специфических бактериофагов необходимо проведение исследований, направленных на изучение механизмов взаимодействия в системе «фаг–прокариотит» с использованием микробиологических, молекулярно-генетических, биохимических и иных методов.

Целью данной работы являлось электронно-микроскопическое исследование взаимодействия бактерий *Y. pseudotuberculosis* и *Y. pestis* со специфическими бактериофагами в условиях *in vitro*.

В работе использовали бактерии *Y. pseudotuberculosis*, штамм 1b (кат. № 474) и *Y. pestis*, штамм EV, а также бактериофаги диагностические псевдотуберкулезный и чумной Покровской, полученные из коллекции ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб». Бактериальные культуры выращивали на плотной

питательной среде на основе питательного агара «Биотехновация» (БТН-агар, Россия) в течение 1 сут при температуре 37 и 27 °С для *Y. pseudotuberculosis* и *Y. pestis* соответственно. Инкубацию микробных клеток и соответствующего бактериофага в соотношении 1:100 проводили при температуре 37 °С в течение 5, 20, 40, 60 и 180 мин, фиксировали в течение 1 ч при комнатной температуре 2,5 % раствором глутарового альдегида («Serva», Германия). Исследуемые препараты наносили на медные сеточки (200 меш), покрытые углеродной пленкой-подложкой, сорбировали 2 мин, проводили негативное контрастирование 2 % уранилацетатом. Снимки получали на электронном микроскопе JEM-2100 («Jeol», Япония) при ускоряющем напряжении 160 кВ. Фотографирование проводили CCD с помощью камеры Keen View («Olympus», Германия).

Как показали результаты просвечивающей электронной микроскопии, частица обоих фагов состоит из головки (икосаэдрического капсида) гексагональной формы на плоскости, размеры которой варьируют от 40 до 60 нм в диаметре, и короткого отростка длиной до 15 нм. Головка псевдотуберкулезной фаговой частицы имела немного вытянутую форму вдоль центральной оси (рис. 1, а). Размеры фагов псевдоту-



Электронно-микроскопическая картина динамики взаимодействия клеток *Y. pseudotuberculosis* 1b со специфическим бактериофагом:

а – неадгезированные фаговые частицы; б–е – инкубация в течение 5, 20, 40, 60 и 180 мин соответственно

беркулезного и Покровской оказались следующими: диаметр головки вдоль центральной оси ($52,3 \pm 2,2$) и ($50,3 \pm 1,8$) нм, ширина – ($50,2 \pm 0,9$) и ($50,2 \pm 1,3$) нм, длина отростка – ($13,0 \pm 1,2$) и ($10,4 \pm 1,0$) нм. По принятой классификации [4] оба фага можно отнести к семейству Podoviridae, морфотип С1, к которому относятся большинство чумных литических бактериофагов, в том числе, как было показано ранее, и фаг Покровской [5].

В течение первых 5 мин инкубации бактериальной культуры *Y. pseudotuberculosis*, инфицированной специфическим фагом, уже наблюдалась адсорбция фаговых частиц на поверхности бактериальных клеток (рис. 1, б). Большая часть фагов к этому времени еще находится в межклеточном пространстве. На поверхности бактерий фаги располагались неравномерно и были представлены как небольшими группами, так и одиночными частицами. Большинство микробных клеток в этот период не имело видимых изменений, наблюдалось продолжение их роста и процессов деления. Инфицированные бактерии в большей степени проявляли склонность к формированию слоя внеклеточного матрикса, призванного защитить клетки от воздействия агрессивных факторов среды

[2]. По-видимому, это можно считать проявлением адаптивной реакции на адсорбцию фаговых частиц. Клетки, не атакованные фагами, защитного слоя не имели, либо он был выражен в меньшей степени. У единичных бактерий после 5 мин инкубации с фагом уже наблюдались локальные разрывы в оболочке, но клетки еще не разрушались полностью и не теряли своей формы.

После 20 мин инкубации инфицированной культуры *Y. pseudotuberculosis* в межклеточном пространстве встречались только отдельные фаговые частицы, на большинстве микробных клеток наблюдались адсорбированные фаги, расположенные относительно равномерно по поверхности бактерий. При этом головки фагов были окутаны достаточно плотным слоем матрикса и имели вид наростов или шишек на клеточной оболочке (рис. 1, в). Не исключено, что многие из них представляют собой уже вторичные фаги, которые при выходе из клеток несли на себе часть цитоплазматического коллоида и имели вид ватных комочков. На созревание к этому времени урожая вторичных фагов указывает и тот факт, что среди микробных клеток выявлялось некоторое количество мертвых особей, отличающихся значи-

тельно меньшей электронной плотностью. Меньшая плотность таких бактерий определяется тем, что они представлены почти исключительно клеточной оболочкой, т.к. основная масса их содержимого «выплеснулась» при выходе зрелых фаговых частиц.

При продолжении инкубации бактериальной культуры с фагом в течение 40 мин процессы, отмеченные на предыдущем этапе опыта, становились более выраженными. В частности, наблюдалось значительно большее количество мертвых клеток и бактерий с измененной морфологией (рис. 1, г). В то же время снизилось относительное количество микробов с адсорбированными фаговыми частицами, уменьшилось и среднее количество фагов, приходящихся на одну клетку. Это отчасти связано с тем, что фаговые частицы становятся менее различимы в связи с их большей экранировкой обволакивающим внеклеточным матриксом. В этот период отмечено также появление переживающих (персистирующих) форм бактерий, формирование которых является одним из проявлений защитной реакции микробной культуры на воздействие неблагоприятных факторов [1, 3]. Переживающие клетки отличаются сферической формой, меньшими размерами и более прочной оболочкой. Такие формы менее доступны в отношении адсорбции фагов и более устойчивы к воздействию их литических ферментов.

После 60 мин инкубации *Y. pseudotuberculosis* со специфическим бактериофагом в культуре наблюдались только отдельные живые микробные клетки; чаще они были покрыты адсорбированными фаговыми частицами, имеющими вид наростов или шишек на теле бактерии, редкие из них были защищены толстым слоем внеклеточного матрикса. Основная масса клеток имела искаженную морфологическую форму и различные повреждения оболочки, из которых «выплескивалось» содержимое микробов. В них часто можно было различить и сформированные фаговые частицы (рис. 1, д).

Через 3 ч инкубации в культуре *Y. pseudotuberculosis* наблюдали только мертвые, электронно-прозрачные клетки (рис. 1, е). Единичные жизнеспособные особи были представлены, в основном, переживающей формой бактерий.

Для инфицированной фагом Покровской культуры штамма EV *Y. pestis* характерно некоторое запаздывание динамики эффектов взаимодействия по сравнению с культурой *Y. pseudotuberculosis*, зараженной специфическим бактериофагом. К 60-й минуте инкубации регистрируемые различия были выражены в меньшей степени. В этот период стали явно заметны морфологические изменения клеток, разрывы их оболочек и выброс содержимого вместе со зрелыми фаговыми частицами. Отличительной чертой динамики взаимодействия культуры штамма EV с фагом было и то, что до 60-й минуты наблюдения включительно отмечено нарастание количества фаговых частиц на микробных клетках. К 3 ч

инкубации в культуре наблюдались только мертвые бактерии, однако на некоторых клетках можно было наблюдать относительно большое количество равномерно расположенных фагов. Появления переживающих форм микробов не зафиксировано. На протяжении всего опыта для микробных клеток штамма EV было характерно менее выраженное образование защитного слизистого слоя, в связи с чем фаговые частицы были менее экранированы и лучше выявлялись на поверхности бактерий вплоть до конца срока наблюдения.

Таким образом, электронно-микроскопически оценена динамика морфологических изменений бактерий рода *Yersinia* под действием специфических фагов. Показано, что в использованных условиях опыта скорость нарастания деструктивных изменений ниже в инфицированной культуре *Y. pestis* по сравнению с *Y. pseudotuberculosis*, в которой через 40 мин совместной инкубации с псевдотуберкулезным фагом отмечали появление персистирующих форм бактерий. Данного явления в суспензии клеток штамма EV, зараженной фагом Покровской, не отмечали.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бухарин О.В., Гинцбург А.Л., Романова Ю.М., Эль-Регистан Г.И. Механизмы выживания бактерий. М.: Медицина; 2005. 367 с.
2. Павлова И.Б., Ленченко Е.М. Электронно-микроскопическое исследование адгезивности бактерий. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 2002; 1:3–6.
3. Эль-Регистан Г.И., Мulyukin А.Л., Николаев Ю.А., Сузина Н.Е., Гальченко В.Ф., Дуда В.И. Адаптогенные функции внеклеточных ауторегуляторов микроорганизмов. *Микробиология.* 2006; 75(4):446–56.
4. Ackerman H.-W. Frequency of morphological phage description in the year 2000. *Arch. Virol.* 2001; 146:843–57.
5. Garcia E., Chain P., Elliot J.M., Bobrov A.G., Motin V.L., Kirillina O., Lao V., Calendar R., Filippov A.A. Molecular characterization of L-413C, a P2-related plague diagnostic bacteriophage. *Virology.* 2008; 372:85–96.

References

1. Bukharin O.V., Gintsburg A.L., Romanova Yu.M., El'-Registan G.I. [Survival mechanisms of bacteria]. M.; 2005. 367 p.
2. Pavlova I.B., Lenchenko E.M. [Electron-microscopic investigation of bacterial adhesiveness]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2002; 1:3–6.
3. El'-Registan G.I., Mulyukin A.L., Nikolaev Yu.A., Suzina N.E., Gal'chenko V.F., Duda V.I. [Adaptogenic functions of extracellular auto-regulators in microorganisms]. *Mikrobiologia.* 2006; 75(4):446–56.
4. Ackerman H.-W. Frequency of morphological phage description in the year 2000. *Arch. Virol.* 2001; 146:843–57.
5. Garcia E., Chain P., Elliot J.M., Bobrov A.G., Motin V.L., Kirillina O., Lao V., Calendar R., Filippov A.A. Molecular characterization of L-413C, a P2-related plague diagnostic bacteriophage. *Virology.* 2008; 372:85–96.

Authors:

Chernyad'ev A.V., Dudina L.G., Litvinets S.G., Byvalov A.A. Vyatka State University. Kirov, Russian Federation.
Dudina L.G., Byvalov A.A. Komi Institute of Physiology at the Scientific Center of Ural Branch of RAS, Syktyvkar, Russian Federation;
Chernikov V.P. Research Institute of Human Morphology, Moscow, Russian Federation

Об авторах:

Чернядьев А.В., Дудина Л.Г., Литвинец С.Г., Бывалов А.А. Вятский государственный университет. Киров, Российская Федерация.
Дудина Л.Г., Бывалов А.А. Институт физиологии Коми НЦ УрО РАН. Сыктывкар, Российская Федерация.
Черников В.П. ФГБУ НИИ морфологии человека. Москва, Российская Федерация.

Поступила 29.10.14.