

УДК 578.322,347

**МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВИРУСОПОДОБНЫХ
ЧАСТИЦ РЕДКО ВСТРЕЧАЮЩИХСЯ МОРФОТИПОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ
ИЗ САЛЬМОНЕЛЛЕЗНОГО И ПРОТЕЙНОГО ФАГОЛИЗАТОВ**

© 2019 Е.О. Чугунова¹, А.А. Зимин², Н.Е. Сузина²

¹ Пермский государственный аграрно-технологический университет
им. академика Д.Н. Прянишникова

² Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН - обособленное подразделение ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН, г. Пущино

Статья поступила в редакцию 04.03.2019

В статье представлен поиск бактериофагов редких морфотипов в фаговых лизатах, полученных внутри кишечника лабораторных животных. В сальмонеллезном и протейном фаголизатах, полученных таким методом обнаружены на ряду с хвостатыми фагами бактериофаги семейств *Inoviridae* и *Tectiviridae*. Проведена морфологическая характеристика обнаруженных частиц. Частицы *Inoviridae* имели 600-1000 нм и толщиной около 35 нм. Частицы *Tectiviridae* имели 87,5 нм и ширину 80 нм. Частица имела толстую двойную оболочку толщиной - 12,5 нм. При этом толщина внешнего покрова составляла 7,5 нм, а толщина внутреннего покрова - 5 нм.

Ключевые слова: Фаговый лизис внутри кишечника животных, *Inoviridae*, *Tectiviridae* нитчатые бактериофаги, фаголизат, бактерии рода *Salmonella* и *Proteus*.

ВВЕДЕНИЕ

По современной классификации фаги разделены на 3 отряда (порядка): *Caudovirales*, *Mononegavirales*, *Nidovirales*, 61 семейство, 214 родов и около 3600 видов. Около 96 % известных фагов принадлежит порядку *Caudovirales* - хвостатые фаги [1, 8].

В последние десятилетия появилось множество работ, посвященных обнаружению, выделению и изучению нитчатых фагов, принадлежащих к роду *Inovirus* семейства *Inoviridae* [3, 4]. Нитчатые фаги, широко распространенные среди бактерий, инфицируют широкий круг грамотрицательных бактерий разных родов - *Escherichia*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Vibrio*, *Thermus*, *Neisseria* и др. [2, 11]. Наиболее изученные нитчатые фаги семейства *Inoviridae* – M13, f1 и fd, объединенные в группу Ff, поскольку инфицируют *Escherichia coli*, несущие F-пили и также вследствие зависимости процесса инфицирования от наличия F-плазмиды [4, 6, 15]. Нитчатые фаги сальмонелл уже нашли широкое применение в практике. На основе таких сальмонельных бактериофагов,

например, сделан биосенсор для детекции патогенных сальмонелл в медицинских и санитарных пробах [1, 13, 16]. Такие бактериофаги имеют большую перспективу для получения живых вакцинных препаратов для вакцинации против различных инфекционных заболеваний как вирусной, так и бактериальной этиологии [2]. Нитчатые умеренные бактериофаги сальмонелл применяются и для конструирования интегративных векторов для экспрессии и клонирования целевых чужеродных генов в хромосому данной бактерии [3].

Нитчатые бактериофаги являются также тестерными биологическими объектами для испытания новых видов стерилизующих агентов, так как они могут являться переносчиками островков патогенности и, следовательно, необходимым объектом стерилизации [4]. В течение ряда десятилетий Г.-В. Аккерман из Канады проводил регулярное исследование фаголизатов сальмонелл и других бактерий для идентификации всех новых морфологий этих вирусов [8]. В последнее время такие регулярные исследования не проводятся и заполнение этой бреши в мировых исследованиях кажется весьма интересным как с чисто научной, так и практической точек зрения.

Одним из наиболее редко обнаруживаемым семейством бактериофагов являются *Tectiviridae*. Эта группа содержит липиды в составе своей оболочки и обработка хлороформом, которую производят большинство исследователей фагов при выделении их из природы, исключает обнаружение липид-содержащих вирусов в таких пробах. Наиболее изученным объектом из

Чугунова Елена Олеговна, доктор биологических наук, профессор кафедры внутренних незаразных болезней, хирургии и акушерства. E-mail: chugunova.elen@yandex.ru
Зимин Андрей Антонович, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии. E-mail: apollo66@rambler.ru
Сузина Наталья Егоровна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории цитологии микроорганизмов.
E-mail: suzina@ibpm.pushchino.ru

этой группы является бактериофаг PRD1 [10, 14]. Но и его достаточно редко обнаруживают в различных пробах из природы. Каких либо современных тест-систем для обнаружения этого бактериофага и родственных ему тетивирид по ДНК пока не разработано. *Tectiviridae* имеют достаточно характерную морфологию и их однозначно можно идентифицировать на снимках ТЭМ. С этой точки зрения описание новых морфологии представителей этой группы вирусов в различных пробах из природы также дает новые сведения исследователям о встречаемости этих бактериофагов, их взаимоотношениях с различными штаммами бактерий и другими подробностями их экологии.

Хотя в настоящее время для оценки степени родства между фагами используют анализ генома фага [5, 12] большую роль в понимании классификации и морфологии фагов играет трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ). Результаты ее лежат в основе морфологической (морфотипической) классификации бактериофагов. Данная классификация было предложена в 1960е годы А.Бредли [9] и А.С. Тихоненко [7] и используется в почти полной сохранности до настоящего времени.

Цель работы - получить и исследовать фаголизаты различных сальмонелл и протея в кишечнике лабораторных животных; исследовать данные фаголизаты на наличие более редко встречающихся морфотипов бактериофагов и провести морфологическую классификацию частиц на фотографиях полученных с помощью негативного окрашивания на трансмиссионной электронной микроскопии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Среды. Для реализации поставленных задач использовали жидкые и твердые питательные среды. С целью получения сальмонеллезного фаголизата работали с забуференной пептонной водой (ЗПВ) и селенитовым бульоном (ООО «НПЦ «Биокомпас-С» » г. Углич Ярославской области (Россия)), средой для выделения протейных бактериофагов служил мясо-пептонный бульон (МПБ) (ФБУН «ГНЦ ПБМ», п. Оболенск Московской области (Россия)). Для работы с тест-штаммами микроорганизмов использовали висмут-сульфит агар (ВСА) и мясо-пептонный агар (МПА) (ФБУН «ГНЦ ПБМ», п. Оболенск Московской области (Россия)), биохимическую идентификацию штаммов бактерий осуществляли на микробиологическом анализаторе Multiskan FC (ThermoFisher Scientific Inc., Финляндия) с помощью тест-системы ЭНТЕРО-тест24Н, типизацию бактерий рода *Salmonella* проводили сыворотками сальмонеллезными О-комплексными и монорецепторными О- и

Н-агглютинирующими производства ФГУП «Курская биофабрика-«БИОК» (Россия).

Штаммы. При этом работали с типичными по культуральным, морфологическим, ферментативным и серологическим свойствам серотипами: *S. Typhimurium*, *S. Infantis*, *S. Dublin*, *S. Enteritidis*, *S. Choleraesuis*, *S. Virchow*, *S. Gallinarum-Pullorum*, *S. Hamburg* и *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*.

Материалы. Для приготовления сред и буферов использовали российские реактивы квалификации хч и осх. Использовали фильтры Владипор марки МФАС-ОС-3 и МФАС-ОС-2 (Россия), для ультрафильтрации Millipore Millex-GP (США) и Corning (Германия).

Основная методика получения и исследования фаголизатов. Методика. Для выделения изолятов фагов бактерий рода *Salmonella* и *Proteus* использовали белых лабораторных разнополых мышей массой 16-18 г (n = 22). Опыты, выполненные с использованием лабораторных животных, проводили с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества – Европейской конвенции по защите животных (№86/609/EEC, Страсбург, 1986) и Хельсинской декларации. Готовили суспензию суточной культуры соответствующих штаммов микробов в количестве 10⁸МТ/мл и инокулировали белым мышам внутрибрюшинно по 0,5 см³. После гибели последних, отделяли тонкий и толстый кишечник и помещали его в жидкие питательные среды, соблюдая соотношение патологического материала и среды 1:10. Контрольной группе мышей внутрибрюшинно вводили по 0,5 см³ стерильного физиологического раствора. В качестве питательных сред использовали мясо-пептонный бульон (МПБ), забуференную пептонную воду (ЗПВ) и селенитовый бульон. При этом пользовались традиционными приемами обогащения по методу Адамса: пробы обогащали типичными по культуральным, морфологическим, ферментативным и серологическим свойствам бактериями родов *Salmonella* и *Proteus* в логарифмической фазе роста. Очистку фаголизатов от бактериальных клеток, эндотоксина и балластных веществ осуществляли осветляющей микрофильтрацией через мембранны Владипор марки МФАС-ОС-3 с размером пор 0,8 мкм, затем МФАС-ОС-2 с размером пор 0,45 мкм, которые представляют собой мелкопористый пленочный материал, изготовленный на основе смеси ацетатов целлюлозы. В итоге фаголизаты подвергали стерилизующей фильтрации с помощью фильтрующей насадки фирмы Millipore Millex-GP с полимерсульфоновым наполнителем и диаметром пор 0,22 мкм.

Просвечивающая электронная микроскопия препаратов фагов. Морфологические особенности собственно фаговых частиц изучали в электронном микроскопе EM-1200EX (JEOL, Япония). Для подготовки образца лизата проводили дробное центрифугирование: на первом этапе осуществляли центрифугирование на центрифуге CM-6 (ELMI Ltd, Латвия) в режиме 3000 об/мин в течение 15 минут, затем супернатант фильтровали с помощью мембранный насадки Corning (Германия) с диаметром пор 0,20 мкм. На заключительном этапе фаги осаждали центрифугированием со скоростью 15000 об/мин в течение 10 минут на центрифуге MiniSpin Eppendorf (Германия). 10 мкл подготовленного таким образом образца наносили на формваровую пленку-подложку, через 1 минуту жидкую фазу удаляли фильтровальной бумагой, не допуская полного высыхания поверхности подложки. Адсорбированные на пленке бактериофаги подвергали негативному контрастированию 1% незабуференным раствором уранилацетата и микроскопировали при увеличении х50000. Полученные изображения использовали для морфометрического анализа выявленных морфотипов фагов. Для этого характеризовали форму и тип фага, измеряли его величину, а также размеры хвоста и диаметр головки.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

По результатам ТЭМ нами была изучена морфология выделенных бактериофагов, фагоподобных и вирусоподобных частиц. На основании полученных данных проанализированы семейства и морфотипы фагов по Бредли.

Известно, что вирионы нитчатых фагов представляют собой длинные тонкие спирально закрученные нити, внутри которых заключена циркулярно замкнутая однонитевая ДНК (ssDNA) [2]. Фагоподобные частицы, которые могут представлять собой бесхвостые бактериофаги, были обнаружены нами посредством ТЭМ в фаголизате, обогащенном сальмонеллами серотипа *Choleraesuis*. На снимке видны два объекта длиной 600-1000 нм и толщиной около 35 нм, по морфологии сходными с бактериофагами семейства *Inoviridae* морфотипа F1 (рис. 1).

По данным электронной микроскопии протейный фаголизат отличался неоднородностью и содержал фаги разных морфотипов и семейств. В частности были обнаружены фаги семейства *Siphoviridae* морфотипа B1c и *Podoviridae* морфотипа C3. Кроме вышеописанных и идентифицированных нами бактериофагов, в изучаемом лизате обнаружены вирусные частицы размером 100 x 110 нм, которые по своей морфологии могут быть отнесены к семейству *Tectiviridae* (рис. 2).

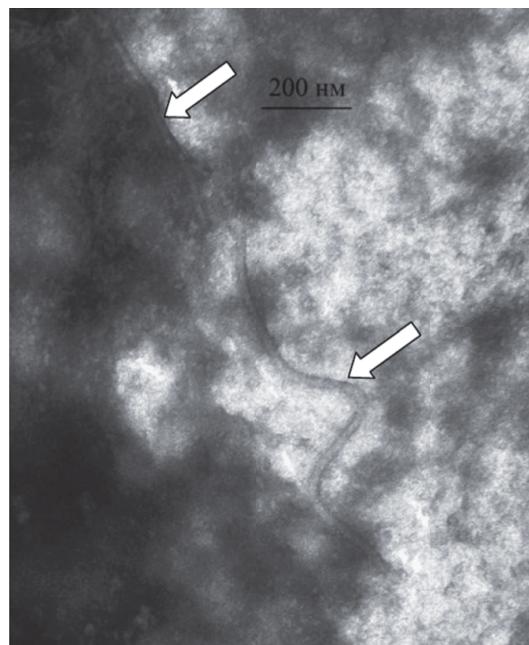


Рис. 1. Трансмиссионная электронная микроскопия фагового лизата *Salmonella Choleraesuis*. Частицы фагов семейства *Inoviridae* отмечены белыми стрелками. Увеличение х 30000. Масштабная линейка 200 нм. Контрастирование 1% уранилацетатом

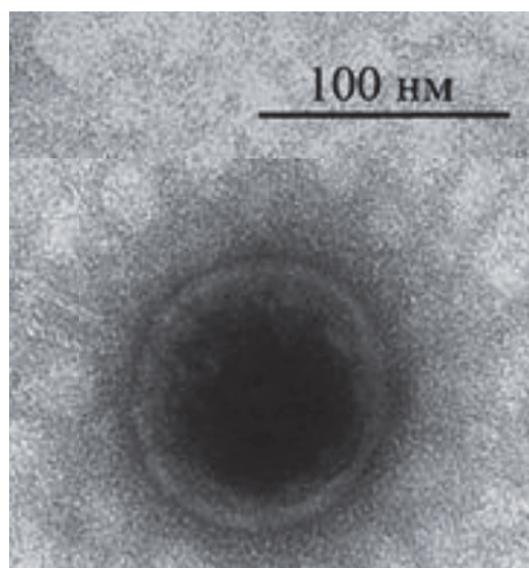


Рис. 2. Трансмиссионная электронная микроскопия фагового лизата *Proteus spp.* В центре снимка крупная вирусоподобная частица, сходная с фагами из семейства *Tectiviridae*. Увеличение X 50000. Масштабная линейка 100 нм. Контрастирование 1% уранилацетатом

Предполагаем, что на рисунке 2 изображен капсид фага из семейства *Tectiviridae* с хорошо визуализируемой внутренней мембраной, окруженной белковой оболочкой. Необходимо отметить, что определение семейства бактериофага,

изображенного на рисунке 2, опираясь лишь на анализ снимков ТЭМ, является сложной задачей. С одной стороны видно морфологическое сходство с представителями фагов семейства *Tectiviridae*, с другой стороны, диаметр капсида обнаруженных нами частиц ориентировано в два раза больше, чем диаметр вириона бактериофагов данного семейства.

Кроме того, на одном из ТЭМ снимков была обнаружена округлая вирусоподобная частица довольно большого размера (рис. 3). Ее длина была 87,5 нм и ширина 80 нм. Частица имела толстую двойную оболочку толщиной - 12,5 нм. При этом толщина внешнего покрова составляла 7,5 нм, а толщина внутреннего покрова - 5 нм. Внешние покровы были разделены тонким промежутком. Можно однозначно сказать, что в форме частицы просматривается полигональность. Можно предположить, что эта частица по форме представляет собой слегка вытянутый икосаэдр. Одна из вершин этого икосаэдра выглядит как отверстие, заткнутое подобием пробки, в форме усеченного конуса. Внутренняя камера частицы также имеет признаки полигональности. Внутренняя камера содержит комок электронно-прозрачного вещества, занимающего примерно 2/3 камеры. Исходя из структуры

частицы можно предположить, что это частица вириуса из семейства *Tectiviridae*. В этом случае отверстие в одной из вершин может служить для упаковки и выпуска ДНК из частицы. Вершина с отверстием у фагов семейства *Tectiviridae* при этом называется порталной вершиной. С достаточно большой долей уверенности можно говорить, что это бактериофаг родственный фагу энтеробактерий PRD1.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

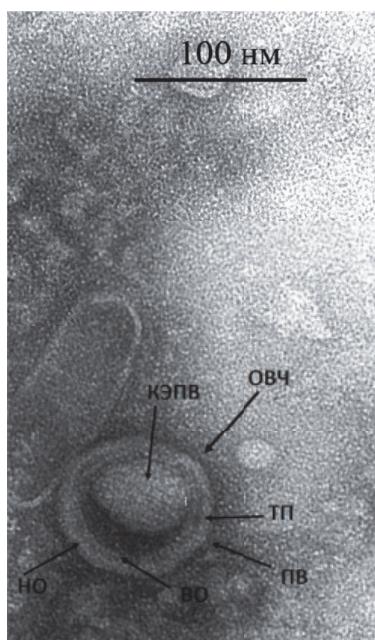


Рис. 3. Трансмиссионная электронная микроскопия фагового лизата бактерии *Proteus spp.* Округлая вирусоподобная частица бактериофаг из семейства *Tectiviridae*.

Обозначения на рисунке:

- ОВЧ – округлая вирусоподобная частица; ;
- НО – наружная оболочка, ВО - внутренняя оболочка;
- ТП – тонкий промежуток между оболочками;
- ПВ – предполагаемая порталная вершина частицы, заткнутая белковой «пробкой»;
- КЭПВ – комок электронно-прозрачного вещества внутри камеры частицы

1. Бактериофаги: биологическое и практическое применение / ред. : Э. Катер, А. Сулаквелидзе. М.: Научный мир, 2012. – 640 с.
2. Ильина Т.С. Нитчатые бактериофаги и их роль в вирулентности и эволюции патогенных бактерий // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2015. № 1. С. 3-10.
3. Использование нитчатого бактериофага M13 для целей белковой инженерии / А.А. Ильичев, О.О. Миненкова, С.И. Татьков и др. // Новые направления биотехнологии: Всесоюзная конференция: тезисы докладов. Пущино. 1988. С. 97-98.
4. Фаговый дисплей на основе нитчатых бактериофагов: применение для отбора рекомбинантных антител / О.О. Миненкова, Н.В. Тикунова, В.В. Морозова // Acta Naturae (русскоязычная версия). 2009. Т. 1. № 3. С. 22-31.
5. Молекулярное типирование (Rapid-анализ) ДНК-содержащих бактериофагов патогенных иерсиний / Л. В. Романова [и др.] // Бактериофаги. Теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности: материалы международной научно-практической конференции / Ульяновская ГСХА им. П. А. Столыпина. Ульяновск, 2013. Т. 2. С. 60-63.
6. Фаговые пептидные библиотеки как источник адресующих лигандов / А.А. Немудрая, В.А. Рихтер, Е.В. Кулигина // Acta Naturae (русскоязычная версия). 2016. – Т. 8. №1 (28). – С. 52-63.
7. Тихоненко А.С. Ультраструктура вирусов бактерий. М.: Наука, 1968. 90 с.
8. Ackermann H. W. Phages examined in the electron microscope // Arch. Virol. 2007. Vol. 152. P. 227-243.
9. Bradley D.E. The morphology and physiology of bacteriophages as revealed by the electron microscope // J. R. Microsc. Soc. 1965. Vol. 84. P. 257-316.
10. Lipid-containing viruses: bacteriophage PRD1 assembly / S.J. Butcher, V. Manole, N.J. Karhu// Adv Exp Med Biol. 2012. Vol. 726. P. 365-377.
11. A novel, broad-range, CTXФ-derived stable integrative expression vector for functional studies/ B. Das, R. Kumari, A. Pant, S. Sen Gupta, S. Saxena, O. Mehta, G.B. Nair// J Bacteriol. 2014. Vol. 196 (23). P. 4071-4080.
12. Jalasvuori M. Viruses are ancient parasites that have influenced the evolution of contemporary and archaic forms of life. Jyvaskula: University of Jyvaskula, 2010. 94 p.
13. Niyomdecha, S. Phage-based capacitive biosensor for *Salmonella* detection / S. Niyomdecha, W., Limbut, A. Numnuam, P. Kanatharana, R. Charlermroj, N. Karoonuthaisiri, P. Thavarungkul// Talanta. 2018.

- Vol. 1(188). P. 658-664.
14. Characteristics of PRD1, a plasmid-dependent broad host range DNA bacteriophage / R.H. Olsen, J.S. Siak, R.H. Gray// J Virol. 1974. Vol. 14 (3). P. 689-699.
 15. Oral Immunization of Rabbits with *S. enterica* Typhimurium Expressing Neisseria gonorrhoeae Filamentous Phage Φ6 Induces Bactericidal Antibodies Against *N. gonorrhoeae* Kłyż / A. Piekarowicz, M. Majchrzak, D.C. Stein// Sci Rep. – 2016. Vol. 4. P. 22546-22549.
 16. Studies of inactivation of encephalomyocarditis virus, M13 bacteriophage, and *Salmonella typhimurium* by using a visible femtosecond laser: insight into the possible inactivation mechanisms / K.T. Tsen, S.W. Tsen, Q. Fu, S.M. Lindsay, Z. Li, S. Cope, S. Vaiana, J.G. Kiang// J Biomed Opt. 2011. Vol. 16 (7). P. 078003.

MORPHOLOGY OF BIOLOGY PARTICLES FROM *SAFMONELLA* AND *PROTEUS* PHAGOLYSATIES

© 2019 E.O. Chugunova¹, A.A. Zimin², N.E. Suzina²

¹Perm State Agro-Technological University named after Academician D.N. Pryanishnikov

²Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Pushchino

The article presents the search for bacteriophages of rare morphotypes in phage lysates obtained inside the intestines of laboratory animals. In the *Salmonella* and *Proteus* phagolysates obtained by this method, bacteriophages of the *Inoviridae* and *Tectiviridae* families were found along with the tailed phages. Conducted morphological characteristics of the detected particles. Particles of *Inoviridae* had 600-1000 nm and a thickness of about 35 nm. The *Tectiviridae* particles were 87.5 nm and 80 nm wide. The particle had a thick double shell with a thickness of 12.5 nm. The thickness of the outer cover was 7.5 nm, and the thickness of the inner cover was 5 nm.

Keywords: Filamentous bacteriophage, phagolysate, *Salmonella spp.*, *Proteus spp.*

Elena Chugunova, Doct. Biol. Sci., Professor of Noninfectious Diseases, Surgery and Obstetrics Department.

E-mail: chugunova.elen@yandex.ru

Andrej Zimin, Cand. Biol. Sci., Senior Researcher of Molecular Microbiology Laboratory.

E-mail: apollo66@rambler.ru

Natalia Suzina, Cand. Biol. Sci., Senior Researcher of Cytology of Microorganisms Laboratory.

E-mail: suzina@ibpm.pushchino.ru