

О.А. СТЕПАНОВА, В.Г. ШАЙДА

МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ИЗУЧЕНИЮ ПРОЦЕССА ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МОРСКИХ БАКТЕРИЙ И ВИРУСОВ

Сравнительное изучение процесса взаимодействия морских бактерий и вирусов в микрокалориметрии и в автоматическом анализаторе «Биоскрин-С» выявило более высокую чувствительность метода микрокалориметрии. Использование этого метода позволяет изучать динамику взаимодействия "вирус - бактериальная клетка" не только на уровне литической фаговой инфекции, но и при других формах их отношений.

Изучение процесса взаимодействия морских вирусов и бактериальных сообществ представляет особый интерес для определения роли морских бактериофагов в продукции, трансформации и циркуляции органического вещества в Мировом океане.

При использовании для этих целей автоматического анализатора "Биоскрин-С" с программой BioRTN, принцип работы которого основан на регулярном определении динамики оптической плотности исследуемых проб, было выявлено ингибирующее влияние морских вирусов на рост бактериальных культур [4], а применение метода микрокалориметрии показало, что морские вирусы подавляют метаболизм бактериопланктона, моно- и полиассоциаций морских микроорганизмов [5,6].

В данной работе сравнивается эффективность использования обоих названных методов для изучения процесса взаимодействия морских вирусов и бактерий.

Материал и методика. В работе использованы четыре суточные монобактериальные культуры (1, 2, 3 и 5), выделенные из поверхностного слоя морской воды, взятой из одной точки у побережья Севастополя в 1997 г. Из этой же пробы воды по методу [1] были приготовлены обогащенные фильтраты (ОФ), применяемые в качестве бактериофагов. Микробиологические методики и способы стерилизации ОФ описаны ранее [6].

В микрокалориметрии применяли закрытый ампульный метод, используя прибор непрерывного мониторинга процессов и реакций Termal Activity Monitor 2277 (ТАМ) шведской фирмы LKB. Исследования проводили в жидкой среде в объеме 1,0 мл. В опыте к 0,8 мл ОФ добавляли 0,1 мл питательной среды (пептонной воды) и 0,1 мл монокультуры, разведенной в физиологическом растворе до 10^8 клеток/мл. В контроле использовали те же компоненты и в тех же пропорциях, но ОФ был стерилен.

Сравнительные исследования в автоматическом анализаторе «Биоскрин-С» проводили в объеме 0,4 мл. Материалы для опытов и контроля в данном случае брали в тех же пропорциях, что и в микрокалориметрии.

Принципы и особенности приборов ТАМ и «Биоскрин-С» описаны ранее [4-6]. Калибровки приборов проводили по соответствующим инструкциям.

Результаты и обсуждение. При изучении процесса взаимодействия морских вирусов в виде ОФ и четырех морских монобактериальных культур в автоматическом анализаторе "Биоскрин-С" были получены графики кривых роста этих культур (рис.1). По вертикали отмечена величина абсорбции в 10 условных единицах (1 условная единица равна 0,05 величины абсорбции), по горизонтали – время эксперимента в часах.

Кривые a1, b1, c1 и d1 отражают контрольный рост культур 1, 2, 3 и 5 (в присутствии стерильных ОФ), кривые a2, b2, c2 и d2 – рост этих же культур в опыте. Как видно из графиков А, В и С, кривые роста культур 1, 2 и 3 в опытах и контроле не отличаются. На графике D наблюдается разница между кривыми d1 и d2 после

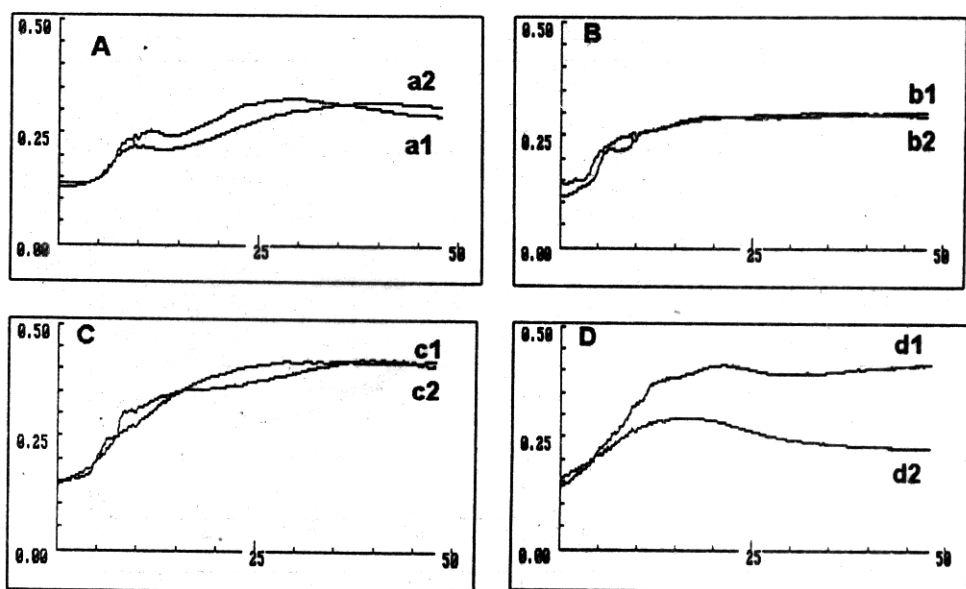


Рис.1. Кривые роста морских бактериальных культур 1(A), 2(B), 3(C) и 5 (D): в контроле - a1, b1, c1, d1 и в опыте - a2, b2, c2, d2.

Fig.1. Growth curves of marine bacteria cultures 1(A), 2(B), 3 (C) and 5 (D): in control - a1, b1, c1, d1; in experimental conditions -a2, b2, c2, d2.

5-10 ч эксперимента, которая составляет 4 условные единицы абсорбции после 25 ч, что свидетельствует о подавлении ОФ роста бактериальной культуры в опыте и подтверждает наличие бактериофагов, проявляющееся в лизисе некоторого количества бактериальных клеток.

Графики - термограммы, полученные при использовании метода микрокалориметрии, представлены на рис.2. По вертикали отмечена величина теплопродукции, выраженная в микроваттах (мквт), по горизонтали - длительность эксперимента в часах. Как уже отмечалось [6], вид графических линий термограмм, отражающих теплопродукционные процессы динамики роста и развития различных микроорганизмов, по временным интервалам и уровням тепловыделения соответствует всем последовательным фазам, характерным для метаболизма любых бактериальных популяций и во многом определяется видовой принадлежностью изучаемых микроорганизмов, их первоначальной концентрацией, качеством питательной среды, температурой и рядом других факторов. Термографические линии e1, f1, g1 и h1 отражают теплопродукционные процессы метаболизма роста и развития морских культур 1, 2, 3 и 5 в контроле, e2, f2, g2 и h2 - энергетические уровни метаболизма микроорганизмов в опытах под влиянием ОФ. Различия в термограммах по величинам теплопродукции наблюдаются на графиках Е, G и H. Термограммы графика F свидетельствует об отсутствии ингибирования ОФ метаболизма монобактериальной морской культуры 2. На графике Е явление ингибирования метаболических процессов культуры 1 в опыте возникает после 5-6 ч эксперимента, достигая различия в величинах теплопродукции между опытом и контролем в 8 мквт. После 20 ч термографические линии, отражающие метаболизм роста и развития этой культуры, в опыте и контроле практически не отличаются. На графике G ингибирующий эффект теплопродукции бактериальной культуры 3 бактериофагами ОФ в опыте наблюдается уже в первые часы эксперимента, усиливаясь со временем и достигая через 80 ч разницы в энергетических потоках между опытным (g1) и контрольным (g2) ростом культуры в 20 мквт. Значительное отличие между опытом и контролем выявлено и для культуры 5 (график H).

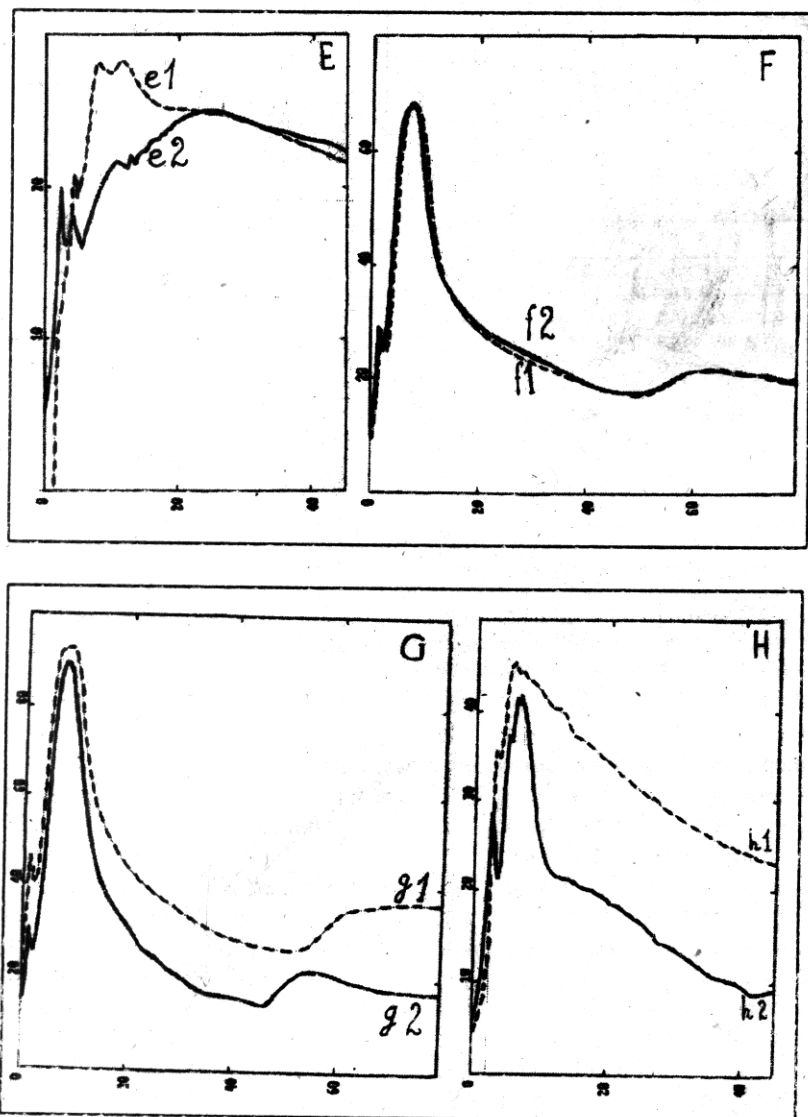


Рис.2. Термограммы, отражающие метаболизм морских бактериальных культур

1(Е), 2(Ф), 3(Г) и 5(Н): в контроле - е1, ф1, г1, h1 и в опыте - е2, ф2, г2, h2.

Fig.2. Termograms, reflecting the metabolism of marine bacteria cultures

1 (E), 2 (F), 3 (G) and 5 (H): in control - e1, f1, g1, h1;

in experimental conditions - e2, f2, g2, h2.

Возникшее через 5-6 ч от начала эксперимента ингибирование метаболизма бактериальной культуры в опыте (h1) продолжается на протяжении всего времени, достигая различия в уровнях энергетических потоков в 13-15 мквт по сравнению с контролем (h2).

Статистический анализ позволил установить, что коэффициенты корреляции между уровнями теплопродукции и временем, а также величинами абсорбции и временем заключены в пределах $\geq 0,81$ и $\leq 0,98$ для всех исследованных вариантов [2].

Выявленное в анализаторе "Биоскрин-С" подавляющее влияние бактериофагов на плотность бактериальной культуры 5 свидетельствует об эффекте литической фаговой инфекции, выражающейся в опыте снижением количества клеток за счет лизиса. В микрокалориметрии также наблюдали ингибирующее воздействие ОФ на метаболизм роста и развития морских микроорганизмов культуры 5. Случаи

отсутствия влияния ОФ на численность бактериальных клеток в культурах 1 и 3 в анализаторе "Биоскрин-С" и выявления в микрокалориметрии ингибирующего воздействия ОФ на метаболизм этих культур указывают на более высокую чувствительность метода микрокалориметрии при изучении взаимодействия вирусов и бактерий. В ОФ возможно наличие интегральных ДНК-геномных бактериофагов, ДНК которых объединяется с ДНК хромосом бактериальных клеток, становясь их составной частью и превращаясь таким образом в группу генов. Поскольку в геноме таких клеток появляется дополнительная генетическая информация, клетки приобретают ряд новых свойств. Так, у бактерий могут появляться новые ферменты или токсины, отсутствовавшие до интеграции фаговой ДНК, что, несомненно, отразится на уровне метаболизма культуры [3]. Не исключено, что в проводимых исследованиях при помощи микрокалориметрии наблюдается лизогенное действие морских умеренных вирусов (интегральных ДНК-геномных бактериофагов) на бактериальные клетки.

Выводы. При изучении двумя различными методами взаимодействия морских вирусов и бактерий на примере четырех различных культур и ОФ, явление ингибирования вирусами метаболизма микроорганизмов в микрокалориметрии удалось выявить у трех культур, а в автоматическом анализаторе "Биоскрин-С" – эффект подавления численности бактерий лишь у одной культуры. Полученные результаты свидетельствуют о более высокой чувствительности метода микрокалориметрии, позволяющей изучать взаимодействия между клеткой-хозяином и вирусом-паразитом на метаболическом уровне, отражающем как явления фаголизиса, так и многие ферментативные и иные функции микроорганизма, возникающие при лизогении в результате интеграции вирусной ДНК в бактериальную.

Авторы выражают благодарность сотруднице ИнБЮМ Сосновской Р.В. за оказанную помощь в проведении микробиологических работ.

1. Крисс А.Е. Морская микробиология (глубоководная). – М.: Изд-во АН СССР. – 1959. – 456 с.
2. Лакин Г.Ф. Биометрия. Учебное пособие для университетов и педагогических институтов. – М.: Высшая школа, 1973. – 345 с.
3. Общая вирусология: Руководство. Т.1 /Под ред. В.М.Жданова, С.Я.Гайдамович; АМН СССР. – М.: Медицина, 1982. – 496 с.
4. Пахорукова О.Н., Степанова О.А., Жильцова Н.Н. К методу выделения бактериофага из морской воды //Сборник научных работ специалистов санитарно-эпидемиологической службы г. Севастополя. – Вып.4. – Севастополь, 1996. – С.43-47.
5. Степанова О.А., Пахорукова О.Н., Шайда В.Г., Жильцова Н.Н. Экспериментальное изучение влияния морских фагов на бактериопланктон //Сборник научных работ специалистов санитарно-эпидемиологической службы г. Севастополя – Вып.5. – Севастополь, 1997. – С.47-49.
6. Степанова О.А., Шайда В.Г. Микрокалориметрическая характеристика взаимодействия бактерий и бактериофагов //Экология моря. – 1998. – Вып.47. – С.100-105.

Ин-т биологии южных морей НАНУ,
г.Севастополь

Получено 12.02.99

O.A. STEPANOVA, V.G. SHAIDA

METHODS OF STUDY OF MARINE BACTERIA AND VIRUSES INTERACTIONS

Summary

Comparative study of marine bacteria and viruses interactions was carried on by the methods of microcalorimetry and automatic analyses "Bioscreen-C". Results showed the microcalorimetry method is more sensitive as compared with "Bioscreen-C" analysis. Application of this method can be used in investigations of virus – bacteria interactions in dynamics both in litic phage infection and in various forms of their relationships.