

**МИКРОКАЛОРИМЕТРИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ
БАКТЕРИЙ И БАКТЕРИОФАГОВ**

Микрокалориметрические исследования взаимодействия бактерий и вирусов выявили ингибирующее влияние литической фаговой инфекции на метаболизм чувствительных микроорганизмов, причем степень подавляющего воздействия вирусов зависела от их концентрации. При длительном наблюдении литической фаговой инфекции проявлялась поддерживающая роль вирусов в жизнедеятельности бактериальных клеток-хозяев. Установлено, что вирусы Черного моря в основном представлены умеренными фагами, а среди черноморского бактериопланктона преобладают лизорезистентные формы.

Морские бактериофаги являются доминирующим фактором в бактериальной смертности, приводя к формированию микронных и субмикронных неживых частиц, участвуя в цикличности материала и энергии океана. Для изучения бактериофагов используют ультрафильтрацию, электронную и люминисцентную микроскопию, экспериментальные модели с привлечением биохимических и других методов [6-12, 14-17, 22]. Известно, что между фагами и бактериальными клетками существует два типа взаимодействия – литическое (вирулентные фаги) и лизогенное (умеренные фаги) [2]. Существует предположение, что явление лизогении более широко распространено в природе и что основная вирусная продукция в морской воде идет через лизогенную индукцию. Однако путем экспериментов было выявлено, что литическая инфекция более ответственна за продукцию бактериофагов, чем лизогения. Проявление лизогенной или литической инфекции зависит от соотношения концентраций вирусов и бактерий [1, 21, 22].

Настоящая работа посвящена изучению взаимодействия чувствительных бактерий и фагов, а также морских микроорганизмов и морских бактериофагов с использованием метода микрокалориметрии.

Материал и методика. Для исследования использованы бактериопланктон, суточные полибактериальные ассоциации (накопительные культуры) и монобактериальные культуры, выделенные из поверхностных слоев морской воды из разных точек побережья г. Севастополя в 1995-97 гг.

В качестве основной жидкой питательной среды использована пептонная вода, приготовленная на морской воде [3]. Культуру *Сальмонеллы энтеритидис* гр. Д (09 – Н-г) выделяли, идентифицировали и культивировали в соответствии с требуемыми методами [2]. Количественную оценку морского бактериопланктона проводили в эпифлуоресцентной микроскопии с использованием нитроцеллюлозных фильтров фирмы Сарториус с диаметром пор 0,2 мкм [20]. Численность бактериальных культур определяли по стандарту мутности с дальнейшим десятикратным разведением, в некоторых случаях прибегали к методу эпифлуоресцентной микроскопии.

Морские бактериофаги изучались в виде первичных (необогатенных) и обогатенных на бактериальных культурах фильтратов морской воды, методика приготовления которых основана на способе А.Е. Крисса [1]. При необходимости осуществляли стерилизацию фильтратов автоклавированием либо путем 30-ти минутного ультрафиолетового облучения, используя бактерицидную лампу БУФ-30, в 10 см от поверхности которой располагали 10 мл фильтрата, налитого в стерильную чашку Петри на 0,25 см.

В микрокалориметрии применяли закрытый ампульный метод, используя прибор непрерывного мониторинга процессов и реакций Thermal Activity Monitor (ТАМ) LKB 2277 шведской фирмы. Принцип и особенности работы прибора описаны ранее [4]. Исследования вели в жидкой среде в объеме 2,0 мл.

Для экспериментального изучения взаимодействия вирулентного бактериофага и бактериальной клетки использовали жидкий сальмонеллезный бактериофаг групп АВСДЕ (производства Горьковского НИИ эпидемиологии и микробиологии). В опыте смешивали равные объемы цельного бактериофага и разведенной до 1 млн. клеток на 1 мл среды (мясопептонный бульон) бактериальной культуры Сальмонеллы энтеритидис. В контроле роста культуры в тех же равных объемах смешивали культуру с питательной средой. Одновременно исследовали контроли бактериофага и питательной среды.

Влияние морских бактериофагов на бактериопланктон, поли- и монобактериальные ассоциации морских микроорганизмов изучали при смешивании 0,8 мл первичных или обогащенных фильтратов с 0,2 мл морского бактериопланктона или суточной исследуемой культуры в присутствии 1,0 мл питательной среды (пептонной воды). В контроле роста культур использовали стерильный фильтрат. Результаты учитывали при отсутствии теплопродукции в контролях фильтратов и питательной среды.

Результаты и обсуждение. При изучении теплопродукции метаболизма различных микроорганизмов при помощи микрокалориметрии были получены графики – термограммы (термографические линии), представленные в единой координатной системе: по вертикали – величина теплопродукции, выраженная в микроваттах (мквт); по горизонтали – длительность эксперимента, выраженная в часах.

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 [2] и во многом определяется видовой принадлежностью изучаемых микроорганизмов, их первоначальной концентрацией, качеством питательной среды, температурой и рядом других факторов [5,13,18].

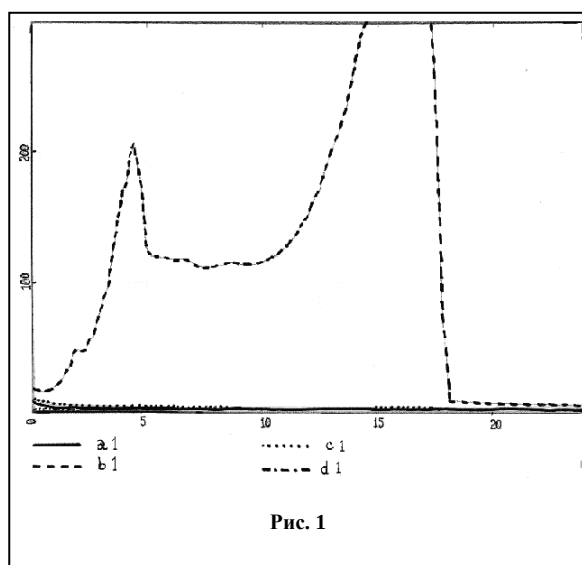


Рис. 1

При изучении взаимодействия вирулентного сальмонеллезного фага с культурой Сальмонеллы энтеритидис получена термограмма (рис.1), проходящая по нулевой отметке энергетического потока, что свидетельствует об отсутствии процессов тепловыделения в опыте (графическая линия a1). В контрольной пробе (графическая линия b1) наблюдаются интенсивные энергетические процессы, характеризующиеся через 14 ч возрастанием теплового

потока до уровней свыше 300 мквт, а через 18 ч резким снижением теплопродукции с постепенным переходом к нулевой отметке. В данном эксперименте мы наблюдаем вирулентную фаговую инфекцию чувствительной бактериальной культуры, приводящую к ингибированию метаболизма клеток-хозяев и, возможно, к полному бактериолизису. Особенности эксплуатации прибора ТАМ, а также некоторые сложности при работе со штаммами патогенных бактерий привели к тому, что первоначальный процесс взаимодействия культуры Сальмонеллы и бактериофага в течение первых 1,5 – 2 ч на термограммах не зафиксирован. Тем не менее, можно предположить, что первоначальные фазы репродукции клетками вирусов (адсорбция, проникновение в клетку, синтез вирусных структурных компонентов и т.д.) могут сопровождаться тепловыми изменениями. Графические линии c1 и d1 отражают

теплопродукцию в контрольных пробах бактериофага и используемой среды и, как видно из рис.1, проходят по нулевой отметке энергетического потока. Это свидетельствует об отсутствии каких-либо метаболических процессов, т.е. о стерильности питательной среды и об отсутствии микробиологической контаминации бактериофага.

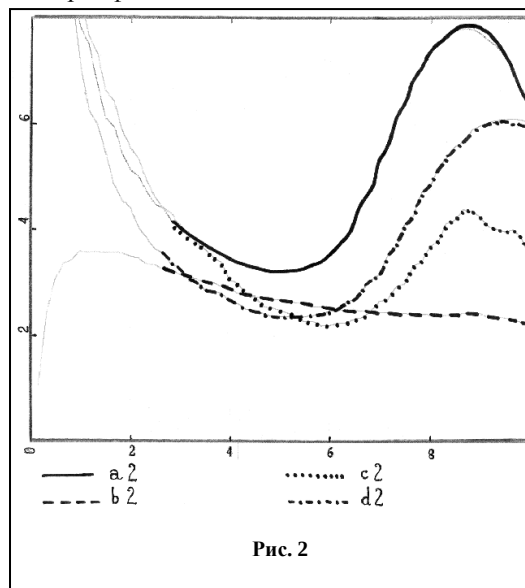


Рис. 2

Следующий эксперимент был посвящен определению роли концентрации вирулентного фага в степени ингибирования метаболизма чувствительных микроорганизмов. Полученные термограммы представлены на рис.2. Графическая линия a2 отражает динамику роста и развития контрольной пробы культуры Сальмонеллы энтеритидис в первые 8-10 ч. Линии b2, c2 и d2 – термограммы метаболизма культуры в присутствии бактериофага, разведенного соответственно в 10, 100 и 1000 раз. За период 5-10 ч эксперимента наблюдается разница в уровнях теплопродукционных процессов динамики роста и развития бактериальной культуры: наивысшей величине энергетического потока соответствует термограмма

контрольного роста культуры – a2, под которой располагаются последовательно одна под другой термограммы метаболизма культуры с бактериофагом, разведенным в 1000, 100 и 10 раз, т.е. от наиболее разведенного к наименее разведенному. Таким образом, степень подавления метаболических процессов чувствительной культуры при взаимодействии с бактериофагом зависит от его количества.

При более длительном наблюдении при низких первоначальных концентрациях чувствительной бактериальной культуры и вирулентных бактериофагов после 20 - 30 ч отмечается всплеск теплопродукции, достигающий в последующие часы 90-100 мквт. Подобный эффект можно наблюдать на термограммах, представленных на рис.3, где графические линии a3 и b3 отражают процессы взаимодействия чувствительной культуры и бактериофагов, взятых в разных разведениях (в 1000 и 100 раз), а графические линии c3 и d3 показывают отсутствие какой-либо биоэнергетики со стороны контролей вирулентного фага. Всплеск теплопродукции можно объяснить проявлением у части не подвергшихся лизису клеток метаболизма, возникающего вследствие обогащения среды питательными веществами в результате бактериолиза основной массы микроорганизмов. Иными словами, возникает новая, так называемая вторичная бактериальная культура [2]. Подобное явление стимулирования фаговой инфекцией деления хозяина и повышения его метаболической активности

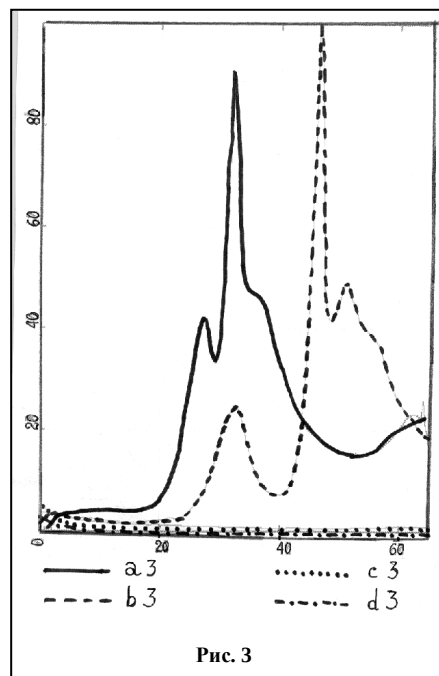


Рис. 3

[12,14,15], возможно, играет важную, хотя и мало изученную роль в водной микробиальной экологии.

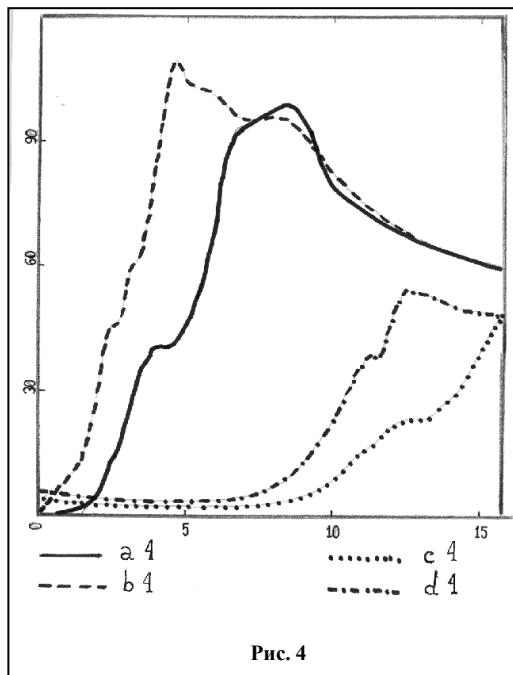


Рис. 4

контрольным ростом этой же культуры в присутствии стерильного первичного фильтрата (графическая линия b4). Термограмма c4, отставая от линии d4 до 30 мквт в период 12-14 ч, свидетельствует о подавлении первичным фильтратом морской воды метаболизма бактериопланктона, по сравнению с жизнедеятельностью этого же бактериопланктона в присутствии стерильного фильтрата (d4). Термограммы на рис.5 отражают длительное, возникающее уже через 2-3 ч после начала эксперимента, ингибирующее влияние обогащенных морских фильтратов на метаболизм накопительной поли - (графическая линия a5 – опыт, b5 – контроль роста культуры) и монокультуры бактерий (линия c5 – опыт, d5 – контроль роста монокультуры). Разница в теплопродукции при изучении накопительной поликультуры доходит до 10-15 мквт, а при исследовании монокультуры - до 17-18 мквт. Графическая линия a6 на рис.6 свидетельствует о подавляющем воздействии первичного фильтрата уже после 18 ч на фазы роста и развития морского бактериопланктона по сравнению с уровнем метаболических процессов при его контрольном росте (b6). Уровень теплопродукционных процессов в опыте почти в два раза ниже, чем в контроле. Сравнение энергетических значений графических линий c6 (опыт) и d6 (контроль роста культуры) выявляет ингибирующую роль обогащенного

По классификации Сибурта, основная масса морских вирусов и фагов сосредоточена в фемтопланктоне - размерной фракции микропланктона, которая включает живые формы менее 0,2 мкм [19]. Влияние этой фракции, сосредоточенной в первичных и обогащенных фильтратах морской воды, на бактериопланктон, накопительные поли- и монокультуры морских бактерий было изучено нами в микрокалориметрии. На рис.4-6 представлены термограммы, отражающие ингибирующее воздействие обогащенных и необогащенных фильтратов морской воды на метаболизм морских бактериальных культур в разные периоды времени. Графическая линия a4 в первые 5-6 ч микрокалориметрии по уровню энергетики постоянно отстает от линии b4 на 6-45 мквт и отражает ингибирующее воздействие первичного фильтрата морской воды на накопительную полиассоциацию морских бактерий по сравнению с

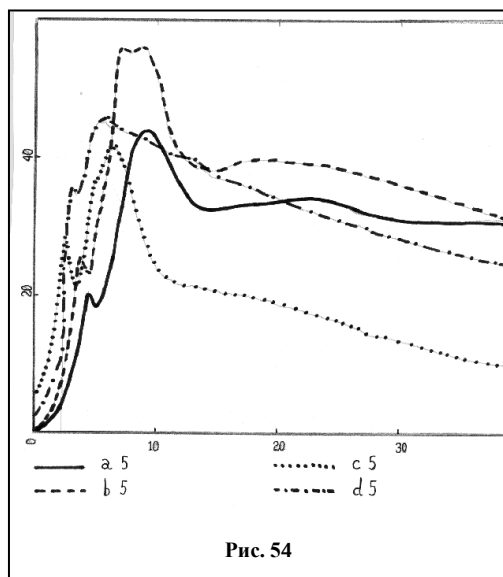


Рис. 5

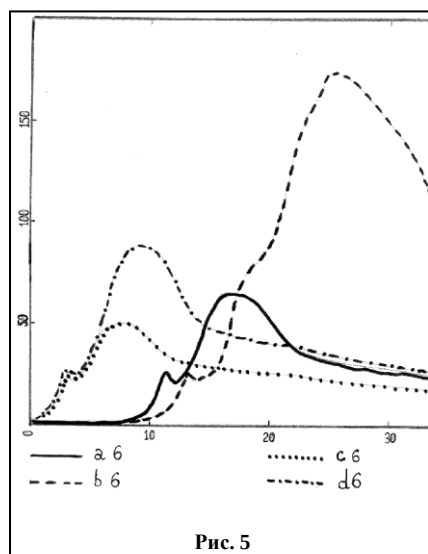


Рис. 5

фильтрата на метаболизм морской монокультуры за 10-12 ч эксперимента более, чем на 35-40 мквт.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что морские бактериофаги в виде первичных или обогащенных морских фильтратов влияют ингибирующе на метаболические процессы морских бактерий. Время, интенсивность и продолжительность воздействия зависят от видов микроорганизмов и бактериофагов, а также их концентраций в среде обитания. Наши наблюдения подтверждают мнения других исследователей, применявших иные методики [8,10,11,16,17,21,22]. В период проводимых экспериментов явления ингибирования встречались не часто и наблюдались лишь в 10-15% от всего количества изучаемых фильтратов морской воды. Это

позволяет предположить, что бактериопланктон Черного моря в своей значительной массе представлен лизорезистентными популяциями, и что лизогения, вероятно, преобладает над литической фаговой инфекцией. Об этом свидетельствуют и результаты поиска бактериофагов Черного моря, проводимые еще в конце 50-х годов [1].

Выводы. Вирулентные бактериофаги при контакте с чувствительными бактериальными культурами вызывают ингибирование метаболизма этих микроорганизмов, вплоть до полного их лизиса. Этот процесс зависит от вида и количественных соотношений клеток-хозяев и фагов-паразитов. Микрокалориметрические наблюдения такого взаимодействия выявили поддерживающую роль фаговой инфекции в жизнедеятельности чувствительных микроорганизмов, что, по-видимому, является одним из важных факторов в экологическом значении морских вирусов для продукции, трансформации и циркуляции органического вещества и энергии в Мировом океане.

Бактериофаги Черного моря в основном представлены умеренными фагами, чья продукция осуществляется за счет лизогении. Явления более или менее выраженной литической инфекции среди бактериальных популяций бактериопланктона Черного моря встречаются редко и, по нашим наблюдениям, не превышают 10-15% от всей фаговой инфекции.

Применение микрокалориметрии весьма перспективно при изучении влияния различных факторов антропогенного воздействия на морских гидробионтов, а также для углубленного исследования процессов взаимодействия отдельных представителей микромира, и, в частности, бактерий и фагов.

Авторы благодарят Сосновскую Р.В. и сотрудников Севастопольской СЭС за оказанную помощь в проведении микробиологических исследований.

1. *Крисс А.Е.* Морская микробиология (глубоководная). - М.: Изд.АН СССР. - 1959. - 456 с.
2. *Макиров К.А.* Микробиология, вирусология и иммунология. - Алма-Ата: Казахстан, 1974. - 372 с.
3. Практикум по микробиологии / Под ред. Н.С.Егорова; М.: Изд. Московского Университета. - 1976. - 308 с.
4. *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: ЭКОСИ-Гидрофизика. - 1997. - С.47-49.
5. *Battley E.H.* Termodinamies of growth E. Coly K-12. //Calorymetry and Thermodynamics of Biological Processes: Inter. Soc. For Biol. Calorymetry 8 th ISBC Conf. Godep. May 15-19, 1992. - Goteborg. - 1992. - I.1.

6. Bergh O., Borsheim K.Y., Bratbak G., Heldal M./ High abundance of viruses found in aquatic environments.//Nature. – 1989 – 340, n.6233. – P.467-468.
7. Boehme J., Frischer M.E., Jiang S.C. et al. Viruses, bacterioplankton and phytoplankton in the southeastern Gulf of Mexico: Distribution and contribution to oceanic DNA pools.//Mar. Ecol. Prog.-Ser. – 1993. - **97**, n.1 – P.1-10
8. Hara S., Koike I. Abundance of bacterialphage in the ocean.//5th Int.Symp. Microp.Ecol. (ISME 5), Kyoto, Aug.27 - Sept. 1,1989: Abstr. – S.I., [1990]. – P.161.
9. Hara S., Terauchi K., Koike I. Abundance of viruses in marine waters: Assessment by epifluorescence and transmission electron microscopy.//Appl. Environ. Microbiol. – 1991. – **57**, n.9 – P.2731-2734.
10. Hennes K.P., Simon M. Significance of bacteriophages for controlling bacterioplankton growth in mesotrophic lake.//Appl. Environ. Microbiol. – 1995. - **61**, n.1. – P.333-340.
11. Koike I., Hara S., Terauchi K. et al. Marine viruses – their role in upper ocean DOM dynamics.//8th Int. Congr. Immunol., Budapest, Aug. 23-28, 1992:Abstr. – Budapest. - 1992 – P.72.
12. Lammers W.T. Stimulation of bacterial cytokinesis by bacteriophage predation.//Sediment Water Interactions. Hart.B.T.; Sly. P.G. – eds. – 1992 -**235-236**. – P.261-265.
13. Lamprecht I. Toxicological Studies of Energy Flows in Ecological Systems.//Calorimetry and Thermodynamics of Biological Processes: Inter. Soc. For Biol. Calorimetry 8 th ISBC Conf. Goteb. May 15-19, 1992. – Goteborg. - 1992. – IV. 6.
14. Middelboe M., Jorgensen N.O.G., Kroer N. Effects of viruses on nutrient turnover and growth efficiency of noninfected marine bacterioplankton. // Appl. Environ. Microbiol. – 1996 - **62**, n.6. – P.1991-1997.
15. Murray A.G., Eldridge P.M. Marine viral ecology: Incorporation of bacteriophage into the microbial planktonic food web paradigm.//J. Plankton - Res. – 1994. – **16**, N6. – P.627-641.
16. Proctor L.M., Fuhrman J.A. Roles of viral infection in organic particles flux.// Mar. Ecol. Progr. Ser. – 1991 – **69**, n. 1-2. – P.133-142.
17. Proctor L.M., Fuhrman J.A. Mortality of marine bacteria in response of the virus size fraction from seawater.// Mar.Ecol.Prog. Ser. – 1992 – **87**, n.3. – P.283-293.
18. Schaarschmidt B., Lamprecht J. Calorimetric Characterization of Microorganisms.//Separatum EXPERIENTIA 32, 1230 (1976), Birkhauser Verlag, Basel (Schweiz) – P.1230-1234.
19. Sieburth J. Mc N., Smetacek V., Lenz J. Pelagic ecosystem structure: heterotrophic compartments of the plankton and their relationships to plankton size fractions// Limnology and Oceanography. – 1978. – **23**, n.6. – P.1256-1263.
20. U.S.Joint Global Ocean Flux Study: Bermuda Atlantic Time-Series Study. - 1993. – Vers.3. – P.85-87.
21. Weinbauer M.G., Peduzzi P. Frequency, size and distribution of bacteriophages in different marine bacterial morphotypes.//Mar. Ecol. Prog. Ser. – 1994. – **108**, n.1/2. – P.11-20.
22. Wilcox R.M., Fuhrman J.A. Bacterial viruses in coastal sea water: Lytic rather than lysogenic production.//Mar.Ecol.Prog.Ser. – 1994. – **114**, n. 1-2. – P.35-45.

Получено 25.08.98

O. A. STEPANOVA, V. G. SHAIDA

MICROCALORIMETRICAL CHARACTERISTICS OF BACTERIA – BACTERIOPHAG INTERACTIONS

Summary

Microcalorimetric studies of bacteria-bacteriophage interactions have showed the inhibition influence of litic phage infection on microorganism-sensitive metabolism. Level of inhibition depends upon the phages concentration. During long term studies of litic phage infection the support role of viruses in metabolism of bacteria-host cells was found. The microcalorimetric studies of interactions between marine microorganisms and bacteriophages showed that Black Sea viruses usually are presented by temperate bacteriophages, and the lisesistent individuals are dominated among Black Sea bacterioplankton..