

УДК619:616.22/23-002

Еспембетов Б.А., Сырым Н.С., Зайцев В.Л., Султанкулова К.Т., Сансызбай А.Р.

*РГП «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности,
пгт. Гвардейский*

ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ МИКОБАКТЕРИОФАГОВ

Аннотация

Результаты исследований морфологии фаговых корпускул позволят получить более полное представление о морфологических характеристиках штаммов микобактериофагов (МБфагов). При проведении электронно-микроскопического анализа препарата на электронном микроскопе JEOLJEM 100 CX2, были определены формы и сделаны фотоснимки с увеличением $\times 10000$ для проведения морфометрического расчета размеров МБфагов.

Ключевые слова: электронный микроскоп, туберкулез, микобактериофаг, морфология, морфометрический анализ.

Введение

В настоящее время выяснения морфологии бактериофагов в большой степени остается зависимой от электронной микроскопии. Объективный характер электронно-микроскопических исследований подтверждается выявлением влияния микроорганизмов, вызывающих в процессе своей жизнедеятельности деструктивные изменения, как в окружающей среде, так и в организме животных [1, 2].

Электронная микроскопия – метод морфологического исследования с помощью потока электронов, позволяющих изучить структуру культур, фагов на макромолекулярном и субклеточном уровнях [3, 4]. Данное исследование позволяет судить о морфологических характеристиках фаговых частиц, которые могут являться косвенным доказательством генетической однородности популяции. Изучение ультраструктуры бактериофагов также имеет большое значение при конструировании биопрепаратов для практических целей [5, 6, 7, 8].

Анализ данных литературы позволил предположить, что только при совместном исследовании морфо-биологических особенностей можно получить полную и углубленную информацию о функциональных характеристиках фагов. Это объясняется тем, что различные виды туберкулезных фагов отличаются по морфологическим свойствам, формируя тем самым хорошо очерченные группы.

В связи с этим, определение особенностей фагов на основе изучения электронно-микроскопическим методом позволит правильно оценить морфологические характеристики МБфагов.

Цель исследований – изучить морфологию фаговых корпускул МБфагов электронно-микроскопическим методом.

Материалы и методы

Для исследований были взяты выделенные из биологического материала и объектов внешней среды различные МБфаги.

Препараты для электронной микроскопии готовили методом. Варианты фагов выделяли из среды культивирования с помощью низкоскоростного центрифугирования при 3000 об/мин в течение 30 минут и последующего центрифугирования надосадочной

жидкости при 100000g в течение 40 мин. Полученные осадки ресуспендировали в минимальном объеме 0,05 М фосфатного буфера.

Для негативного контрастирования фагов концентрированный биоматериал адсорбировали на сетки с формваровой подложкой, напыленный углем. Адсорбцию проводили под воздействием электростатического поля тефлоновой пластины с ячейками для биопроб в электростатическом поле тефлоновой пластины. Время адсорбции составляло 10 минут. После адсорбции пробы контрастировали в течение 5 минут 2 % водным раствором фосфорно-вольфрамовой кислоты с pH 6.8-7.0

Для проведения электронной микроскопии осадок бактерий фиксировали 2% раствором глутаральдегида на 0.2 М каодилатном буфере в течение 2 часов с последующей фиксацией 2% - ным осмиевым фиксатором Шестранда. Фиксированные пробы обезвоживали в этиловом спирте возрастающей концентрации от 60% до абсолютного. Морфометрический анализ размеров фагов проводили на полученных негативных фотопластинах с помощью увеличительной лупы, со шкалой деления 0,1 мм. Для анализа использовали замеры не менее 100 фагов.

Результаты и обсуждение

Электронно-микроскопическое изучение препаратов фага показало следующее, что фаг имеет изометрическую головку и гибкий не сокращающийся хвостовой отросток с базальной пластинкой и одиночной фибриллой.

При исследовании проб фаги выявлены в образцах, различающиеся по морфологии и структуре (рисунки 1, 2, 3, 4, 5)

На рисунке 1, представлены микобактериальные клетки из использованных культуральных образцов. Жгутики отсутствуют, поверхность бугристая.

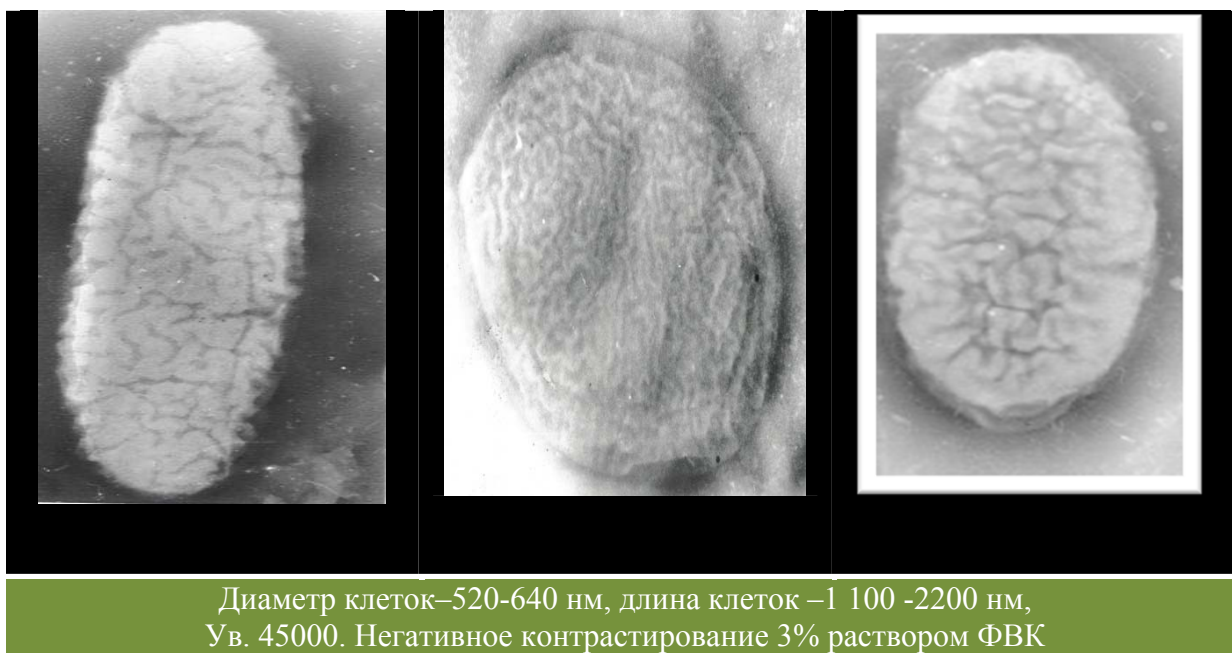
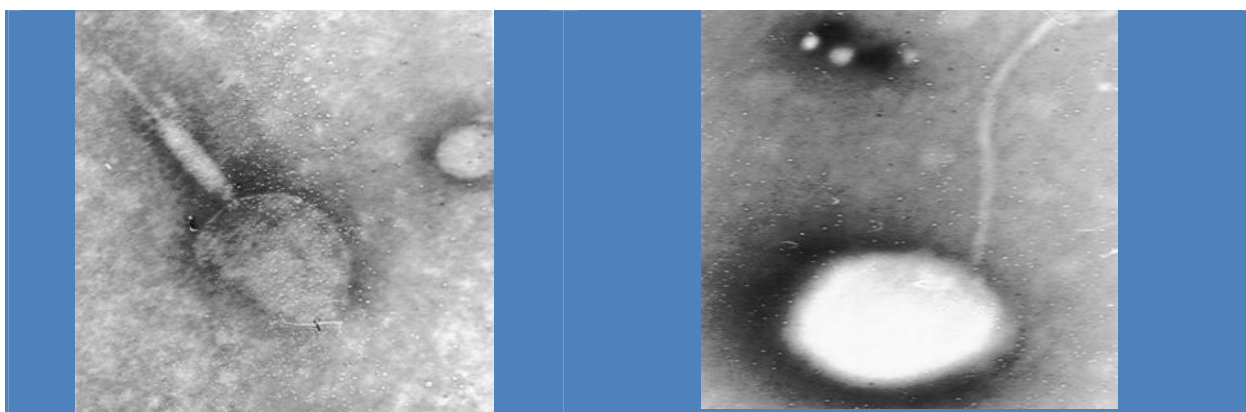


Рисунок 1 - Микобактериальные клетки из культуральных образцов овальной и удлиненной формы.



Диаметр капсида – 123-125 нм, длина хвостового отростка – 125-127 нм, диаметр хвостового отростка 20-25 нм, хвостовая пластинка диаметром 35-40 нм. Ув. 145000. Негативное контрастирование 3% раствором ФБК.

Рисунок 2 - Фаги с капсидом икосаэдрической формы. Классификация Myoviridae.



А

Б

А - Фаг с капсидом овальной формы, слегка заостренной вершиной. Классификация Siphoviridae. Диаметр капсида – 150-155 нм, длина хвостового отростка – 220-227 нм, длина чехла - 115 нм, диаметр чехла 25 нм, диаметр иглы 5-7 нм.

Б - Фаг с капсидом круглой формы. Классификация Siphoviridae. Диаметр капсида – 175-180 нм, длина хвостового отростка – 370-375 нм, диаметр хвостового отростка 5 – 7 нм. Ув. 145000. Негативное контрастирование 3% раствором ФБК.

Рисунок 3 - (А, Б).



Рисунок 4 - Ув. 145000. Негативное контрастирование 3% раствором ФВК.

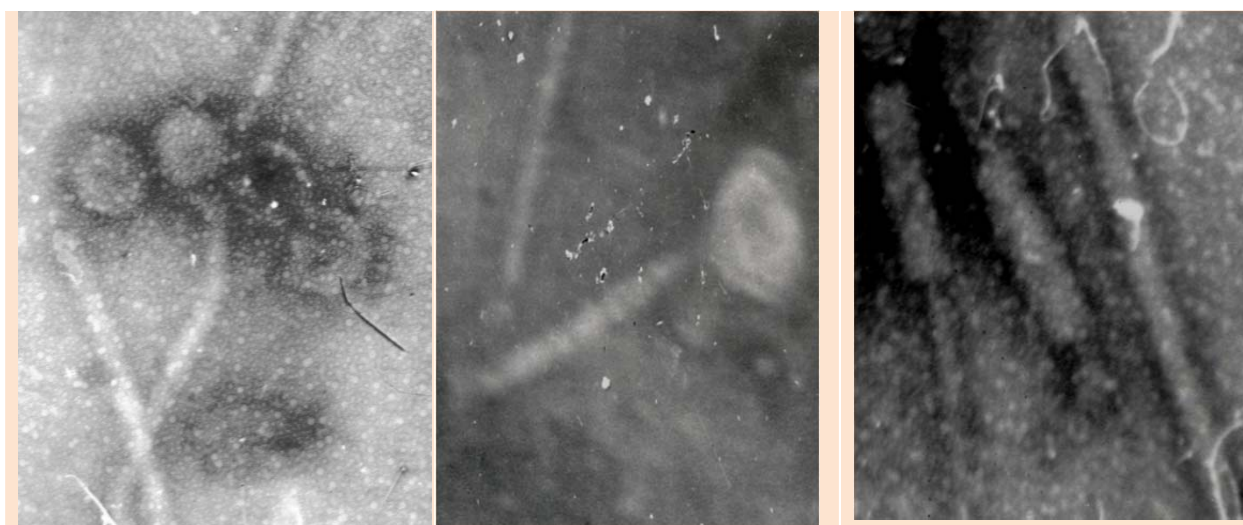


Рисунок 5-Фаги с капсидом округлой и икосаэдрической формы(1,2)

Рисунок 6 - Фаги вибрионообразной формы (3)

Таким образом, при визуализации нефиксированных образцов отмечено, что у большинства фаговых частиц базальная пластинка и фибрилла имеется. Хвостовой отросток соединен с головкой посредством характерного структурного комплекса, хорошо заметного на снимках теней МБфага (рисунок 6). Это образование можно увидеть и в проксимальной части отдельных отростков (рис 7, 8, 9).

Изучения взаимодействия между фагами и микобактериальной клеткой проводили следующим образом: на жидкой питательной среде DubosBrothBase суспензию (МБфаг+культура микобактерий) в отработанной концентрации (соотношение 1:100) культивировали 5, 15, 30 мин и 1, 3, 4, 9, 12, 18, 24 часа при температуре 38 °С (таб.1).

Таблица 1 - Экспозиция взаимодействия между МБфагами и микобактериальной клеткой

п/ п	Mycobacterium phages	Экспозиция взаимодействия МБфагов с микобактериальной клеткой									
		5 мин	15 мин	30 мин	1 час	3 час	6 час	9 час	12час	18час	24час
1	MBphage - bovis-8 из почвы от 23.06.15.	Н	Н	Н	Н	К	К	Н	Ф+К	Ф+К	Ф+К
2	MBphage-tuber. из почвы от 26.06.15.	Н	Н	Н	Н	Ф+К	Ф+К	Ф+К	Ф+К	Ф+К	Ф+К
3	MBphage-tuber. из мокроты от 23.10.15.	Н	Н	Н	К+Ф	Ф+К	Ф+К	Ф+К	Ф+К	К	К
4	Mycobacterium - bovis изпат.мат. от 06.10.15.	Н	Н	Н	К+Ф	Ф+К	Ф+К	Ф+К	Н	Н	Н
Примечание: Н- не выявлено; Ф-МБфаги; К - бактериальные клетки											

Через каждые 5, 15, 30 мин и 1, 3, 4, 9, 12, 18, 24 часа отбирали по 200 мкл суспензии, которые после обработки 2%-ным раствором глутарового альдегида и негативным контрастированием анализировали под электронным микроскопом. Изучение электронных микрофотографий позволило констатировать следующее: исследования проб взаимодействия всех МБфагов на поверхности микобактерий по времени, начинались с пятиминутной и завершались 24 часовой экспозицией. Так в результате у 1-ой пробы взаимодействие проявлялось через 12 часовой экспозицией, у 2-ой пробы через 3 часа, у 3-ей и 4 -ой пробах через час, соответственно. Также нами было обнаружено, что на большинство клеток (ориентировочно – 80-85%) составляющие микобактерии эффективно адсорбировались фаги и после 60 – минутной экспозиции системы фаг-клетка с момента внесения фага в образцах можно увидеть разрушенные клеточные структуры

M.bovis и M.tuberculosis (рисунки 7 и 8).



Рисунок 7 – Электронная микроскопия бактерий, выявленных в образцах MBphage- tuberculosis. Негативное контрастирование 3% раствором ФВК. X 50000 и 60000

Полученные данные позволяют сделать вывод, что период взаимодействия при инфицировании клеток *M.bovis* и *M. tuberculosis* H₃₇R_v МБфагами составляет начиная с 60-ой минут.

Судя по фотоснимкам и учитывая относительно короткий временной интервал инкубации системы фаг-клетка, можно сделать заключение о достаточно умеренной скорости адсорбции МБфага на таких клетках (от 1 до 12 час).

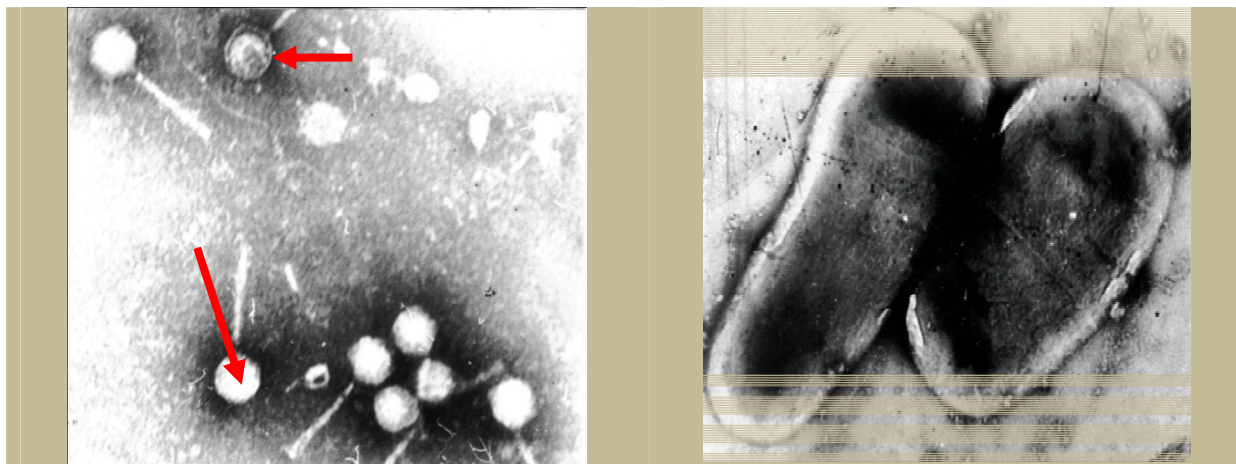


Рисунок 8– Электронная микроскопия бактериофагов и бактериальных клеток в образцах MBphage-bovis. Негативное контрастирование 3% раствором ФВК. x 100000 и 65000

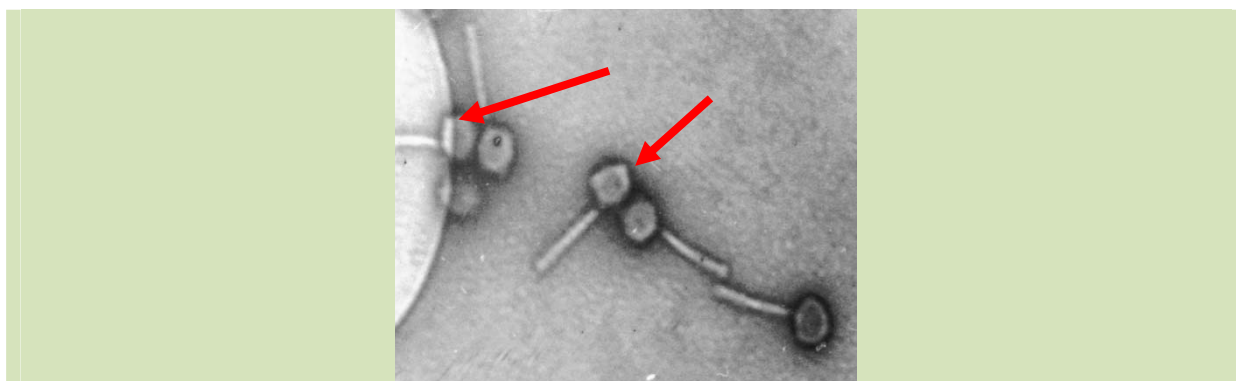
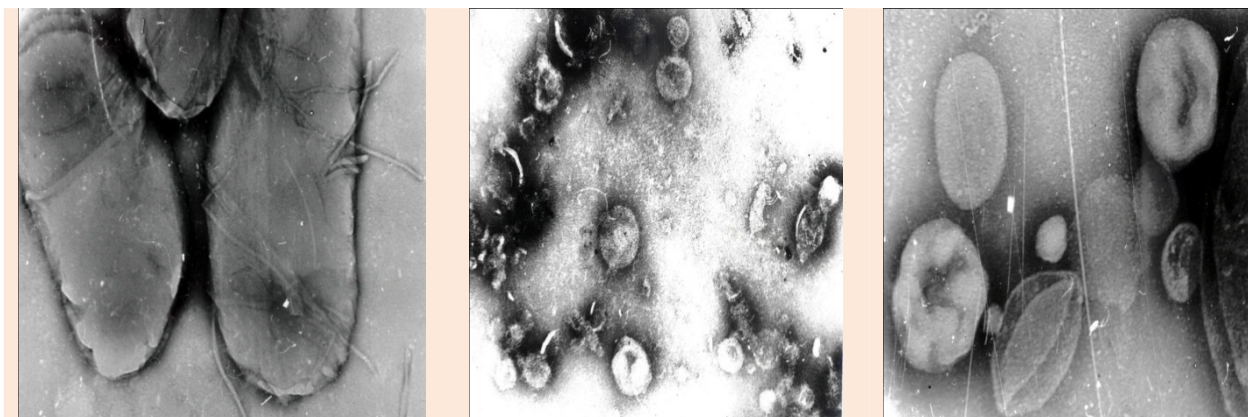


Рисунок 9 – Электронная микроскопия бактериофагов в образцах MBphage-bovis. Негативное контрастирование 3% раствором ФВК. X 120000

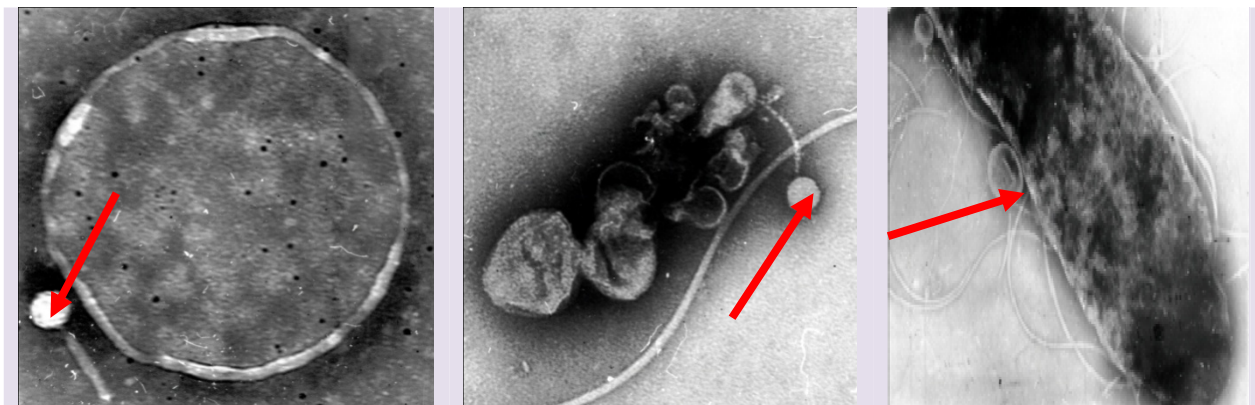


Рисунок 10 – Электронная микроскопия бактериофагов в образцах MBphage-tuberculosis. Негативное контрастирование 3% раствором ФВК. X 100000.

Как видно из рисунков 8, 9, 10 к клеточной стенке бактерий фаги прикрепляются концевыми нитями отростков. Затем оболочка бактерии растворяется с помощью фермента лизоцима, белковый чехол хвостового отростка сокращается и через канал хвостового отростка нуклеиновая кислота вводится (впрыскивается) в цитоплазму клетки. Проникновение нуклеиновой кислоты фага в клетку путем впрыскивания, при этом оболочка фага остается на поверхности бактериальной клетки.

По данным электронной микроскопии (рисунок.10) фаг принадлежит MBphage-tuberculosis. Вирион МБфаг состоит из капсида округлой формы головки диаметром 70 нм и длинного хвостового отростка длиной 190 нм. Головка соединяется с хвостом посредством такого же структурного комплекса, который характерен и для МБфаг.

Вместе с тем в суспензии МБфаг-tuberculosis обнаружены микроорганизмы, на поверхности которых адсорбировано всего несколько фаговых частиц. В препаратах найдены формы *M. tuberculosis* H₃₇R_V, которые с фагом не взаимодействуют.

В результате выявленных при электронной микроскопии пробах бактериофагов установлено, что они содержат икосаэдрическую головку 65-70 нм в диаметре и хвост длиной 150-160 нм. При визуализации нефиксированных образцов отмечено, что у большинства фаговых частиц имеется базальная пластинка и фибрилла. Хвостовой отросток соединен с головкой посредством характерного структурного комплекса, хорошо заметного на снимках теней МБфага. Это образование можно увидеть и в проксимальной части отдельных отростков.

Обобщение данных электронной микроскопии позволило фиксировать схематическое изображение МБфагов и указать средние значения морфологических размеров дискретных элементов МБфагов.

Таким образом, методические приемы электронной микроскопии оправдывают себя изучении тонкой структуры МБфага.

Литература

1. Каттер Э. Бактериофаги: биология и практическое применение / Каттер Э., Сулаквелидзе А.; пер. с англ.: коллектив пер.; науч. ред. рус. изд. А.В. Летаров. – Москва: Научный мир, 2012. – 636 с.
2. Русалеев, В.С. Таксономия вирусов бактерий / В.С. Русалеев // Ветеринария. – 1990. – № 12. – С. 25 – 28.

3. Электронно-микроскопическое изучение новых бактериофагов малоизученных энтеробактерий / С.Н. Золотухин [и др.] // Перспективы использования препаратов бактериофагов для превенции и лечения инфекций, вызываемых патогенными и условно-патогенными микроорганизмами: материалы Международного семинара, 10 – 11 ноября 2005. – Тбилиси, 2005. – С. 37 – 38.

4. *Virus Taxonomy*. Classification and Nomenclature of Viruses. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses / Edited by M.H.V. van Regenmortel [et al.]. – San Diego: Academic Press, 2000. – P. 43 – 53, 64 – 129.

5. Пономарев, А.П. Электронно-микроскопическое выявление вирусов животных в неконцентрированных вирусосодержащих суспензиях / А.П. Пономарев, О.Г. Андреева, Т.Н. Артамонова // Вестник РАСХН. – 2002. – № 2. – С. 74 – 77.

6. *Clokie, M.R.J.* Bacteriophages: methods and protocols, volume 1: isolation, characterization, and interactions / M.R.J. Clokie, A.M. Kropinski, 2009, Humana Press, 301 p.

7. Тихоненко, А.С. Ультраструктура вирусов бактерий / А.С. Тихоненко. – М.: Наука, 1968 – С. 89.

8. Ковалева Е.Н., Золотухин С.Н., Васильев Д.А. Электронно-микроскопическое исследование энтерококковых бактериофагов // VestnikOrelGAU, 2(53), April 2015. С 68-71

Еспембетов Б.А., Сырым Н.С., Зайцев В.Л., Султанкулова К.Т., Сансызбай А.Р.

МИКОБАКТЕРИОФАГТАРДЫҢ ЭЛЕКТРОНД МИКРОСКОПИЯСЫ

Аңдатпа

Бұл зерттеу микобактериофаг корпускулаларының морфологиялық сипаттамаларының толық бейнесін алуға мүмкіндік берді. Препараттың электронды микроскопиялық талдауы JEM 100 СІІ электронды микроскопы арқылы жүзеге асырылып, микобактериофаг морфометриялық өлшемдерін есептеу үшін фотосуреттер x10000 ұлғайтылды.

Кілт сөздер: электрондық микроскоп, туберкулез, микобактериофаг, морфология, морфометриялық талдау.

Yespembetov B.A., Syrym N.S., Zaitsev V.L., Sultankulova K.T., Sansyzbay A.R.

ELECTRONIC MICROSCOPY OF MICROBACTERIOPHAGES

Annotation

The results of studies of the morphology of phage corpuscles will make it possible to obtain a more complete picture of the morphological characteristics of strains of mycobacteriophages. When the electron microscopic analysis of the preparation was carried out with the JEM 100 CX, JEOL electron microscope, the shape was determined and photographs were taken with an increase of x10000 for morphometric calculation of the mycobacteriophages dimensions.

Key words: electron microscope, tuberculosis, mycobacteriophage, morphology, morphometric analysis.