

**Библиографический список**

1. Castro-Chacón J.H., Khomenko A.V., Rangel-Rojo R. Phase matched vectorial three-wave mixing in isotropic Kerr media. // Optic. Communcat., 2009, V. 282, N. 7, P. 1422-1426
2. Stoylov S.P., Gyurova A., Georgieva R., Danova S. Do bacteria have an electric permanent dipole moment? // Colloids and Surfaces B, 2008, V. 64, N. 2, P. 255-259.
3. Bunin V. D., Voloshin A. G. Determination of cell structures, electrophysical parameters and cell population heterogeneity. // J. of Colloid and Interface Sci.–1996.–V.180.–P. 122–126.

**ELRCTROOPTICAL STUDY OG PHAGE-BACTERIA INTERACTION**

*Ignatov S.G., Denisenko E.A., Verevkin V.V., Voloshin A.G.*

**Key words:** bacteriophages, electrooptic, identification of bacteria

*The electrooptical studies have been used to analyze phage-bacteria interaction. The possibility of electrooptical measurements for identification of bacteria has been investigated.*

УДК 579.61

**ПОИСК ЛИЗОГЕННЫХ ШТАММОВ ВАГИНАЛЬНЫХ ЛАКТОБАЦИЛЛ**

*Исаева А.С. \*, Летаров А. В. \*, Ильина Е.Н. \*\*,*

*Муравьёва В.В. \*\*\*, Анкирская А.С. \*\*\**

*\* ФГБУН Институт микробиологии им. С. Н. Виноградского РАН, Москва,*

*[letarov@gmail.com](mailto:letarov@gmail.com), [isaeva\\_alina@list.ru](mailto:isaeva_alina@list.ru)*

*\*\* ФГУ НИИ Физико-химической медицины, Москва*

*\*\*\* ФГУ Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии*

*им. академика В.И. Кулакова Минздравооцразвития России, Москва*

**Ключевый слова:** *Лактобактерии, бактериофаги, MALDI-TOF масс-спектрометрия, митомициновая индукция профагов*

*В результате проведенных исследований удалось показать высокую степень видовой и внутривидовой гомогенности индивидуальных популяций влагалищных лактобацилл. Кроме того с помощью ПЦР-системы были обнаружены лизогенные изоляты лактобактерий. Детекция свободной фаговой частицы после митомициновой индукции лизогенных культур может говорить в пользу гипотезы о роли фаговой инфекции в развитии бактериального вагиноза.*

**Введение**

С момента первого описания в 1892г. А. Дедерлейном лактобактерий как преобладающего микроба нормального влагалищного биоценоза [1], их значимость в поддержании колонизационной резистентности женской мочеполовой системы и до настоящего времени остается неоспоримой. Известно также, что первыми признаками вагинальных дисбиотических нарушений является снижение концентрации лактофлоры или потеря ею биологических свойств.

Существуют различные факторы, способные отрицательно влиять на лактобацилл. Исследование возможных причин возникновения бактериального вагиноза, состояния, характеризующегося значительным снижением численности лактофлоры или полной ее элиминацией, привело к появлению гипотезы о роли фагов в развитии симптомов данного дисбиоза [2]. Виды и штаммы вагинальных лактобацилл варьируют у различных индивидуумов [3]. Плотность колонизации довольно высока, и составляет около  $10^6 - 10^7$  КОЕ на вагинальный мазок. Таким образом, можно предположить, что это сообщество может подвергаться массовому лизису бактериофагами. Попадание лизогенного штамма в популяцию с высокой плотностью, представленную штаммами чувствительными к внесенному в среду фагу, может действительно привести к сокращению популяции из-за фагового лизиса резидентной флоры. В этот момент свободная ниша может быть заселена строгими анаэробами (*Prevotella/Porphyromonas* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Fusobacterium* spp., *Mobiluncus* spp.) и гарднереллой.

Результаты исследования Kilic et al. [4], показали преобладание лизогенных штаммов лактобацилл в образцах, отобранных у группы пациенток, выделенные фаги оказались вирулентными для изолятов лактобацилл полученных от тех же или других женщин. Однако позже Martin et al. [5] не обнаружили в своей коллекции лактобактерий лизогенных штаммов, способных высвободить жизнеспособные фаговые частицы.

Частота лизогенизации клеток хозяина умеренными фагами, как правило, не велика ( $10^{-7} - 10^{-2}$ ) [6, 7], таким образом, размножение этих вирусов в экологической нише, плотно заселённой чувствительным штаммом хозяина происходит главным образом по литическому пути, что приводит к гибели большинства клеток, которые потом могут быть замещены потомками клеток лизогенного штамма, исходно высвободившего фаг, а также вновь образованными лизогенными бактериями, либо, при менее благоприятном стечении обстоятельств, другими видами бактерий. Такой сценарий был смоделирован математически и экспериментально [7] на модели популяций *E. coli*. Принимая во внимание, что частота спонтанной индукции многих лизогенных штаммов вагинальных лактобацилл составляет менее чем  $10^{-8}$  БОЕ на клетку [4] в лабораторных культурах, любой фактор, способствующий повышению частоты индукции, может увеличивать вероятность «экологической катастрофы» в вагинальном микробном сообществе. Это может объяснить существующую эпидемиологическую связь между курением и риском бактериального вагиноза [2], так как компоненты табачного дыма могут вызывать индукцию профагов у лактобацилл [8]. Однако вышеописанный механизм нарушения сообщества вагинальных лактобацилл может работать только при условии, что индивидуальные популяции этих бактерий достаточно гомогенны и составлены одним, максимум двумя доминирующими штаммами. В противном случае маловероятно одновременное попадание в систему фагов, способных лизировать все основные компоненты лактобактериального сообщества, а, следовательно, существенного снижения общей численности не произойдёт. Поэтому для верификации гипотезы фаговой этиологии (по меньшей мере, части случаев) бактериального вагиноза необходимо получить данные о степени гетерогенности индивидуальных популяций лактобацилл.

### **Материалы и методы**

Клинические образцы лактобактерий отбирались в поликлинике при Федеральном государственном учреждении «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И.Кулакова Федерального агентства по высокотехнологичной медицинской помощи». Идентификацию лактобацилл проводили методом MALDI-TOF масс-спектрометрии. Для записи, обработки и анализа масс-спектров использовали программное обеспечение фирмы Bruker Daltonics (Германия): FlexControl 3.0 и Biotyper 2.0. Дифференциацию лактобацилл осуществляли методом REP-ПЦР. ДНК из клеток лактобацилл выделялась с помощью набора

ДНК-Экспресс (Литех, Россия) в соответствии с инструкцией. Рер-ПЦР проводилась, как описано в работе May et al. [3]. Секвенирование гена 16S лактобацилл проводилось с использованием набора для секвенирования BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit и секвенатора 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems, USA) согласно инструкциям производителя.

Поиск изолятов, содержащих профаг, проводился с помощью ПЦР - системы. Изоляты положительные на наличие интегразы, подвергали митомициновой индукции [9]. Наличие свободных фаговых частиц в индуцированной культуре детектировали с помощью ПЦР-системы [10].

### Результаты и обсуждение

Для того чтобы изучить видовой состав индивидуальных популяций лактобацилл влагалища человека, были получены клинические образцы от 44 пациенток с разной формой микроценоза влагалища. За время исследований удалось сформировать довольно богатую коллекцию изолятов лактобацилл, включающую в себя 897 изолятов, представленных 11 видами.

Следует отметить, что среди 44 пациенток, от которых были получены и идентифицированы лактобациллы, у 43 лактофлора была представлена одним или двумя (в 6-ти случаях) видами. И только у одной разнообразие лактобацилл доходило до 3-х видов. С помощью РЕР-ПЦР удалось установить и относительную штаммовую гомогенность индивидуальных популяций лактобацилл. При таких условиях фаговая инфекция может действительно явиться причиной снижения численности лактофлоры. Однако, при предварительном анализе выборки изолятов, в количестве 45, из сформированной коллекции на способность выделять фаги, инфекционные в отношении этих же наборов культур при индукции митомицином С, лизогенных штаммов не было обнаружено, что находится в противоречии с ранее опубликованными данными [4]. Вероятно, изоляты этой выборки не содержали профагов, поэтому, для полноценной проверки гипотезы о фаговой этиологии части случаев вагиноза нами была проведена дополнительная работа, а именно, поиск изолятов, содержащих профаг, с помощью ПЦР-системы. Нами были созданы пары праймеров, отжигающиеся на участки ДНК гена интегразы, белка, ответственного за встраивание ДНК фага в геном бактерии-хозяина. Для этого мы использовали геномы, известных на данный момент, лактофагов kc5a и phiadh. При анализе выборки изолятов *L.gasseri*, мы обнаружили наличие участка этого гена требуемой длины у некоторых из них (рис.1 дорожки 5, 6, 7, 8), что было подтверждено секвенированием выделенных фрагментов из геля.



**Рис. 1 - Фрагменты гена интегразы фага phiadh. Маркер - 1kb DNA ladder (Fermentas).**

Для того чтобы детектировать наличие свободных фаговых частиц после индукции, нами были синтезированы праймеры, отжигающиеся вблизи концов генома профага. При эксцизии профага вирусная ДНК замыкается в кольцо и при упаковке в вирионы раскрывается по другому сайту, поэтому на матрице ДНК из свободных вирусных частиц, мы получим ПЦР-продукт известной длины (Рис.2).



**Рис. 2. - Обнаружение свободных вирусных частиц в одном из лизатов (дорожка №2), полученных в результате индукции профагов митомицином. Маркер - 1kb DNA ladder (Fermentas).**

Нами был обнаружен один изолят, из которого после митомициновой индукции выделяются свободные фаговые частицы. Однако пока остается неизвестным, способны ли данные частицы инфицировать какие-либо изоляты лактобацилл. Данная ПЦР-система поможет нам отобрать лизогенные культуры, с целью выделения фагов и изучения их инфекционности по отношению к коллекции клинических изолятов лактобацилл.

#### Заключение

Очевидная гомогенность индивидуальных популяций лактобацилл показывает, что популяция не подвергается постоянному воздействию штамм специфичных селективных факторов, зависящих от плотности популяции (таких, как фаговая инфекция). В то же время, существование популяции с относительно высокой плотностью делает возможным редкие явления массового фагового лизиса, что было предложено Blackwell [2] в качестве одного из триггерных механизмов при развитии бактериального вагиноза. Такое событие может произойти в результате попадания лизогенного штамма, высвобождающего фага, активного против резидентной популяции. Тем не менее, низкий (если он есть)

уровень внутривидового разнообразия является просто фактором, способствующим вмешательству фагов в развитие вагиноза. Детальное исследование временной динамики штаммов лактобацилл во влагалище и феномена лизогении у этих культур также может дать ключ к проверке этой гипотезы.

#### *Библиографический список*

1. Анкирская А.С., Муравьёва В.В. Лабораторная диагностика оппортунистических инфекций влагалища // *Consilium medicum*, 2005, Т. 7. № 3, с. 206-210.
2. Blackwell A.L. Vaginal bacterial phaginoses? // *Sexually Transmitted Infections*, 1999, 75, 352-353.
3. Antonio May A. D., Hillier S. L. DNA Fingerprinting of *Lactobacillus crispatus* Strain CTV-05 by Repetitive Element Sequence-Based PCR Analysis in a Pilot Study of Vaginal Colonization // *Journal of Clinical Microbiology*, 2003, 41(5), 1881-1887.
4. Kiliç A. O., Pavlova S. I., Alpay S., Kiliç S. S., Tao L. Comparative Study of Vaginal *Lactobacillus* Phages Isolated from Women in the United States and Turkey: Prevalence, Morphology, Host Range, and DNA Homology // *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 2001, 31-39.
5. Martin R., Soberon N., Escobedo S., Suarez J.E. Bacteriophage induction versus vaginal homeostasis: role of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the selection of *Lactobacillus* defective prophages // *International Microbiology*, 2009, 12(2), 131-6.
6. Riipinen, K.A., Raisanen, L. and Alatossava, T. Integration of the group c phage JCL1032 of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Lactis* and complex phage resistance of the host // *Journal of Applied Microbiology*, 2007, 103, 2465-2475.
7. Brown S.P., Chat L., Paeppe M. and Taddel F. Ecology of microbial invasions: Amplification allows virus carriers to invade more rapidly when rare // *Current Biology*, 2006, 16, 2048-2052.
8. Pavlova S.I., Kiliç A.O., Mou S.M., Tao Lin. Phage infection in vaginal lactobacilli: An in vitro study // *Infectious diseases in obstetrics and gynecology*, 1997, 5, 36-44.

9. Raya R., Kleeman E. G., Luchansky J. B and Klaenhammer T. R. Characterization of the Temperate Bacteriophage fadh and Plasmid Transduction in *Lactobacillus acidophilus* ADHt // Applied and Environmental Microbiology, 1989, 55, 9, 2206-2213

10. Ventura M., Canchaya C., Bernini V., Altermann E., Barrangou R., McGrath S., Claesson M. J., Li Y., Leahy S., Walker C.D., Zink R., Neviani E., Steele J., Broadbent J., Klaenhammer T. R., Fitzgerald G.F., O'Toole P.W. and Sinderen D. Comparative genomics and transcriptional analysis of prophages identified in the genomes of *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus salivarius*, and *Lactobacillus casei*// Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72, 5, 3130–3146.

## SEARCH FOR LYSOGENY AMONG VAGINAL LACTOBACILLI ISOLATES

*Isaeva A. S., Letarov A.V., Ilina E.N., Muravieva V. V., Ankirskaya A.S.*

**Key words:** *Lactobacilli, bacteriophages, MALDI-TOF mass-spectrometry, induction of prophages.*

*Lactobacilli are the dominant bacteria of healthy womens' vagina. These bacteria can inhibit the growth of other potentially harmful microorganisms. However, during bacterial vaginosis, lactobacilli decrease for unknown reason. Phages are the natural inhibitors of bacteria. They can infect vaginal lactobacilli, that induce the reduction of lactobacilli, though, no attempts to detect free bacteriophages in vaginal swab gave positive results. Instead of this, the lysogenic strains of lactobacilli were found in human vagina.*

УДК 619:616 -07

## ПОДБОР И УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ВЫДЕЛЕНИЯ БАКТЕРИОФАГОВ АНАЭРОБНЫХ БАКТЕРИЙ *DESULFOVIBRIO DESULFURICANS*

*Карамышева Н. Н., ассистент*

*8(8422)55-95-47, [Natali – kar@inbox.ru](mailto:Natali-kar@inbox.ru)*

*Васильев Д. А., доктор биологических наук, профессор*

*8(8422)55-95-47, [dav ul@mail.ru](mailto:dav_ul@mail.ru)*

*Золотухин С. Н., доктор биологических наук, профессор*

*8(8422)55-95-47, [fym.zol@yandex.ru](mailto:fym.zol@yandex.ru)*

*ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина»*

**Ключевые слова:** *Desulfovibrio desulfuricans, биопрепарат, технологические параметры.*

*Работа посвящена подбору и усовершенствованию технологических параметров выделения бактериофагов анаэробных бактерий *Desulfovibrio desulfuricans*.*

### **Введение**

Исследование биотехнологических процессов с участием *D. desulfuricans* приобретает большое значение в связи с развитием и усовершенствованием методов регулирования их жизнедеятельности.

Материалы и методы исследований