

ОБЪЕДИНЕННЫЙ
ИНСТИТУТ
ЯДЕРНЫХ
ИССЛЕДОВАНИЙ
ДУБНА

P19-85-719

М.Г. Аносова, М.Н. Бонев, В.И. Данилов

РОЛЬ ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ
В ОПРЕДЕЛЕНИИ ЧИСЛА
БЛЯШКООБРАЗУЮЩИХ ЕДИНИЦ
МЕТОДОМ АГАРОВЫХ СЛОЕВ

Направлено в журнал "Микробиология"

1985

ВВЕДЕНИЕ

Методом подсчета стерильных пятен /бляшек/ определяется количество тех фаговых частиц, которые способны развиваться на чувствительных штаммах бактерий. Формирование бляшек представляет конечный этап процесса взаимодействия между фагом и чувствительными бактериями. Начальный этап взаимодействия – адсорбция фаговых частиц на поверхности чувствительных клеток происходит в жидкой среде. Последующие этапы взаимодействия фаг – чувствительные бактерии происходят на поверхности твердой питательной среды.

Общие закономерности процесса адсорбции фагов на поверхности чувствительных клеток в жидкой среде исследованы давно ^{/1,2/}. Известны также некоторые закономерности формирования бляшки на поверхности твердой питательной среды ^{/2/}. Однако в этих работах физиологическим особенностям чувствительного штамма бактерий отводится второстепенная роль.

Целью настоящего исследования явилось изучение зависимости числа бляшек на поверхности твердой питательной среды от концентрации чувствительного штамма бактерий, засеянных на чашку.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы. В работе использовались: 1/ *E. coli* K12(λ)² – лизогенный по фагу λ , не адсорбирующий его на своей поверхности, стрептомициночувствительный; 2/ *E. coli* C – чувствительный к фагу λ , устойчивый к стрептомицину; 3/ суспензия фага λ , полученная путем осаждения лизогенной культуры *E. coli* K12(λ)².

Бактериальные штаммы были получены из музея кафедры микробиологии 2-го МОЛПИИ им. Н.И.Пирогова.

Среды. Для выращивания лизогенной культуры использовался бульон Лурья ^{/3/}. Для выращивания чувствительной культуры использовали скошенный питательный агар Н ^{/3/}. Для подсчета бляшек применяли 1,3% агар Н ^{/3/} в качестве основного, верхний агар был 0,7%. Адсорбция происходила при 37° С. Количество свободного фага определяли

методом агаровых слоев. Концентрацию чувствительной культуры определяли титрованием числа жизнеспособных бактерий.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что адсорбция фага на чувствительной культуре бактерий происходит, в основном, в течение первых пяти минут. В предварительной серии экспериментов нами было показано, что уже после третьей минуты от момента контакта фаговых частиц и чувствительных бактерий адсорбция практически закончена /таб./ . Все последующие пробы, взятые в интервале от 5 до 30 минут, дают одно и то же число бляшек в пределах ошибки метода. Как видно из таблицы, концентрация чувствительной культуры в суспензии не оказывает влияния на время адсорбции фага, но существенно влияет на абсолютное значение числа бляшек. Кроме того, из таблицы видно, что для выявления максимального числа бляшек необходимо использовать чувствительную культуру бактерий в концентрации 10^8-10^9 /клеток в 1 мл/. При использовании чувствительной культуры бактерий как в меньшей, так и в большей концентрациях, выявляемое число бляшек уменьшается. Для того, чтобы определить, с чем связано это уменьшение, была предпринята следующая серия опытов, проведенных по схеме, представленной на рис.1.

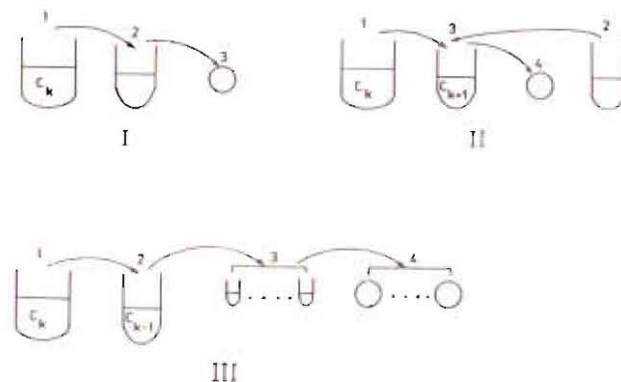


Рис.1. Схема опытов, результаты которых представлены на рис.2. I: 1 – адсорбционная смесь /чувствительные клетки с концентрацией C_k ; $k=1, \dots, 6$ /; 2 – пробирка с верхним агаром; 3 – чашка Петри; II: 1 – адсорбционная смесь /чувствительные клетки с концентрацией C_k ; $k=1, \dots, 5$ /; 2 – пробирка с чувствительными клетками; 3 – пробирка с верхним агаром, где концентрация чувствительных клеток доводится до C_{k+1} ; $k=1, \dots, 5$; 4 – чашка Петри; III: 1 – адсорбционная смесь /чувствительные клетки с концентрацией C_k ; $k=2, \dots, 6$ /; 2 – высеваемый объем адсорбционной смеси разводится до концентрации C_{k-1} чувствительных

ВЫСВЕТСКИЙ ИНСТИТУТ
КЛЕТКИ И ТКАНИ
БИБЛИОТЕКА

клеток; $k=2, \dots, 6$; 3 - пробирка с верхним агаром для высева всего содержимого пробирки 2; 4 - чашка Петри.

Опыты I соответствуют стандартной схеме титрования фага, где концентрация чувствительных клеток в момент адсорбции $/C_{ад}/$ равна начальной концентрации чувствительных клеток в газоне $/C_T/$. В опытах II $C_{ад} < C_T$, а в опытах III $C_{ад} > C_T$. Для всех способов титрования фага исследовали зависимость числа бляшек от концентрации чувствительных клеток $C_{ад}$. Полученные данные представлены на рис. 2

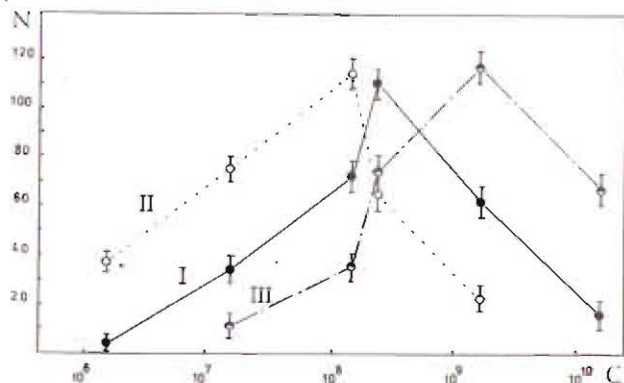


Рис. 2. Зависимость числа бляшек от концентрации чувствительных клеток. По оси ординат - среднее число N бляшек на одной чашке; по оси абсцисс - концентрация C чувствительных клеток в 1 мл.

Как видно из этого рисунка, кривая I соответствует данным титрования по стандартной схеме для следующих концентраций $C_{ад}$ - $1,93 \cdot 10^6$; $1,93 \cdot 10^7$; $1,93 \cdot 10^8$; $3,86 \cdot 10^8$; $1,93 \cdot 10^9$; $1,93 \cdot 10^{10}$. Максимальное число бляшек для кривой I проявляется при $C_{ад} = C_T = 3,86 \cdot 10^8$ нл/мл. Максимальное число бляшек для кривой II проявляется при $C_{ад} = 1,93 \cdot 10^8$; $C_T = 3,86 \cdot 10^8$. Максимальное число бляшек для кривой III проявляется при $C_{ад} = 1,93 \cdot 10^9$; $C_T = 3,86 \cdot 10^8$.

Обнаруженный нами сдвиг кривых II и III относительно I, очевидно, обусловлен изменением начальной концентрации чувствительных бактерий, формирующих газон.

Мы полагаем, что при использовании в стандартной схеме титрования концентраций чувствительных культур больше оптимальных, часть фаговых частиц не проявляется из-за того, что в этом случае до полного формирования газона на чашке Петри проходит незначительное число делений, которое, очевидно, недостаточно для того, чтобы сформировать визуальную различимую бляшку.

Таблица. Влияние концентрации чувствительных бактерий и времени их контакта с умеренным фагом на число бляшек

Концентрация чувствительных бактерий в 1 мл	Число бляшек					
	Время контакта в минутах					
	3	10	15	20	25	30
$(1,93 \pm 0,11) \cdot 10^{10}$ $n=6$	115 ± 7 $n=6$	114 ± 12 $n=6$	90 ± 11 $n=6$	103 ± 8 $n=6$	95 ± 10 $n=6$	112 ± 9 $n=6$
$(5,53 \pm 0,15) \cdot 10^9$ $n=6$	128 ± 10 $n=6$	142 ± 18 $n=6$	136 ± 6 $n=6$	145 ± 6 $n=6$	142 ± 5 $n=6$	131 ± 5 $n=6$
$(4,47 \pm 0,14) \cdot 10^8$ $n=6$	225 ± 10 $n=6$	208 ± 25 $n=6$	222 ± 9 $n=6$	189 ± 14 $n=6$	192 ± 11 $n=6$	216 ± 18 $n=6$
$(2,02 \pm 0,12) \cdot 10^7$ $n=6$	79 ± 5 $n=6$	85 ± 6 $n=6$	87 ± 8 $n=6$	82 ± 6 $n=6$	79 ± 6 $n=6$	82 ± 5 $n=6$
$(2,10 \pm 0,11) \cdot 10^6$ $n=6$	15 ± 3 $n=6$	12 ± 2 $n=6$	16 ± 4 $n=6$	17 ± 3 $n=6$	18 ± 4 $n=6$	15 ± 3 $n=6$

для малых концентраций стандартная схема титрования также не позволяет выявить максимальное число бляшек, но в этом случае, несмотря на то, что чувствительная культура проходит достаточное число делений, газон формируется значительно разреженным, и часть фагов либо теряется, не достигнув чувствительной клетки, либо контактирует с уже сформированной колонией, где фаги не размножаются, так как для их размножения, как известно, необходимы клетки с активным метаболизмом /4/.

Таким образом становится ясно, что начальная концентрация чувствительных клеток, которая формирует газон, существенно влияет на выявление числа бляшек. Уменьшение числа бляшек при низких и высоких концентрациях чувствительных клеток связано не с измененной константой адсорбции, как считалось ранее /1/, а с измененной кинетикой процесса формирования газона.

Исходя из полученных данных, можно предположить, что различная эффективность посева для одного фага на разных штаммах чувствительных клеток /5/ связана с тем, что клетки этих штаммов имеют различный период генерации и размер, в связи с чем до формирования газона у них проходит разное количество генераций, которое, как мы видели, играет существенную роль в определении числа бляшкообразующих единиц методом титрования с помощью агаровых слоев.

По-видимому, эта зависимость останется справедливой не только для умеренных фагов, но и для всех вирусов, при подсчете которых используют метод титрования с помощью агаровых слоев. Причем для каждой конкретной системы вирус - чувствительная клетка будет оптимальный интервал концентраций, при использовании которого выявляется максимальное число бляшек.

Авторы выражают глубокую признательность проф. В.И.Корогодину за постоянное внимание к данной работе и полезные обсуждения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Krueger A.L., J.Gen.Physiol., 1951, v.14, p.493-499.
2. Адамс М. Бактериофаги. ИЛ, М., 1961, с. 127-147.
3. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике. "Мир", М., 1976, с.395.
4. Стайнер Р., Эдельберг Э., Ингрэм Дж. Мир микробов, "Мир", М., т.2, 1979.
5. Лурья С. Общая вирусология, "Мир", М., 1961.

Рукопись поступила в издательский отдел
5 октября 1985 года.

Аносова М.Г., Бонев М.Н., Данилов В.И. P19-85-719
Роль чувствительных бактерий в определении числа
бляшкообразующих единиц методом агаровых слоев

Исследована зависимость числа бляшек на твердой питательной среде от концентрации чувствительного штамма бактерий, высеванных на чашках Петри. Показано, что для системы фаг λ - чувствительная клетка E.coli C, максимальное число бляшек проявляется при концентрации $\sim 4 \cdot 10^8$ кл./мл.

Работа выполнена в Лаборатории ядерных проблем ОИЯИ.

Препринт Объединенного института ядерных исследований. Дубна 1985

Перевод О.С.Виноградовой

Anosova M.G., Bonev M.N., Danilov V.I. P19-85-719
Role of Sensitive Bacteria in Determining the Number of
Plaque Forming Units by Gratia's Method

The dependence of a number of plaques on a solid nutrient upon a cropped sensitive bacteria concentration was investigated. It is shown that for the phage-sensitive cell system the maximum plaque number manifests itself at the $4 \cdot 10^8$ cell/ml concentration.

The investigation has been performed at the Laboratory of Nuclear Physics, JINR.

Preprint of the Joint Institute for Nuclear Research. Dubna 1985