

ВЛИЯНИЕ ФИЗИЧЕСКИХ, ХИМИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ И РЕЖИМОВ ХРАНЕНИЯ НА ЛИТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ АЭРОМОНАДНЫХ БАКТЕРИОФАГОВ

Насибуллин Ильдар Равильевич, соискатель кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ВСЭ»

Васильев Дмитрий Аркадьевич, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ВСЭ»

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

Швиденко Инна Григорьевна, доктор медицинских наук, профессор кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии

ФГБОУ ВПО «Саратовский ГМУ имени В.И. Разумовского Минздравсоцразвития России»

432017, г. Ульяновск, бульвар Новый Венец, 1; тел.: +7(8422)55-95-47,

e-mail: dav_ul@mail.ru

Ключевые слова: *Aeromonas hydrophila*, бактериофаги, инактивация, литическая активность, температура, устойчивость, хлороформ.

Статья посвящена изучению литической активности новых изолятов бактериофагов *Aeromonas hydrophila*, выделенных из объектов окружающей среды Ульяновской области, а также влиянию на них высокой температуры, хлороформа и режимов хранения. Выделенные бактериофаги проявили различную литическую активность, варьирующую в пределах от 10^{-5} до 10^{-8} по методу Аппельмана и от $0,6 \times 10^6$ до $2,5 \times 10^8$ БОЕ/мл по методу Грациа. Изучаемые бактериофаги чувствительны к температурной обработке выше 64 в течение 30 минут и к обработке хлороформом в соотношении 1:10 в течение 15 минут. Хранение в течение 12 месяцев незначительно снижало их литическую активность.

Введение

Литическая активность является одним из решающих критериев при селекции бактериофагов и их включения в состав биопрепаратов для индикации и идентификации микроорганизмов, а также для деконтаминации [1]. Литическая активность бактериофага оценивается по его способности вызывать лизис бактериальной культуры в жидких или на плотных питательных средах. При определении литической активности по методу Аппельмана её выражают тем максимальным разведением, в котором испытуемый бактериофаг проявил свое литическое действие [1-5]. Более точным методом оценки активности бактериофага является определение количества бляшкообразующих единиц (БОЕ) фага в 1 мл суспензии (метод Грациа) [1,4,6]. Активность бактериофага определяется в конкретных, стандартных условиях. Бактериофаг по отношению к одной и той же культуре, но при отличающихся условиях, так же как и при испытании его в одинаковых условиях на разных штам-

мах одного и того же вида бактерий, может проявлять разную литическую активность и формировать неодинаковое число бляшек (негативных колоний) на плотной питательной среде [6,7].

Одними из важных факторов внешней среды, которые могут снижать литическую активность бактериофагов, является повышенная температура, хлороформ и длительность хранения.

Ввиду того, что для работы с бактериофагами важным этапом исследования является подбор метода инактивации жизнеспособных бактерий в фаголизате, применяемый для этих целей метод не должен снижать литическую активность бактериофагов [2,3,6,8].

Поэтому задачей наших исследований явилось изучение влияния вышеперечисленных факторов на изменение литической активности выделенных нами новых штаммов фагов *Aeromonas hydrophila*.

Объекты и методы исследований

В работе были использованы: 3

Таблица 1

Результаты исследований литической активности фагов бактерий *A. hydrophila*.

№	Штамм фага	Титр по Аппельману	Титр по Грациа, БОЕ/мл
1	Фаг F43-УГСХА	10^{-8}	$2,5 \times 10^8 \pm 0,2 \times 10^8$
2	Фаг 1р-УГСХА	10^{-6}	$4,2 \times 10^6 \pm 0,3 \times 10^6$
3	Фаг F43g-УГСХА	10^{-7}	$3,7 \times 10^7 \pm 0,5 \times 10^7$
4	Фаг 13а-УГСХА	10^{-5}	$0,6 \times 10^6 \pm 0,7 \times 10^6$
5	Фаг Ahd-УГСХА	10^{-8}	$1,5 \times 10^8 \pm 0,4 \times 10^8$

референс-штамма *Aeromonas hydrophila* Ahd, 43-УГСХА, АТСС 7966, полученные из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы ФГБОУ ВПО «Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия им. П.А. Столыпина», 14 полевых штаммов *A. hydrophila* и 5 штаммов бактериофагов, выделенных нами из объектов окружающей среды (озер и рек) Ульяновской области. Культуры бактерий *A. hydrophila* выращивали на стандартном питательном бульоне в течение 18-24 часов при 28°C. Литическую активность селекционированных бактериофагов определяли по методам Аппельмана и Грациа [1,2,6,7,9].

Определение температурной устойчивости бактериофагов проводили при прогревании пробирок с бактериофагами *A. hydrophila* на водяной бане в течение 30 минут при температуре от 58 °С до 66 °С с интервалом 2°C.

После прогревания активность бак-

териофагов определяли по методу Грациа. Учет результатов проводили после 12-18 часового термостатирования чашек при температуре 28 °С [1,2,3,4,7].

Для определения чувствительности бактериофагов к воздействию хлороформа пробирки с фаговой суспензией бактерий *A. hydrophila* обрабатывали хлороформом в соотношении 1:10 при по-

стоянном встряхивании в течение 15, 30 и 40 минут. Контролем служили пробирки с фагами, необработанные хлороформом. После воздействия хлороформа активность бактериофагов определяли по методу Грациа [1,2,6,7].

Бактериологические исследования проводили по общепринятым методам [9].

Результаты исследований

Результаты исследований литической активности изучаемых бактериофагов представлены в табл. 1.

Установлено, что прогревание пробирок с бактериофагом при температуре 60-62°C в течение 30 минут несколько снижало активность фагов (таб. 2, рис.1). Дальнейшее повышение температуры приводило к резкому снижению активности фагов. Воздействие температуры выше 64°C полностью инактивировало все изучаемые бактериофаги в течении 30 минут (табл. 2, рис.1).

Таблица 2

Температурная устойчивость бактериофагов *A. hydrophila*

Температурный режим, °С	Активность штаммов, подвергнутых температурной обработке, БОЕ/мл					
	ИШ	F43-УГСХА	1р-УГСХА	F43g-УГСХА	13а-УГСХА	Ahd-УГСХА
58-60	$2,0 \times 10^8$ $\pm 0,2 \times 10^8$	$2,0 \times 10^8$ $\pm 0,4 \times 10^8$	$3,0 \times 10^6$ $\pm 0,6 \times 10^6$	$2,0 \times 10^7$ $\pm 0,5 \times 10^7$	$4,0 \times 10^5$ $\pm 0,3 \times 10^5$	$3,0 \times 10^7$ $\pm 0,4 \times 10^7$
60-62	$1,0 \times 10^8$ $\pm 0,3 \times 10^8$	$1,0 \times 10^8$ $\pm 0,5 \times 10^8$	$1,0 \times 10^5$ $\pm 0,7 \times 10^5$	$1,0 \times 10^6$ $\pm 0,2 \times 10^6$	$1,0 \times 10^4$ $\pm 0,4 \times 10^4$	$1,0 \times 10^6$ $\pm 0,5 \times 10^6$
62-64	-	$3,0 \times 10^7$ $\pm 0,4 \times 10^7$	-	$2,0 \times 10^5$ $\pm 0,6 \times 10^5$	-	$2,0 \times 10^5$ $\pm 0,3 \times 10^5$
64-66	-	-	-	-	-	-
Контроль (без обработки)	$4,0 \times 10^8$ $\pm 0,2 \times 10^8$	$2,5 \times 10^8$ $\pm 0,2 \times 10^8$	$4,2 \times 10^6$ $\pm 0,3 \times 10^6$	$3,7 \times 10^7$ $\pm 0,5 \times 10^7$	$0,58 \times 10^6$ $\pm 0,1 \times 10^6$	$1,5 \times 10^8$ $\pm 0,4 \times 10^8$

Примечание: «иш» - индикаторный бактериальный штамм *A. hydrophila*

Результаты исследований устойчивости фагов к воздействию хлороформа свидетельствовали, что наблюдаются существенные изменения количества БОЕ в 1 мл при обработке хлороформом. Данные опытов позволяют сделать вывод о чувствительности изучаемых бактериофагов к обработке их хлороформом. Воздействие хлороформом на культуры индикаторных штаммов *A. hydrophila* Ahd, 43-УГСХА, АТСС 7966 в течение 15 минут приводила к их полной инактивации (табл. 3, рис. 2).

В связи с тем, что изучаемые бактериофаги не устойчивы к изученным режимам, инактивирующим бактериальные клетки, методы прогревания и обработки хлороформом нельзя использовать при работе с вышеперечисленными штаммами бактериофагов.

Дальнейшие эксперименты были направлены на изучение изменения литической активности штамма бактериофага F43-

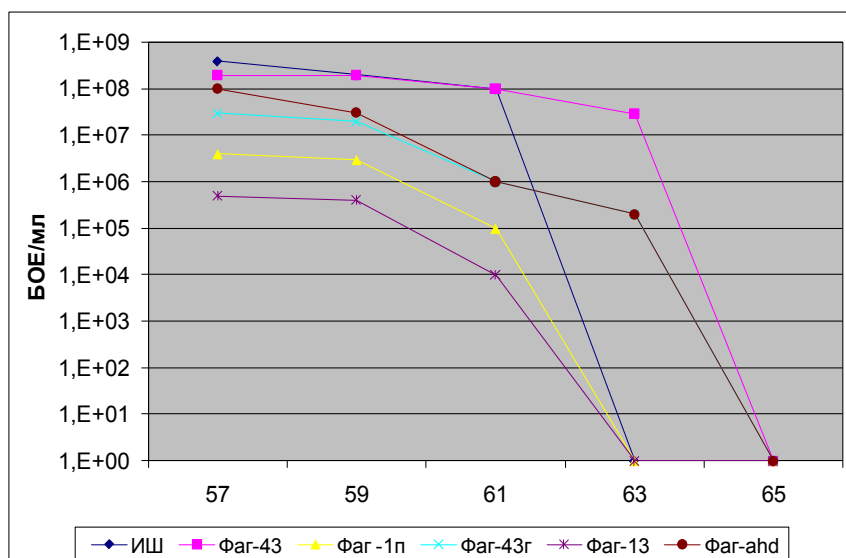


Рис. 1 – Температурная устойчивость бактериофагов *A. hydrophila*

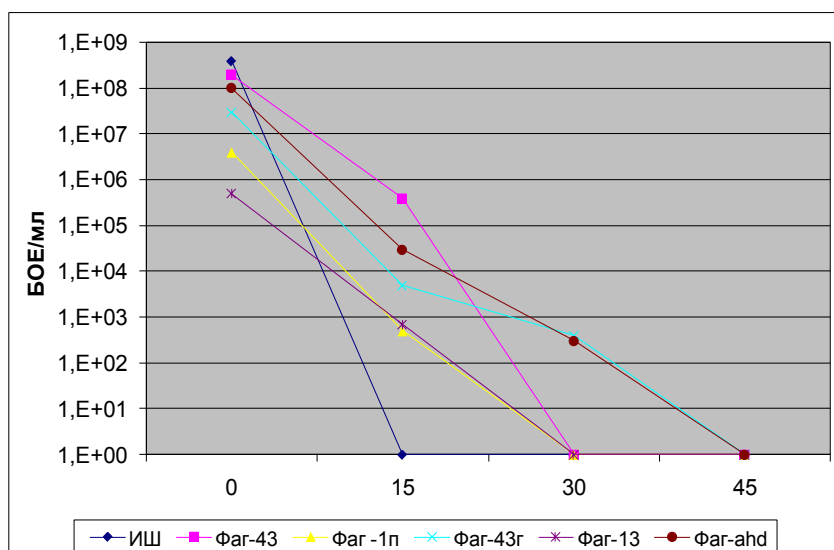


Рис. 2 – Устойчивость бактериофагов *A. hydrophila* к воздействию хлороформа

Таблица 3

Устойчивость бактериофагов *A. hydrophila* к воздействию хлороформа в течение 30 минут.

Время воздействия хлороформа, мин	Активность штаммов подвергнутых обработке хлороформом, БОЕ/мл					
	ИШ	F43-УГСХА	1p-УГСХА	F43g-УГСХА	13a-УГСХА	Ahd-УГСХА
15	-	$4,0 \times 10^5 \pm 0,2 \times 10^5$	$5,0 \times 10^2 \pm 0,4 \times 10^2$	$5,0 \times 10^3 \pm 0,3 \times 10^3$	$7,0 \times 10^2 \pm 0,2 \times 10^2$	$3,0 \times 10^4 \pm 0,5 \times 10^4$
30	-	-	-	$4,0 \times 10^2 \pm 0,3 \times 10^2$	-	$3,0 \times 10^2 \pm 0,5 \times 10^2$
45	-	-	-	-	-	-
Контроль	$4,0 \times 10^8 \pm 0,3 \times 10^8$	$2,5 \times 10^8 \pm 0,2 \times 10^8$	$4,2 \times 10^6 \pm 0,3 \times 10^6$	$3,7 \times 10^7 \pm 0,5 \times 10^7$	$0,58 \times 10^6 \pm 0,1 \times 10^6$	$1,5 \times 10^8 \pm 0,4 \times 10^8$

Примечание: «иш»-индикаторный бактериальный штамм *A. hydrophila*

Таблица 4

Изменение литической активности бактериофага F43-УГСХА при хранении в течении 12 месяцев

Фаг	Срок хранения	Литическая активность, БОЕ/мл
F43-УГСХА	Момент укупоривания	$2,5 \times 10^8 \pm 0,2 \times 10^8$
	3 месяца	$2,5 \times 10^8 \pm 0,2 \times 10^8$
	6 месяцев	$4,5 \times 10^7 \pm 0,3 \times 10^7$
	9 месяцев	$3,7 \times 10^7 \pm 0,2 \times 10^7$
	12 месяцев	$3,5 \times 10^7 \pm 0,2 \times 10^7$

УГСХА при хранении в холодильнике при температуре 4 °С, во флаконах в течение 12 месяцев, как наиболее перспективного. Эти исследования были связаны с необходимостью изучения сроков годности биопрепаратов и кратностью пересева. При хранении показатели литической активности определяли методом агаровых слоев [3,5,6,7,8].

Результаты исследований представлены в табл. 4.

В течение 3 месяцев литическая активность бактериофага F43-УГСХА оставалась без изменений, через 6 месяцев она снизилась и составила $4,5 \times 10^7 \pm 0,3 \times 10^7$ БОЕ/мл, через 9 месяцев хранения составляла $3,7 \times 10^7 \pm 0,2 \times 10^7$ БОЕ/мл, а через 12 месяцев – $3,5 \times 10^7 \pm 0,2 \times 10^7$ БОЕ/мл. При однократном пассировании фага F43-УГСХА на индикаторном штамме бактерий *A. hydrophila* он восстанавливает литическую активность до исходного уровня, что подтверждается литературными данными по свойствам бактериофагов других видов [1,2,5,6,7].

Выводы

Литическая активность выделенных нами бактериофагов бактерий *A. hydrophila* по Аппельману находится в пределах от 10^{-5} до 10^{-8} , а по Грациа – от $0,58 \times 10^6$ до $2,5 \times 10^8$ БОЕ/мл. Максимальный титр наблюдается у бактериофага F43-УГСХА: по Аппельману 10^{-8} , по Грациа $2,5 \times 10^8$ БОЕ/мл. Изучаемые бактериофаги термолабильны в условиях выше 60°С и чувствительны к обработке хлороформом в соотношении 1:10 в течение 15 минут. Хранение бактериофага F43-УГСХА в течение 12 месяцев в условиях холодильника при температуре 4 °С снижает литическую активность на один порядок, что, согласно

литературным данным, является допустимым при создании биопрепарата [1,2,7].

Библиографический список

1. Биоиндикация бактерий *Bacillus mycoides* в объектах санитарного надзора / Васильев Д.А., Золотухин С.Н., Феоктистова Н.А., Лыдина М.А., Калдыркаев А.И., Макеев В.А., Швиденко И.Г. // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2013. – № 3 (23). – С. 52-56.
2. Васильева, Ю.Б. Фаги бактерий *Bordetella bronchiseptica*: свойства и перспективы применения // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2013. – №3 (23). – С.44-49.
3. Викторов, Д.А. Выделение и изучение биологических свойств бактериофагов *Pseudomonas fluorescens* // Д.А. Викторов, А.М. Артамонов, Д.А. Васильев // Ветеринария и кормление. – Москва: «ВЕТКОРМ», 2012. – №5. – С. 8-9.
4. Горшков, И.Г. Сравнительный анализ роста бактерий родов *Aeromonas* и *Pseudomonas* на средах с красителями / И.Г. Горшков, Н.Г. Куклина, Д.А. Викторов, Д.А. Васильев // Вестник ветеринарии. – Ставрополь: «Энтропос», 2012. – № 63 (4/2012). – С.38-39.
5. Ковалева, Е.Н. Фагоидентификация бактерий рода *Listeria monocitogenes* /Ковалева Е.Н., Васильев Д.А., Золотухин С.Н.// Биодиагностика в экологической оценке почв и сопредельных. Материалы Международной научно-практической конференции. – Москва, 2013. – С. 97.
6. Адамс, М. Бактериофаги (перевод с английского) / М. Адамс.- М., - 1961. – 521 с.
7. Габрилович, И.М. Основы бактериофагии / И.М. Габрилович. – Минск: Высшая школа, 1973.
8. 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.
9. Васильев, Д.А. Методы общей бактериологии: учебное пособие / Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин, Н.М. Никишина. – Ульяновск, 1998. – 170с.