

ВЫДЕЛЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БАКТЕРИОФАГОВ *AEROMONAS SOBRIA*

Горшков Иван Геннадьевич, научный сотрудник НИИЦМиБ

Викторов Денис Александрович, кандидат биологических наук, старший преподаватель кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

Васильев Дмитрий Аркадьевич, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

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

432017, г. Ульяновск, бульвар Новый Венец, 1; тел.: 8(422)55-95-47

e-mail: dav_ul@mail.ru

Ключевые слова: бактериофаги, аэромонады рыб, биотехнология, микробиология, *Aeromonas*, выделение, литическая активность, титр, специфичность, чувствительность, устойчивость, морфология.

В результате проведенных исследований из объектов внешней среды (водные источники) было выделено 8 штаммов бактериофагов, специфичных в отношении *Aeromonas sobria*, исследованы их основные биологические свойства: литическая активность, температурная устойчивость, устойчивость к обработке хлороформом, видовая и родовая специфичность, морфология негативных колоний.

Введение

Бактериофаги, активные в отношении бактерий рода *Aeromonas*, вызывают научный и практический интерес, прежде всего, как средство выявления названных бактерий (методами фаготипирования и реакции нарастания титра фага), а также как средство деконтаминации [1, 2].

Бактерии рода *Aeromonas* играют существенную роль в инфекционной ихтиопатологии. Аэромонады рыб – это заболевание, встречающееся в рыбоводческих хозяйствах и вызываемое бактериями: *Aeromonas salmonicida*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae*, *Aeromonas sobria* [3, 4, 5].

Поскольку существующие методы диагностики не предусматривают типирование возбудителей аэромонадозов до вида, лечение заболевания заключается в применении антибиотиков широкого спектра, высокомолекулярных соединений, содержащих йод, формалин [1, 2].

В отечественной литературе нет подробной информации о выделении бактериофагов, активных в отношении *A. sobria*, разработке и применению биопрепаратов на их основе. Однако есть результаты исследований бактериофагов, активных в отно-

шении других аэромонад, прежде всего *A. salmonicida* [6, 7] и *A. hydrophila* [8, 9].

Перечисленные причины обуславливают необходимость в разработке эффективной тест-системы для быстрой и точной индикации и идентификации бактерии *A. sobria* в патологическом материале рыб и образцах воды из прудов рыбоводческого назначения. В качестве дешевого и доступного метода диагностики аэромонадозов правомерно рассматривать реакцию нарастания титра фага [10-17].

Цель исследования: выделение бактериофагов, активных в отношении бактерии *A. sobria* и изучение их биологических свойств.

Задачи:

1. Выделение бактериофагов, активных в отношении *A. sobria*,
2. Исследование литической активности выделенных фагов по методу Грация,
3. Исследование отношения выделенных бактериофагов к температурному воздействию и обработке хлороформом,
4. Исследование видовой и родовой специфичности выделенных бактериофагов,
5. Исследование морфологии негативных колоний выделенных бактериофагов.

Объекты и методы исследований

Объект исследования.

Выделение бактериофагов проводили из образцов воды различных источников: Черное море (близ станции Лоо), река Лоо, стоячий водоем рядом с железнодорожной станцией Лоо, родник в черте города Ульяновска. Всего исследовано 16 объектов.

Штаммы, используемые в работе.

При выделении бактериофагов в качестве индикаторных бактериальных штаммов использовали *A. sobria* №23, № 22, № +/2, №+/1, полученные из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы Ульяновской ГСХА им. П.А. Столыпина. Для определения видовой и родовой специфичности выделенных бактериофагов использовали штаммы бактерий следующих видов: *A. caveae*, *A. salmonicida*, *A. hydrophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Yersinia enterocolitica*.

Материалы.

ГРМ-бульон (производства ГНЦ ПМБ, п. Оболенск), агар бактериологический (производства ГНЦ ПМБ, п. Оболенск), дистиллированная вода, хлороформ, стандартный набор посуды для микробиологических исследований. Для очистки бактериальных лизатов использовали фильтродержатели и мембранные фильтры с диаметром пор 0,2 мкм (производства Millipore - Millivac)

Оборудование.

Термостат лабораторный ТС-180, центрифуга лабораторная MULTI CENTRIFUGE CM 6 M, водяная баня KL-2, холодильник (+4...+8 °C).

Работа проводилась на лабораторной базе кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы Ульяновской ГСХА им. П.А. Столыпина.

Методы.

Выделение бактериофагов проводили методом накопления по схемам, описанным в работах Викторова Д.А., Золотухина С.Н., Насибуллина И.Р. и оптимизированным нами с учётом биологических особенностей *A. sobria* и их бактериофагов [6-12].

В 16 колб на 200 мл с 50 мл стерильного концентрированного (2х) мясopептонного

бульона добавляли по 50 мл исследуемых образцов воды. В каждую из колб добавляли по 0,5 мл суточных индикаторных культур штаммов *A. sobria* №23, № 22, № +/2, №+/1. Полученную смесь перемешивали и помещали в термостат на 24 часа при 27 °C (оптимум роста *A. sobria*) [11]. После инкубации из полученной в колбах суспензии отбирали по 10 мл в стерильные центрифужные пробирки, центрифугировали 20 минут при 3000 об/мин. Супернатант фильтровали через мембранные фильтры с диаметром пор 0,2 мкм (Millipore - Millivac), после чего фильтрат помещали в стерильные пробирки для хранения и дальнейшего исследования.

Первичные фаговые стоки пассировали для получения чистых линий бактериофагов путём 5-10 кратного пересева их бляшек [2, 3, 6].

Определение спектра литической активности, а также родовой и видовой специфичности бактериофагов проводили методом спот-теста [2]. Для этого на чашки Петри, засеянные газонами суточных бактериальных культур (*A. sobria*, *A. salmonicida*, *A. hydrophila*, *A. caveae*, *A. sobria*, *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. mirabilis*, *E. coli*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*) по каплям пипеткой наносили суспензии исследуемых фагов. Посевы *A. sobria*, *A. salmonicida*, *A. hydrophila*, *A. caveae*, *A. sobria*, *P. fluorescens*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica* культивировали 24 часа при температуре 27 °C, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis*, *E. coli* – при 37 °C (оптимум роста бактерий).

Литическую активность бактериофагов, а также морфологию негативных колоний изучали по методам Грациа [2].

Для исследования устойчивости выделенных бактериофагов к обработке хлороформом использовали методику, предложенную Золотухиным С.Н. и Викторовым Д.А. [11, 12]. Определение чувствительности бактериофагов проводили путем обработки суспензий бактериофагов хлороформом в соотношении 1:10 при постоянном встряхивании. Контролем служили пробирки с суспензиями бактериофагов, не обработанными хлороформом. После воздействия хлороформа различной продолжительностью (5, 10, 15, 20 минут) активность бактериофагов определяли по методу Грациа.

Таблица 1

Литическая активность выделенных бактериофагов (по методу Грациа).

№	Штамм бактериофагов	Литическая активность
1	Aer.sobr.1- УГСХА	3,0(±0,1)×10 ⁹
2	Aer.sobr.2 –УГСХА	4,0(±0,4)×10 ⁷
3	Aer.sobr.3 –УГСХА	5,0(±0,1)×10 ⁹
4	Aer.sobr.4 –УГСХА	2,0(±0,2)×10 ¹⁰
5	Aer.sobr.5 –УГСХА	5,0(±0,2)×10 ⁹
6	Aer.sobr.6 –УГСХА	4,0(±0,2)×10 ⁷
7	Aer.sobr.7 –УГСХА	0,6(±0,1)×10 ⁶
8	Aer.sobr.8 –УГСХА	4,0(±0,6)×10 ⁹

Для изучения температурной устойчивости, ряд пробирок с суспензиями исследуемых бактериофагов, разведёнными мясопептонным бульоном 1:10, прогревали на водяной бане в течение 20 минут при температуре от 20 °С до 60 °С с интервалами 10 и 2 °С. Контрольные пробирки не прогревали [2, 3, 6]. После воздействия температуры активность исследуемых фагов определяли по методу Грациа.

Исследования по определению количественных показателей проводили в 3-5 повторностях. При статистической обработке данных использовали программу Statistica 8.

Результаты исследований

Было выделено 8 бактериофагов, активных в отношении индикаторных штаммов *A. sobria* №23, № 22, № +/2 и №+/1.

Результаты исследования литической активности бактериофагов представлены в табл. 1.

Установлено, что выделенные бактериофаги устойчивы к воздействию температуры до 48°С в течение 20 минут и полностью инактивируются при 54°С (табл. 2).

Результаты исследования устойчивости бактериофагов к обработке хлороформом приведены в табл. 3.

После 5 минут обработки фаголизатов хлороформом существенного изменения титра бактериофагов не наблюдалось, после 10 минут наблюдалось резкое падение титра, после 15

минут – полная инактивация бактериофагов.

Результаты исследований специфичности бактериофагов представлены в таблицах 4 и 5.

Морфология негативных колоний выделенных бактериофагов имеет следующие характеристики:

- негативные колонии бактериофагов Aer.sobr.1–УГСХА, Aer.sobr.3–УГСХА, Aer.sobr.5–УГСХА имели диаметр 1-2 мм, полностью прозрачны, без зоны вторичного лизиса;

- негативные колонии бактериофагов Aer.sobr.2–УГСХА, Aer.sobr.7–УГСХА, Aer.sobr.8–УГСХА – диаметр 0,5-1 мм с мутным центром, без зоны вторичного лизиса;

- негативные колонии бактериофагов Aer.sobr.4–УГСХА, Aer.sobr.6–УГСХА – диаметр 3-4 мм с прозрачным центром и мутной зоной вторичного лизиса на периферии.

Выводы

1. Из 16 водных источников выделено

Таблица 2

Устойчивость выделенных бактериофагов к тепловому воздействию.

t, °С	Aer.sobr.1-УГСХА	Aer.sobr.1-УГСХА	Aer.sobr.1-УГСХА	Aer.sobr.1-УГСХА	Aer.sobr.1-УГСХА	Aer.sobr.1-УГСХА	Aer.sobr.1-УГСХА	Aer.sobr.1-УГСХА
20	3,0(±0,1)×10 ⁹	4,0(±0,4)×10 ⁷	0,6(±0,1)×10 ¹⁰	2,0(±0,2)×10 ¹⁰	5,0(±0,2)×10 ⁹	4,0(±0,2)×10 ⁷	0,6(±0,1)×10 ⁶	4,7(±0,6)×10 ⁹
30	3,0(±0,1)×10 ⁹	4,0(±0,4)×10 ⁷	0,6(±0,1)×10 ¹⁰	2,0(±0,2)×10 ¹⁰	5,0(±0,2)×10 ⁹	4,0(±0,2)×10 ⁷	0,6(±0,1)×10 ⁶	4,7(±0,6)×10 ⁹
40	2,8(±0,1)×10 ⁹	4,0(±0,4)×10 ⁷	0,6(±0,1)×10 ¹⁰	1,6(±0,2)×10 ¹⁰	5,0(±0,2)×10 ⁹	4,0(±0,2)×10 ⁷	3,0(±0,1)×10 ⁵	4,7(±0,6)×10 ⁹
46	2,8(±0,1)×10 ⁹	4,0(±0,4)×10 ⁷	0,6(±0,1)×10 ¹⁰	1,6(±0,2)×10 ¹⁰	5,0(±0,2)×10 ⁹	3,9(±0,2)×10 ⁷	3,0(±0,1)×10 ⁵	4,5(±0,6)×10 ⁹
48	2,6(±0,1)×10 ⁹	4,0(±0,4)×10 ⁷	0,6(±0,1)×10 ¹⁰	1,6(±0,2)×10 ¹⁰	4,9(±0,2)×10 ⁹	3,9(±0,2)×10 ⁷	3,0(±0,1)×10 ⁵	4,2(±0,6)×10 ⁹
50	4,9(±0,1)×10 ⁷	0,6(±0,4)×10 ⁶	0,6(±0,1)×10 ⁸	0,7(±0,2)×10 ⁸	4,3(±0,2)×10 ⁶	0,6(±0,2)×10 ⁶	2,5(±0,1)×10 ⁴	3,9(±0,6)×10 ⁶
52	0,5(±0,1)×10 ⁴	0,7(±0,4)×10 ³	0	0,8(±0,2)×10 ⁴	0,6(±0,2)×10 ³	3,4(±0,2)×10 ²	0	0,6(±0,6)×10 ⁴
54	0	0	0	0	0	0	0	0
56	0	0	0	0	0	0	0	0
58	0	0	0	0	0	0	0	0
60	0	0	0	0	0	0	0	0

Таблица 3

Устойчивость выделенных бактериофагов к хлороформу

№	Штамм бактериофагов	Время обработки хлороформом, мин.				
		Контроль (0 минут)	5	10	15	20
		Титр бактериофагов, БОЕ/мл				
1	Aer.sobr.1- УГСХА	3,0(±0,1)×10 ⁹	2,8(±0,1)×10 ⁹	4,2(±0,1)×10 ³	0	0
2	Aer.sobr.2 -УГСХА	4,0(±0,4)×10 ⁷	3,7(±0,4)×10 ⁷	3,5(±0,4)×10 ²	0	0
3	Aer.sobr.3 -УГСХА	0,6(±0,1)×10 ¹⁰	0,6(±0,1)×10 ¹⁰	0,6(±0,1)×10 ⁴	0	0
4	Aer.sobr.4 -УГСХА	2,0(±0,2)×10 ¹⁰	1,7(±0,2)×10 ¹⁰	2,2(±0,2)×10 ⁴	0	0
5	Aer.sobr.5 -УГСХА	5,0(±0,2)×10 ⁹	4,7(±0,2)×10 ⁹	0,6(±0,2)×10 ³	0	0
6	Aer.sobr.6 -УГСХА	4,0(±0,2)×10 ⁷	3,7(±0,2)×10 ⁷	4,1(±0,2)×10 ³	0	0
7	Aer.sobr.7 -УГСХА	0,6(±0,1)×10 ⁶	5,0(±0,1)×10 ⁵	1,2(±0,1)×10 ²	0	0
8	Aer.sobr.8 -УГСХА	4,7(±0,6)×10 ⁹	4,0(±0,6)×10 ⁹	1,3(±0,6)×10 ²	0	0

Таблица 4

Активность бактериофагов по отношению к гетерогенным бактериальным культурам

№ пп	Штамм бактериофагов	Штаммы исследуемых бактерий					
		<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>Y. pseudotuberculosis</i>	<i>Y. enterocolitica</i>
1	Aer.sobr.1- УГСХА	-	-	-	-	-	-
2	Aer.sobr.2 –УГСХА	-	-	-	-	-	-
3	Aer.sobr.3 –УГСХА	-	-	-	-	-	-
4	Aer.sobr.4 –УГСХА	-	-	-	-	-	-
5	Aer.sobr.5 –УГСХА	-	-	-	-	-	-
6	Aer.sobr.6 –УГСХА	-	-	-	-	-	-
7	Aer.sobr.7 –УГСХА	-	-	-	-	-	-
8	Aer.sobr.8 –УГСХА	-	-	-	-	-	-

«+» наличие зон лизиса, «-» отсутствие зон лизиса.

8 штаммов бактериофагов, активных в отношении *A. sobria*,

2. Литическая активность выделенных бактериофагов (по методу Грация) составила от 0,6(±0,1)×10⁶ до 2,0(±0,2)×10¹⁰ БОЕ/мл,

3. Выделенные бактериофаги устойчивы к воздействию температуры до 48 °С в течение 20 минут и полностью инактивируются при 54 °С; неустойчивы к обработке хлороформом в соотношении 1:10 продолжительностью свыше 5 минут,

4. Выделенные фаги обладают видо-

Таблица 5

Специфичность выделенных штаммов бактериофагов по отношению к бактериям рода *Aeromonas*

№	Штамм бактериофагов	Штамм бактерий рода <i>Aeromonas</i>						
		<i>A. sobria</i> № 23	<i>A. sobria</i> № +/2	<i>A. sobria</i> № +/1	<i>A. sobria</i> № 22	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. cavae</i>
1	Aer.sobr.1- УГСХА	+	+	+	+	-	-	-
2	Aer.sobr.2 –УГСХА	+	+	+	+	-	-	-
3	Aer.sobr.3 –УГСХА	+	+	+	+	-	-	-
4	Aer.sobr.4 –УГСХА	+	+	+	+	-	-	-
5	Aer.sobr.5 –УГСХА	+	+	+	+	-	-	-
6	Aer.sobr.6 –УГСХА	+	+	+	+	-	-	-
7	Aer.sobr.7 –УГСХА	+	+	+	+	-	-	-
8	Aer.sobr.8 –УГСХА	+	+	+	+	-	-	-

«+» наличие зон лизиса, «-» отсутствие зон лизиса.

вой специфичностью,

5. Определена морфология негативных колоний выделенных бактериофагов.

Библиографический список

1. Инструкция о мероприятиях по борьбе с аэромонозом карповых рыб, 1998 г.
2. Инструкция по борьбе с фурункулезом лососевых рыб, 1997 г.
3. Блинов, А.И. Аэромонады: выделение, идентификация и дифференциация: учебно-методические рекомендации /А.И. Блинов, Н.А. Глушанова. - Новокузнецк,

1997. – 123с.

4. Austin, B. Taxonomy of bacterial fish pathogens. / B. Austin. // Institute of Aquaculture, Pathfoot Building. University of Stirling, Stirling FK9 4LA, Scotland, UK. 2011; 42(1):20

5. Rahman, M. Identification and Characterization of Pathogenic *Aeromonas veronii* Biovar *Sobria* Associated with Epizootic Ulcerative Syndrome in Fish in Bangladesh. / M. Rahman, P. Colque-Navarro, R. Möllby // Appl Environ Microbiol. 2002 February. - 68(2): 650–655.

6. Викторov, Д.А. Усовершенствование методов выделения, идентификации и индикации бактерий *Pseudomonas putida* : автореф. дис. ... канд. биол. наук / Д.А. Викторov. – Саратов. – 2011. – 22 с.

7. Выделение бактериофагов *Aeromonas salmonicida* / И.Г. Горшков, Н.Г. Куклина, Д.А. Викторov, И.Р. Насибуллин, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин // Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности: Материалы международной научно-практической конференции, Ульяновск, ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина», 23-25 апреля 2013. – Т. 2. – Ульяновск, 2013. – С. 3-4.

8. Горшков, И.Г. Перспективы применения бактериофагов для индикации патогенных бактерий рода *Aeromonas* / И.Г. Горшков, Н.Г. Куклина, Д.А. Викторov, И.Р. Насибуллин, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин // Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности: Материалы международной научно-практической конференции, Ульяновск, ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина», 23-25 апреля 2013. – Т. 2. – Ульяновск, 2013.

9. Применение реакции нарастания титра фага для индикации аэромонад в рыбной продукции / И.Р. Насибуллин, И.Г. Горшков, Н.Г. Куклина, Д.А. Викторov, Д.А. Васильев, А.А. Нафеев // Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности: Материалы международной научно-практической конференции, Ульяновск, ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина», 23-25 апреля 2013. – Т. 2. – Ульяновск, 2013. – С. 158-161.

10. Выделение фагов бактерий

Aeromonas hydrophila и изучение их биологических свойств / И.Р. Насибуллин, Д.А. Викторov, Д.А. Васильев, А.А. Нафеев, И.Г. Швиденко // Вестник ветеринарии. – Ставрополь: «Энтропос», 2013. – № 66 (3/2013). – С. 8-10.

11. Викторov, Д.А. Выделение и изучение биологических свойств бактериофагов *Pseudomonas fluorescens* / Д.А. Викторov, А.М. Артамонов, Д.А. Васильев // Ветеринария и кормление. – Москва: «ВЕТКОРМ», 2012. – №5. – С. 8-9.

12. Золотухин, С.Н. Создание и разработка схем применения диагностических биопрепаратов на основе выделенных и изученных бактериофагов энтеробактерий: автореф. дис. ... д-ра биологических наук / С.Н. Золотухин. - Ульяновск, 2007. – 39 с.

13. Биосенсорная детекция бактерий рода *Bacillus* в молоке и молочных продуктах для предупреждения их порчи / Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин, Н.А. Феоктистова, А.В. Алешкин // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2013. - №4 (24). - С. 36-43.

14. Разработка параметров постановки реакции нарастания титра фага для индикации бактерий *Bacillus mesentericus* в объектах санитарного надзора / Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин, А.В. Алешкин, Н.А. Феоктистова, С.В. Мерчина, В.В. Батраков, М.А. Юдина, В.А. Макеев, Н.А. Романова // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2012. - №3 (19). - С. 69-73.

15. Васильев, Д.А. Биоиндикация бактерий *Bacillus thuringiensis* в объектах санитарного надзора / Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин, Н.А. Феоктистова, М.А. Лыдина, А.И. Калдыркаев, В.А. Макеев, И.Г. Швиденко // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2013. - №3 (23). - С. 52-57.

16. BERGEY'S MANUAL OF Systematic Bacteriology Second Edition. USA 2007.

17. Катер, Э. Бактериофаги: биология и практическое применение / Э. Каттер, А. Сулаквелидзе; пер. с англ.: коллектив пер.; науч. ред. рус. изд. А.В. Летаров. – Москва: Научный мир, 2012. – 636 с.