

УДК: 578.23

**РАЗРАБОТКА ПАРАМЕТРОВ ПОЛУЧЕНИЯ
МАКСИМАЛЬНОГО ТИТРА БАКТЕРИОФАГА РА04
PSEUDOMONAS AERUGINOSA В КЛЕТОЧНОЙ
КУЛЬТУРЕ НА ПЛОТНОЙ СРЕДЕ**

*А.Г.Шестаков, кандидат биологических наук, доцент,
тел. 8(8422) 55-95-47, usxa@yandex.ru*
*А.И.Калдыркаев, кандидат биологических наук, доцент,
тел. 8(8422) 55-95-47, usxa@yandex.ru*
*Н.И. Молофеева, кандидат биологических наук, доцент,
тел. 8(8422) 55-95-47, tolo-na@mail.ru*
*Д.А.Васильев, доктор биологических наук, профессор,
тел. 8(8422) 55-95-47, tolo-na@mail.ru*
ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ

Ключевые слова: *Pseudomonas aeruginosa*, бактериофаг, титр фага, лизогенизация.

Работа представляет собой сравнение нескольких параметров культивирования системы фаг-бактерия. Параметры культивирования бактериофага Ра04 на чувствительных бактериальных клетках Pseudomonas aeruginosa штамм ATCC № 1677 исследованы в трех экспериментальных вариантах. Основной целью данной работы явилось исследование возможности получения бактериофага Ра04 с титром 12 Ig и более. Исследована возможность повышения титра бактериофага при внесении дополнительной бактериальной массы в систему фаг бактерия при наивысшей концентрации бактериофага.

Введение. В 1942 г. Иосиф Виссарионович Сталин спросил у Зинаиды Виссарионовны Ермольевой: «Не помешает ли планам командования развивающаяся в Сталинграде эпидемия холеры?». Зинаида Виссарионовна ответила, что на своем фронте, с помощью бактериофагов, она победу одержала – теперь слово за Красной Армией. Данная аллегория на наш взгляд наиболее точно характеризует мощь и потенциал маленького вируса – бактериофага в качестве антибактериального агента. В отличие от холерного вибриона, способного инфицировать места массового скопления людей, синегнойная палочка является бактерией с обширным набором факторов патогенности, высокой способностью к адаптации и значительным эпидемическим потенци-

алом, особенно в условиях стационаров. *Pseudomonas aeruginosa* - одна из наиболее распространенных инфекций быстро формирующая устойчивость к антибиотикам. Среди альтернативных антимикробных агентов, активных в отношении антибиотикорезистентных штаммов *Pseudomonas aeruginosa*, особый интерес вызывают бактериофаги. Их преимущества в отношении мультирезистентных штаммов бесспорны и многократно доказаны. Не случайно, еще в 1941 году, Магдалина Петровна Покровская делала особый акцент на производственных процессах при изготовлении бактериофагов [1]. Культура производства бактериофагов, сохраненная благодаря творческому и самоотверженному труду отечественных ученых, приобретает особую ценность в современном мире, в условиях стремительно нарастающей бактериальной устойчивости к антибиотикам. На сегодняшний день, в том числе и нами, апробированы различные технологии культивирования бактериофагов, отработаны многофакторные параметры. Однако при культивировании бактериофагов *Pseudomonas aeruginosa* существуют некоторые трудности, с которыми мы сталкивались ранее, в технических решениях получения высоких титров бактериофагов, связанные с формированием биопленок, CRISP иммунитетом, появлением фагорезистентных мутантов и т.д. [2,3]. Кроме того при культивировании бактериофагов на клетках *Pseudomonas aeruginosa* в жидких средах не обойтись без дополнительных методов очистки фаголизатов от белковых компонентов среды и цитоплазмы разрушенных клеток. Крупнейшие биофабрики, такие как «Микроген» успешно реализуют данные технологии посредством многомиллионного оборудования. Однако не всем компаниям малого и среднего бизнеса доступно данное оборудование, особенно для целей освоения все еще узкого сегмента рынка – биопрепаратов бактериофагов. В данной работе мы поставили перед собой цель - исследовать возможность получения бактериофага Pa04 с титром 12 lg и более [4].

Материалы и методы. *Pseudomonas aeruginosa* штамм ATCC № 1677, бактериофаг Pa04, ГРМ-бульон (пр-во Оболенск), ГРМ-агар (пр-во Оболенск), трихлорметан. Фильтродержатели Svinex с комплектом фильтров 0,2 мкм, чашки Петри, пробирки микробиологические, пипетки стеклянные 0,1мл-0,2мл-1мл-10мл. Колбы конические 100мл-500мл-1000мл. Термостат ТС-80. Автоклав ГК-100. Центрифуга СМ-6 лабораторная 3500 об/мин. При работе с определением титров клеточной культуры и бактериофага использовали методы, описанные Лабинской А.С., Адамсом М., Гольдфарбом Д.М.

Результаты исследований и их обсуждение. Бактерии *Pseudomonas aeruginosa* культивировали на газоне клеток выращенных на плотной питательной среде. В начале эксперимента готовили суточную бульонную культуру бактерии *Pseudomonas aeruginosa* штамм ATCC № 1677. Параллельно готовили плотную среду ГРМ-агар разлитую в чашки Петри. ГРМ-агар в чашках Петри подслушивали при 37 °С в течение 24 часов. Таким образом, подсушенный агар соответствовал плотности 2% агарового геля. Суточную культуру бактерий *Pseudomonas aeruginosa* с титром бактериальных клеток $1 \cdot 10^8$ КОЕ/мл в объеме 1мл с использованием стерильного шпателя наносили газоном на поверхность ГРМ-агара в чашки Петри и помещали в термостат при 37 °С на 3 часа. Через 3 часа просматривали чашки Петри, рост культуры представлял собой слабо различимую не вооруженным глазом поверхностную пленку. После визуального осмотра указанные чашки Петри оставляли при означенных параметрах еще на 3 часа. Общее время культивирования составило 6 часов. Титр бактериальных клеток при этом составил $2 \cdot 10^{12}$ КОЕ/мл. Далее, с целью подбора оптимальных параметров получения наивысшего титра бактериофага, применили три варианта эксперимента. Первый вариант представлял собой процесс внесение бактериофага Ра04 с титром $1 \cdot 10^9$ БОЕ/мл в дозе 1 мл на поверхность 6-ти часового бактериального газона *Pseudomonas aeruginosa*. Второй вариант предполагал внесение бактериофага Ра04 с титром $1 \cdot 10^9$ БОЕ/мл в дозе 1 мл на поверхность 6-ти часового бактериального газона *Pseudomonas aeruginosa* с последующим растиранием (перемешиванием и последующим равномерным распределением) культуры и бактериофага на поверхности агара. Третий вариант включал внесение бактериофага Ра04 с титром $1 \cdot 10^9$ БОЕ/мл в дозе 1 мл на поверхность 6-ти часового бактериального газона *Pseudomonas aeruginosa* с последующим растиранием культуры и бактериофага и дальнейшим культивированием в течении шести часов с повторным внесением 1мл суточной бульонной культуры *Pseudomonas aeruginosa* штамм ATCC № 1677 с титром $1 \cdot 10^8$ КОЕ/мл. Контролем служил ГРМ-агар не засеянный бактериальной культурой для контроля стерильности среды и засеянный сплошным газоном ГРМ-агар в чашке Петри для контроля мутности-прозрачности газона бактериальной культуры [5].

Далее представляем Вашему вниманию результаты первого варианта эксперимента. После того как на газон бактериальной культуры внесли бактериофаг систему фаг-бактерия поместили в термостат при 37 °С с периодическим контролем просветления газона бактериальной

культуры через 1, 2, 3 и 6 часов культивирования. Через указанные интервалы времени проводили титрование полученного бактериофага по методу Аппельмана. Через 1 час культивирования титр по Аппельману составил $3 \cdot 10^{10}$ БОЕ/мл. Через 2 часа культивирования титр бактериофагов по Аппельману составил $5 \cdot 10^{12}$ БОЕ/мл. Через 3 часа культивирования титр по Аппельману составил $9 \cdot 10^{13}$ БОЕ/мл. Наконец через 6 часов культивирования титр бактериофага Pa04 на культуре бактерии *Pseudomonas aeruginosa* штамм ATCC № 1677 составил незначительное увеличение $1 \cdot 10^{14}$ БОЕ/мл.

В процессе постановки второго варианта эксперимента при перемешивании культуры бактериальных клеток и суспензии бактериофагов наблюдали формирование конгломератов, которые представляли скопления бактериальной массы различимые невооруженным глазом. После того как на газон бактериальной культуры внесли бактериофаг систему фаг-бактерия поместили в термостат при 37 °С с периодическим контролем просветления газона бактериальной культуры через 1, 2, 3 и 6 часов культивирования. Через указанные интервалы времени проводили титрование полученного бактериофага по методу Аппельмана. Через 1 час культивирования титр по Аппельману составил $2 \cdot 10^9$ БОЕ/мл. Через 2 часа культивирования титр бактериофагов по Аппельману составил $4 \cdot 10^{10}$ БОЕ/мл. Через 3 часа культивирования титр по Аппельману составил $1 \cdot 10^{13}$ БОЕ/мл. Через 6 часов культивирования титр бактериофага Pa04 на культуре бактерии *Pseudomonas aeruginosa* штамм ATCC № 1677 составил $5 \cdot 10^{13}$ БОЕ/мл [6].

Третий вариант эксперимента позволил исследовать возможность дальнейшего увеличения титра бактериофага в системе фаг-бактерия при внесении дополнительного субстрата в виде 24-х часовых клеток бактерий *Pseudomonas aeruginosa*. После того как на газон бактериальной культуры внесли бактериофаг систему фаг-бактерия поместили в термостат при 37 °С на 6 часов культивирования. Через указанный временной интервал в указанную выше систему внесли суточную бульонную культуру *Pseudomonas aeruginosa* штамм ATCC № 1677 с титром $1 \cdot 10^8$ КОЕ/мл. Через 6 часов культивирования титр по Аппельману составил $3 \cdot 10^{14}$ БОЕ/мл. При этом через 6 часов культивирования не наблюдалось помутнения среды, и среда визуально была более прозрачна в сравнении с контролем. Во всех трех вариантах эксперимента контроль среды был стерилен. Контроль сплошного газона бактериальных клеток соответствовал характерному росту *Pseudomonas aeruginosa* штамм ATCC № 1677 [7].

Выводы.

В результате проведенных экспериментов установлено:

1. Максимально возможный титр бактериофага Pa04 на культуре бактерии *Pseudomonas aeruginosa* штамм ATCC № 1677 при культивировании системы фаг-бактерия на плотных средах может составлять 14 lg.

2. В процессе культивирования не целесообразно проводить перемешивание культуры и бактериальной массы, так как возникают конгломераты в которых, наиболее вероятно, возникает феномен «чувство кворума» с последующим формированием биопленки. Данные результаты согласуются с ранее полученными нами.

3. Дополнительное внесение бактериальной массы после достижения титра бактериофага Pa04 на культуре бактерии *Pseudomonas aeruginosa* штамм ATCC № 1677 12lg и более не целесообразно в связи с отсутствием дальнейшей динамики увеличения вирионов.

Библиографический список

1. Покровская, М. П. Лечение ран бактериофагом. / М. П. Покровская, Л. С. Коганова, М. А. Морозенко и др.. - М.: НАРКОМЗДРАВ СССР, МЕДГИЗ. 1941. 57 с.
2. Шестаков, А. Г. Схема выделения и идентификации бактерий *Pseudomonas aeruginosa* / А. Г. Шестаков, И. И. Богданов, Д. А. Васильев // Естественные и технические науки. - 2009. - № 6 (44). С. 118-120.
3. Шестаков, А. Г. Литическая активность бактериофага *Pseudomonas aeruginosa* в биопленке / А. Г. Шестаков, Д. А. Васильев, Е. С. Малинов // Материалы Третьей научно-практической конференции с международным участием: Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности. – М., 2016. - С. 92.
4. Батраков, В. В. Влияние L-аргинина на формирование внеклеточного полимерного матрикса бактериями *Pseudomonas aeruginosa* / В. В. Батраков, А. Г. Шестаков, Е. С. Малинов, Д. А. Васильев // В сборнике: Любичевские чтения - 2014. Современные проблемы эволюции и экологии Сборник материалов международной конференции. – Ульяновск., 2014. - С. 267-270.
5. Малинов, Е. С. Бактериальные биопленки и методы их получения / Е. С. Малинов, А. Г. Шестаков, Д. А. Васильев // В сборнике: Биотехнология: реальность и перспективы в сельском хозяйстве Материалы Международной научно-практической конференции. – Сартов., 2013. - С. 201-203.
6. Шестаков А. Г. Схема индукции профага, повышающая частоту мутации у бактерий *Pseudomonas aeruginosa* при воздействии ультрафиолетового из-

лучения / А. Г. Шестаков, Е. С. Малинов, Д. А. Васильев // Инфекция и иммунитет. - 2014. - № 9. - С. 121.

7. Шестаков А. Г. Параметры изготовления диагностического биопрепарата бактериофага / А. Г. Шестаков, Е. Н. Семанина, Е. Г. Семанин // Научное обозрение. - 2013. - № 7. - С. 22-27.

DEVELOPMENT OF PARAMETERS OF OBTAINING THE MAXIMUM TITER OF BACTERIOPHAGO PA04 PSEUDOMONAS AERUGINOSA IN CELLULAR CULTURE ON A DENSIVE ENVIRONMENT.

Shestakov A.G., Kaldykaev A.I., Molofeeva N.I., Vasiliev D.A.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa, bacteriophage, phage titer, lysogenization.*

The work is a comparison of several parameters of cultivation of the phage-bacterium system.