

БАКТЕРИОФАГИ РОДА *CITROBACTER*

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

Пульчеровская Лидия Петровна, кандидат биологических наук, доцент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

Золотухин Сергей Николаевич, доктор биологических наук, профессор кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ

432017, г. Ульяновск, бульвар Новый Венец, 1; тел.: 8(8422)55-95-47;

e-mail: pulcherovskaya.lidia@yandex.ru

Ключевые слова: *Citrobacter*, бактериофаги, объекты окружающей среды, патологический материал, биологические свойства фагов.

В статье представлены результаты исследований по индикации и идентификации фагов, активных в отношении бактерий рода *Citrobacter*. Бактериофаги были выделены из объектов окружающей среды (песка, воды открытых водоемов, почвы) по стандартным классическим методикам с использованием индикаторных бактерий рода *Citrobacter*, выделенных нами из патологического материала и пищевого сырья. Для детальной характеристики бактериофагов были изучены их основные биологические свойства: морфология негативных колоний; литическая активность; спектр литической активности; специфичность действия; температурная устойчивость; устойчивость к хлороформу. Всего нами было выделено 4 бактериофага (CIT-1, CIT-2 CIT-3 CIT-4), активных в отношении бактерий рода *Citrobacter*. Выделенные и селекционированные фаги обладали выраженной специфичностью к бактериям рода *Citrobacter* и не лизировали представителей семейства *Enterobacteriaceae*; были устойчивы к нагреванию, не обладали устойчивостью к хлороформу фаги CIT-1, CIT-2 и CIT-4, их активность падала уже через 10 минут на 40 %, через 40 минут наблюдалась полная инактивация названных фагов. Фаг CIT-3 на протяжении всего опыта сохранял свои свойства на постоянном уровне. На основании полученных данных не все выделенные и селекционированные бактериофаги обладали необходимыми оптимальными биологическими свойствами, при которых можно было бы рекомендовать их для дальнейших исследований. Из вышеперечисленных выделенных бактериофагов нами был отобран один бактериофаг CIT-3 с наиболее подходящими биологическими свойствами, благодаря которым его можно использовать для дальнейшего изучения генома с целью создания терапевтического биопрепарата.

Введение

Род *Citrobacter* включает в себя несколько разных видов бактерий, представляющих собой опасность для животных и человека как инфекционного агента как в ассоциации с другими микроорганизмами, так и самостоятельно [1].

Исходя из вышесказанного, целью наших исследований стало выделение бактериофагов *Citrobacter* из культур и объектов окружающей среды.

Объекты и методы исследований

Материалом для исследования послужили:

почва из загонов для лошадей и других мест, вода открытых водоемов (р. Волга), сточные воды, песок песочниц.

Суточные культуры бактерий рода *Citrobacter* – 3 штамма, выделенные нами из патологического материала и пищевых продуктов; питательные среды: мясопептонный бульон ТУ 10-02-02789-176-94(ООО «БиоКомпас-С», РФ); мясопептонный агар (НПО «Питательные среды», г. Махачкала), 0,3%-й, 0,7%-й, 1,5%-й; среда Эндо (ФГБУН, ГНЦ ПМБ, РФ); висмут-сульфит агар (ФГБУН, ГНЦ ПМБ, РФ).

Приборы и оборудование. Холодильники

Таблица 1

Источники выделения бактериофагов *Citrobacter*

№	Лизис индикаторных штаммов	Из чего выделен	Место и год выделения
1.	<i>C. freundii</i> №1	песок	п. Октябрьский, 2016
2.	<i>C. freundii</i> №4	вода	р. Волга, 2017
3.	<i>C. freundii</i> №9	почва	п. Октябрьский, 2017
4.	<i>C. freundii</i> №9	песок	п. Октябрьский, 2016

бытовые; ультратермостаты УТ-15У4,2; термостаты ТС-80М-2; микроскопы МБИ-3; лупа бинокулярная МБС-9; центрифуги лабораторные ОПн-8УХЛ4,2 и ЦЛС-3; аппарат ультрафиолетового облучателя крови «Изольда» с ртутной лампой ДРБ8-1; фильтры фирмы Millipore (filter type: 0,22 μm GV).

Методы. В работе использовали методы выделения бактериофагов, предложенные С. Лурия, Д. Дарнеллом (1970), И. П. Ревенко [2], Адельсоном (1962). Изучение биологических свойств фагов проводили по методам, предложенным М. Adams [3].

Результаты исследований

В первой серии опытов мы попытались обнаружить бактериофаги в штаммах цитробактера, так как бактериофаги, выделенные из таких культур, обладают, как правило, более выраженной специфичностью [3].

В качестве индуцирующего фактора применяли воздействие на бактерии ультрафиолетовых лучей в течение 15, 30 и 45 секунд при помощи прибора «Изольда» с ртутной лампой ДРБ8, 18,0 % мощности которой приходится на область 254 нм. Полученный фильтрат исследовали на наличие фага на имеющихся культурах *Citrobacter* методом агаровых слоев. Накануне опыта по чашкам разливали 1,5%-й мясопептонный агар. Перед использованием чашки подсушивали в термостате 15-20 минут. Индикаторные и исследуемые культуры выращивались 18-20 часов при 37 °С на мясопептонном бульоне. Стерильно подготовленный 0,7%-й агар, разлитый в пробирки по 2,5 мл, расплавляли и остужали до 46-48 °С. Исследуемый фильтрат, или центрифугат, в количестве 1,0 мл помещали в 2,5 мл 0,7%-го агара, туда же вносили 0,2 мл индикаторной культуры.

В процессе этих исследований нам не удалось выделить бактериофаги бактерий рода *Citrobacter* из имеющихся у нас штаммов бактерий *Citrobacter*.

Результаты свидетельствуют о том, что действия индуцирующего фактора на бактерии рода *Citrobacter* в наших опытах не приводило к появлению свободного фага.

Результаты поиска лизогенных штаммов были отрицательны.

Во второй серии опытов использовали метод поиска бактериофагов в объектах внешней среды, предложенный Грация [4], [1].

Исследуемый материал (почва, вода, сточные воды, песок) засеивали с бактериями рода *Citrobacter* в МПБ. В 1,0-литровую колбу, содержащую 0,5 литра мясопептонного бульона, добавили по 1,0 мл 18-часовых культур всех имеющихся у нас штаммов *Citrobacter*. Колбу ставили в термо-

стат при 37 °С на 24 часа. Затем смесь бактерий центрифугировали при 2000 об/мин в течение 30 минут, далее фильтровали. Полученный фильтрат для инактивации сопутствующей микрофлоры использовали тремя способами: 1 - прогревали при 60 °С в течение 30 минут; 2 – обрабатывали хлороформом в соотношении 1:10 в течение 30 минут и 3 – очистку фагов осуществляли методом фильтрации с использованием мембранных фильтров фирмы Millipore (filter type: 0,22 μm GV). Наличие фага в фильтрате выявляли при его посеве на плотные питательные среды методом агаровых слоев [5].

В результате исследований семи проб объектов окружающей среды удалось по указанной схеме выявить 4 изолята цитробактериных бактериофагов (СІТ-1, СІТ-2 СІТ-3 СІТ-4). Результаты опыта представлены в таблице 1.

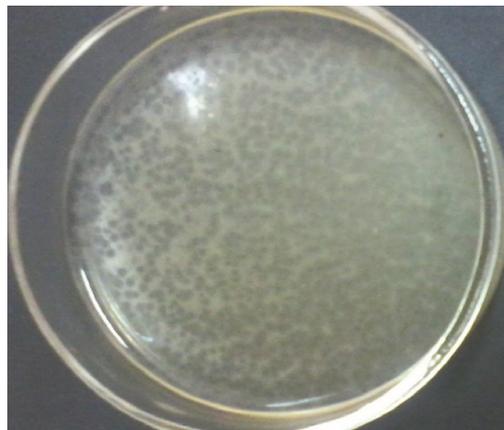
Селекцию штаммов бактериофагов производили методом их пассирования на индикаторных культурах с последующим клонированием однородных негативных колоний, типичных для каждого изолята с периодической отбивкой типичных негативных колоний по методике, описанной и использованной И. М. Габриловичем, С. Н. Золотухиным, Л. П. Пульчеровской [3,6-8].

С этой целью готовили разведение фага в мясопептонном бульоне (рН 7,4-7,6) от 10^{-1} до 10^{-9} . Исследуемый фаг засеивали по методу агаровых слоев по Грация, используя разведения 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , чтобы на питательной среде сформировались отдельные негативные колонии. После 24-часового культивирования в термостате одну негативную колонию, расположенную от других не менее чем в 10 мм, отбивали бактериологической петлей на мясопептонный бульон, туда же вносили индикаторную культуру *Citrobacter* в количестве 0,2 мл. Одновременно ставили контроль – мясопептонный бульон, засеянный *Citrobacter*. Опытные пробирки культивировали в термостате при 37 °С в течение 6 часов. Полученные фаголизаты освобождали от микрофлоры и исследовали по методу агаровых слоев, отбирали негативную колонию идентичную исходной, с которой вновь проводили такую же операцию. Делали до 6 пассажей [1-9].

Характеристика выделенных фагов бактерий



а



б

Рис. 1 - Негативные колонии: а - фаг № 1; б - фаг № 4

рода *Citrobacter*

Дальнейшей целью наших исследований было изучение следующих свойств фагов *Citrobacter*: морфологии негативных колоний; литической активности; спектра литической активности; специфичности действия; температурной устойчивости; устойчивости к хлороформу.

Морфология негативных колоний (бляшек, стерильных пятен) бактериофагов является фенотипическим признаком, поэтому она может изменяться в зависимости от условий культивирования, прежде всего от концентрации агара в плотной среде и от культуральных свойств используемого индикаторного штамма. В стандартных условиях морфология негативных колоний относительно стабильна, и их описание всегда используется при характеристике бактериофагов [1-9].

Морфологию негативных колоний изучали при посеве фага методом агаровых слоев по Грация на мясопептонный агар. После культивирования в термостате при температуре 37 °С в течение суток негативные колонии были прозрачные, округлой формы с ровными краями от 1,5 до 5 мм. Результаты опыта представлены на рис. 1.

Активность выделенных бактериофагов определяли по методам Грация и Аппельмана.

Литическая активность выделенных фагов по Грация составила от $6,1 \times 10^5$ до $3,5 \times 10^9$ фаговых корпускул в 1 мл среды.

Литическая активность выделенных фагов по Аппельману составила от 10^{-4} до 10^{-8} .

Спектр литической активности является характерной особенностью штаммов фага, и его используют для их идентификации. Определение спектра литической активности проводили методом нанесения фага на газон бактериальной культуры [1, 3-4].

Для изучения спектра литической активности 4 селекционированных фагов (CIT-1, CIT-2 CIT-3

CIT-4) мы использовали 3 полевых штамма бактерий рода *Citrobacter*.

На поверхность МПА в чашках Петри пастеровской пипеткой наносили 3-4 капли 18-часовой бульонной культуры исследуемых микроорганизмов. Затем равномерно распределяли по поверхности среды стерильным шпателем. Чашки ставили в термостат для подсушивания на 15-20 минут. На поверхность засеянной среды пастеровской пипеткой легким прикосновением капли наносили фаг и наклоняли, чтобы капли стекли, а затем инкубировали при температуре 37 °С, оценку результатов проводили через 18-20 часов. Результаты опыта представлены в табл. 2 [1, 3, 6, 7].

Исследования показали, что изучаемые фаги лизировали все изученные в опыте культуры.

Видовая специфичность фагов используется в практике для дифференциации бактерий. Эта способность фагов определяется, прежде всего, средством их к рецепторам лизируемых бактерий.

Определение видовой специфичности 4 изучаемых бактериофагов бактерий рода *Citrobacter* (CIT-1, CIT-2 CIT-3 CIT-4) проводили на агаровых средах путём нанесения фага на газон культуры. На поверхность МПА в чашках Петри пастеровской пипеткой наносили 3-4 капли 18-часовой бульонной культуры исследуемых микроорганизмов. Затем равномерно распределяли по поверхности среды стерильным шпателем. Чашки ставили в термостат для подсушивания на 15-20 минут. На поверхность засеянной среды пастеровской пипеткой легким прикосновением капли наносили фаг и наклоняли, чтобы капли стекли, а затем инкубировали при температуре 37 °С, оценку результатов проводили через 18-20 часов [2, 5, 7].

В результате изучения специфичности выделенных бактериофагов рода *Citrobacter* (CIT-1, CIT-2 CIT-3 CIT-4) по отношению к представителям других семейств, родов и видов использовали:

Спектр литической активности

Культура микроорганизмов	Бактериофаг			
	CIT-1	CIT-2	CIT-3	CIT-4
<i>C. freundii</i> №1	+	+	+	+
<i>C. freundii</i> №4	+	+	+	+
<i>C. freundii</i> № 9	+	+	+	+

Morganella, *Escherichia*, *Salmonella*, *Proteus*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Yersini*, – полученные из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ УЛГАУ (*Proteus* 14 штаммов, *Morganella* 7 штаммов, *Klebsiella* 12 штаммов, *Salmonella* 4 штамма, *Pseudomonas aeruginosa* 8 штаммов, *E. coli* 12 штаммов, *Enterobacter* 14 штаммов, *Y. enterocolitica* 6 штаммов).

Установлено, что выделенные бактериофаги не лизировали ни одну из испытываемых культур других родов бактерий. На основании полученных результатов можно сделать вывод о том, что выделенные фаги являются специфическими по отношению к бактериям рода *Citrobacter* и не активны в отношении представителей других родов бактерий [3].

Температурную устойчивость выделенных изолятов проводили путем прогревания в ультратермостате при температуре от 60 до 90 °С с интервалом 2-3 °С в течение 30 минут.

Исследования показали, что выделенные и селекционированные фаги обладали примерно одинаковой температурной устойчивостью. Прогревание бактериофагов при температуре 60-68 °С не меняло их активность. При температуре 69-74 °С активность снизилась на два порядка, при 75-80 °С активность понизилась еще на два порядка, при 81-83 °С активность фагов CIT-1 и CIT-2 упала до единичных негативных колоний, активность фагов CIT-3 и CIT-4 снизилась до $1,5 \times 10^3$ и $2,0 \times 10^2$ БОЕ. При температуре 84-90 °С в 1 мл фаголизата активных корпускул фагов CIT-1, CIT-2 и CIT-4 не обнаружено. Фаг CIT-3 был незначительно активнее, и наблюдались единичные активные корпускулы [1-9].

Устойчивость выделенных бактериофагов к воздействию хлороформа

Бактериофаги обычно устойчивее к хлороформу, чем клетки микроорганизмов, поэтому данный химический агент является хорошим средством для освобождения фаголизата от жизнеспособных бактерий.

Определение чувствительности к хлороформу выделенных фагов проводили путем обработки фаговой суспензии хлороформом в соотношении 1:10 при постоянном встряхивании в течение 10-40 минут с шагом в 10 минут.

Изменение литической активности изучали при исследовании титра фага на плотных питательных средах методом Грациа.

Исследования показали, что выделенные изоляты фагов CIT-1, CIT-2 и CIT-4 не обладали устойчивостью к хлороформу, их активность падала уже через 10 минут на 40 %, через 20 минут – на 60 %, через 30 минут у названных фагов сохранялось не более 10 % негативных колоний, а через

40 минут наблюдали их полную инактивацию. Изолят фага CIT-3 на протяжении всего опыта сохранял свою активность на исходном уровне [1-9].

Выводы

1. Из объектов внешней среды было выделено 4 изолята фагов, активных по отношению к бактериям рода *Citrobacter*.

2. Селекционированные штаммы фагов CIT-1, CIT-2, CIT-3 и CIT-4 имели литическую активность от 10^4 до 10^8 в жидких и от $6,1 \times 10^5$ до $3,5 \times 10^9$ фаговых корпускул в 1 мл на плотных питательных средах. Выделенные и селекционированные бактериофаги лизировали все изученные культуры бактерий рода *Citrobacter*.

3. Выделенные и селекционированные фаги бактерий рода *Citrobacter* обладали выраженной специфичностью и не лизировали представителей родов *Morganella*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Proteus*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Yersinia*; были устойчивы к нагреванию до 71 °С в течение 30 минут, бактериофаги CIT-1, CIT-2 и CIT-4 не обладали устойчивостью к хлороформу, их активность снижалась уже через 10 минут прогревания на 40 %, через 20 минут – на 60 %, через 30 минут у названных фагов сохранялось не более 10 % негативных колоний, а через 40 минут наблюдали полную инактивацию фагов. Фаг CIT-3 на протяжении всего опыта сохранял свою активность на исходном уровне.

4. На основании полученных данных выделенный и селекционированный бактериофаг CIT-3 обладает выраженными свойствами, которые позволяют использовать его в качестве производственного штамма с целью создания терапевтического биопрепарата после изучения структуры генома.

Исследования проводятся при поддержке государства в лице ФГБУ «Российский фонд фундаментальных исследований» по научному проекту «Геномика и биология кандидатских бактериофагов для терапии энтеробактериальных инфекций в ветеринарной медицине» № 16-44-732038/16 от 03.11.2016 г.

Библиографический список

1. Пульчеровская Лидия Петровна. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов *Citrobacter* и их применение в диагностике / Пульчеровская Л.П. Диссертация на со-

искание ученой степени кандидата биологических наук: 03.00.07, 03.00.23. - Ульяновск, 2004. - 186 с.

2. Ревенко И.П. Бактериофаги и их использование в ветеринарной практике / И.П. Каврук. – Киев: Урожай, 1978. – 88 с.

3. Бактериофаги микроорганизмов значимых для животных, растений и человека. Научное издание / Д.А. Васильев [и др.]; под ред. Васильева Д.А., Золотухина С.Н. – Ульяновск, НИИЦМиБ, 2013. – 316с.

4. Золотухин Сергей Николаевич. Бактериофаги *M. morganii* и их применение при желудочно-кишечных заболеваниях поросят // Автореферат дис. канд. вет. наук: 16.00.03. - Москва, 1994. - 19 с.

5. Мониторинг объектов окружающей среды на наличие бактерий рода *Citrobacter* и их фагов / Пульчеровская Л.П., Васильев Д.А., Золотухин С.Н., Ефрейторова Е.О. // В сборнике: Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения Материалы VII Международной научно-практической конференции. 2016. - С. 253-260.

6. Бактериофаги: биология и практическое применение/ Под.ред. Э. Каттер, А. Сулаквелидзе // Пер. с англ. Коллектив переводчиков; науч. ред.А.В.Летаров.- М.: Научный мир, 2012.-640с.

7. Садртдинова Г.Р. Селекция выделенных клонов бактериофагов, активных к *Klebsiella pneumonia* / Е.А. Ляшенко, Г.Р. Садртдинова, Д.А. Васильев // Инфекция и иммунитет. 2014.-№S.-С.95.

8. Феоктистова Наталья Александровна. Выделение и изучение биологических свойств рода *Proteus*, конструирование на их основе биопрепарата и разработка параметров практического применения : дис. ... канд. биол. наук: 03.00.07, 03.00.23 / Н.А. Феоктистова Ульяновск, 2006. - 166 с.

9. Каврук, Леонид Сергеевич. Тесты, критерии и методы ускоренной санитарно-бактериологической оценки репродукторных помещений животноводческих ферм и пути оптимизации в них микробиоценоза: автореферат дис. доктора ветеринарных наук: 16.00.03 / ВНИИ вет. санитарии, гигиены и экологии. - Москва, 1994. - 43 с.

BACTERIOPHAGES OF CITROBACTER GENUS

Vasilyev D.A., Pulcherovskaya L.P., Zolotukhin S.N.
FSBEI HE Ulyanovsk SAU

432017. Ulyanovsk, Novyy Venets bld., 1;
8 (8422) 55-95-47; e-mail: pulcherovskaya.lidia@yandex.ru

Key words: *Citrobacter*, bacteriophages, environmental objects, pathological material, biological properties of phages.

The article presents results of studies on the indication and identification of phages that are active against bacteria of *Citrobacter* genus. Bacteriophages were isolated from environmental objects (sand, open water, soil) by standard classical methods using indicator bacteria of *Citrobacter* genus isolated by us from pathological material and food raw materials. To identify detailed properties of bacteriophages, their primary biological properties were studied: morphology of negative colonies; lytic activity; spectrum of lytic activity; specificity of the action; temperature stability; resistance to chloroform. In total, we isolated 4 bacteriophages (CIT-1, CIT-2 CIT-3 CIT-4), active against bacteria of *Citrobacter* genus. The isolated and selected phages had a pronounced specificity for *Citrobacter* genus bacteria and did not lyse the representatives of the Enterobacteriaceae family; they were resistant to heat, such phages as CIT-1, CIT-2 and CIT-4 did not have resistance to chloroform, their activity dropped by 40% after 10 minutes, after 40 minutes complete inactivation of these phages was observed. The phage CIT-3 retained its properties at a constant level throughout the experiment. On the basis of the data obtained, not all isolated and selected bacteriophages possessed the necessary, appropriate biological properties for which they could be recommended for further studies. We selected one bacteriophage (CIT-3) among the above-mentioned / isolated bacteriophages, it has the most suitable biological properties, due to which it can be used to further study of genome in order to create a therapeutic biological product.

Bibliography

1. Pulcherovskaya Lydiya Petrovna. Isolation and study of the main biological properties of *Citrobacter* bacteriophages and their use in diagnosis / Pulcherovskaya L.P. Dissertation of Candidate of Biological Sciences: 03.00.07, 03.00.23. - Ulyanovsk, 2004. - 186 p.
2. Revenko I.P. Bacteriophages and their usage in veterinary practice / I.P. Kavruk. - Kiev: Urozhai, 1978. - 88 p.
3. Bacteriophages of microorganisms significant for animals, plants and humans. Scientific publication / D.A. Vasilyev [et al]; Edited by Vasilyev D.A., Zolotukhin S.N. - Ulyanovsk, SRICMB, 2013. – 316p.
4. Zolotukhin Sergey Nikolaevich. Bacteriophages *M. morganii* and their application for gastrointestinal diseases of pigs // Abstract of dissertation of Candidate of Veterinary Sciences: 16.00.03. - Moscow, 1994. - 19 p.
5. Monitoring of environmental objects for the presence of bacteria of *Citrobacter* genus and their phages / Pulcherovskaya L.P., Vasilyev D.A., Zolotukhin S.N., Efreitorova E.O. // In the collection: Agrarian science and education at the present stage of development: experience, problems and solutions. Materials of the VII International Scientific and Practical Conference. 2016. - P. 253-260.
6. Bacteriophages: Biology and Practical Applications / Edited by E. Kutter, A. Sulakvelidze // Trans. from English. Scientific editor. A.V. Letarov.- M. : Nauchnyi mir, 2012.-640p.
7. Sadrtidinova G.R. Selection of isolated clones of bacteriophages active against *Clebsiella pneumonia* / E.A. Lyashenko, G.R. Sadrtidinova, D.A. Vasilyev // Infection and immunity. 2014.-No.S.-P.95.
8. Feoktistova Natalia Alexandrovna. Isolation and study of biological properties of *Proteus* genus, design of a biological medication on their basis and development of parameters of practical application: Dissertation of Candidate of Biology: 03.00.07, 03.00.23 / N.A. Feoktistova Ulyanovsk, 2006. - 166 p.
9. Kavruk, Leonid Sergeevich. Tests, criteria and methods for accelerated sanitary-bacteriological evaluation of reproductive premises of cattle-breeding farms and ways to improve microbiocenosis there: abstract of dissertation of Doctor of Veterinary Sciences: 16.00.03 / ARSRI of veterinary, sanitary science, hygiene and ecology. - Moscow, 1994. - 43 p.