

УДК 619:616-07

БАКТЕРИОФАГИ *AEROMONAS HYDROPHILA* И ИХ БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

И.Р.Насибулин, соискатель
ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ, г. Ульяновск, nir72@mail.ru;
А.А.Нафеев, д.м.н., профессор
ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет»

Ключевые слова: *Aeromonas hydrophila*, бактериофаг, изолят фагов, литическая активность, реакция нарастания титра фага, терморезистентность, специфичность.

В статье представлены результаты собственных исследований по выделению, селекционированию, изучению основных биологических свойств бактериофагов *Aeromonas hydrophila* и их применению для индикации и идентификации указанных бактерий в объектах внешней среды методом реакции нарастания титра фага.

Введение. Бактерии *Aeromonas hydrophila* - прямые палочки с закругленными концами, располагаются поодиночке, парами, цепочками, подвижные, имеют капсулу, на МПА образуют блестящие, полупрозрачные с беловато-желтым оттенком колонии, на среде УГСХА-2 формируют округлые, выпуклые, светло-бежевые, блестящие колонии 2 – 3 мм в диаметре, в МПБ вызывают равномерное помутнение бульона с образованием серовато-серебристой пленки и хлопьевидного белого осадка, грамотрицательные, оксидазоположительные, разжижают желатин, оптимальная температура роста 37°C [1]. Бактерии *Aeromonas hydrophila* широко распространены в биосфере. Их активно выделяют из речной и морской воды, сточных вод, гидробионтов, продуктов питания, домашних животных птиц, почвы, беспозвоночных, насекомых, растений. Данный микроорганизм обладает широким набором факторов вирулентности обеспечивающих его патогенность и способен вызывать опасные заболевания, как у человека, так и у животных. Активно размножаясь при низких температурах и вызывая порчу продуктов, бактерии *A. hydrophila* являются возбудителями пищевой инфекции. Вызываемый данной бактерией аэромоноз рыб приводит к массовой гибели рыб и наносит тем самым экономический ущерб рыбоводческим хозяйствам [2,3]. Распространенность *Aeromonas hydrophila*, полиморфизм клиники, внутривидовая схожесть требуют от лабораторий быстрой и

точной индикации и идентификации данного микроорганизма. Существующие на момент исследований методики индикации и идентификации *Aeromonas hydrophila* по разным причинам недостаточно решают эту проблему. Решить данную проблему может использование биопрепарата на основе бактериофагов *Aeromonas hydrophila*, обладающего высокой чувствительностью, специфичностью, быстротой и простотой в применении. На основе анализа литературных данных биопрепарат для диагностики *Aeromonas hydrophila* в ветеринарных и медицинских лабораториях на момент исследования отсутствует. В ходе работы были выделены бактериофаги *Aeromonas hydrophila* и на их основе разработан биопрепарат для фагодетекции данной бактерии[4].

Материалы и методы исследований. Вода из открытых водоемов Ульяновской области (реки, озера, пруды), сточные воды, гидробионты. Штаммы бактерий полученные из музея кафедры МВЭИВСЭ при ФГБОУ ВО УлГАУ им. П.А. Столыпина»: референс-штамм бактерии *A. hydrophila* ATCC 49140; *A. sobria* ATCC9071, *A. salmonicida* ATCC 33658, *A. caviae* ATCC 12633; *E. coli* №4, *Kl. pneumonia* №4463, *C. freundii*, *B. cereus* №2527, *B. subtilis* №6633, *E. faecalis* №189, *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis* №0630, *Ps. aeruginosa* №128, *Pr. rettgeri* №175, *Ps. putida* №12633, *P. mirabilis* №523. 14 штаммов *A. hydrophila*, 5 изолятов бактериофагов *A. hydrophila*, выделенных из объектов ветеринарно-санитарного надзора. Все перечисленные штаммы бактерий обладают типичными видами биологическими свойствами.

Выделение бактериофагов и изучение их основных биологических свойств проводили с помощью методов предложенных И. П. Ревенко[5], С. Н. Золотухиным [6], А.Г. Шестаковым[7].

Результаты исследований и их обсуждение. Первым этапом нашей работы было изучение 15 штаммов *A. hydrophila* как потенциально лизогенных. В первой серии опытов выделение бактериофагов из бактерий проводили без воздействия на них индуцирующего фактора. Вторая серия опытов предусматривала воздействие на исследуемые штаммы *A. hydrophila* индуцирующих факторов: ультрафиолетовое излучение (воздействие бактерицидной лампы в течении 5-20 минут с расстояния 50 см, длина волны 254нм, трихлотетан в соотношении 10:1. Данные серии опытов показали, что исследуемые штаммы *A. hydrophila* не проявили естественную и искусственную лизогенность.

Следующим этапом исследовательской работы стало выделение бактериофагов *A. hydrophila* из объектов ветеринарно-санитарного надзора методом накопления. Материалом для исследований были сточ-

Таблица 1 – Литическая активность бактериофагов бактерий *A. hydrophila*

№	Штамм фага	Титр по Аппельману	Титр по Грация, 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}	$0,58 \times 10^6 \pm 0,7 \times 10^6$
5	Фаг Ahd-УГСХА	10^{-8}	$1,5 \times 10^8 \pm 0,4 \times 10^8$

Таблица 2 – Спектр литической активности бактериофагов бактерий *A. hydrophila*

Бактериофаги <i>A. hydrophila</i>	Кол-во испытанных штаммов <i>A. hydrophila</i> шт.	Количество лизируемых штаммов <i>A. hydrophila</i> шт.	Процент лизируемых штаммов <i>A. hydrophila</i> , %
F43-УГСХА	15	13	86,7
1р-УГСХА	15	4	26,6
F43g-УГСХА	15	8	53,3
13а- УГСХА	15	5	33,3
Ahd-УГСХА	15	2	13,3

ные воды, вода открытых водоемов (озера, реки, пруды) Ульяновской области. При исследовании более 130 проб нами выделено 5 изолятов фагов бактерий *A. hydrophila*. Селекцию бактериофагов проводили десятикратным пассированием изолированных БОЕ на МПА с перевиванием на МПБ. Очистку фагов от бактериальных клеток проводили методом вакуумной фильтрации на установке фирмы «Millipor», или использовали шприц - насадку типа «Swinnex» с диаметром пор 0,22 μm GV. Фильтраты укупоривали в стерильные флаконы и хранили при температуре 4-6° без использования консервантов.

Выделенные бактериофаги формировали схожие негативные колонии округлой формы с прозрачными центрами, без вторичного роста и зонами неполного лизиса, диаметром от 0,1 до 2,0 мм. Литическая активность изучаемых бактериофагов составила: по Аппельману от 10^{-5} до 10^{-8} ; по Грация от $0,58(\pm 0,2) \times 10^6$ до $2,5(\pm 0,1) \times 10^8$ БОЕ/мл (таблица 1). Спектр литической активности выделенных бактериофагов составил от 13,3 до 86,7 % из имеющихся у нас 15 штаммов *A. hydrophila* (таблица 2).

Таблица 3 – Специфичность бактериофагов *A. hydrophila*

№ п/п	Вид бактерий	Бактериофаги <i>A. hydrophila</i>					Контроль МПБ
		F43-УГСХА	1p-УГ-СХА	F43g-УГСХА	13a-УГ-СХА	AhD-УГСХА	
1	<i>Aeromonas salmonicida</i>	-	-	-	-	-	-
2	<i>Aeromonas sobria</i>	-	-	-	-	-	-
3	<i>Aeromonas caviae</i>	-	-	-	-	-	-
4	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-	-	-	-
5	<i>Proteus mirabilis</i>	-	-	-	-	-	-
6	<i>Citrobacter freundii</i>	-	-	-	-	-	-
7	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-
8	<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	-	-	-
9	<i>Enterobacter faecalis</i>	-	-	-	-	-	-
10	<i>Yersinia enterocolitica</i>	-	-	-	-	-	-
11	<i>Yersinia pseudotuberc.</i>	-	-	-	-	-	-
12	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-
13	<i>Pseudomonas putida</i>	-	-	-	-	-	-
14	<i>Providencia rettgeri</i>	-	-	-	-	-	-
15	<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-	-	-	-
16	<i>A. hydrophila</i>	+	+	+	+	+	-

Примечание: «-» отсутствие лизиса, «+» лизис культуры

Специфичность 5 выделенных изолятов бактериофагов *A. hydrophila* изучали на вышеуказанных видах и родах культур бактерий. Результаты исследований показали что выделенные бактериофаги строго специфичны по отношению к *A. hydrophila* и не лизируют бактерии других видов и родов (таблица 3).

Для изучения температурной устойчивости выделенных бактериофагов, фаголизаты прогревали в ультратермостате при температуре от 45° до 57° с интервалом 2° в течении 30 минут(таблица 4).

Устойчивость изучаемых бактериофагов к трихлорметану определяли в соотношении 1:10 в течении 15,30,45 минут с обязательной постановкой контроля и определения количества БОЕ методом агаровых слоев по Грациа. Исходя из результатов опытов выделенные бактерио-

Таблица 4–Температурная устойчивость бактериофагов *A. hydrophila*

Температурный режим, °С	Активность штаммов, подвергнутых температурной обработке, БОЕ/мл					
	ИШ	F43-УГСХА	1p-УГСХА	F43g-УГСХА	13a-УГ-СХА	Ahd-УГСХА
45	2,0x10 ⁸ ±0,2x10 ⁸	2,0x10 ⁸ ±0,4x10 ⁸	3,0x10 ⁶ ±0,6x10 ⁶	2,0x10 ⁷ ±0,5x10 ⁷	4,0x10 ⁵ ±0,3x10 ⁵	3,0x10 ⁷ ±0,4x10 ⁷
47	1,0x10 ⁷ ±0,3x10 ⁷	1,0x10 ⁷ ±0,5x10 ⁷	1,0x10 ⁵ ±0,7x10 ⁵	1,0x10 ⁶ ±0,2x10 ⁶	1,0x10 ⁴ ±0,4x10 ⁴	1,0x10 ⁶ ±0,5x10 ⁶
49	1,0x10 ⁶ ±0,2x10 ⁶	3,0x10 ⁶ ±0,4x10 ⁶	1,0x10 ⁴ ±0,2x10 ⁴	2,0x10 ⁵ ±0,6x10 ⁵	2,0x10 ³ ±0,2x10 ³	2,0x10 ⁵ ±0,3x10 ⁵
51	1,0x10 ⁵ ±0,2x10 ⁵	2,0x10 ⁵ ±0,2x10 ⁵	2,0x10 ³ ±0,2x10 ³	1,0x10 ⁴ ±0,2x10 ⁴	-	1,0x10 ⁴ ±0,3x10 ⁴
53	2,0x10 ³ ±0,1x10 ³	1,0x10 ⁴ ±0,2x10 ⁴	-	2,0x10 ³ ±0,1x10 ³	-	2,0x10 ³ ±0,2x10 ³
55	-	1,0x10 ³ ±0,2x10 ³	-	-	-	-
57	-	-	-	-	-	-
Контроль	4,0x10 ⁸ ±0,2x10 ⁸	2,5x10 ⁸ ±0,2x10 ⁸	4,2x10 ⁶ ±0,3x10 ⁶	3,7x10 ⁷ ±0,5x10 ⁷	0,58x10 ⁶ ±0,1x10 ⁶	1,5x10 ⁸ ±0,4x10 ⁸

Примечание: «иш»-индикаторный бактериальный штамм *A. hydrophila* №43-УГСХА.

Таблица 5 – Результаты исследования устойчивости выделенных бактериофагов к обработке трихлорметаном

№ пп	Штаммы бактериофагов	Титр исследуемых бактериофагов по Грация, БОЕ/мл			
		Контроль	Время обработки трихлорметаном, мин.		
			15	30	45
1	ФaгF43-УГСХА	2,0x10 ⁸ ± 0,1x10 ⁸	4,0x10 ⁸ ± 0,1x10 ⁸	3,0x10 ⁶ ± 0,1x10 ⁶	1,0x10 ⁴ ±0,1x10 ⁴
2	Фaг1p-УГСХА	4,0x10 ⁶ ± 0,2x10 ⁶	5,0x10 ⁶ ± 0,1x10 ⁶	4,0x10 ⁴ ± 0,2x10 ⁴	4,0x10 ³ ±0,2x10 ³
3	Фaг43g-УГСХА	3,0x10 ⁷ ± 0,1x10 ⁷	5,0x10 ⁷ ± 0,2x10 ⁷	4,0x10 ⁵ ± 0,1x10 ⁵	3,0x10 ³ ±0,3x10 ³
4	Фaг13-УГСХА	5,0x10 ⁵ ± 0,2x10 ⁵	7,0x10 ⁵ ± 0,1x10 ⁵	6,0x10 ⁴ ± 0,1x10 ⁴	6,0x10 ³ ±0,1x10 ³
5	ФaгAhd-УГСХА	1,0x10 ⁸ ± 0,1x10 ⁸	3,0x10 ⁸ ± 0,3x10 ⁸	3,0x10 ⁵ ± 0,2x10 ⁵	1,0x10 ³ ±0,2x10 ³

фаги являются устойчивыми к воздействию трихлорметаном в соотношении 1:10 в течении до 45 минут (таблица 5).

Заключение. По результатам исследований основных биологических свойств выделенных бактериофагов для дальнейшего конструирования биопрепарата был выбран бактериофаг F-43УГСХА: титр по Грация $2,5 \times 10^8 \pm 0,2 \times 10^8$ и 10^8 по Appельману, спектр литической активности 86,7%, специфичность, температурную устойчивость до 55°, устойчивость к трихлорметану до 45 минут воздействия в концентрации 1:10.

Библиографический список.

1. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Second Edition V. Two Part B. G.M. Garrity, Don Brenner, Noel Krieg, James T. Staley. 2005/
2. Janda, J. M., and S. L. Abbott. 2010. The Genus *Aeromonas*: Taxonomi, Pathogenicity, and Infection. Clin. Microbiol.23:35 – 73.
3. Грищенко Л. И. Болезни рыб и основы рыбоводства. Учебник / Л. И. Грищенко, М. Ш. Акбаев, Г. В. Васильков – М.: Колос, 1999. — С. 10-69; 139-263; 420-448.
4. Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин Бактериофаги микроорганизмов значимых для животных, растений и человека. Научное издание.-Ульяновск: НИИЦМиБ,2013.-316с.
5. Ревенко, И. П. Бактериофаги и их использование в ветеринарной практике / И. П. Ревенко. – Киев: Урожай, 1978. – С. 88.
6. Золотухин, С. Н. Создание и разработка схем применения диагностических биопрепаратов, на основе выделенных и изученных бактериофагов энтеробактерий: автореф. дис. ... д-ра биол. наук / С. Н. Золотухин. – Ульяновск, 2007. – 39 с.
7. Шестаков А. Г. Усовершенствование методов выделения, идентификации и индикации бактерий *Pseudomonas aeruginosa* / А. Г. Шестаков // Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Саратов, 2010 – 22 с.

AEROMONAS HYDROPHIL BACTERIOPHAGES AND THEIR BIOLOGICAL CHARACTERISTICS

Nasibulin I.R., Nafeev A.A.

Key words: *Aeromonas hydrophila, bacteriophage, phage isolate, lytic activity, phage titer increase reaction, thermal resistance, specificity.*

The article presents the results of our own research on the isolation, selection, study of the basic biological properties of bacteriophages Aeromonas hydrophila and their use for the indication and identification of these bacteria in environmental objects by the method of reaction of increase in phage titer.