

УДК 619:578.832.1

ИЗУЧЕНИЕ ОСНОВНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БАКТЕРИОФАГОВ *BORDETELLA BRONCHISEPTICA*, ВЫДЕЛЕННЫХ МЕТОДОМ ИНДУКЦИИ

Д.А. Васильев, доктор биологических наук, профессор,

Е.Н. Семанина, аспирант,

С.Н. Золотухин, доктор биологических наук, профессор,

И.Н. Хайруллин, доктор ветеринарных наук, профессор,

Ю.Б. Васильева, кандидат ветеринарных наук, доцент,

А.Г. Шестаков, кандидат биологических наук, научный сотрудник.

Научно-исследовательский инновационный центр микробиологии и биотехнологии
Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии

e-mail: fvm.zol@mail.ru

Ключевые слова: *Bordetella bronchiseptica*, биологические свойства, индукция, бактериофаг.

Представлен материал по выделению фагов *Bordetella bronchiseptica*, изучены основные биологические свойства выделенных бактериофагов: морфология негативных колоний, литическая активность, спектр литической активности, специфичность действия, температурная устойчивость, устойчивость к воздействию хлороформа.

Введение

Бордетеллез – инфекционное заболевание животных и человека, вызываемая *Bordetella bronchiseptica*, широко распространена в странах Европы и США и изучается с начала XX века [6,7]. Однако в Российской Федерации до настоящего времени это заболевание не изучалось, отсутствуют статистические данные о широте его распространения. Многие аспекты бордетеллезной инфекции до сих пор остаются неясными. В значительной степени это обусловлено недостаточно разработанными методами лабораторной диагностики бордетеллеза в нашей стране, что затрудняет получение исчерпывающей эпизоотологической и эпидемиологической информации.

Для выделения и идентификации бордетелл в микробиологической практике используют бактериологический метод исследования, который связан с выделением чистой культуры возбудителя и изучением его биологических свойств, что требует длительного времени (6-8-х дней) и специальных питательных сред.

Имеющиеся на вооружение современные методы диагностики (ИФА, ПЦР), хоть и являются высокоспецифичными, но высокая стоимость оборудования и реактивов делает их пока недоступными большинству рядовых бактериологических лабораторий.

При индикации и идентификации некоторых микроорганизмов хорошо зарекомендовали методы с применением специфических бактериофагов [1,2,3,4,5].

Методы фагоиндикации и фагоидентификации просты в исполнении, не требуют много времени и дополнительного оборудования, поэтому доступны лабораториям любого уровня [3,4,5].

Биологическая промышленность нашей страны не выпускает бактериофаги, активные в отношении бордетелл и в доступной литературе мы не нашли научных данных о бактериофагах *Bordetella bronchiseptica*, поэтому целью нашей работы было изыскание бактериофагов вышеуказанных микроорганизмов и изучение их основных биологических свойств: морфология негативных колоний, литическая активность,

спектр литической активности, специфичность действия, температурная устойчивость, устойчивость к воздействию хлороформа.

Материалы и методы

Работа была выполнена в научно-исследовательском инновационном центре микробиологии и биотехнологии Ульяновской ГСХА. Для опыта были использованы 5 референс-штаммов *Bordetella bronchiseptica* из коллекции музея НИИЦМБ Ульяновской ГСХА (№ 1, 7, 214, 22067, 8344), выделенные от клинически больных собак и кошек.

Согласно научной информации, изложенной в литературных источниках, бактериофаги можно выделить из тех субстратов, где находятся бактерии – их хозяева. Но наиболее специфичными являются бактериофаги, выделенные из культур микроорганизмов, присутствующие в них в виде профагов. Для активизации процесса превращения профагов в вирулентные фаги мы применяли действие индуцирующего фактора на культуры бактерий, методом облучения их ультрафиолетовыми лучами.

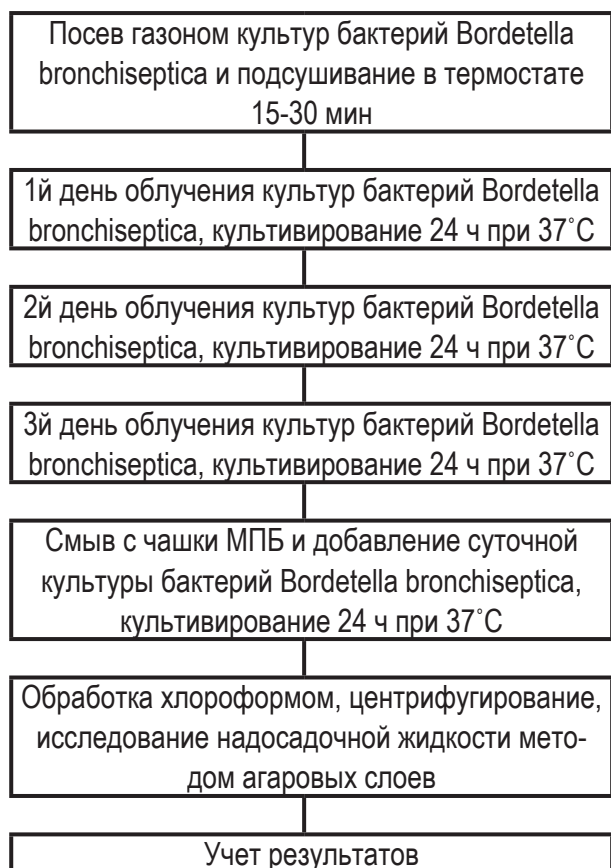


Рис. 1. - Схема выделения бактериофагов из культур *Bordetella bronchiseptica*

Выделение бактериофагов проводили по схеме представленной на рис 1.

Процесс выделения бактериофага занимал 5 дней, из них 3 дня облучали бактерии УФЛ с помощью ртутно-кварцевой лампы Philips, длинной волны 250 нм на расстоянии одного метра от поверхности плотной питательной среды в течение 5,0 минут с дальнейшим инкубированием чашек в термостате при 37°C. На 4-й день производили смыв облученной культуры бактерий мясопептонным бульоном и переносили в пробирку с суточной культурой бордетелл. Далее культивировали в термостате в течение суток. Затем обрабатывали хлороформом 1:10 в течение 15 минут, центрифугировали при 3000 об/мин – 15 мин. Сливали надосадочную жидкость в стерильную пробирку. Надосадок исследовали по методу агаровых слоев. Присутствие бактериофага определяли по наличию зон лизиса (негативных колоний), хорошо видимых на матовом фоне глубинного роста бактерий.

Изучение биологических свойств фагов проводили по методам, предложенным М. Адамс [1], Д.М. Гольдфарб [2].

Для определения морфологии негативных колоний мы высевали фаг в разведении 10^{-8} – 10^{-9} на чашки Петри методом агаровых слоев. Это было необходимо, чтобы в используемом разведении содержание фаговых корпускул в 1 мл не превышало 10 – 15. Для формирования роста газона культуры на поверхности агара использовали индикаторные штаммы *Bordetella bronchiseptica* №1, №8344. Посевы культивировали в термостате при температуре 37 °С. Изучение морфологии негативных колоний проводили через 6, 10, 16, 24 часа.

Индикаторные культуры *Bordetella bronchiseptica* выращивали на стандартном мясопептонном бульоне (рН 7,4 – 7,6) при температуре 37°C 18 часов.

Для селекции клонов фагов по методике, описанной и использованной И.М. Габриловичем (1992), С.Н. Золотухиным (1994), отивали одну негативную колонию и помещали в пробирку с МПБ и индикаторной культурой бордетелл. Содержимое пробирок инкубировали в термостате при 37°C в течение 8 часов, затем обрабатывали хлороформом из расчета 1:10 в течение 15 минут и центрифугировали при 3000 об/

мин в течение 15 минут. Полученный фаголизат вновь исследовали методом агаровых слоев. Таким образом проводили ряд последовательных пассажей до получения бактериофага с однородными негативными колониями.

Определение литической активности (максимальное разведение, в котором испытуемый фаг оказывает свое литическое действие) проводили по методам Аппельмана и Грация [1].

Для изучения спектра литической активности выделенных бактериофагов мы использовали 5 штаммов *Bordetella bronchiseptica* методом нанесения капель бактериофага на газон изучаемой бактериальной культуры. Для этого на поверхность МПА в чашках Петри наносили 0,3 мл 18-ти часовой культуры. Бактериальную культуру растирали равномерно шпателем по поверхности среды для получения газона. Для подсушивания чашки ставили в термостат на 20 минут. На дне чашек карандашом отмечали одинаковые секторы (по 2 сектора на каждой чашке). На поверхность подсушенной среды наносили капли исследуемых бактериофагов и наклоняли чашки, чтобы капли стекли. Каждый сектор используется для одного фага. В качестве контроля наносили каплю стерильного МПБ.

В качестве гетерологичных культур при определении специфичности выделенных и селекционированных штаммов фагов использовали бактерии родов *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Escherichia*, *Proteus*, *Yersinia*, *Salmonella*, *Morganella*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*. Исследования проводили по методике изучения специфичности.

Оценку результатов проводили через 18 – 20 часов.

Для работы с бактериофагами при их получении, изучении биологических свойств и применении с диагностической целью важным моментом исследования является подбор метода инактивации оставшихся жизнеспособными культур бактерий в фаголизате. Применяемый для этих целей метод не должен понижать литическую активность фагов.

В качестве физического фактора мы изучали действие высокой температуры на бактериофаги, а в качестве химического –

действие хлороформа.

Определение температурной устойчивости бактериофагов проводили по следующей методике: 11 пробирок с фагом в разведении 1:10 в МПБ прогревали на водяной бане в течение 30 минут при температуре от 60 до 95°C с шаговым интервалом 5°C. Контрольные пробирки не прогревали.

После прогревания активность бактериофагов определяли по методу Грация на индикаторных культурах. Контролем служили штаммы непрогретого бактериофага.

Для определения чувствительности фагов к воздействию хлороформа фаголизат обрабатывали хлороформом в соотношении 1:10 при постоянном встряхивании в течение 40 минут, активность фагов проверяли методом агаровых слоев через каждые 10 минут.

Результаты и обсуждение

По разработанной нами методике нам удалось выделить два штамма фагов из 5 культур бактерий *Bordetella bronchiseptica*.

Результаты изучения морфологии негативных колоний бактериофагов после 24 часов культивирования показывают, что образовавшиеся колонии прозрачные, округлые, с четко выраженными краями, диаметром 2 – 3 мм.

Литическая активность фагов бактерий рода *Bordetella bronchiseptica* составила по Аппельману 10^{-8} , по Грация 1,2 – 2,5 x 10^{10} корпускул в 1 мл.

Исследования показали, что изучаемые фаги характеризуются различным спектром литической активности. Бактериофаги *Bordetella bronchiseptica* - 7 УГСХА, *Bordetella bronchiseptica* - 1 УГСХА являются поливалентными, диапазон лизиса изучаемых культур составляет 60%.

Нами установлено, что селекционированные бактериофаги не вызывали лизис ни одной из изучаемых культур гетерологичных родов, являясь специфичными по отношению к бактериям вида *Bordetella bronchiseptica*.

В результате исследований температурной устойчивости нами было установлено, что прогревание фагов в течение 30 минут при температуре 60°C не оказывает влияния на их активность (табл. 1). Дальнейшее повышение температуры до 65-75°C приводит к потере активности фагов, темпе-

Температурная устойчивость фагов бактерий *Bordetella bronchiseptica*

Температурный режим, °С	Активность фагов, подвергнутых температурной обработке, количество активных корпускул в 1 мл <i>Bordetella bronchiseptica</i> –	
	7 УГСХА	1 УГСХА
60	$1,9 \times 10^9$	$1,8 \times 10^9$
65	$5,1 \times 10^7$	$4,2 \times 10^7$
70	$2,2 \times 10^6$	$3,1 \times 10^6$
75	$6,2 \times 10^5$	$3,8 \times 10^5$
80	$5,8 \times 10^5$	$1,9 \times 10^5$
85	$5,3 \times 10^5$	$2,3 \times 10^5$
90	$2,1 \times 10^5$	$1,2 \times 10^5$
95	-	-
Контроль активности фага	$1,8 \times 10^9$	$2,3 \times 10^9$

ратура в пределах 95 °С вызывало полную инактивацию вирусов.

Результаты изучения устойчивости бактериофагов к воздействию хлороформа представлены в таблице 2.

Бактериофаги *Bordetella bronchiseptica* УГСХА проявили выраженную устойчивость к воздействию хлороформа в течение 30 минут. Наблюдалось снижение активности фага после 30 минут обработки хлороформом. Активность восстанавливалась до первоначального уровня после одного пассажа.

Выводы

В результате облучения ультрафиолетовыми лучами бактерий *Bordetella bronchiseptica* мы получили два вирулентных фага. Выделенные и селекционированные бактериофаги обладали следующими биологическими свойствами: штаммы фагов при исследовании методом агаровых слоев образовывали прозрачные округлые негативные колонии, прозрачные с ровными краями диаметром 2 – 3 мм; литическая активность фагов составила по Аппельману 10^{-8} , по Грациа 10^{10} активных корпускул в 1 мл; спектр литической активности был равен 60%; фаги проявили выраженную специфичность по отношению к бактериям вида *Bordetella bronchiseptica* и были не активны к бактериям других изученных родов; они теряли активность при нагревании выше 60°С и были устойчивы к воздействию хлороформа в течение 30 минут.

Библиографический список

1. Адамс М. Бактериофагия // - М.: Издательство иностранная литература – 1961. 521 с.
2. Гольдфарб Д.М. Бактериофаги// - М.: Медгиз – 1961.
3. Васильев Д.А., Коритняк Б.М., Золотухин С.Н. Выделение бактериофагов *Yersinia enterocolitica* из объектов внешней среды // Сб. тр. межрегион. научно-практ. конф. - Самара, 2005. - С. 192 – 194.
4. Золотухин С.Н. // Создание и разработка схем применения диагностических биопрепаратов на основе выделенных и изученных бактериофагов энтеробактерий. – Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук. – Ульяновск. – 2007.
5. Методические рекомендации по индикации и идентификации энтеробактерий рода *Enterobacter* в патологическом материале, кормах, пищевом сырье и объектах внешней среды с применением специфических бактериофагов. РАСХН, Москва, 2006, 16 с. (С.Н. Золотухин, Е.Н. Пожарникова, Д.А. Васильев, Л.С. Каврук.).
6. Goodnow, R.A. Biology of *Bordetella bronchiseptica* // *Microbiological Reviews*, Dec. – 1980, p.722-738.
7. Mattoo, S., A. K. Foreman-Wykert, P. A. Cotter, and J. F. Miller. Mechanisms of *Bordetella pathogenesis* // *Front. Biosci.* – 2001. 168-186.