

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ПОЛУЧЕНИЕ ФАГОРЕЗИСТЕНТНЫХ МУТАНТОВ НА ПРИМЕРЕ БАКТЕРИЙ РОДА *PSEUDOMONAS*

*Викторов Д.А., кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, Тел. 9084775573, viktorov\_da@mail.ru*  
*Гринева Т.А., соискатель, Тел. 9033201410, e-mail: tag78@mail.ru*  
*Васильев Д.А., доктор биологических наук, профессор Тел. 8(8422) 55-95-47, dav\_ul@mail.ru*  
*Артамонов А.М., соискатель кафедры МВЭиВСЭ*  
*Воротников А.П., студент факультета ветеринарной медицины Тел. 9279807993, vorot.ru@mail.ru*  
*Антошкин П.А., студент факультета ветеринарной медицины Тел. 9603604787, vita1468@mail.ru*  
*Золотухин С.Н., доктор биологических наук, профессор Тел. 9272703480, fvm.zol@yandex.ru*  
**ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А.Столыпина»**

**Ключевые слова:** бактериофаги, фагоустойчивость, фагорезистентность, *Pseudomonas*, лизогения.

Проведено экспериментальное получение фагорезистентных вариантов бактериальных штаммов. Механизм фагорезистентности в рассматриваемом случае заключается в лизогенном состоянии бактериальных клеток, обусловленном редуктивной инфекцией штаммами умеренных бактериофагов. Однако в ряде исследований признак фагоустойчивости не был обусловлен лизогенией. Эксперименты проведены на примере бактерий *Pseudomonas putida* и гомологичных умеренных бактериофагов серии Psp-УГСХА.

### Актуальность темы

На явление фагоустойчивости обращали внимание отечественные и зарубежные авторы. Вегуани G. (1953), изучая умеренные бактериофаги и явление лизогении бактерий, установил, что лизогенные штаммы бактерий всегда иммунны к литической инфекции, осуществляемой тем же умеренным или близкородственным фагом. Коибонг Ли с соавторами в 1961 году высказали предположение, что при лизисе инфицированные фагом бактерии освобождают фермент, который удаляет фаговые рецепторы из оболочек клеток, оставшихся неинфицированными, делая их устойчивыми к адсорбции фага. Деттори R. с соавторами (1961) и М. Монк (1962) обнаружили, что мужские штаммы *E.coli* K12 способны к приобретению фенотипической устойчивости к фаговой инфекции путём утраты антигена, к которому прикрепляется фаг. Ряд исследователей (Fraser, 1957; Zinder, 1958; Luria et al., 1958) установили, что бактерии могут являться носителями фага, при этом не подвергаясь лизису.

Однако данные, полученные различными авторами при изучении фагоустойчивости бактерий, не систематизированы, а механизмы таких явлений изучены недостаточно.

В связи с этим встает вопрос о детальном и всестороннем изучении явления устойчивости бактерий к фаговой инфекции, систематизации полученных результатов.

**Цель исследования:** экспериментальное получение фагорезистентных мутантов на примере бактерий рода *Pseudomonas*.

Объект, материалы и методы исследования.

В работе использовались ранее выделенные и изученные культуры бактериофагов



Psp101-УГСХА, Psp102-УГСХА, Psp1-УГСХА, Psp6-УГСХА, а так же референс-штамм бактерии *Pseudomonas putida* ATCC 12633, чувствительный к перечисленным бактериофагам.

Основываясь на утверждении W. Hayes (1964), согласно которому умеренные бактериофаги, в отличие от вирулентных, формируют «мутные» негативные колонии, в зоне лизиса которых размножаются лизогенные бактерии, нами была составлена схема получения фагоре-зистентных бактериальных штаммов.

Первоначально по стандартной методики готовили мясопептонный агар, разливали его в стерильные чашки Петри и тщательно подсушивали при 37 °С не менее 24 часов в целях избавления от капель конденсата и усиления гигроскопичных свойств поверхности агара. Для исследования был отобран бактериофаг Psp101-УГСХА, особенности формирования негативных колоний которого аналогичны умеренным фагам (Hayes, 1964). Суспензию бактериофага Psp101-УГСХА с титром  $4 \times 10^{10}$  вносили в количестве 0,7 мл на поверхность МПА в заранее подготовленных чашках и равномерно распределяли по поверхности агара покачивающими движениями, ставили в термостат крышкой вверх при 28 °С на 10-30 минут для подсушивания. После полного подсыхания остатков суспензии чашки переворачивали крышкой вниз и термостатировали при 28 °С в течение 24 часов для проверки отсутствия во внесённой суспензии бактериальных клеток. Чашки Петри с обнаруженными на поверхности агара бактериальными колониями должны были быть отбракованы, так как наличие нечувствительных к исследуемому фагу бактериальных клеток ввело бы в заблуждение при получении последующих результатов. В наших исследованиях использовалась суспензия фага, полностью очищенная от жизнеспособных бактериальных клеток надлежащими и тщательно подобранными способами обработки фаголизата: воздействие хлороформа в соотношении 1:10 в течение 15 минут при постоянном перемешивании суспензии. Вследствие этого на чашках Петри с внесённым бактериофагом Psp101-УГСХА роста бактериальных колоний не обнаруживалось.

Полученные таким образом чашки с питательной средой, содержащей избыточное количество бактериофага Psp101-УГСХА, засеивали газоном 24-х часовой культуры штамма *P. putida* ATCC 12633. Для этого 0,7 мл бактериальной взвеси в мясопептонном бульоне, содержащей  $10^8$  к.о.е./мл вносили на поверхность агара и равномерно распределяли покачивающими движениями, ставили в термостат при 28 °С крышкой вверх и после подсыхания остатков суспензии (через 10-30 минут) переворачивали крышкой вниз. Одновременно аналогичным образом засеивали суточную бактериальную культуру штамма *P. putida* ATCC 12633 на МПА без предварительного внесения бактериофага – для контроля роста бактериального газона; засеивали суточную культуру на МПА штрихом по методу Дригальского – для контроля однородности колоний и отсутствия посторонней микрофлоры; проводили контрольное определение к.о.е. в суточной культуре; 1-2 чашки с внесённым бактериофагом оставляли без засева бактериальной культурой – для дополнительного контроля на стерильность питательных сред и отсутствия жизнеспособных бактериальных клеток в суспензии бактериофага.

#### **Полученные результаты:**

После термостатирования перечисленных посевов при 28 °С в течение 24 часов были получены следующие результаты:

1. На чашках с бактериофагом без внесения бактериальной культуры рост бактерий не выявлялся (после 48 часов культивирования при 28 °С), что указывает на отсутствие посторонней микрофлоры в питательных средах и фаговой суспензии.

2. В 1 мл 24-часовой бульонной культуры штамма *P. putida* ATCC 12633 содержалось  $10^8$  колониобразующих единиц.

3. На чашках, засеянных суточной культурой штамма *P. putida* ATCC 12633 штрихом по методу Дригальского, наблюдался однородный рост бактериальных колоний, характерных

для данного штамма – мелкие (1-2 мм), правильной округлой формы, с ровным краем, рельеф куполообразный, поверхность гладкая, влажная, блестящая, цвет молочно-мутный, прозрачны в проходящем свете, структура однородная, консистенция пастообразная. Наличие посторонней микрофлоры в посевах не наблюдалось, что указывает на гомогенность суточной культуры штамма *P. putida* ATCC 12633.

4. Контрольный газон суточной культуры штамма *P. putida* ATCC 12633 на поверхности МПА без предварительного внесения бактериофага представлял собой сплошной, однородный, равномерный рост бактерий молочно-мутного цвета по всей поверхности агара в чашке Петри.

5. На чашках с МПА, содержащем избыточное количество бактериофага Psp101-УГСХА и внесённой суспензией суточной культуры штамма *P. putida* ATCC 12633, в отличие от контрольного газона, сплошного роста бактерий не наблюдалось. Вместо этого рост бактериальной культуры был представлен отдельными бактериальными колониями, равномерно распределёнными по поверхности агара. Данные колонии имели аналогичные характеристики с колониями, полученными на контрольном посеве штамма *P. putida* ATCC 12633 штрихом по методу Дригальского – мелкие (1-2 мм), правильной округлой формы, с ровным краем, рельеф куполообразный, поверхность гладкая, влажная, блестящая, цвет молочно-мутный, прозрачны в проходящем свете, структура однородная, консистенция пастообразная (рис. 1).

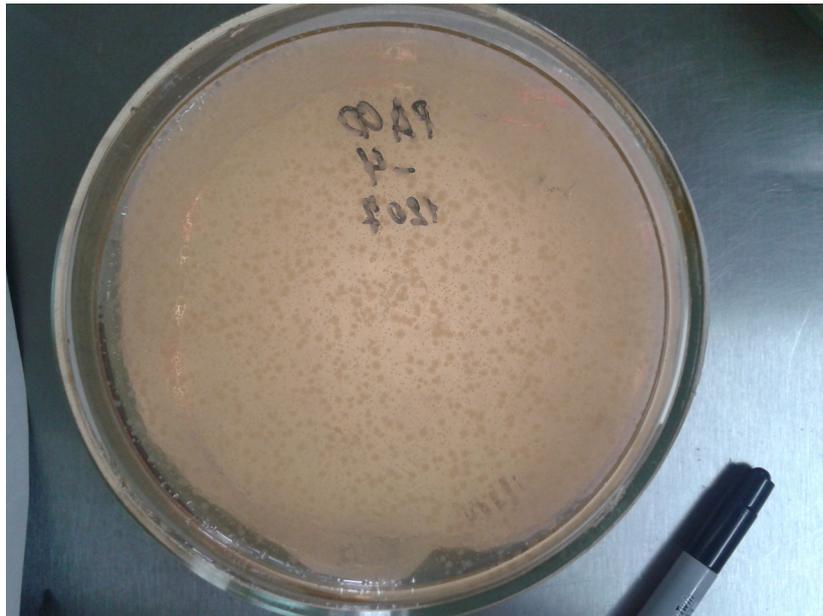
6. Количество бактериальных колоний, образовавшихся на МПА, содержащем бактериофаг Psp101-УГСХА, после внесения 0,7 мл суспензии суточной культуры, содержащей  $10^8$  клеток штамма *P. putida* ATCC 12633 в 1 мл, составило  $10^4$  колоний, что соответствует примерно 1:7000 части от изначального количества клеток в суспензии суточной культуры бактерий. Однако данный показатель определён приблизительно, для получения более точных данных требуется проведение серии дополнительных исследований.

Колония штамма *P. putida* ATCC 12633, образованная на мясопептонном агаре, содержащем избыточное количество бактериофага Psp101-УГСХА, была отлита на полужидкий агар для дальнейших исследований. Полученному таким образом фагорезистентному штамму *P. putida* присвоен номер Pp02phr1.

Общая схема исследования представлена на рисунке 2.

#### **Вывод:**

Принимая во внимание отсутствие роста бактерий на контрольных чашках, что говорит о стерильности питательных сред и об отсутствии посторонней микрофлоры в фаголизате Psp101-УГСХА, особенности роста колоний штамма *P. putida* Pp02phr1 на мясопептонном агаре, содержащем избыточное количество бактериофага Psp101-УГСХА в сравнении с ростом бактериального газона, полученного при аналогичном посеве на мясопептонный агар, не содержащий бактериофага, а так же однородность колоний штамма *P. putida* ATCC 12633, полученного на чашках, засеянных штрихом по методу Дригальского и их морфологическая однотипность с колониями *P. putida* Pp02phr1 на опытных чашках с бактериофагом, правомерно сделать вывод о том, что последние колонии образованы бактериальными клетками штамма *P. putida* Pp02phr1, резистентными к бактериофагу Psp101-УГСХА.



**Рис. 1 - Образование колоний фагорезистентного штамма *P. putida* Pp02phr1 на агаре, содержащем избыточное количество бактериофага Psp101-УГСХА.**

#### **Библиографический список**

1. Азизбекян Р.Р. Изменение наследственности бактерий путем фаговой конверсии / Р.Р. Азизбекян // В кн. Микробиология. Генетика микроорганизмов. Итоги науки и техники ВИНТИ АН СССР. – М., 1974. – Т.3. – С. 191-233.
2. Викторов, Д.А. Система тестов для диагностики псевдомоноза рыб, вызываемого бактерией *Pseudomonas putida* / Д.А. Викторов, И.И. Богданов, А.Г. Шестаков // Актуальные проблемы инфекционной патологии ветеринарной медицины: Материалы конференции молодых учёных, ГНУ ВНИИВВиМ РОССЕЛЬХОЗАКАДЕМИИ - Покров, 2009. – С. 136-140.
3. Висконти Р. Генетика бактериофага / Р. Висконти // В кн.: Онтогенез вирусов. – М., 1956. – 141 с.
4. Выделение и анализ фагоустойчивых мутантов *Pseudomonas putida* с помощью новых бактериофагов / В.Н. Крылов [и др.] // Генетика. – 1981. – Т.17, №2. – С.239-245.
5. Выделение и общая характеристика группы умеренных фагов *Pseudomonas aeruginosa* / А.С. Яненко [и др.] // Микробиология. – 1979. – Т.48, №1. – С.109-113.
6. Габрилович И.М. Общая характеристика бактериофагов / И.М. Габрилович // Основы бактериофагии. – Минск. – 1973. – С. 5-24.
7. Гольдфарб Д.М. Бактериофагия / Д.М. Гольдфарб // М.: Медгиз. – 1961. – 225 с.
8. Жиленков Е.Л. Изучение начальных стадий взаимодействия умеренного фага phi04 с клеткой *Pseudomonas aeruginosa* / Е.Л. Жиленков // Микробиология. – 1997. – Т.66, №4. – С. 532-538.
9. Золотухин С.Н. Создание и разработка схем применения диагностических биопрепаратов на основе выделенных и изученных бактериофагов энтеробактерий / С.Н. Золотухин // Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. - Ульяновск, 2007. – 39 с.
10. Зуева, Л.П. Бактериофаги – факторы эволюции госпитальных штаммов и средства борьбы с инфекциями / Л.П. Зуева, Б.И. Асланов, А.А. Долгий, А.Е. Гончаров, А.И. Архангельский // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. – 2012. - №1. – С. 9-13.
11. Каттер Э. Бактериофаги : биология и практическое применение / Э. Каттер, А. Сулак-

велидце; пер. с англ.: коллектив пер.; науч. ред. рус. изд. А.В. Летаров. – Москва: Научный мир, 2012. – 636 с.

12. Крылов, В.Н. Роль горизонтального переноса генов бактериофагами в возникновении патогенных бактерий / В.Н. Крылов // Генетика. – 2003. – Т.39. - №5. – С. 595-619.

13. Кульба А.М. Биологические свойства и нуклеотидный состав ДНК бактериофагов *Pseudomonas* / А.М. Кульба, А.С. Горельшев // Микробиология. – 1981. – Т.50. – С. 536-542

14. Методы получения, концентрации и очистки бактериофагов, поражающих фитопатогенные бактерии рода *Pseudomonas* / Ж.И. Оемчук [и др.] // Пробл.общ.и молекул. биол. – Киев, 1988. – №7. – С. 97-100.

15. Ревенко И.П. Бактериофаги и их использование в ветеринарной практике. – Киев: Урожай. – 1978. – С. 41-88.

16. Стент Г. Молекулярная биология вирусов бактерий / Г. Стент – М.: Мир, 1965. – 452 с.

17. Тимаков В.Д. Об условиях взаимодействия фага и бактериальной клетки / В.Д. Тимаков, Д.М. Гольдфарб // Вестник АМН СССР. – 1958. – №2. – С. 37.

18. Тихоненко А.С. Ультраструктура вирусов бактерий / А.С. Тихоненко – М.: Наука, 1968. – С. 89-168.

19. Хейс У. Генетика бактерий и бактериофагов / У. Хейс – М.: «Мир», 1965. – С. 288-294.

20. Adams M. H. Bacteriophages / M.H. Adams – Interscience Publishers, Inc., New York, 1959. – 473 p.

21. Berdygulova Z. Temporal regulation of gene expression of the *Thermus thermophilus* bacteriophage p23-45 / Berdygulova Z. [et al.] // Journal of Molecular Biology. – Academic Press. – 2011. – Т. 405. – N 1. – P. 125-142.

22. Bradley D.E. The structure and infective process of a *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophage containing ribonucleic acid / D.E. Bradley // J. Gen. microbiol. – 1966. – V.45. – P. 83-96.

23. Burnet F.M. Induced lysogenicity and mutation of bacteriophage within lysogenic bacteria / F.M. Burnet, D. Lush. // Australian J. Exptl. Biol. Med. Sci. – 1936. – V.14. – P. 27-38.

24. Djordjevic M. Quantitative analysis of a virulent bacteriophage transcription strategy / Djordjevic M. [et al.] // Virology. – 2006. – Т. 354. – С. 240.

25. Enikeeva F.N. Restriction-modification systems and bacteriophage invasion: who wins? / Enikeeva F.N., Gelfand M.S., Severinov K.V. // Journal of Theoretical Biology. – Academic Press. – 2010. – Т. 266. – N 4. – P. 550-559.

26. Holloway B. W. Lysogenic conversion in *Pseudomonas aeruginosa* / B.W. Holloway, G.N Cooper. // J. Bacteriol. – 1962. – V.84. – P. 321-324.

27. Minakhin L. Transcription regulation by bacteriophage t4 asia / Minakhin L., Severinov K. // Protein Expression and Purification. – Academic Press. – 2005. – Т. 41. – N 1. - 1-8.

28. Minakhin L. Genome comparison and proteomic characterization of *Thermus thermophilus* bacteriophages p23-45 and p74-26: siphoviruses with triplex-forming sequences and the longest known tails / Minakhin L. [et al.] // Journal of Molecular Biology. – 2008. – Т. 378. – N 2. – P. 468-480.

29. Nechaev S. Bacteriophage-induced modifications of host RNA polymerase / Nechaev S., Severinov K. // Annual Review of Microbiology. – 2003. – Т. 57. – P. 301-322.

30. Savalia D. The role of the t7 gp2 inhibitor of host RNA polymerase in phage development / Savalia D. [et al.] // Journal of Molecular Biology. – Academic Press. – 2010. – Т. 402. – N 1. – P. 118-126.

31. Severinova E. Localization of the *Escherichia coli* RNA polymerase  $\beta'$  subunit residue phosphorylated by bacteriophage t7 kinase gp0.7 / Severinova E., Severinov K. // Journal of Bacteriology. – 2006. – Т. 188. – N 10. – P. 3470-3476.

## EXPERIMENTAL DETERMINATION OF PHAGORESISTANT MUTANTS BY THE EXAMPLE OF BACTERIA OF THE GENUS PSEUDOMONAS

*Viktorov D.A., Grineva T.A., Vasilev D.A., Artamonov A.M., Vorotnikov A.P.,  
Antoshkin P.A., Zolotukhin S.N.*

**Key words:** bacteriophage, phage resistance, fagorezistentnost, Pseudomonas, lysogens.

*Experimental getting of phagoresistant variants of the bacterial strains was conducted. The mechanism of phagoresistance in the case under consideration is in lysogenic state of bacterial cells, caused by the reductive infection by strains of temperate phages. However, in a number of researches the sign of phagoresistance was not motivated by lysogenic. Experiments were carried out by the example of bacteria of Pseudomonas putida and homologous temperate phages of series Psp-USAA.*

УДК 578.81

## БАКТЕРИОФАГИ *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS*: ВЫДЕЛЕНИЕ, БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА, ГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ И ПЕРСПЕКТИВЫ ПРАКТИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

*Воложанцев Н.В., кандидат биологических наук,  
тел. 7-4967-36-01-47; [nikvol@obolensk.org](mailto:nikvol@obolensk.org)*

*Баннов В.А.,*

*Веревкин В.В., кандидат биологических наук*

*Красильникова В.М., кандидат биологических наук,*

*Мякина В.П., Левчук В.П.,*

*Светоч Э.А., доктор ветеринарных наук, профессор,*

*тел. 7-4967-36-00-79; [svetoch@obolensk.org](mailto:svetoch@obolensk.org)*

*Дятлов И.А., чл. корр. РАМН, доктор медицинских наук, профессор;*

*тел. 7-4967-36-00-03; [dyatlov@obolensk.org](mailto:dyatlov@obolensk.org)*

*ФБУН ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора*

*B.S. Seal, PhD, Poultry Microbiological Safety Research Unit, R.B. Russell Agricultural  
Research Center, Agricultural Research Service, USDA*

*Phone: 1-706-546-3549; [bruce.seal@ars.usda.gov](mailto:bruce.seal@ars.usda.gov)*

**Ключевые слова:** бактериофаги, *Clostridium perfringens*, геномный анализ, амидаза

*Представлены результаты изучения биологических и молекулярно-генетических свойств бактериофагов, лизирующих бактериальные клетки *Clostridium perfringens*. Обсуждаются перспективы использования бактериофагов и их литических ферментов для контроля *C. perfringens* - инфекций*

### **Введение.**

**Clostridium perfringens* - одна из основных причин заболеваний людей, передающихся с продуктами питания [1, 2]. Кроме того, эти грамположительные анаэробные бактерии вы-*