

УДК 619:579

ВЫДЕЛЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БАКТЕРИОФАГОВ *PSEUDOMONAS CHLORORAPHIS*

Викторов Денис Александрович, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Научно-исследовательского инновационного центра микробиологии и биотехнологии при ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина»

Гринева Татьяна Алексеевна, соискатель кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ВСЭ»

Васильев Дмитрий Аркадьевич, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ВСЭ»
ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина»
432017, г. Ульяновск, бульвар Новый Венец, 1; тел.: 89084775573,
e-mail: viktorov_da@mail.ru

Ключевые слова: псевдомонады, *Pseudomonas chlororaphis*, псевдомонозы рыб, бактериофаги, биологические свойства.

В результате комплекса проведённых исследований были выделены 6 изолятов бактериофагов *Pseudomonas chlororaphis*, изучены основные биологические свойства и рассмотрены перспективы их применения в целях индикации и идентификации бактерий *Pseudomonas chlororaphis* методом реакции нарастания титра фага, а также фагоиндикации названного вида бактерий в различных объектах санитарного надзора. Полученные результаты направлены на сокращение сроков выявления возбудителя до 18-24 часов.

Введение

Pseudomonas chlororaphis способна вызывать псевдомоноз рыб [1,2,3]. Гибель и уменьшение темпов роста рыбы наносят значительный экономический ущерб рыбноводческим хозяйствам. Бактериологические методы диагностики псевдомонозов, используемые в настоящее время, являются трудоемкими и продолжительным. Видовое типирование требует выделения чистой культуры возбудителя с дальнейшей поста-

новой ряда биохимических тестов. Затраты времени могут составлять от 3,5 до 5 суток [3,4].

На основании выше изложенного актуальным является поиск перспективных бактериофагов, специфически инфицирующих *P. chlororaphis*, для индикации бактерий в объектах санитарного надзора методом реакции нарастания титра фага (РНФ) [4,5].

Методы фагоиндикации и фагоидентификации имеют следующие преимуще-

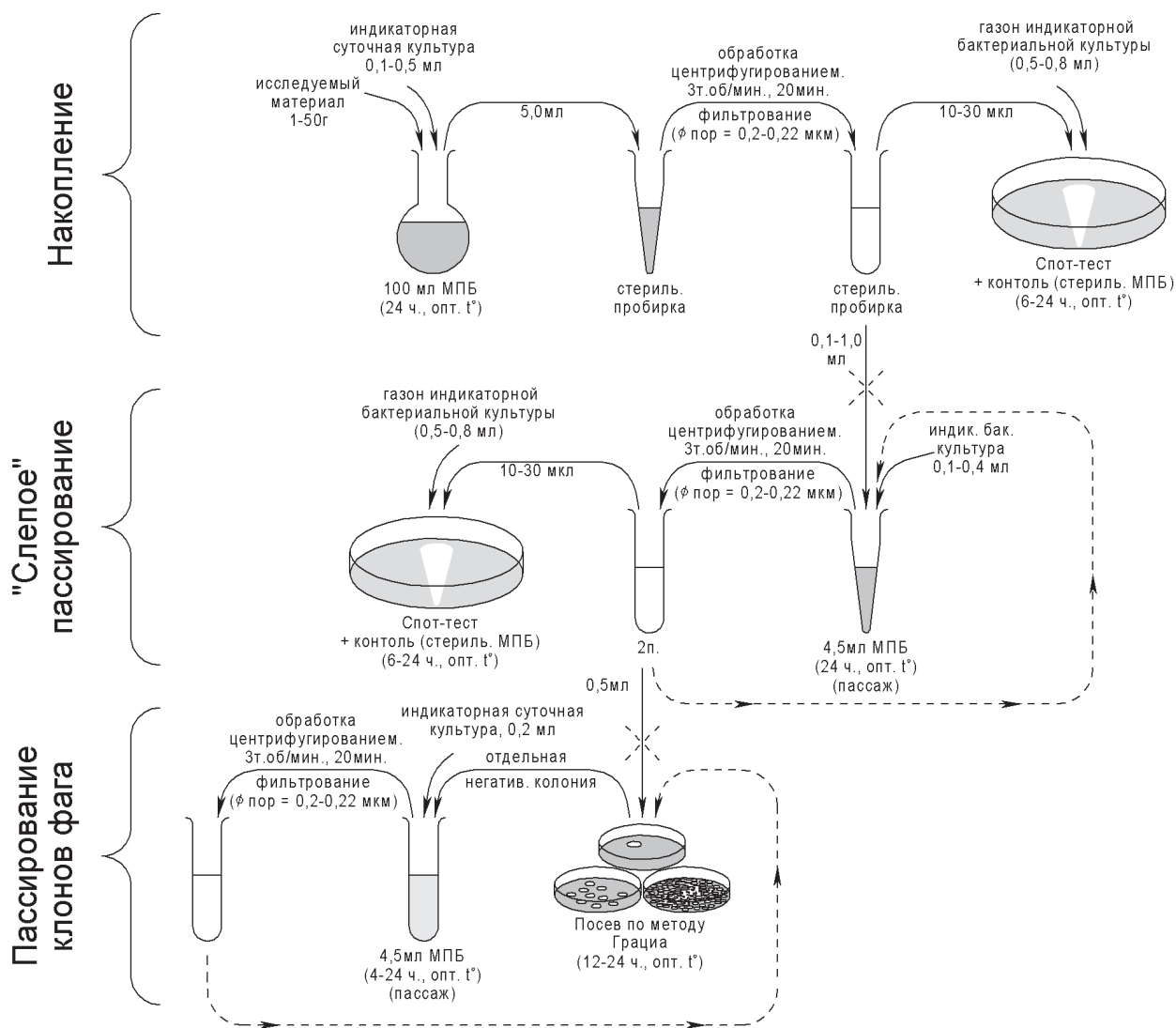


Рис. 1 – Схема выделения и пассирования бактериофагов *P. chlororaphis* (пояснения в тексте)

ства: не требуют наличия дорогостоящего оборудования и материалов, высококвалифицированных специалистов, реакция нарастания титра фага не требует выделения чистой культуры, позволяет сократить продолжительность исследования до 24 часов, обладает высокой специфичностью и чувствительностью (при применении надлежащих штаммов фагов); с помощью фагов можно осуществлять фаготипирование бактериальных штаммов [5].

Цели исследования: выделение бактериофагов *P. chlororaphis* из водных источников, изучение их биологических свойств, селекция и отбор наиболее перспективных по критериям спектра литической активности и специфичности в целях конструирования

биопрепарата для индикации и идентификации *P. chlororaphis*.

Объекты и методы исследований

Для выделения бактериофагов *P. chlororaphis* исследовано 30 проб из водных источников Ульяновской области. В качестве индикаторной культуры использовали референс-штамм *P. chlororaphis* В-1246, полученный во Всероссийской коллекции микроорганизмов (г. Пущино).

Первичное выделение бактериофагов проводили методом накопления [5] по усовершенствованной нами схеме, представленной на рисунке 1.

В колбы с 50 мл концентрированного мясопептонного бульона добавляли исследуемую воду в количестве 50 мл, доводя

концентрацию среды до обычной, и 1 мл 18-часовой бульонной культуры индикаторного штамма *P. chlororaphis* B-1246. После 24 часов культивирования при 28°C (оптимум роста *P. chlororaphis*) полученную суспензию в количестве 5 мл переносили в стерильные пробирки и центрифугировали 20 минут при 3000 об/мин. Супернатант фильтровали через бактериальные фильтры с диаметром пор 0,2 мкм (Millipore - Millivac). Наличие бактериофагов в фильтрате определяли методом спот-теста. На чашки Петри с мясопептонным агаром проводили посев 18-часовой бульонной культуры индикаторного штамма *P. chlororaphis* B-1246 сплошным газоном. После подсыхания газона на поверхность агара наносили 20 мкл исследуемого фильтрата. Контроль бактериального загрязнения фильтрата проводили на чашках Петри со стерильным мясопептонным агаром. Посевы просматривали через 24, 36, 48 часов. Присутствие в исследуемом материале бактериофагов определяли по наличию зон лизиса бактериального газона или отдельных негативных колоний в области нанесения капли фаголизата.

Для усиления активности выделенных бактериофагов и для получения чистых линий проводили пассирование с последующим пересевом типичных колоний методом агаровых слоев по Грациа до получения чистых линий бактериофага [5]. Всего для каждого из выделенных бактериофагов проводилось от 5 до 9 последовательных пассажей.

На втором этапе исследований были изучены следующие основные биологические свойства выделенных бактериофагов [7,8]:

- морфология негативных колоний,
- литическая активность,
- спектр литической активности,
- специфичность действия,
- температурная устойчивость.

Литическую активность определяли по методам Аппельмана и Грациа [6]. Для определения спектра литической активности использовали референс-штамм *P. chlororaphis* B-1246 и выделенные нами ранее 16 поле-

вых штаммов [9,11]. При определении специфичности использовали следующие штаммы: *Pseudomonas putida* №901 IV-89; ATCC 12633 IV-87, B-1292, B-899, *Pseudomonas fluorescens* 13525 IV-96, B-896, B-970, B-1470, полученные во Всероссийской коллекции микроорганизмов (г. Пущино), *P. aeruginosa* №128, №381, №1677 и 14 штаммов бактерий других родов: *Aeromonas hydrophila*, *Proteus mirabilis*, *Morganella morganii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp., *Bacillus cereus*, *E. coli*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Yersinia enterocolitica*, *Stenotrophomonas maltophilia*, полученные из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина».

Результаты исследований

С использованием разработанной схемы было выделено 6 культур бактериофагов *P. chlororaphis* и изучены их основные биологические свойства [5,7,10]. Полученные бактериофаги на газоне индикаторной культуры образовывали негативные колонии округлой формы диаметром до 1 мм, с прозрачным центром, без зоны вторичного лизиса. Все изучаемые бактериофаги являлись термолабильными, полностью инактивировались после воздействия температуры от 47 до 51°C в течение 20 минут (таблица 1). Литическая активность фагов по методу Грациа составила от $0,8(\pm 0,2) \times 10^3$ до $4,0(\pm 0,1) \times 10^7$ БОЕ/мл. Спектр литической активности выделенных нами бактериофагов составил от 47,0 до 82,3 % из 17 имеющихся у нас штаммов бактерий вида *P. chlororaphis* (таблица 2).

Отсутствие лизиса на газоне бактерий гетерологичных родов и видов свидетельствовало о строгой специфичности выделенных бактериофагов по отношению к бактериям *P. chlororaphis* (таблица 3).

Негативные колонии выделенных бактериофагов имели диаметр от 0,5 мм (Pc1F-УГСХА, Pc14F-УГСХА) до 1,0 мм (Pc6F-УГСХА, Pc11F-УГСХА, Pc12F-УГСХА, Pc25F-УГСХА), полностью прозрачные, без зоны вторичного лизиса.

Таблица 1

Чувствительность выделенных бактериофагов к температурному воздействию

Штамм бактериофага	Температура воздействия, °C					
	42	44	45	47	49	51
	Титр бактериофагов по Грациа, БОЕ/мл					
Pc1F-УГСХА	$1,0(\pm 0,3) \times 10^4$	$4,9(\pm 0,2) \times 10^3$	$0,9(\pm 0,3) \times 10^2$	0	0	0
Pc6F-УГСХА	$1,2(\pm 0,3) \times 10^4$	$1,0(\pm 0,3) \times 10^4$	$0,7(\pm 0,3) \times 10^4$	$4,9(\pm 0,4) \times 10^3$	$0,6(\pm 0,4) \times 10^2$	0
Pc11F-УГСХА	$0,7(\pm 0,1) \times 10^7$	$3,8(\pm 0,2) \times 10^6$	$0,7(\pm 0,2) \times 10^4$	0	0	0
Pc12F-УГСХА	$1,0(\pm 0,2) \times 10^6$	$2,9(\pm 0,2) \times 10^5$	$1,0(\pm 0,3) \times 10^5$	$0,6(\pm 0,3) \times 10^3$	0	0
Pc14F-УГСХА	$0,8(\pm 0,2) \times 10^3$	$3,4(\pm 0,2) \times 10^2$	$0,6(\pm 0,2) \times 10^2$	$2,8(\pm 0,2) \times 10^1$	0	0
Pc25F-УГСХА	$4,0(\pm 0,1) \times 10^7$	$1,2(\pm 0,3) \times 10^7$	$1,8(\pm 0,3) \times 10^6$	$1,0(\pm 0,7) \times 10^4$	$3,1(\pm 0,5) \times 10^2$	0

Таблица 2

Различия в свойствах выделенных бактериофагов *P. chlororaphis*

Свойства	Штаммы бактериофагов					
	Pc1F-УГСХА	Pc6F-УГСХА	Pc11F-УГСХА	Pc12F-УГСХА	Pc14F-УГСХА	Pc25F-УГСХА
Литическая активность по Грациа	$1,0(\pm 0,3) \times 10^4$	$1,2(\pm 0,3) \times 10^4$	$0,7(\pm 0,1) \times 10^7$	$1,0(\pm 0,2) \times 10^6$	$0,8(\pm 0,2) \times 10^3$	$4,0(\pm 0,1) \times 10^7$
Спектр литической активности	52,9 %	76,4 %	82,3%	47,0%	58,8 %	76,4%

Таблица 3

Специфичность выделенных бактериофагов

Вид бактерий (колич. штаммов)	Штаммы бактериофагов					
	Pc1F-УГСХА	Pc6F-УГСХА	Pc11F-УГСХА	Pc12F-УГСХА	Pc14F-УГСХА	Pc25F-УГСХА
<i>P. putida</i> (4)	-	-	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i> (3)	-	-	-	-	-	-
<i>P. fluorescens</i> (4)	-	-	-	-	-	-
<i>A. hydrophila</i>	-	-	-	-	-	-
<i>P. mirabilis</i>	-	-	-	-	-	-
<i>M. morganii</i>	-	-	-	-	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella spp.</i>	-	-	-	-	-	-
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Streptococcus</i>	-	-	-	-	-	-
<i>B. cereus</i>	-	-	-	-	-	-
<i>E.coli</i>	-	-	-	-	-	-
<i>E. cloacae</i>	-	-	-	-	-	-
<i>C. freundii</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Y. enterocolitica</i>	-	-	-	-	-	-
<i>S. maltophila</i>	-	-	-	-	-	-

Примечание: «-» - отсутствие лизиса.

Выводы

1. В результате проведённых исследований нами было выделено 6 культур бактериофагов *P. chlororaphis*, изучены их основные биологические свойства.

2. По результатам полученных данных, в целях конструирования биопрепарата для индикации и идентификации *P. chlororaphis*, наиболее перспективным является бактериофаг Pс11F-УГСХА с титром $0,7(\pm 0,1) \times 10^7$ БОЕ/мл, спектром литической активности 82,3% и выраженной специфичностью в отношении бактерий *P. chlororaphis*.

Библиографический список

1. Hatai, K. *Pseudomonas chlororaphis* as a Fish Pathogen. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries. 1975. Volume 41:11. P.1203
2. Anzai, et al.; Kim, H; Park, JY; Wakabayashi, H; Oyaizu, H (2000, Jul). Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. Int J Syst Evol Microbiol 50 (4): 1563–89.
3. Методические указания по лабораторной диагностике псевдомоноза рыб. Утверждены Департаментом ветеринарии Министерств сельского хозяйства и продовольствия Российской Федерации 22.09.1998. N 13-4-2/1403.
4. Palleroni N. Genus I. *Pseudomonas*. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd edition. 2005. Volume 2. p. 323-379.
5. Викторов, Д.А. Усовершенствование методов выделения, идентификации и индикации бактерий *Pseudomonas putida* : автореферат дис. ... канд. биологических наук / Д.А.Викторов. – Саратов, 2011. – 22 с.
6. Характеристика биологических свойств бактериофагов вида *Bacillus subtilis* / Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин, И.Н. Хайруллин, Н.А. Феоктистова, А.И. Калдыркаев, М.А. Юдина, А.Х. Мустафин // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2011. - № 1 (13). – С.79-83.
7. Инструкция о мероприятиях по профилактике и ликвидации псевдомоноза рыб. Утверждены Департаментом ветеринарии Министерств сельского хозяйства и продовольствия Российской Федерации 18.09.1998. N 13-4-2/1394.
8. Васильев, Д.А. Выделение бактериофагов бактерий *Pseudomonas putida* и их селекция в целях создания биопрепарата для диагностики псевдомоноза рыб / Д.А. Васильев, Д.А. Викторов, И.И. Богданов // Естественные и технические науки. – 2011. – №2(52). – С. 79-82.
9. Викторов, Д.А. Выделение и изучение биологических свойств бактериофагов *Pseudomonas fluorescens* / Д.А. Викторов, А.М. Артамонов, Д.А. Васильев // **Ветеринария и кормление.** «ВЕТКОРМ» .-2012. – №5. – С. 8-9.
10. Золотухин Сергей Николаевич. Создание и разработка схем применения диагностических биопрепаратов на основе выделенных и изученных бактериофагов энтеробактерий : автореферат дис. ... доктора биологических наук / С.Н. Золотухин. - Ульяновск, 2007. – 39 с.
11. Гринева, Т.А. Схема выделения *Pseudomonas chlororaphis* / Т.А. Гринева, Д.А. Викторов, Д.А. Васильев // Вестник ветеринарии. – Ставрополь: «Энтропос», 2013. – №64(1/2013). – С. 18-20.