

ВЫДЕЛЕНИЕ БАКТЕРИОФАГОВ *KLEBSIELLA OXYTOSA* ПОД ДЕЙСТВИЕМ РЕНТГЕНОВСКОГО ОБЛУЧЕНИЯ

Садрtdинова Гузелия Рафиковна, аспирант кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

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

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

ФГБОУ ВО Ульяновская ГСХА

432017, г. Ульяновск, бульвар Новый Венец, 1; тел.: 8(8422)55-95-47; e-mail:sadrtdinovaguzlik@yandex.ru

Ключевые слова: бактерии, бактериофаги, рентгеновские лучи, выделение, метод, морфология.

В статье представлены результаты выделения бактериофагов действием рентгеновского излучения на штаммы бактерий *Klebsiella oxytoca*. Дозы рентгеновского излучения подобраны экспериментально и составляют: первая серия опытов - 2,0 миллизиверта; вторая серия опытов - 4,0 миллизиверта; третья серия опытов - 6,0 миллизиверта. Наиболее благоприятным методом для получения фагов является режим, включающий воздействие по схеме II периода (1,6 сек.) с дозой облучения - 4,0 миллизиверта. Выделенные фаги имеют достаточно высокую активность в отношении изучаемых культур: бактериофаг Ф-1 - 10^{-5} и 1×10^8 , бактериофаг Ф-24 - $24 \cdot 10^{-6}$ и 4×10^9 по Аппельману и Грациа соответственно.

Введение

Klebsiella oxytoca представляют собой вид грамотрицательных факультативно-анаэробных бактерий. Ранее бактерии вида *K. oxytoca* были подвидом вида *K. pneumoniae*, однако позже все индолположительные штаммы были объединены в самостоятельный вид — *K. oxytoca*. Эти микроорганизмы можно обнаружить практически в любой среде: в почве, пресной и морской воде, горячих источниках, нефтяных и газовых скважинах, придонном иле и сточных водах [1].

По результатам ранее проведенных нами исследований среди бактерий *K. oxytoca* могут встречаться лизогенные штаммы. Частота перехода профага в инфекционное состояние (умеренный фаг) может быть увеличена рядом факторов [2]. Одним из таких факторов наряду с ультрафиолетовым облучением являются рентгеновские лучи.

Целью наших исследования было получение бактериофагов из культур *K. oxytoca* методом воздействия на них рентгеновски-

ми лучами с последующим изучением некоторых биологических свойств выделенных изолятов.

Объекты и методы исследований

В работе использовали три штамма клебсиелл, которые были выделены нами из объектов внешней среды с типичными для *K. oxytoca* свойствами, и один штамм, полученный из коллекции кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы Ульяновской ГСХА им. П.А. Столыпина (ATCC 8724). Для получения культур *K. oxytoca* делали пересевы в мясопептонный бульон (4,5 мл) 4-суточной культуры в количестве 1,0 мл. Культуры в пробирках подвергали рентгеновскому облучению при анодном напряжении (для всех исследований) - 63 киловольт, силе тока - 250 миллиампер.

Рентгеновское облучение является более мощным фактором по сравнению с ультрафиолетовыми лучами, и если для последнего необходим непосредственный

контакт с бактериями [2], то для индукции фага рентгеновскими лучами достаточно воздействовать ими на пробирку или чашку через стекло [4]. В наших исследованиях облучению подвергали культуры *K. oxytoca*, находящиеся в пробирках в среде с мясопептонным бульоном.

Результаты исследований

В работе использовалось три режима.

Первая серия опытов: I период облучения, длительность периода - 1,6 сек., доза облучения - 2,0 миллизиверта.

Вторая серия опытов: II периода, каждый период по 1,6 сек., общая доза облучения - 4,0 миллизиверта.

Третья серия опытов: III периода, период по 1,6 сек. с перерывом в 1 мин, общая доза облучения - 6,0 миллизиверта.

После облучения пробирки с культурами инкубировали при 37°C в течение 24-х часов. По истечении этого времени облученные культуры объемом 0,4 мл высевали на мясопептонный агар сплошным газоном при помощи шпателя. Для этого накануне опыта расплавленный 1,5%-ный мясопептонный агар разливали в чашки Петри по 25 мл и после застывания хорошо подсушили, чтобы капли конденсата не исказили результаты исследования. Засеянные таким образом чашки культивировали при 37°C. Результаты учитывали по истечении 4, 8, 12, 16 и 20 часов.

Схема индукции фага бактерий *K. oxytoca* рентгеновским облучением представлена на рисунке 1.

В качестве контроля проводили посевы на мясопептонный агар бактерий без облучения. Наличие фага выявляли визуально, наблюдая за образованием негативных колоний на газоне роста культур клебсиелл или появлением зон лизиса на поверхности питательной среды

Негативные колонии образовывались по истечении 20 часов инкубирования.

В результате проведенных исследований в первой серии опытов отмечается сплошной рост культуры по всей поверхности чашки.

Во второй серии опытов на некоторых чашках (*K. oxytoca* 1, *K. oxytoca* 24) отмечали

зоны образования негативных колоний.

В третьей серии опытов – большая часть посевов характеризовалась образованием сплошных зон лизиса культуры микроорганизмов.

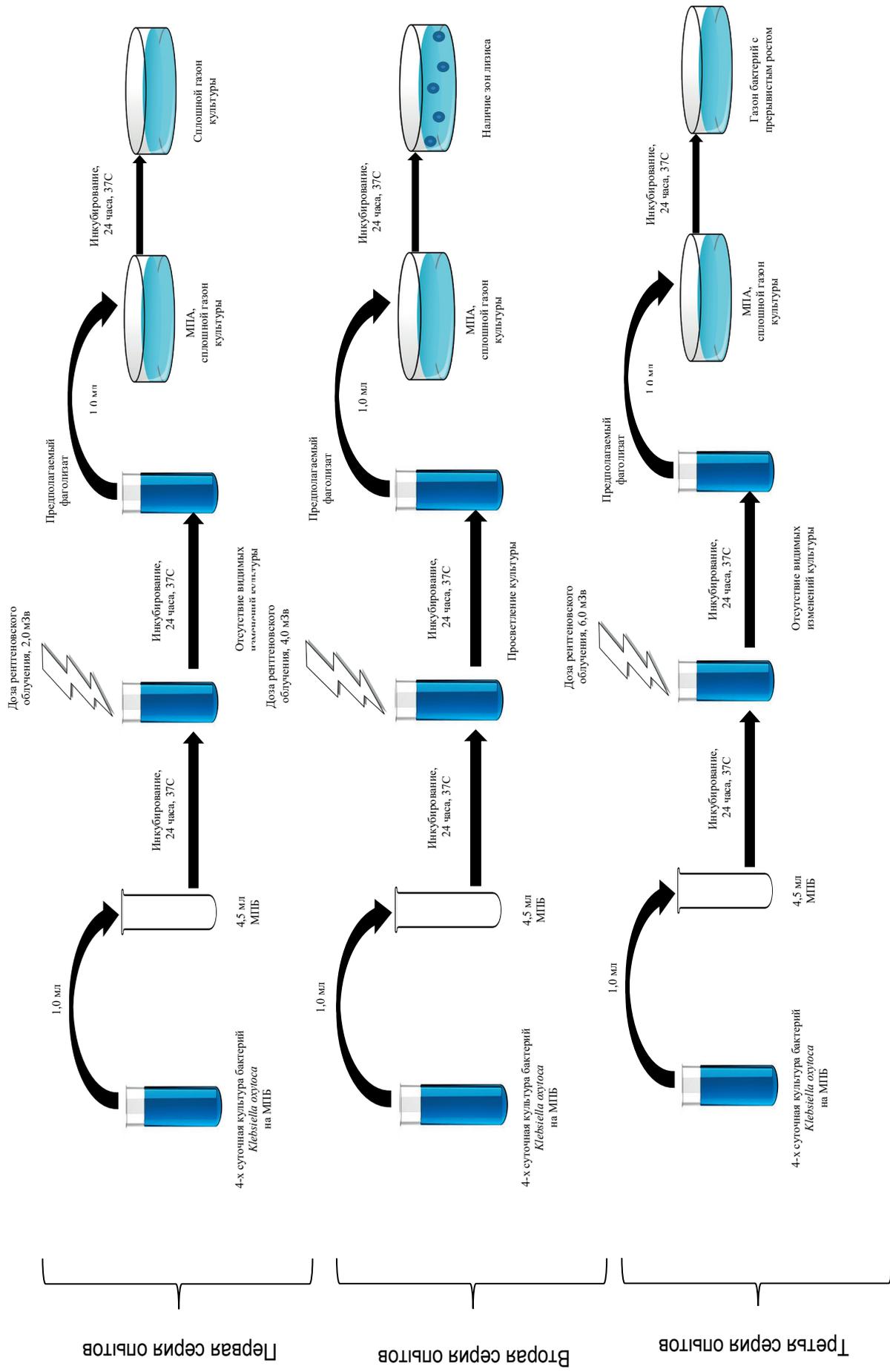
Для получения «чистых» линий бактериофагов участки лизиса отщипывали бактериологической петлей в пробирки с культурой гомологичных микроорганизмов. Посевы инкубировали в термостате при 37°C до полного лизиса бактериальной культуры [5].

С целью селекции клонов фагов проводили многократное пассирование выделенных изолятов. Для чего к 4,5 мл мясопептонного бульона добавляли 0,5 мл 20-часовой индикаторной культуры и 1 мл фаголизата. Полученную смесь инкубировали при 37°C в течение 4 часов. Контролем служили культуры клебсиелл, засеянные в мясопептонный бульон без фаголизата [6]. При просветлении питательной среды (лизис бактерий) содержимое пробирки делили на две части. Одну часть прогревали на водяной бане в течение 30 минут при 60°C, а другую пробирку обрабатывали хлороформом в соотношении 1:10. Таким образом проводили селекцию терморезистентных и хлороформоустойчивых линий бактериофагов (рис. 2). По данной методике было проведено 4 пассажа бактериофагов.

После проведенного пассирования была проверена способность лизиса бактерий под действием фагов, уже с учетом устойчивости к тому или другому фактору. Для этого изучаемые штаммы *K. oxytoca* сплошным газоном высевали на 1,5%-ный мясопептонный агар. Каждая из чашек была разделена на два сектора, на которых, соответственно, проверяли устойчивость профага к хлороформу или температуре. На каждый из секторов с края чашки наносили капли фагов и дали им стечь.

Чашки с посевами ставили в термостат и инкубировали в течение 18 часов. При положительном результате на месте стекания капли фагов обнаруживали прозрачную зону на газоне роста бактериальной культуры. Результаты исследования представлены в табл. 1.

Результаты проведенных исследова-


Рис. 1- Схема индукции профага бактерий *K. oxytoca* рентгеновским облучением

ний свидетельствуют о том, что оба индуцированных рентгеновским облучением фага были терморезистентными.

Исследование морфологии негативных колоний проводили при посеве фагов методом агаровых слоев [7,8]. Негативные колонии были округлые, прозрачные, диаметром $1,0 \pm 0,5$ мм.

Для изучения литической активности руководствовались методами Грациа и Аппельмана, апробированными во многих работах по выделению и изучению биологических свойств фагов [9, 10]. Результаты изучения литической активности представлены в табл. 2.

Таки образом, выделенные и селекционированные нами изоляты фагов имели достаточно высокую активность по отношению к изучаемым культурам: бактериофаг Ф-1 в отношении индикаторной культуры *K. oxytoca* 1 - 10^{-5} и 1×10^8 , бактериофаг Ф-24 в отношении индикаторной культуры *K. oxytoca* 24 - 10^{-6} и 4×10^9 по Аппельману и Грациа соответственно.

Выводы

Для получения фагов *K. oxytoca* методом рентгеновского облучения бактериальных культур оптимальным был режим, включающий воздействие на них дозы облучения 4,0 миллизиверта в течение 1,6 сек.

Полученные и селекционированные по указанной методике бактериофаги были терморезистентными, имели прозрачные негативные колонии округлой формы диаметром около 1 мм, литическая активность составила в пределах 10^{-5} - 10^{-6} (по Аппельману) и 10^8 - 10^9 корпускул фага в одном миллилитре среды (по Грациа).

Библиографический список

1. Садртдинова, Г.Р. Бактериофаги клебсиелл: их роль и значение / Г.Р. Сад-

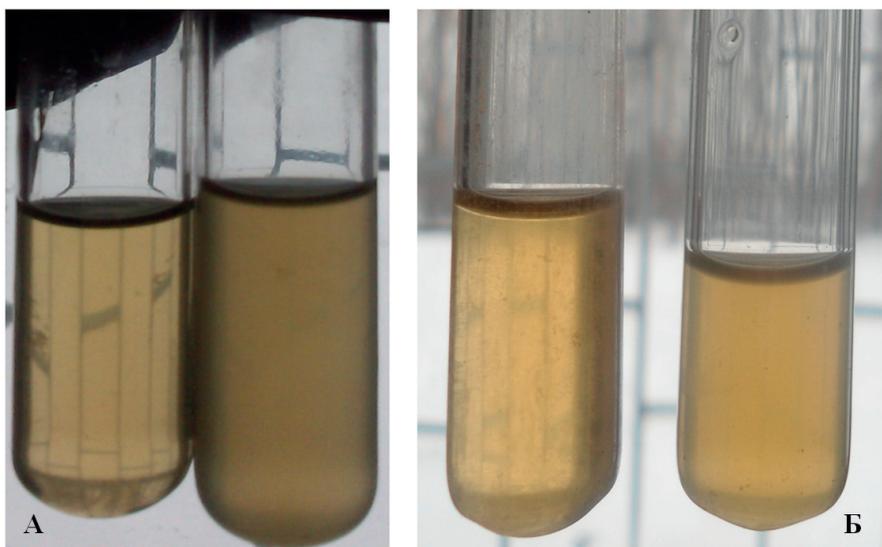


Рис.2. Пассирование бактериофагов *K. oxytoca*

А) Бактериофаг Ф-1, индикаторная культура *K. oxytoca* 1 (слева направо: пассаж фага и контроль); Б) Бактериофаг Ф-24, индикаторная культура *K. oxytoca* 24 (слева направо: пассаж фага и контроль)

Таблица 1

Результаты определения лизиса у штаммов *K. oxytoca* под действием хлороформа и температуры

Исследуемый штамм	Фактор воздействия	
	t (60°C)	хл (10%)
<i>K. oxytoca</i> 1	+	-
<i>K. oxytoca</i> 24	+	-

Примечание:

«+» - наличие зон лизиса

«-» - отсутствие зон лизиса

Таблица 2

Литическая активность полученных бактериофагов бактерий вида *K. oxytoca*

Индикаторная культура	Исследуемый фаг	Активность фага	
		по Аппельману	по Грациа
<i>K. oxytoca</i> 1	Ф-1	10^{-5}	1×10^8
<i>K. oxytoca</i> 24	Ф-24	10^{-6}	4×10^9

рtdинова // Молодежь и наука XXI века. Материалы IV Международной научно-практической конференции молодых ученых. 16-20 сентября 2014 года.- Ульяновск: УГСХА им. П.А. Столыпина, 2014.-Том 1. - С.115-121.

2. Васильев, Д.А. Выделение бактериофага *Klebsiella oxytoca* методом индукции / Г.Р. Садртдинова, Д.А. Васильев // Актуаль-

ные проблемы биологии, биотехнологии, экологии и биобезопасности. Материалы Международной научно-практической конференции посвященной 80-летию заслуженного ученого, профессора В.Л. Зайцева. 13 июля 2015 года.- Kiiik-LTD, 2015.-С.258-260.

3. Карамышева, Наталья Николаевна. Выделение бактериофага *Desulfovibrio desulfuricans* и создание на его основе био-препарата по профилактике коррозии металлов в нефтяной промышленности: автореф. дис. ... канд.биологических наук: 17.01.2013 / Н.Н. Карамышева.- Саратов, 2013.- 18 с.

4. Выделение профага бактерий *Desulfovibrio desulfuricans* / Н.Н. Карамышева, Д.А. Васильев, Ю.В. Пичугин, С.Н. Золотухин // Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения. Материалы Международной научно-практической конференции. -Ульяновск: УГСХА им. П.А. Столыпина, 2012.-Том 1.- С.267-271.

5. Ляшенко, Е.А. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов бактерии рода *Klebsiella* / Е.А.Ляшенко // Бактериофаги микроорганизмов значимых для животных, растений и человека. - Ульяновск, 2013.- С. 61-74.

6. Ляшенко, Е.А. Селекция выделенных клонов бактериофагов, активных к *Klebsiella pneumoniae* / Е.А. Ляшенко, С.Г. Садртдинова, Д.А. Васильев // Инфекция и иммунитет.- 2014.-№5.-С.95.

7. 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. - С. 79-83.

8. Журавская, Н.П. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов бактерий вида *Yersinia pseudotuberculosis* / Н.П. Журавская //Бактериофаги микроорганизмов значимых для животных, растений и человека.- Ульяновск, 2013. -С. 89-100.

9. Пульчеровская, Лидия Петровна. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов *Citrobacter* и их применение в диагностике дис. ... канд. биологических наук / Л.П. Пульчеровская.- Саратов, 2004. - 186 с.

10. Барт, Н.Г. Выделение бактериофагов рода *Providencia* / Н.Г. Барт, С.Н. Золотухин, Д.А. Васильев // Аграрная наука: и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения. Материалы Международной научно-практической конференции. – Ульяновск, 2012. -Том 1.– С. 236 – 238.

11. Садртдинова, Г.Р. Сравнительная эффективность методов выделения бактериофагов *Klebsiella oxytoca*/ С.Н. Золотухин, Д.А. Васильев, Г.Р.Садртдинова//Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2015. - № 4 (32).-С.68-72.