

БАКТЕРИОФАГИ БАКТЕРИЙ *ENTEROBACTER* И ИХ ОСНОВНЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Сулдына Екатерина Владимировна, ассистент 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»

Богданов Ильгизар Исмаилович, кандидат ветеринарных наук, доцент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ

432017. г. Ульяновск, бульвар Новый Венец, 1; 89374545651; e-mail: e.suldina2006@yandex.ru

Ключевые слова: *Enterobacter*, бактериофаги, объекты окружающей среды, бактерии, энтеробактер, биологические свойства.

В статье представлены результаты исследований по изучению биологических свойств 7 новых изолятов бактериофагов бактерий рода *Enterobacter* и отбору наиболее перспективных штаммов фагов для конструирования на их основе биопрепарата для деконтаминации пищевого сырья и продуктов питания. Установлено, что морфология негативных колоний энтеробактерных фагов представлена двумя типами: округлые, прозрачные, без зоны неполного лизиса, диаметром до 1 мм, формируемые фагами E1, E3, E6. И круглые, прозрачные, без зоны неполного лизиса, до 3-4 мм в диаметре, образуемые фагами E2, E4, E5, E7. Литическая активность исследуемых бактериофагов варьировала от $1,2 \pm 0,2 \times 10^7$ до $1,8 \pm 0,2 \times 10^{10}$ корпускул в 1 мл по Грациа и от 10^7 до 10^{10} по Аппельману. Наибольшим диапазоном лизиса изучаемых культур обладали бактериофаги E4 и E7, суммарный спектр которых составлял более 95 %. Проверка специфичности действия выделенных бактериофагов осуществлялась на 90 штаммах бактерий родов *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Escherichia*, *Proteus*, *Yersinia*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Rhodococcus*, *Listeria* и показала, что фаги являются специфичными по отношению к бактериям рода *Enterobacter*. Изучаемые фаги обладали выраженной устойчивостью к температурному воздействию до 65 °C и трихлорметану в течение 40 минут. Полученные результаты позволяют отобрать для дальнейшей работы бактериофаги E4 и E7, обладающие всеми свойствами, необходимыми для использования их в составе биопрепарата для деконтаминации пищевого сырья и продуктов питания.

Исследования проводятся в соответствии с тематическим планом научно-исследовательских работ, выполняемых по заданию МСХ РФ в 2017 году.

Введение

Как отмечает Продовольственная сельскохозяйственная организация Объединенных Наций, одной из существенных проблем сегодняшнего дня является потеря продовольственного сырья в виде мясной и рыбной продукции из-за его порчи в процессе транспортировки [1].

Несмотря на то что порча продукции животного происхождения – это сложный биохимический процесс, она в первую очередь зависит от количества и видов микроорганизмов, контаминирующих продукцию [2].

Многочисленные данные ученых по изучению основных контаминантов пищевой продукции свидетельствуют о том, что третье место по распространенности бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, сразу после *Escherichia* и *Klebsiella*, занимают бактерии рода *Enterobacter* [3].

Бактерии данного рода довольно часто встречаются в естественных водоемах, сточных водах, в пищеварительном тракте животных и человека, на растениях [4, 5, 6], что обуславливает высокую степень загрязнения ими пищевого сырья и продуктов питания.

Следует отметить, что использование в пищевой промышленности средств повышения сохранности продукции, в частности химиотерапевтических препаратов, приводит к развитию у патогенов устойчивости. Кроме того, данные препараты могут накапливаться в сырье и продуктах питания.

Решить эту проблему от части позволит разработка и применение бактериофаговых биопрепаратов в качестве безопасного средства для деконтаминации пищевого сырья и продуктов питания [7, 8].

Проблеме выделения и изучения бактериофагов посвящено большое число работ, однако бактериофаги бактерий рода *Enterobacter* изучены недостаточно.

В связи с этим целью нашей работы было изучение биологических свойств новых изолятов бактериофагов бактерий рода *Enterobacter* и отбор перспективных штаммов фагов для конструирования биопрепарата для деконтаминации пищевого сырья и продуктов питания.

Задачи исследования:

1. Изучить морфологию негативных колоний бактериофагов бактерий рода *Enterobacter*.
2. Определить литическую активность энтеро-

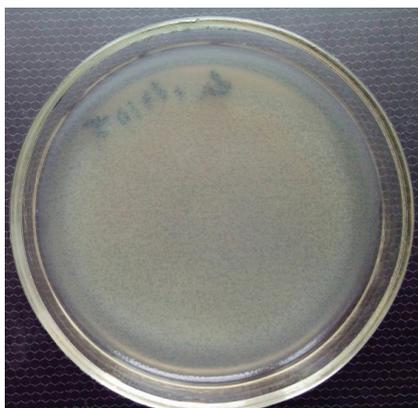


Рис. 1 – Негативные колонии фага E-3



Рис. 2 – Негативные колонии фага E-4



Рис. 3 – Изучение спектра литической активности энтеробактерных бактериофагов

бактерных фагов.

3. Изучить спектр литической активности фагов бактерий рода *Enterobacter*.

4. Определить специфичность фагов *Enterobacter*.

5. Изучить устойчивость энтеробактерных бактериофагов к воздействию температуры и хлороформа.

6. Отобрать штаммы фага с высокой литической активностью, выраженной специфичностью и широким спектром действия.

Объекты и методы исследований

Бактериофаги, специфичные к бактериям рода *Enterobacter* - 7 изолятов: E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, выделенные и селекционированные авторами в 2016-2017 годах. В работе использованы: 21 штамм бактерий рода *Enterobacter* (*E. dissolvens* – 10, *E. cloacae* – 11), 90 штаммов гетерологичных родов *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Escherichia*, *Proteus*, *Yersinia*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Rhodococcus*, *Listeria*, полученные из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ Ульяновского ГАУ и выделенные нами из объектов окружающей среды и санитарного надзора. Культуры бактерий обладали типичными для данных видов культуральными, морфологическими и биохимическими свойствами.

В работе использовали питательные среды: мясопептонный бульон (TM Media, Rajasthan, India); мясопептонный агар (TM Media, Rajasthan, India) 0,3%-ный, 0,7%-ный; 1,5%-ный.

Работа с бактериофагами проводилась по методикам, ранее апробированным сотрудниками кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ ФГБОУ ВО Ульяновского ГАУ [9, 10].

Морфологию негативных колоний и литическую активность фагов бактерий рода *Enterobacter* определяли методом агаровых слоев по A. Gratia.

Литическую активность фагов в жидкой питательной среде определяли методом серийных разведений по Аппельману.

Диапазон литической активности и специфичность селекционированных фагов изучали методом нанесения фага на газон гомологичных или гетерологичных бактериальных культур по Отто.

Результаты исследований

Для определения морфологии негативной ко-

лонии мы высевали фаг в разведении 10^{-7} - 10^{-9} по Аппельману на чашки методом агаровых слоев. Для формирования газона на поверхности агара использовали индикаторный штамм *Enterobacter*, на который фаг был выделен. Посевы культивировали в термостате при температуре 37 °С. Изучение морфологии негативных колоний проводили через 18-24 часа (рис. 1-2).

Негативные колонии, образуемые бактериофагами, по наличию зоны неполного лизиса, вторичного роста и величине колоний мы разделили на два типа. К первому относятся негативные колонии – округлые, прозрачные, без зоны неполного лизиса, диаметром до 1 мм. Негативные колонии первого типа формируют фаги E1, E3, E6. Колонии второго типа круглые, прозрачные, без зоны неполного лизиса, имеют диаметр до 3-4 мм. Колонии второго типа образуются фагами E2, E4, E5, E7.

Литическую активность бактериофага оценивают по его способности вызывать лизис бактериальной культуры и выражают это тем максимальным разведением, в котором испытуемый фаг проявил свое литическое действие. Более точным методом оценки активности бактериофага является определение количества активных корпускул фага в единице объема. Результаты исследования литической активности выделенных фагов представлены в таблице 1. Литическая активность исследуемых бактериофагов варьировала от $1,2 \pm 0,2 \times 10^7$ до $1,8 \pm 0,2 \times 10^{10}$ корпускул в 1 мл по Грациа и от 10^{-7} до 10^{-10} по Аппельману.

К основным биологическим свойствам бакте-

Таблица 1

Литическая активность бактериофагов бактерий рода *Enterobacter*

Фаг	Индикаторная культура	Активность по Аппельману	Активность по Грациа, корпускул в 1 мл
E1	<i>E. cloacae</i> 1	10^{-8}	$7,4 \pm 0,2 \times 10^8$
E2	<i>E. dissolvens</i> 3	10^{-6}	$1,2 \pm 0,2 \times 10^7$
E3	<i>E. dissolvens</i> 3	10^{-7}	$1,6 \pm 0,2 \times 10^8$
E4	<i>E. dissolvens</i> 1	10^{-9}	$3 \pm 0,2 \times 10^9$
E5	<i>E. dissolvens</i> 3	10^{-7}	$3 \pm 0,2 \times 10^8$
E6	<i>E. dissolvens</i> 3	10^{-9}	$2,8 \pm 0,2 \times 10^9$
E7	<i>E. cloacae</i> 1	10^{-10}	$1,8 \pm 0,2 \times 10^{10}$

Таблица 2

Результаты исследования спектра литической активности выделенных бактериофагов

Фаг	Испытанные штаммы <i>Enterobacter</i>	Чувствительные к фагу	% лизируемых штаммов
E1	21	8	38
E2	21	11	52
E3	21	4	19
E4	21	16	76
E5	21	13	62
E6	21	12	57
E7	21	17	81

Таблица 3

Специфичность бактериофагов E4 и E7

Род	Количество исследуемых штаммов	Фаг E4	Фаг E7	Контроль (МПБ)
<i>Klebsiella</i>	2	-	-	-
<i>Citrobacter</i>	6	-	-	-
<i>Escherihia</i>	12	-	-	-
<i>Proteus</i>	6	-	-	-
<i>Yersinia</i>	34	-	-	-
<i>Salmonella</i>	2	-	-	-
<i>Listeria</i>	19	-	-	-
<i>Pseudomonas</i>	4	-	-	-
<i>Rhodococcus</i>	1	-	-	-
<i>Staphylococcus</i>	4	-	-	-
<i>Enterobacter</i>	21	+	+	-

Примечание: «+» - лизис культуры; «-» - отсутствие лизиса.

риофага, имеющим важное практическое и теоретическое значение, относится диапазон литической активности – это спектр лизиса гомологичных фагу бактерий. Определение спектра литической активности проводили методом нанесения капель бактериофага на газон изучаемой культуры по методу Отто.

Для этого на поверхность МПА в чашках Петри наносили 0,5 мл 18-20-часовой культуры. Бактериальную культуру раскатывали равномерно по поверхности среды для получения газона. Для подсушивания ставили в термостат на 20 минут. На дне чашек карандашом отмечали одинаковые сектора (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. Результаты представлены в таблице 2 и на рисунке 6.

Исследования показали, что изучаемые фаги характеризуются различным спектром литической активности, а также перекрестным лизисом. Бактериофаги E1 и E3 являются видоспецифичными. Наибольшим диапазоном лизиса изучаемых культур обладают бактериофаги E4 и E7, который составляет более 75 %. А суммарный лизис двух этих бактерио-

фагов составляет более 95 %.

По сочетанию показателей проведенных тестов нами для дальнейших исследований отобрано 2 бактериофага – E4 и E7. В сумме они оказывают литическое действие на более 95 % имеющихся у нас культур и обладают высокой литической активностью.

Необходимым условием применения фагов для деконтаминации пищевого сырья и готовых к употреблению продуктов является отсутствие литического действия в отношении гетерологичных бактерий (специфичность). В качестве гетерологичных культур использовали бактерии родов *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Escherihia*, *Proteus*, *Yersinia*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Rhodococcus*, *Listeria*, полученные из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ Ульяновского ГАУ.

Проверка специфичности действия выделенных бактериофагов осуществлялась нами на 90 штаммах гетерологичных культур и показала, что бактериофаги E4 и E7 являются специфичными по отношению к бактериям рода *Enterobacter* и не активны к представителям других родов и семейств бактерий.

При изучении температурной устойчивости бактериофагов E4 и E7 установили, что прогревание фагов при температуре 63–65 °С не оказало влияния на их активность, при более высокой температуре фаги теряют свою физиологическую активность и погибают при 83–85 °С.

Для изучения устойчивости бактериофагов E4 и E7 к хлороформу фаголизат обрабатывали трихлорметаном в соотношении 1:10 при постоянном помешивании в течение 10–40 минут. После чего определяли активность фаголизата исследуемых бактериофагов методом агаровых слоев. Установили, что устойчивость к хлороформу бактериофагов E4 и E7 выражена и в течение 40 минут составляет 100 %.

Выводы

Нами были изучены основные биологические свойства энтеробактерных бактериофагов E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, выделенных и селекционированных авторами в 2016-2017 годах.

Морфология бляшкообразующих единиц бактериофагов представлена двумя типами: округлые, прозрачные, без зоны неполного лизиса, диаметром до 1 мм, формируемые фагами E1, E3, E6. И круглые, прозрачные, без зоны неполного лизиса, до 3-4 мм в диаметре, образуемые фагами E2, E4, E5, E7.

Литическая активность исследуемых бактериофагов варьировала от $1,2 \pm 0,2 \times 10^7$ до $1,8 \pm 0,2 \times 10^{10}$ корпускул в 1 мл по Грациа и от 10^{-7} до 10^{-10} по Аппельману.

Установлено, что изучаемые фаги характеризовались различными диапазонами литического действия, а также перекрестным лизисом. Бактериофаги E1 и E3 оказались видоспецифичными. Наибольшим диапазоном лизиса изучаемых культур обладали бактериофаги E4 и E7, который составлял 75 %. А суммарный лизис двух этих бактериофагов составлял более 95 %.

Проверка специфичности действия выделен-

ных бактериофагов E4 и E7 осуществлялась нами на 90 штаммах бактерий родов *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Escherichia*, *Proteus*, *Yersinia*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Rhodococcus*, *Listeria* и показала, что бактериофаги E4 и E7 являются специфичными по отношению к бактериям рода *Enterobacter* и не активны к представителям других родов и семейств бактерий.

Исследуемые фаги обладали выраженной устойчивостью к температурному воздействию до 65 °С, при более высокой температуре фаги теряли свою физиологическую активность и погибали при 83–85 °С. Устойчивость к хлороформу бактериофагов E4 и E7 выражена и в течение 40 минут составляет 100%.

Таким образом, для дальнейшей работы нами отобраны бактериофаги E4 и E7, обладающие всеми свойствами, необходимыми для использования их в составе биопрепарата для деконтаминации пищевого сырья и продуктов питания.

Библиографический список

1. FAO (2014): Food balance sheets. (Available at <http://faostatfaoorg/site/610> (Accessed 26 May 2014)).

2. Wang, H., Qi, J., Dong, Y., Li, Y., Xu, X., Zhou, G., Characterization of attachment and biofilm formation by meat-borne Enterobacteriaceae strains associated with spoilage, LWT - Food Science and Technology, Volume 86, 2017, Pages 399-407, ISSN 0023-6438, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.08.025>.

3. Phenotypic characterization of ESBL- and AmpC-type beta-lactamases in Enterobacteriaceae from chicken meat and dairy products / Ozpinar, H. et al // Ankara Üniv

Vet Fak Derg, 64, 267-272, 2017.

4. Золотухин Сергей Николаевич Создание и разработка схем применения диагностических биопрепаратов на основе выделенных и изученных бактериофагов энтеробактерий: дис. ... докт. биол. наук: 03.00.07, 03.00.23 / С.Н. Золотухин. – Ульяновск, 2007. – 341с.

5. Золотухин, С.Н. Малоизученные энтеробактерии и их роль в патологии животных / С.Н. Золотухин. – Ульяновск: Копиринг, 2004. – С.67–77.

6. Бактериофаги микроорганизмов значимых для животных, растений и человека. Научное издание / Д.А. Васильев [и др.]; под ред. Васильева Д.А., Золотухина С.Н. – Ульяновск, НИИЦМиБ, 2013. – 316 с.

7. Каттер, Э. Бактериофаги: биология и практическое применение / под общ. ред. Э. Каттер, А. Сулаквелидзе (пер. с англ. коллектив переводчиков; науч. ред. А.В. Летаров). – М., Научный мир, 2012. – 640 с.

8. Алешкин, А.В. Возможности применения бактериофагов в качестве пробиотических средств деконтаминации в области питания/ А.В. Алешкин, М.В. Зейгарник // Вопросы диетологии. – 2012. – Т.2, №4. – С.24 – 34

9. Выделение бактериофагов бактерий рода *Listeria* / Д.А. Васильев, Е.Н. Ковалева, Е.В. Сульдина // Инфекция и иммунитет. – 2014. – сентябрь, специальный выпуск – С. 69-70.

10. Основные биологические свойства листериозных бактериофагов / Е.В. Сульдина, Д.А. Васильев, Е.Н. Ковалева // Материалы VI Международной научно-практической конференции «Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения». Часть III / Ульяновск, ГСХА им. П.А.Столыпина. - 2015. – С.125-127.

BACTERIOPHAGES OF ENTEROBACTER BACTERIA AND THEIR MAIN BIOLOGICAL CHARACTERISTICS

Suldina E.V., Vasilyev D.A., Zolotukhin S.N., Bogdanov I.I.
FSBEI HE Ulyanovsk SAU

432017. Ulyanovsk, Novyy Venets bld., 1; 89374545651; e-mail: e.suldina2006@yandex.ru

Key words: *Enterobacter*, bacteriophages, environmental objects, bacteria, enterobacter, biological properties.

The article presents results of studies on biological properties of 7 new bacteriophage isolates of *Enterobacter* genus bacteria and selection of the most prospective phage strains for constructing a biopreparation for decontamination of food raw materials and food products on their basis. It is established that the morphology of negative colonies of enterobacterial phages is represented by two types: rounded, transparent, without an incomplete lysis zone, up to 1 mm in diameter, formed by phages E1, E3, E6. And round, transparent, without an incomplete lysis zone, up to 3-4 mm in diameter, formed by phages E2, E4, E5, E7. The lytic activity of the bacteriophages studied varied from $1,2 \pm 0,2 \times 10^7$ to $1,8 \pm 0,2 \times 10^{10}$ corpuscles in 1 ml by Grazia method and from 10⁻⁷ to 10⁻¹⁰ by Appelman. The bacterial phages E4 and E7 possessed the greatest range of lyses of the studied cultures, the total spectrum of which was more than 95%. The specificity of the isolated bacteriophage activity was tested on 90 strains of the bacteria of *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Escherichia*, *Proteus*, *Yersinia*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Rhodococcus*, *Listeria* genera and showed that the phages are specific for bacteria of *Enterobacter* genus. The phages studied had a significant resistance to temperatures up to 65 °C and trichloromethane for 40 minutes. The obtained results allow to select the bacteriophages E4 and E7 for the further work. They possess all the properties necessary for their use as a part of the biopreparation for decontamination of food raw materials and food products.

Bibliography

1. FAO (2014): Food balance sheets. (Available at <http://faostatfaoorg/site/610> (Accessed on May 26, 2014)).
2. Wang, H., Qi, J., Dong, Y., Li, Y., Xu, X., Zhou, G., Characterization of attachment and biofilm formation by meat-borne Enterobacteriaceae strains associated with spoilage, LWT- Food Science and Technology, Volume 86, 2017, Pages 399-407, ISSN 0023-6438, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.08.025>.
3. Phenotypic characterization of ESBL- and AmpC-type beta-lactamases in Enterobacteriaceae from chicken meat and dairy products / Ozpinar, H. et al., Ankara Üniv Vet Fak Derg, 64, 267-272, 2017.
4. Zolotukhin Sergey Nikolaevich. Development and elaboration of application schemes of diagnostic biological preparations on the basis of the isolated and studied bacteriophages of enterobacteria: dissertation of Doctor of Biology: 03.00.07, 03.00.23 / S.N. Zolotukhin. - Ulyanovsk, 2007. – 341p.
5. Zolotukhin, S.N. Little studied enterobacteria and their role in the pathology of animals / S.N. Zolotukhin. - Ulyanovsk: Copyring, 2004. - P.67-77.
6. Bacteriophages of microorganisms significant for animals, plants and humans. Scientific publication / D.A. Vasilyev [et al]; edited by Vasilyev D.A., Zolotukhin S.N. - Ulyanovsk, SRICMB, 2013. - 316 p.
7. Cutter, E. Bacteriophages: Biology and practical application / edited by E. Cutter, A. Sulakvelidze (translated from English, scientific editor A.V. Letarov). - M., Nauchnyi mir, 2012. - 640 p.
8. Aleshkin, A.V. Possibilities of bacteriophage application as probiotic means of decontamination in nutrition sphere / A.V. Aleshkin, M.V. Zeigarnik // Issues of dietology. - 2012. - V.2, №4. - P.24 – 34
9. Isolation of bacteriophages of *Listeria* genus bacteria / D.A. Vasilyev, E.N. Kovaleva, E.V. Suldina // Infection and immunity. - 2014. - September, special issue - P. 69-70.
10. The main biological properties of listeriosis bacteriophages / E.V. Suldina, D.A. Vasilyev, E.N. Kovaleva // Materials of the VI International Scientific and Practical Conference "Agrarian science and education at the present stage of development: experience, problems and solutions". Part III / Ulyanovsk, SAA named after P.A. Stolypin. - 2015. - P.125-127.