

ВЫДЕЛЕНИЕ БАКТЕРИЙ И БАКТЕРИОФАГОВ *YERSINIA ENTEROCOLITICA*

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»

ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ

432017, г. Ульяновск, бульвар Новый Венец, 1; тел.: 89374545651;

e-mail: e.suldina2006@yandex.ru

Ключевые слова: *Yersinia enterocolitica*, бактериофаги, объекты окружающей среды, бактерии, иерсинии, кишечный иерсиниоз.

В статье представлены результаты исследований по выделению бактерий *Yersinia enterocolitica* и гомологичных к ним вирулентных бактериофагов из объектов ветеринарно-санитарного надзора. Для более результативного процесса выделения бактерий вида *Y. enterocolitica* использовали метод «холодового удара». Видовую принадлежность выделенных бактерий устанавливали на основании морфологических, культуральных и биохимических свойств. Всего из 30 проб объектов внешней среды нами получено 3 штамма бактерий *Y. enterocolitica*. Бактериофаги были выделены из объектов окружающей среды (бытовых сточных вод, вод открытых водоемов, фекалий животных и др.) по оптимизированным методикам с целью экономии расходных материалов и снижения трудозатрат. Всего выделено и селекционировано 5 бактериофагов бактерий *Y. enterocolitica*. Для более подробной характеристики фагов *Y. enterocolitica* нами были изучены их основные биологические свойства. Негативные колонии фагов имели различную морфологию, а диапазон литической активности составлял от $1,9 \pm 0,1 \times 10^5$ до $1,5 \pm 0,1 \times 10^{10}$ по Грация и от 10^{-5} до 10^{-9} по Аппельману. На основании полученных данных мы отобрали бактериофаг Ye3-f2 с высокой литической активностью и дающий прозрачные негативные колонии без зоны неполного лизиса диаметром 1,0-1,5 для дальнейшего исследования возможности его использования в качестве терапевтического биопрепарата.

Введение

Род *Yersinia* включает обширную группу грамотрицательных факультативно анаэробных микроорганизмов, относящихся к семейству *Enterobacteriaceae* [1]. Среди 16 видов, включенных в род *Yersinia*, только три отнесены к патогенным для человека и животных — возбудитель чумы *Y. pestis*, возбудитель псевдотуберкулеза *Y. pseudotuberculosis* и отдельные представители *Y. enterocolitica*, являющиеся возбудителями кишечного иерсиниоза. Вид *Y. enterocolitica* широко распространен в природе [2]. Представители вида присутствуют в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ) различных животных, в воде, почве, а также могут контаминировать сырые овощи, молоко и другие продукты, хранящиеся в условиях холодильника [3].

Повсеместное распространение иерсиниоза, многообразие клиники его проявления и трудоёмкость в постановке диагноза сделали актуальной проблему кишечного иерсиниоза. Различные методы индикации и дифференциации *Y. enterocolitica* не идеальны и обладают некоторыми особенностями.

Решить данную проблему и предотвратить возникновение заболевания можно при использовании бактериофагов - естественных природных врагов бактерий - в качестве профилактических и терапевтических препаратов [4].

В связи с этим целью нашей работы было выделение бактериофагов бактерий вида *Yersinia enterocolitica* из объектов внешней среды и изучение их биологических свойств.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. выделить бактерии вида *Y. enterocolitica* из объектов внешней среды;
2. выделить иерсиниозные бактериофаги из внешней среды;
3. селекционировать полученные бактериофаги;
4. отобрать наиболее перспективный штамм фага для использования в составе терапевтического биопрепарата.

Объекты и методы исследований

Штаммы бактерий. В работе были использованы как гомологичные, так и гетерологичные штаммы бактерий. В качестве гомологичных бактерий использовали 34 штамма бактерии вида *Y. Enterocolitica*, полученные из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ Ульяновского ГАУ и выделенные нами из объектов окружающей среды. Культуры бактерий обладали типичными для данного вида культуральными, морфологическими и биохимическими свойствами.

Использовали 56 штаммов бактерий гетерологичных видов: *Proteus vulgaris*, *Klebsiella*

oxytoca, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aureginosa*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* и *Rhodococcus equi*, полученных из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ Ульяновского ГАУ.

Бактериофаги. 5 бактериофагов бактерий вида *Y. enterocolitica*, выделенные нами из внешней среды.

Питательные среды. Для бактериологического исследования использовали питательные среды: мясопептонный бульон (ТМ Media, Rajasthan, India); мясопептонный агар (ТМ Media, Rajasthan, India) 0,3 %-й, 0,7 %-й; 1,5 %-й; среда Эндо, среда Левина; среда Плоскирева; среда Симонса; среда Гисса с маннитом (ФБУН ГНЦ ПМБ, РФ); среда Гисса с глюкозой (ФБУН ГНЦ ПМБ, РФ); среда Гисса с арабинозой (ФБУН ГНЦ ПМБ, РФ); среда Гисса с мальтозой (ФБУН ГНЦ ПМБ, РФ); среда Гисса с сахарозой (ФБУН ГНЦ ПМБ, РФ); «Питательная среда с малонатом натрия для дифференциации энтеробактерий, сухая» (ООО «Биотехновация», РФ).

Микро-ГРАМ-НИЦФ набор реагентов для окраски микроорганизмов по методу Грама ТУ 9398-002-39484474-2002 (ЗАО НИЦФ, РФ).

Объекты внешней среды. В качестве объектов внешней среды использовали: бытовые сточные воды, воду открытых водоемов (рек Волга, Свияга и Сура), фекалии животных и пробы почвы с выгульных площадок для животных г. Ульяновска и Ульяновской области.

Оборудование и лабораторная посуда. Термостат ТС-80М-2, автоклав ГК-100-3, шкаф сушильно стерилизационный ШСС-80п УХЛ 42, холодильник бытовой «Бирюса» СПО 4М1-16-4М1, дистиллятор, микроскоп «Биомед-6» с видеофотонасадкой, центрифуга; автоматические пипеточные дозаторы на 20 мкл, 100 мкл и 1000 мкл «Gilson», «Ленпипет», «Eppendorf»; бактериальные фильтры.

Для проведения боксовых работ использовали комплект посуды, включающий колбы мерные, пипетки, чашки Петри, цилиндры мерные и флаконы различного объема.

При работе с культурами использовали стандартные бактериологические методы [4].

Работа с бактериофагами проводилась по методикам, апробированным сотрудниками кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ ФГБОУ ВО Ульяновского ГАУ [5].

Выделение и изучение биологических свойств бактериофагов проводили методами, предложенными Б. М. Коритняком [2], С. Н. Золотухиным [3], И. П. Ревенко [6], Е. В. Сульдиной [7].

Результаты исследований

Выделение бактерий вида *Y. enterocolitica* производилось нами для применения в последую-

щем полученных штаммов в качестве индикаторных бактериальных культур при изучении биологических свойств гомологичных бактериофагов.

Первичные посеы осуществляли прямым методом на среды Эндо и агар с бромтимоловым синим (БТС), инкубировали при температуре 28 °С в течение 24-48 часов. Дополнительно, в связи с тем что метод прямого посева редко приносит положительный результат, а недостатком классического метода холодого обогащения является его длительность (15 суток), мы использовали метод «холодового удара». Для этого пробирки с исследуемым материалом на 18 часов помещали в морозильную камеру при -18 °С. После оттаивания материал также засеивали на среды Эндо и агар с бромтимоловым синим.

На агаре Эндо выросли мелкие, округлые, розинчатые бесцветные колонии. На вторые сутки колонии увеличивались в диаметре и приобретали розовый оттенок. На среде с бромтимоловым синим выросли круглые, гладкие матовые колонии голубого цвета, в диаметре до 2 мм, а через 48 часов роста колонии приобретали голубовато-зеленый оттенок.

По истечении времени культивирования характерные для иерсиний указанные колонии засеивали в МПБ. Культуры микроорганизмов инкубировали при 22 °С 12-18 часов.

Морфологию клеток иерсиний определяли микроскопией мазков, окрашенных по Грамму. Мазки готовили из 18-24-часовых бульонных и агаровых культур, выращенных при комнатной температуре.

Видовую принадлежность чистых культур устанавливали, опираясь на морфологические, культуральные и биохимические свойства. Биохимические свойства культур определяли при температуре 28 °С в течение 48 часов на средах Гисса, а также на средах с мочевиной, серножелезным железом, агаре Симмонса, МПЖ, среде с фенилаланином. В качестве дополнительных тестов ставили реакции с метилротом, тесты Фогеса-Проскауера, тест на подвижность, наличие орнитиндекарбосилазы и ферментации инозита при 26 и 37 °С. Бактерии вида *Y. enterocolitica* на окрашенных мазках были представлены небольшими грамотрицательными палочками, подвижными при 22-28 °С и неподвижными при 37 °С.

Данные бактерии не образовывали сероводорода, ферментировали без образования газа глюкозу и сахарозу, не ферментировали лактозу, рамнозу, раффинозу и салицин, не гидролизировали эскулин, оксидазоотрицательные, продуцировали нитратредуктазу и уреазу при отсутствии фенилаланиндезаминазы и пиразинамидазы.

Нами было исследовано более 30 проб и выделено 3 штамма бактерий *Y. enterocolitica*.

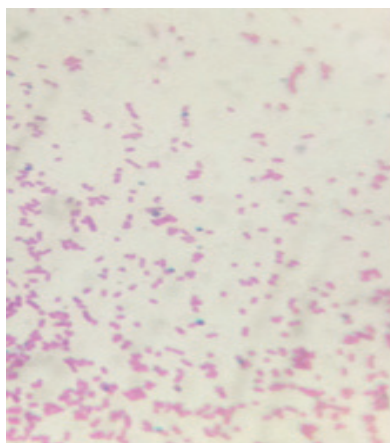


Рис. 1 - Микроскопия окрашенного по Грамму мазка выделенного штамма Ye – 3



Рис. 2 - Негативные колонии фага в зоне «стекающей капли»

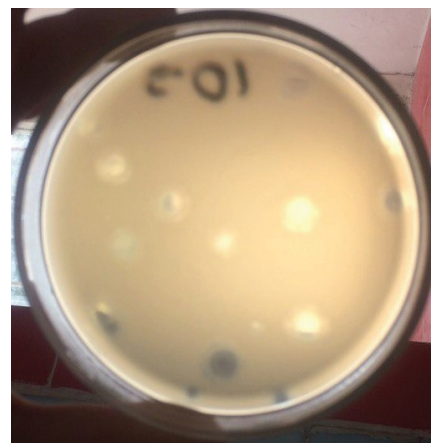


Рис. 3 - Негативные колонии фага Ye3-f2

Первым этапом при работе с тест-культурами является проверка их на лизогенность, поэтому все штаммы, используемые нами как индикаторные, исследовались на возможность выделения бактериофагов из культур в присутствии индуцирующего агента и без него.

В первой серии опытов использовали методику для выделения бактериофагов из бакте-

рий вида *Y. enterocolitica* без воздействия на них индуцирующего фактора [8-9]. В процессе работы свободного фага из культур бактерий вида *Y. enterocolitica* выявлено не было.

Во второй серии опытов на исследуемые культуры воздействовали индуцирующим фактором. В качестве индуцирующего агента использовали ультрафиолетовые лучи (УФ-лучи), источником которых служила ртутно-кварцевая лампа, дающая не менее 90 % излучаемой энергии в виде УФ-лучей с длиной волны 254 нм. Облученные взвеси культур смешивали с культурами, культивировали в течение суток, после чего фильтровали через бактериальные фильтры. Полученный фильтрат исследовали на наличие фага [10] на имеющихся культурах *Y. enterocolitica* методом агаровых слоев. В наших опытах установлено, что воздействие индуцирующего фактора на бактерии вида *Y. enterocolitica* не приводило к появлению зон лизиса.

Анализируя полученные данные, можно утверждать, что мы не обнаружили явления выхода свободного фага и перехода профага в свободный фаг у имеющихся штаммов бактерий по данным схемам.

Дальнейшие исследования были посвящены выделению бактериофагов *Y. enterocolitica* из объектов внешней среды.

Жидкие пробы (бытовые сточные воды, воду открытых водоемов) фильтровали через бумажный фильтр для освобождения от механических примесей в случае необходимости. В 1,0-литровую колбу, содержащую стерильный МПБ в количестве 0,5 литра, вносили 50,0 мл фильтрата либо навеску 50,0 г, в случаях исследования фекалий животных и проб почвы с выгульных площадок для животных, и по 1,0 мл индикаторных штаммов бактерий. Колбу инкубировали в термостате в течение 24 часов при 37 °С. После этого содержимое колбы разливали в пробирки, центрифугировали при 3000 об/мин в течение 30 минут, шприцом отбирали на-

Таблица 1

Описание морфологии негативных колоний фагов *Y. enterocolitica*

№ фага	Колонии фага	Индикаторная культура
F1	Колонии диаметром 0,7-0,8, с прозрачным центром и с широкой зоной неполного лизиса	Ye-2
F2	Колонии диаметром 1,0-1,5, прозрачные, без зоны неполного лизиса	Ye-3
F3	Колонии диаметром 0,5-0,7, прозрачные, с узкой зоной неполного лизиса	Ye-2
F4	Колонии диаметром 0,2-0,3, прозрачные, без зоны неполного лизиса	Ye-1
F5	Колонии диаметром 0,9-1,0 с прозрачным центром и узкой зоной неполного лизиса	Ye-2

Таблица 2

Литическая активность выделенных бактериофагов.

№ п/п	Фаг	По Грациа	По Аппельману
1.	Ye2-f1	$2,1 \pm 0,1 \times 10^8$	10^{-8}
2.	Ye3-f2	$1,5 \pm 0,1 \times 10^{10}$	10^{-9}
3.	Ye2-f3	$1,7 \pm 0,1 \times 10^7$	10^{-7}
4.	Ye1-f4	$1,9 \pm 0,1 \times 10^5$	10^{-5}
5.	Ye2-f5	$1,4 \pm 0,1 \times 10^8$	10^{-8}

досадочную жидкость и фильтровали с помощью бактериального фильтра в стерильную пробирку. Фильтраты исследовали по методу Отто [11]. Чашки помещали в термостат на 18-20 часов при 37 °С. Наличие негативных колоний или зон лизиса на газоне роста индикаторной культуры свидетельствует о присутствии в исследуемом материале бактериофага (рис.2).

Селекцию выделенных бактериофагов и повышение их литической активности проводили с помощью пассирования фага на индикаторной культуре с периодической отливкой типичных негативных колоний по методике, описанной С. Н. Золотухиным.

В результате проведенных исследований удалось выделить 5 изолятов бактериофагов, которые отличались между собой по морфологии негативных колоний. Результаты представлены в таблице 1.

После серии пассажей мы проверили литическую активность выделенных бактериофагов. Результаты представлены в таблице 2.

На основании полученных данных, представленных в таблицах 1 и 2, для дальнейших исследований нами был отобран фаг Ye3-f2 с высокой литической активностью и дающий прозрачные негативные колонии без зоны неполного лизиса диаметром 1,0-1,5 (рис. 3).

Литическая активность фага Ye3-f2 составила $1,5 \pm 0,1 \times 10^{10}$ по Грация и 10^9 по Аппельману, спектр литического действия равен 85 %.

В результате изучения специфичности бактериофага бактерий *Y. enterocolitica* Ye3-f2 по отношению к представителям других семейств, родов и видов использовали: *Proteus vulgaris* 6 штаммов, *Klebsiella oxytoca* 2 штамма, *Staphylococcus aureus* 4 штамма, *Pseudomonas aureginosa* 4 штамма, *Y. pseudotuberculosis* 4 штамма, *Escherichia coli* 12 штаммов, *Enterobacter cloacae* 3 штамма, *Rhodococcus equi* 1 штамм, *Listeria monocytogenes* 20 штаммов.

Установлено, что бактериофаг Ye3-f2 не лизировал ни одну из испытуемых культур других видов бактерий, фаг видоспецифичен к *Y. enterocolitica* и не активен к представителям других видов бактерий.

Выводы

Из 30 проб объектов внешней среды с помощью метода «холодового удара» нами получено 3 штамма бактерий *Y. enterocolitica*.

Из объектов окружающей среды (бытовых сточных вод, вод открытых водоемов, фекалий животных и др.) по оптимизированным методикам нами выделено 5 бактериофагов бактерий *Y. enterocolitica*.

Выделенные и селекционированные фаги *Y. enterocolitica* имели различную морфологию нега-

тивных колоний, а диапазон литической активности их составлял от $1,9 \pm 0,1 \times 10^5$ до $1,5 \pm 0,1 \times 10^{10}$ по Грация и от 10^5 до 10^9 по Аппельману.

На основании полученных данных мы отобрали бактериофаг Ye3-f2 с высокой литической активностью и дающий прозрачные негативные колонии без зоны неполного лизиса диаметром 1,0-1,5 для дальнейшего исследования возможности его использования в качестве терапевтического биопрепарата.

Исследования проводятся при поддержке государства в лице ФГБУ «Российский фонд фундаментальных исследований» по научному проекту «Геномика и биология кандидатских бактериофагов для терапии энтеробактериальных инфекций в ветеринарной медицине» № 16-44-732038/16 от 03.11.2016 г.

Библиографический список

1. Золотухин, С.Н. Малоизученные энтеробактерии и их роль в патологии животных / С.Н. Золотухин. – Ульяновск: Копиринг, 2004. – 130 с.
2. Коритняк, Богдан Михайлович. Изучение биологических свойств выделенных бактериофагов *Yersinia enterocolitica* и разработка на их основе технологии индикации и идентификации возбудителя кишечного иерсиниоза: автореф. дис. ...канд. биологических наук: 03.00.07, 03.00.23 / Б.М. Коритняк. – Саратов, 2005. – 20 с.
3. Золотухин, Сергей Николаевич. Создание и разработка схем применения диагностических биопрепаратов на основе выделенных и изученных бактериофагов энтеробактерий: автореф. дис. ... на соискание ученой степени д-ра биологических наук / С.Н. Золотухин. – Ульяновск: Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия, 2007. – 39 с.
4. Бактериофаги микроорганизмов значимых для животных, растений и человека. Научное издание / Д.А. Васильев [и др.]; под ред. Д.А. Васильева, С.Н. Золотухина. – Ульяновск: НИИЦМиБ, 2013. – 316 с.
5. Ревенко, Иван Павлович. Бактериофаги и их использование в ветеринарной практике / И.П. Ревенко, И.П. Каврук. – Киев: Урожай, 1978. – 88 с.
6. Выделение листериозных бактериофагов и изучение их основных биологических свойств / Е.В. Сульдина, Е.Н. Ковалева, Б.И. Шморгун, Д.А. Васильев // Аграрный научный журнал. – 2015. – № 3. – С. 37-41.
7. Золотухин, Сергей Николаевич. Бактериофаги *M. morganii* и их применение при желудочно-кишечных заболеваниях поросят: автореф. дис. ... канд. ветеринарных наук: 16.00.03 / С.Н. Золотухин. – М., 1994. – 19 с.
8. Бактериофаги: биология и практическое

применение/ под.ред.Элизабет Каттер, Александра Сулаквелидзе ;пер. с англ. Коллектив переводчиков;науч.ред.А.В.Летаров.- М.: Научный мир, 2012.-640с.

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

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

ISOLATION OF YERSINIA ENTEROCOLITICA BACTERIA AND BACTERIOPHAGES

**Suldina E.V., Vasilyev D.A., Zolotukhin S.N.,
FSBEI HE Ulyanovsk SAU
432017, Ulyanovsk, Novyi Venets bld., 1,
Tel:89374545651; e-mail: e.suldina2006@yandex.ru**

Key words: Yersinia enterocolitica, bacteriophages, environmental objects, bacteria, irsinia, intestinal irsiniosis.

The article presents results of studies on the isolation of Yersinia enterocolitica bacteria and virulent bacteriophages homologous to them from the objects of veterinary-sanitary supervision. For a more efficient process of isolating bacteria of the Y. enterocolitica species, the method of "cold shock" was used. Species belonging to the isolated bacteria was established on the basis of morphological, cultural and biochemical properties. In total, we obtained 3 strains of bacteria Y. enterocolitica out of 30 samples of environmental objects. Bacteriophages were isolated from environmental objects (household wastewater, open water, animal faeces, etc.), with application of improved methods to save consumable materials and reduce labor costs. A total of 5 bacteriophages of Y. enterocolitica bacteria were isolated and selected. For more detailed characteristics of Y. enterocolitica phages, we studied their basic biological properties. Negative phage colonies had different morphologies, and the range of lytic activity ranged from $1,9 \pm 0,1 \times 10^5$ to $1,5 \pm 0,1 \times 10^{10}$ according to Gracia and from 10^5 to 10^9 according to Appelman. On the basis of the data obtained, we selected bacteriophage Ye3-f2 with high lytic activity which produced transparent negative colonies without an incomplete lysis zone with a diameter of 1,0-1,5 for further investigation of the possibility of its use as a therapeutic biological medication.

Bibliography

1. Zolotukhin, S.N. Little studied enterobacteria and their role in the pathology of animals / S.N. Zolotukhin. - Ulyanovsk: Copyring, 2004. - 130 p.
2. Koritnyak, Bogdan Mikhailovich. Study of biological properties of isolated Yersinia enterocolitica bacteriophages and development of technology of indication and identification of the causative agent of intestinal yersiniosis on their basis: the author's abstract of dissertation of Candidate of Biology: 03.00.07, 03.00.23 / B.M. Koritnyak. - Saratov, 2005. - 20 p.
3. Zolotukhin, Sergey Nikolaevich. Creation and development of schemes for usage of diagnostic biological products on the basis of isolated and studied bacteriophages of enterobacteria: author's abstract of dissertation of Doctor of Biology/ S.N. Zolotukhin. - Ulyanovsk: USAA, 2007. - 39 p.
4. Bacteriophages of microorganisms significant for animals, plants and humans. Scientific publication / D.A. Vasiliev [et alt]; Edited by D.A. Vasilyev, S.N. Zolotukhin. - Ulyanovsk: SRICMB, 2013. – 316p.
5. Revenko, I.P. Bacteriophages and their application in veterinary practice / I.P. Revenko, I.P. Kavruk. - Kiev: Urozhay, 1978. - 88 p.
6. Isolation of listeriosis bacteriophages and study of their basic biological properties / E.V. Suldina, E.N. Kovaleva, B.I. Shmorgun, D.A. Vasilyev // Agrarian Scientific Journal. - 2015. - № 3. - P. 37-41.
7. Zolotukhin, Sergey Nikolaevich. M. morganii bacteriophages and their use in gastrointestinal diseases of piglets: the author's abstract of dissertation of Candidate of Veterinary Sciences: 16.00.03 / S.N. Zolotukhin. - M., 1994. - 19 p.
8. Bacteriophages: biology and practical application / Edited by Elizabeth Cutter, Alexandra Sulakvelidze; trans. from English.; scientific editor A.V. Letarov. - M.: Nauchnyi mir, 2012.-640p.
9. Vasilyev, D.A. Isolation of bacteriophages of Listeria genus bacteria / D.A. Vasilyev, E.N. Kovaleva, E.V. Suldina // Infection and immunity. - 2014. - P. 69-70.
10. Suldina, E.V. The main biological properties of listeriosis bacteriophages / E.V. Suldina, D.A. Vasilyev, E.N. Kovaleva // Agrarian science and education at the present stage of development: experience, problems and solutions. Materials of the VI International Scientific and Practical Conference. - Ulyanovsk: State Agricultural Academy named after P.A. Stolypin, 2015. - Part III.-P.125-127.