

**ВЫДЕЛЕНИЕ БАКТЕРИОФАГОВ СПЕЦИФИЧНЫХ К
ШТАММАМ *NAFNIA ALVEI* ИЗ ОБЪЕКТОВ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ**

Калдыркаев А.И., кандидат биологических наук, доцент,
тел. 8(8422)55-95-47 e-mail: usxa@yandex.ru

Шестаков А.Г., кандидат биологических наук, доцент,
тел. 8(8422)55-95-47 e-mail: andrewschestakov@yandex.ru

Молофеева Н.И., кандидат биологических наук, доцент,
тел. 8(8422)55-95-47 e-mail: nadezhda.molofeeva.67@mail.ru

Мерчина С.В., кандидат биологических наук, доцент,
тел. 8(8422)55-95-47 e-mail: sv2309@yandex.ru

Хлынов Д.Н., кандидат биологических наук, ст.преподаватель,
тел. 8(8422)55-95-47 e-mail: dmitriy_khlynov@mail.ru

ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ

Ключевые слова: Бактериофаги, фаги *Nafnia alvei*, специфичность, фаголизат, выделение бактериофагов.

*Статья посвящена выделению бактериофагов бактерии *Nafnia alvei* из объектов внешней среды, а также с воздействием индуцирующего фактора на культуры *Nafnia alvei* с целью выделения профага.*

Введение. Бактериофаги – это вирусы, характеризующиеся специфической способностью к избирательному инфицированию бактериальных клеток, принадлежащих к одному штамму или антигенно-гомологичным штаммам одного вида или рода [1, 2]. По многочисленным данным литературы фаги могут быть использованы в качестве естественных антимикробных агентов для борьбы с бактериальными инфекциями у людей, животных и аграрных культур [2, 5]. Весь спектр лечебных мероприятий такого рода обозначается учеными как фаготерапия [7]. Ряд авторов допускают вероятность практического использования бактериофагов в составе санитарно-гигиенических мероприятий в пищевой промышленности, сфере общественного питания, в детских и воинских коллективах, а также лечебно-профилактических учреждениях [7, 13]. Объединяя все возможности такого

применения бактериофагов термином биоконтроль, эксперты предлагают их применение как непосредственно человеком в виде пероральных (пищевой добавки) или иных форм фагокомпозиций (зубной пасты, крема, дезодоранта и т.д.), так и для обработки сельскохозяйственных культур и животных (до сбора урожая и забоя), инструментария и оборудования больниц и предприятий пищевой промышленности, полуфабрикатов или готовых продуктов питания с целью сокращения количества присутствующих на этих объектах определенных штаммов патогенных бактерий, в том числе вызывающих пищевые инфекции, а также для фагодиагностики потенциально опасных микроорганизмов [3, 4].

Вирусы бактерий были открыты в 1915 Frederick Twort, однако «Эра бактериофагов» начинается с публикаций Felix d'Herelle, который 95 лет назад впервые продемонстрировал присутствие фагов в нормальной микрофлоре людей и животных [4]. Более поздние многочисленные исследования подтверждают присутствие и выделение фагов из организма человека и животных с калом, мочой, слюной и мокротой в норме и при патологии в концентрациях достигающих 10^6 БОЕ/мл [4, 7]. Кроме того, доказано, что вирусы бактерий присутствуют повсеместно на объектах окружающей среды в воде, почве, на растениях и т.д. в количествах превышающих миллиарды частиц на единицу субстрата (например, в капле морской воды) [8, 9]. Таким образом, вопрос использования бактериофагов как части пищевого рациона может носить скорее количественный (исходя из содержания вирусных частиц в продукте), а не качественный характер, как это рассматривается в случае с химическими антибактериальными средствами. Ряд авторов относят бактериофаги к разряду пробиотиков, подчеркивая, что по своей биологической природе они полностью подходят под определение ВОЗ: «Пробиотики – живые микроорганизмы, которые при применении в адекватных количествах полезны для организма хозяина» [11, 12, 13]. Специфичность характера взаимодействия фаговой частицы с индикаторной бактериальной культурой в принципе ограничивает возможность прямого отрицательного воздействия бактериофагов на организм (клетки) человека, что и является основой их безопасного применения для деконтаминации продуктов и предотвращения бактерионосительства. Однако теоретически при использовании бактериофагов можно предположить возникновение ряда

побочных эффектов, которые могут реализовываться:

- во-первых, путем инфицирования бактерий нормальной флоры человека с развитием ятрогенного дисбактериоза как это происходит в случае применения других антимикробных агентов. Селекция производственных штаммов бактериофагов, используемых в целях фагопрофилактики, позволяет отобрать вирусные частицы с максимально узкими диапазонами специфической литической активности, ограниченной в рамках вида или даже штамма бактериального хозяина [2, 14]. Включение в фаговый коктейль, используемый в целях снижения риска развития пищевых инфекций, известных, по данным литературы, вирусов поражающих бифидобактерии и лактобациллы исключено [6,]. Более чем 50-летний опыт применения моно и поливалентных фаговых рецептур как лекарственных средств в терапии ОКИ и декомпенсированных форм дисбактериоза в России (Советском Союзе) и Польше также подтверждает невозможность реализации неспецифической литической фаговой активности в отношении нормальной микрофлоры человека [9,10, 13];

- во-вторых, посредством стимуляции иммунных реакций человека. В результате проведенных клинических исследований было показано, что бактериофаги оказывают влияние на различные функции основных популяций клеток иммунной системы человека участвующих как в формировании врожденного, так и приобретенного иммунитета: продукцию цитокинов, пролиферацию Т-клеток, синтез антител, и, наконец, фагоцитоз и респираторные взрывы фагоцитов [11]. В тоже время в процессе местной и системной фаготерапии (профилактики) не были выявлены существенные анафилактические реакции за исключением эндотоксической, связанной как с качеством используемой фаговой композиции (что будет рассмотрено ниже), так и с реакцией бактериолиза (реакция Яриша-Геркстеймера) *in situ* [11]. Минимизируя концентрацию фаговых частиц при профилактическом использовании бактериофагов до титра высеваемого из организма человека (10^3 - 10^6 БОЕ/мл) можно уменьшить количество эндотоксина одномоментно образующего при бактериолизе [12]. Польские исследователи акцентируют внимание на модулирующем влиянии бактериофагов на некоторые иммунные реакции, вызванные патогенными бактериями и вирусами, что может положительно проявляться в синергетическом (антибактериальном и

иммуномодулирующем) эффекте бактериофагов [6];

- в-третьих, путем модуляции вирулентности бактерии-хозяина. Предотвращение данного воздействия бактериофагов на организм человека, также напрямую связано с направленной селекцией производственных штаммов, подразумевающей включение в композицию исключительно вирулентных фагов, не образующих ни при каких условиях устойчивых лизогенов на бактериальной культуре [7]. Таким образом, можно избежать как прямой модификации фенотипа бактерии за счет прикрепления к ДНК хозяина профагового генома, так и трансдукции генов, кодирующих токсины, от лизогенных токсигенных бактериальных культур к непатогенным (т.н. горизонтальный перенос), а также снизить вероятность переноса между микроорганизмами генов антибиотикорезистентности и возникновения фагоустойчивых лизогенных бактериальных культур [2].

- в-четвертых, путем спонтанной трансдукции литических (вирулентных) фагов. Опасность данного феномена заключается в переносе известных локусов патогенности, которые могут находиться в геноме бактериофага. Используя ПЦР-типирование на токсин-кодирующие штаммы или полное секвенирование фагового генома, можно максимально обезопасить применение бактериофагов у человека [20].

- в-пятых, посредством введения в организм человека токсинов бактерии-хозяина, содержащихся в стерильном фильтрате фаголизата. Качество готового фагового коктейля обязательно контролируется на содержание эндо- и экзотоксинов [21]. Концентрацию экзотоксинов можно свести к нулю используя непатогенные бактериальные культуры для наращивания биомассы бактериофагов (например, *E.coli*K-12 для эшерихиозного и *L.innocua* для листериозного фага) [4,5,29]. Содержание эндотоксина в композиции, определяемое после дополнительной очистки стерильного фильтрата фаголизата, нормируется в единицах эндотоксина на мл согласно регулирующих правил страны производителя (так, по документам EFSA – 50 ЕЭ/мл) [27,28].

Таким образом, после более чем восьмидесятилетнего изучения фагов и их взаимодействия с эукариотическими клетками (в т.ч. животных и человека) свидетельств негативного специфического воздействия бактериофагов на здоровье человека не выявлено [11,15].

Цель исследования: Выделить бактериофаги специфичные к штаммам *hafnia alvei* из объектов внешней среды.

Задачи исследования:

1. Проверка штаммов *H. alvei* на содержание профага без индуцирующего фактора; 2. Воздействие индуцирующим фактором на культуры *H. alvei*; 3. Выделение бактериофагов *H. alvei* из объектов внешней среды.

Материалы и методы исследований.

Объекты исследований: 9 штаммов бактерий *Hafnia alvei* (2 штамма референс-штамма *H.alvei* B-8405 и *H.alvei*9760, и 7 полевых штаммов *H.alvei*.

Объекты выделения бактериофагов: поверхностные воды, сточные воды, фекалии животных, пчелы, патологический материал от больных и погибших животных.

Оборудование и реактивы: мясопептонный бульон, мясопептонный агар, термостат ТС-80М-2, автоклав ГК-85, шкаф сушильно-стерилизационный, бытовой холодильник, дистиллятор, лабораторные центрифуги, водяная баня, термометр ртутный, штативы, спиртовки, цилиндры мерные, флаконы, чашки Петри, пробирки, пипетки градуированные, колбы.

Методы: Выделение бактериофагов и изучение их биологических свойств проводили методами, предложенным М. Адамсом (1961), Гольдфарбом (1961). Селекцию бактериофагов и повышение их литической активности проводили по методике изложенной И.М. Габриловичем (1992).

Результаты исследований и их обсуждение.

Первым шагом являлось проведения опыта на содержание профага в штаммах *H. alvei*. Методика адаптирована для индуцирования штаммов *H. alvei* с использованием ультрафиолета на основании данных полученных из схем Гольдфарбом Д.М. (1961), Дж. Мейнелла (1965), Ревенко И.П. (1978). Выявлено, что культуры *H. alvei* без воздействия индуцирующего фактора не проявила своих лизогенных свойств – лизиса и фаговых колоний в стекающей капле не было.

Воздействие индуцирующим фактором. Во второй серии опытов проводили исследование штаммов *H. alvei* после воздействия на бактерии индуцирующим фактором по методикам Дж. Мейнелла (1965), Ревенко И.П. (1978), Шестакова А. Г. (2009).

По данным упомянутых авторов было подтверждено, что частоту клеток, освобождающих фаги, может быть резко увеличена при воздействии на культуру содержащую в себе фаг, ряда факторов, получивших название индуцирующих. При индукции некоторых культур, содержащих профаг удавалось вызывать выделение фага из клеток. К наиболее эффективно и широко применяющимся индуцирующим факторам относят - УФ-лучи.

Вероятность проявления индукции усиливают следующие факторы: - инкубирование при повышенных температурах до 42°C; плотность популяции бактериальных клеток;- возраст облучаемой культуры; время и кратность воздействия УФ; использование обедненной среды. Данные факторы, усиливающие индукцию учтены при разработке методики.

Методика проведения индукции. В качестве индуцирующего фактора использовали воздействие ультрафиолетовых лучей. Облучение 18-часовых культур *H. alvei* проводили в чашках Петри в течение 15 минут на расстоянии 50 см, однократно.

Проводят смыв культур с чашек Петри (ход работы, наливаем 1,5 мл. физ.раствора, плавными движениями шпателя снимают слой культуры в физ.раствор). Получившуюся жидкость (смыв) пипеткой по 1 мл наливают в центрифужные пробирки (эпендорфы). Центрифугирование проводят при 10 тыс. об/мин. в течении 5 мин. (для осаждения бактериальных клеток и просветления смыва).

Прозрачный надосадок (супернатант) наносят методом стекающей капли (или по Грация) на газон с тест культурами *Hafnia alvei* перекрестым порядком.

Первый учет результатов проводят через 6-8 часов, он заключается в осмотре чашек. Положительным результатом считается появление лизиса на месте стекания капли, либо появление фаговых бляшек (при учете методом Грация, колонии фага разбросаны по всей поверхности чашки). Второй раз чашки просматривают через 24 часа и делают заключительный вывод о присутствии или отсутствии профага. Лизис и бляшки умеренного бактериофага, часто имеют слабые очертания, так как присутствует неполный лизис клеток.

Результаты исследования. При первом учете результатов, через 6 часов зон лизиса на чашках с культурами: отмечено не было. При втором учете результатов, через 24 часа зоны лизиса на чашках с культурами не обнаружены.

*Выделение бактериофагов *Naftia alvei* из окружающей среды.* Выделить бактериофаг можно из многих объектов, где присутствуют бактерии, на которых выделенный фаг размножается. Так, например, дизентерийные, брюшнотифозные фаги и фаги кишечной палочки обнаруживаются в сточных водах, почве, в организме мухи, в испражнениях людей и пр. Стафилококковые фаги встречаются в -слизи носа, зева, на коже, в отделяемом - раны, анаэробные - в почве, в раневом отделяемом и т. д.

Обычно для выделения фага исследуемый материал фильтруют через бактериальные фильтры и засевают совместно с известными бактериями на бульон. Бульон инкубируют при 37° в течение 14-18 часов, затем для удаления оставшихся бактерий смесь центрифугируют и фильтруют через бактериальные фильтры. В случае термостабильных фагов вместо фильтрования надосадочную жидкость можно прогреть при 58° в течение 30 минут, что также освобождает от бактерий. Следует указать, что последний прием менее надежен, чем фильтрование. Материал, из которого выделяют фаг, можно предварительно не фильтровать, а непосредственно поместить на питательную среду совместно с бактериями, гомологичными искомому фагу. В этом случае жидкую питательную среду после инкубации в течение суток фильтруют, а затем в фильтрате выявляют наличие фага, что может быть осуществлено на жидких и твердых питательных средах. При выявлении фага на жидких средах 10 мл бульона засевают 0,05 мл густой бактериальной взвеси и добавляют 0,1 мл фильтрата, испытываемого на присутствие фага. Пробирки ставят в термостат при 37° и наблюдают за мутностью каждые 2 часа, сравнивая с контрольной пробиркой, засеянной 'культурой без фильтрата. Если в опытной пробирке мутность не нарастает, а затем исчезает, то это указывает на присутствие фага.

На твердых средах обнаружение фага проводят следующим образом. Фильтрат разводят бульоном и испытывают по описанному выше методу агаровых слоев. При наличии фага он обнаруживается на чашках либо в виде сплошного лизиса добавленной культуры, либо в виде отдельных колоний в зависимости от его концентрации в фильтрате. Рекомендуется засеивать на

чашки несколько разведений фильтрата, так как оплошной лизис культуры на агаровых слоях может ввести исследователя в заблуждение.

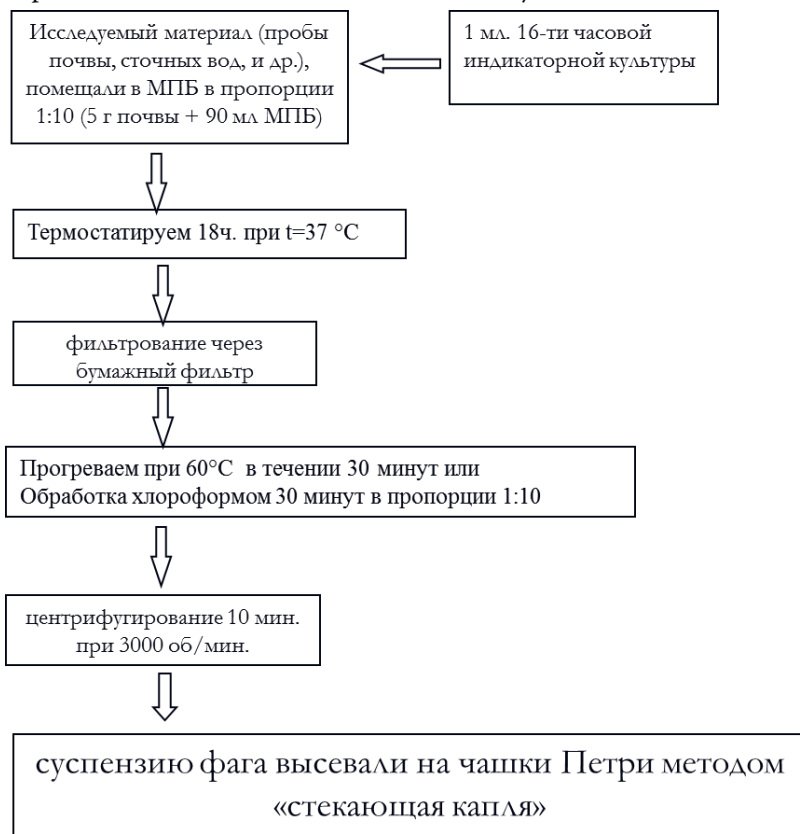


Рис. 1 - Схема выделения бактериофагов из объектов внешней среды *Hafnia alvei*

Методика, по которой мы рекомендуем проводить исследования представлена на рисунке 1. В данной методике для обработки суспензии бактерий и предполагаемого фага, мы применяли прогревание либо обработку хлороформом, после чего наносили фаголизат методом стекающей капли на газон индикаторной культуры.

В результате исследования различных объектов нам удалось выделить 3 бактериофага бактерий вида *Hafnia alvei* (табл.1).

Таблица 1 - Бактериофаги *Hafnia alvei* выделенные из внешней среды

№ пп	Название фага	Индикаторные штаммы	Объект выделения
1	Н.а-1 УЛГАУ	<i>Hafnia alvei</i> 9760	Вода (лужа у приюта)
2	Н.а-2 УЛГАУ	<i>Hafnia alvei</i> B-8405	Вода (стационар хирургии)
3	Н.а-3 УЛГАУ	<i>Hafnia alvei</i> B-8405	Вода (вольер собак)

Заключение.

В результате экспериментов нами проверены штаммы *H. alvei* на содержание профага без индуцирующего фактора, в результате данного эксперимента фаги не выявлены.

Установлено, что изучаемые бактериальные культуры *H. alvei* при использовании в качестве индуцирующего фактора УФ-лучей не проявляют свойств лизогении. Это говорит о том, что культуры не содержат профага (не лизогенны). Также определена оптимальная методика воздействия индуцирующим фактором на культуры *H. alvei*.

Методом индукции не удалось выделить фаги бактерий *H. alvei*, то есть мы не обнаружили перехода профага в свободный фаг у имеющихся штаммов по вышеизложенным методикам, поэтому дальнейшие исследования были посвящены выделению бактериофагов *H. alvei* из объектов внешней среды.

Данный метод выделения бактериофагов из внешней среды оказался успешным, по предложенной схеме нами выделены три бактериофага *H. alvei* из водных объектов внешней среды.

Библиографический список.

1. Беккалиева А.К. Изучение некоторых свойств выделенных бактериофагов *Pseudomonas syringae* / А.К. Беккалиева, Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев // Естественные и технические науки. - 2020. - № 3-2. - С. 11-13.
2. Васильев Д.А. Разработка фагового биопрепарата *Pseudomonas putida* / Васильев Д.А., Феоктистова Н.А., Алёшкин А.В., Золотухин С.Н., Мартынова К.В., Маланина В.С., Сульдина Е.В., Мاستиленко А.В., Викторов Д.А., Шестаков А.Г., и др. // Естественные и технические науки. 2018. № 11 (125). С. 64-68.
3. Карамышева Н.Н. Индикация профага бактериальной клетки бактерии *Desulfovibrio desulfuricans* методом электрофореза геномной ДНК /

Н.Н. Карамышева, Д.А. Васильев, А.В. Мاستиленко, С.Н. Золотухин, А.Г. Шестаков // *Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения*. 2012. Т. 1. С. 271-280.

4. Мейнел, Дж. Экспериментальная микробиология // Дж. Мейнел, Э Мейнел. – М.: Мир, 1967. – С. 347.

5. Молофеева Н.И. Индикация *Escherichia coli* O157 в воде с использованием РНФ / Н.И. Молофеева, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин, С.В. Мерчина, Н.С. Кузьмина, А.Г. Шестаков, В.С. Маланина // В книге: *Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности*. Материалы Четвертой научно-практической конференции с международным участием к 70-летию профессора В.А. Алешкина. 2018. С. 54.

6. Молофеева Н.И. Разработка схемы индикации бактерий *Aeromonas salmonicida* с использованием бактериофагов / Н.И. Молофеева, А.И. Калдыркаев, А.Г. Шестаков // *Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии*. -2020. -№ 4 (52). -С. 184-190.

7. Ревенко, И.П. Бактериофаги и их использование в ветеринарной практике / И.П. Ревенко. – Киев: Урожай, 1978. – С. 41–88.

8. Рыскалиева Б.Ж. Исследование некоторых биологических свойств бактериофагов *Pectobacterium carotovorum* / Б.Ж. Рыскалиева, Д.А. Васильев, Н.А. Феоктистова, Е.А. Ляшенко // В сборнике: *Зыкинские чтения*. Материалы национальной научно-практической конференции, посвященной памяти доктора медицинских наук, профессора Л.Ф. Зыкина. Под редакцией О.С. Ларионовой, И.А. Сазоновой. Саратов, - 2020. - С. 133-137.

9. Феоктистова Н.А. Подбор параметров постановки реакции нарастания титра фага для сибирезвонного бактериофага / Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин и др. // Третья научно-практической конференции с международным участием "Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности». -Москва. 2016. С. 87.

10. Феоктистова Н.А. Разработка метода фагоиндикации бактерии *Pseudomonas syringae* в объектах санитарного надзора / Н.А. Феоктистова, А.К. Беккалиева, Д.А. Васильев, Е.В. Сульдина // *Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии*. - 2020. - № 3 (51). - С. 148-157.

11. Хлынов Д.Н. Выделение бактериофагов *Yersinia pseudotuberculosis* из объектов внешней среды / А.М. Фуньгин, Н.П. Катмакова, Д.Н. Хлынов // В сборнике: Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения. Материалы II-ой Международной научно-практической конференции.- Ульяновск.- ФГОУ ВПО УГСХА; - 2010. - С. 226-228.

12. Шестаков А.Г. Разработка параметров получения максимального титра бактериофага PA04 *Pseudomonas aeruginosa* в клеточной культуре на плотной среде / А.Г. Шестаков, А.И. Калдыркаев, Н.И. Молофеева, Д.А. Васильев // Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения: материалы IX Международной научно-практической конференции, посвященной 75-летию Ульяновского государственного аграрного университета имени П.А. Столыпина. 20-21 июня 2018 года. - Ульяновск : УлГАУ, 2018. - Часть 2. - С. 166-171

13. Шестаков, А.Г. Схема выделения и идентификации бактерий *Pseudomonas aeruginosa* / А.Г. Шестаков, И.И. Богданов, Д.А. Васильев // Естественные и технические науки. – 2009. – №6(44). – С. 118-120.

14. Шестаков, А.Г. Усовершенствование методов выделения, идентификации и индикации бактерий *Pseudomonas aeruginosa*: дис... канд. биол. наук: 03.00.07, 03.00.23 / Шестаков Андрей Геннаевич. – Саратов, 2010. – 22 с.

ISOLATION OF BACTERIOPHAGES SPECIFIC TO HAFNIA ALVEI STRAINS FROM ENVIRONMENTAL OBJECTS

Kaldyrkaev A.I., Shestakov A.G., Molofeeva N.I., Merchina S.V., Khlynov D.N.

Keywords: *Bacteriophages, Hafnia alvei phages, specificity, phagolysate, bacteriophage isolation.*

The article is devoted to the isolation of bacteriophages of Hafnia alvei bacteria from environmental objects, as well as from the influence of an inducing factor on Hafnia alvei cultures in order to isolate the profage.