

УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДОВ ВЫДЕЛЕНИЯ БАКТЕРИОФАГОВ *K. ОХУТОСА*

Г.Р. Садртдинова

Ульяновский государственный аграрный университет имени П.А. Столыпина, Ульяновская область, Россия

Резюме. В статье представлены результаты исследования, связанные с повышением эффективности выделения фагов бактерий вида *K. oxytoca*, за счет разработки оптимального состава среды, используемой в работе. В научных исследованиях практически во всех методиках, связанных с выделением бактериофагов, в качестве питательной основы используются мясопептонный бульон и мясопептонный агар. Особенности роста и культивирования микроорганизмов создают определенные сложности для выделения фагов, активных в отношении бактерий вида *K. oxytoca*. Подбор компонентов и создание среды, которая обеспечивала бы оптимальный рост как бактериальной культуры, так и репродукции вируса позволяет облегчить работу по выделению бактериофагов. Число бактериальных штаммов, используемых в работе — 7. Все штаммы культур получены из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы ФГБОУ ВО Ульяновский государственный аграрный университет имени П.А. Столыпина. Исследования включали в себя 2 основных этапа. Первый этап включал выделение бактериофагов из внешней среды по методике Адельсона Л.И., Ляшенко Е.А. Материалом для исследований были пробы почвы, сточных вод, фекалий (2) — всего 4 пробы. Согласно выбранной методике, высеив предполагаемого фаголизата осуществляли на мясопептонный агар (1,5%) и предлагаемый нами агар для выделения бактериофагов (АФ) (1,5%). Положительным результатом считали наличие на среде негативных колоний, хорошо видимых на матовом фоне глубинного роста бактерий. Отрицательным результатом — сплошной рост («газон») бактериальной культуры. В качестве контроля использовали посев изучаемого микроорганизма на данные среды. В ходе проводимых исследований по первому этапу было выделено 2 бактериофага, активных в отношении искомого вида микроорганизма. Второй этап заключался в сравнительном анализе показателей культивирования выделенных фагов на стандартном мясопептонном агаре и предлагаемой среде для выделения бактериофагов. Также были определены основные биологические свойства изучаемых фагов: морфология негативных колоний, литическая активность, специфичность. Образовавшиеся на сравниваемых средах негативные колонии отнесли к одному типу. Литическая активность изучаемых фагов на мясопептонном агаре и среде АФ была одинаковой. По Грация 2×10^7 БОЕ/мл для бактериофага КО-3 УГСХА, $(3-4) \times 10^8$ БОЕ/мл для бактериофага КО-8724 УГСХА. Выделенные бактериофаги не проявили литическую активность в отношении штаммов гетерогенных культур (*Escherichia* spp., *Citrobacter* spp., *Serratia* spp., *Hafnia* spp., *Yersinia* spp.).

Ключевые слова: бактерии, бактериофаги, выделение, метод, морфология, литическая активность.

K. OXYTOCA BACTERIOPHAGES ISOLATION METHODS IMPROVEMENT

Sadrtdinova G.R.

Ulyanovsk State Agrarian University named after P.A. Stolypin, Ulyanovsk region, Russian Federation

Abstract. The article presents the results of a study related to increasing the efficiency of phage isolation of bacteria of the species *K. oxytoca*, by developing the optimal composition of the medium used in the work. In scientific research, in al-

Адрес для переписки:

Садртдинова Гузелия Рафиковна
433430, Россия, Ульяновская область, Чердаклинский район,
пос. Октябрьский, ул. Студенческая, 8, Ульяновская ГСХА
им. П.А. Столыпина.
Тел.: 8 (953) 981-47-99.
E-mail: sadrtdinova-guzlik@yandex.ru

Contacts:

Guzeliia R. Sadrtdinova
433430, Russian Federation, Ulyanovsk region, Cherdaklinskii
district, Oktjabrskii village, Studencheskaia str., 8, Ulyanovsk State
Agricultural Academy named after P.A. Stolypin.
Phone: +7 (953) 981-47-99.
E-mail: sadrtdinova-guzlik@yandex.ru

Библиографическое описание:

Садртдинова Г.Р. Усовершенствование методов выделения
бактериофагов *K. oxytoca* // Инфекция и иммунитет. 2017. Т. 7, № 4.
С. 413–418. doi: 10.15789/2220-7619-2017-4-413-418

Citation:

Sadrtdinova G.R. *K. oxytoca* bacteriophages isolation methods
improvement // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya
i immunitet, 2017, vol. 7, no. 4, pp. 413–418. doi: 10.15789/2220-7619-2017-
4-413-418

most all methods associated with the isolation of bacteriophages, meat-peptone broth and meat-peptone agar are used as the nutrient basis. The peculiarities of growth and cultivation of microorganisms create certain difficulties for the isolation of phages active against bacteria of the species *K. oxytoca*. The selection of components and the creation of an environment that would ensure the optimal growth of both the bacterial culture and the reproduction of the virus makes it possible to facilitate the isolation of bacteriophages. The number of bacterial strains used in the work was 7. All strains of cultures were obtained from the Museum of the Department of Microbiology, Virology, Epizootology and Veterinary and Sanitary Expertise of the Federal State Budget Educational Institution of Higher Education "Ulyanovsk State Agrarian University named after P.A. Stolypin". The studies included 2 main stages. The first stage consisted in isolation of bacteriophages by the method of isolation from the external environment by the method of Adelson L.I., Lyashenko E.A. The material for the studies were samples: soil, sewage sample, fecal samples (2). Only 4 samples. According to the chosen method, the sowing of the putative phagolysate was carried out on meat-peptone agar (1.5%) and the agar for isolating bacteriophages (Aph) (1.5%). A positive result was the presence on the environment of negative colonies, clearly visible on the matt background of deep growth of bacteria. A negative result is a continuous growth ("lawn") of bacterial culture. As a control, the culture of the microorganism studied was used for the media. In the course of the conducted studies for the first stage, 2 bacteriophages were isolated, active against the desired species of microorganism. The second stage consisted in a comparative analysis of the indices of cultivation of the isolated phages on standard meat-peptone agar and the proposed medium for isolation of bacteriophages. The main biological properties of the phages studied were also determined: morphology of negative colonies, lytic activity, specificity. The negative colonies formed on the compared media were classified as one type. The lytic activity of the studied phages on meat-peptone agar and Aph medium was the same. According to Grazia 2×10^7 BOE/ml for bacteriophage KO-3 UGSHA, $(3-4) \times 10^8$ BOE/ml for bacteriophage KO-8724 UGSHA. The isolated bacteriophages showed no lytic activity against strains of heterogeneous crops (*Escherichia* spp., *Citrobacter* spp., *Serratia* spp., *Hafnia* spp., *Yersinia* spp.).

Key words: *bacteria, bacteriophages, isolation, method, morphology, lytic activity.*

Введение

Один из способов борьбы с патогенными бактериями — использование бактериофагов. Исследования биологических свойств бактериофагов, выполненные с момента их получения, позволили широко использовать эти вирусы бактерий для решения многих задач в микробиологии, вирусологии, генетике, молекулярной биологии, иммунологии, радиобиологии, биотехнологии и других областях биологии. Поэтому процесс изучения вирусов прокариот, характеризовавшийся вначале как узкая область медицинской микробиологии, в настоящее время приобрел общебиологическое значение [4].

Выделением и изучением бактериофагов *Klebsiella* занимались разные научные школы, как в нашей стране, так и за рубежом. Активная работа в этой области проводилась отечественными, польскими и венгерскими учеными (Przondo-Hessek, 1966; Slopek et al., 1967; 1978; Габрилович с соавт., 1970, 1973, 1981, 1983; Gaston et al., 1987; Pieroni et al., 1994; Джапаридзе с соавт., 2005; Васильев Д.А. с соавт., 2001–2016).

Бактерии вида *K. oxytoca* занимают следующее (по числу вызываемых заболеваний) место после *K. pneumoniae* место. В норме данный микроорганизм встречается в желудочно-кишечном тракте, на коже и слизистой оболочке дыхательных путей человека. Микроорганизм

является причиной острых кишечных заболеваний молодняка животных и птиц. Следовательно, получение специфических фагов, активных в отношении бактерий данного вида, является актуальным [2].

В методиках, связанных с выделением бактериофагов, основным питательным субстратом служит мясопептонный агар. В состав данной среды входит: пептон, экстракт мясной, натрия хлорид, агар-агар. Показатель pH среды ($7,4 \pm 0,2$). Данная величина pH для бактерий изучаемого вида не всегда является оптимальной. Оптимальная величина для бактерий вида *K. oxytoca* pH опт = 7,2.

Цель исследования заключалась в оптимизации результатов выделения бактериофагов бактерий *K. oxytoca*, за счет модификации среды культивирования.

Материалы и методы

В работе использовали штаммы изучаемого вида микроорганизма: *K. oxytoca* ATCC 8724, *K. oxytoca* 1, *K. oxytoca* 2, *K. oxytoca* 3, *K. oxytoca* 24, *K. oxytoca* 25, *K. oxytoca* 26.

Нами предложена следующая пропись среды, которую планируется использовать при работе с бактериофагами (АФ-агар для выделения бактериофагов): пептон (источник необходимых аминокислот), дрожжевой экстракт (источник витаминов и микроэлементов), натрия хлорид (для поддержания нормального осмотического

баланса), агар-агар (в качестве загустителя среды, для поддержания необходимой плотности). Конечное значение рН ($7,1 \pm 0,1$).

Предложенный нами вариант среды (по количественным составляющим) может быть видоизменен в последующих исследованиях.

Первая серия опытов включала в себя получение бактериофагов методом выделения из внешней среды [1, 6].

Вторая серия опытов заключалась в проверке сравнительных показателей культивирования выделенных фагов на стандартном мясопептонном агаре и предлагаемой нами среде для выделения бактериофагов. Особое внимание обращали на морфологию образованных негативных колоний, их литическую активность (сохранение активности), специфичность (сходность) [4, 5].

Результаты

Образцы для исследования: проба почвы, проба сточных вод, пробы фекалий (2). Всего 4 пробы. В колбу, содержащую стерильный мясопептонный бульон в количестве 50 мл, вносили 10 мл исследуемого материала и по 0,5 мл всех изучаемых штаммов бактерий *K. oxytoca* — *K. oxytoca* ATCC 8724, *K. oxytoca* 1, *K. oxytoca* 2, *K. oxytoca* 3, *K. oxytoca* 24, *K. oxytoca* 25, *K. oxytoca* 26. Таким образом, каждая проба испытывалась на наличие фагов ко всем имеющимся культурам бактерий *K. oxytoca*. Данную колбу помещали в термостат и инкубировали в течение 3 сут при 37°C. После этого содержимое колбы разливали в стерильные пробирки, центрифугировали.

Одну часть надосадочной жидкости обрабатывали хлороформом (в разведении 1:10), а вторую прогревали на водяной бане при 60°C в течение 30 мин. Мясопептонный агар (1,5%) и агар для выделения бактериофагов (АФ) (1,5%) предварительно разливали в чашки Петри и высушивали в течении 1–2 дней в условиях термостата. После этого в пробирку с 2,5 мл 0,7% расплавленного и остуженного до 45°C агара вносят 0,5 мл исследуемого центрифугата и 0,2 мл суточной культуры. Содержимое пробирок быстро перемешивали и выливали на изучаемые плотные среды. Посевы инкубировали при 37°C. Учет результатов проводили через 18–20 ч. Положительным результатом считали наличие на среде негативных колоний, хорошо видимых на матовом фоне глубинного роста бактерий, отрицательным — сплошной рост («газон») бактериальной культуры. В качестве контроля использовали посев изучаемого микроорганизма на данные среды.

Результаты исследований, связанные с выделением бактериофагов, представлены в таблице 1.

Данные таблицы 1 позволяют заключить, что из внешней среды нами было выделено 2 бактериофага:

- бактериофаг КО-3 УГСХА — бактериофаг, активный в отношении штамма *K. oxytoca* 3;
- бактериофаг КО-8724 УГСХА — бактериофаг, активный в отношении штамма *K. oxytoca* ATCC 8724.

Стоит отметить, что из пробы № 1 наличие негативных колоний фиксировали только на среде АФ — бактериофаг, активный в отношении штамма *K. oxytoca* 3.

Таблица 1. Результаты выделения бактериофагов *K. oxytoca* из объектов внешней среды

Table 1. Results of isolation of *K. oxytoca* bacteriophages from environmental objects

Исследуемый штамм The investigated strain	Исследуемая проба Test sample							
	№ 1		№ 2		№ 3		№ 4	
	МПА NA	АФ APh	МПА NA	АФ APh	МПА NA	АФ APh	МПА NA	АФ APh
<i>K. oxytoca</i> ATCC 8724	–	–	–	–	+	+	–	–
<i>K. oxytoca</i> 1	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>K. oxytoca</i> 2	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>K. oxytoca</i> 3	–	+	–	–	–	–	–	–
<i>K. oxytoca</i> 24	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>K. oxytoca</i> 25	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>K. oxytoca</i> 26	–	–	–	–	–	–	–	–

Примечание: «+» — наличие негативных колоний, «–» — отсутствие негативных колоний.

Note: «+» — presence of negative colonies, «–» — absence of negative colonies.

Таблица 2. Морфология негативных колоний бактериофагов *K. oxytoca*Table 2. Morphology of negative colonies of bacteriophages *K. oxytoca*

Название фага Name of the phage	Питательная среда Nutrient medium					
	МПА NA			АФ APh		
	Величина колоний, мм Value of colonies, mm	Тип колоний A type of colonies	Характер негативных колоний The nature of negative colonies	Величина колоний, мм Value of colonies, mm	Тип колоний A type of colonies	Характер негативных колоний The nature of negative colonies
КО-3 УГСХА KO-3 UGSHA	0,5–1,0	II	мелкие, круглые, слабой прозрачности с неровными краями small, round, weak transparency with uneven edges	1,0–1,2	II	мелкие, круглые, прозрачные с ровными краями small, round, transparent with even edges
КО-8724 УГСХА KO-8724 UGSHA	0,5–1,0	II	мелкие, круглые, слабой прозрачности с неровными краями small, round, weak transparency with uneven edges	1,0–1,5	II	мелкие, круглые, прозрачные с ровными краями small, round, transparent with even edges

Морфологию негативных колоний изучали в разведении фагов 10^{-5} – 10^{-9} с индикаторной культурой на МПА и АФ в посевах методом агаровых слоев по Грациа. Учет проводили через 18 ч инкубации в термостате при температуре 37°C. Отмечали величину негативных колоний, форму, степень прозрачности, характер краев колоний, наличие и величину неполного лизиса (табл. 2).

Образовавшиеся на сравниваемых средах негативные колонии отнесли к одному типу (рис. 1, III обложка). Отметим количественные различия- на МПА негативных колоний было больше, чем на предлагаемой нами среде. Также отличия заключались в размере колоний и характере контура края. Так, на среде АФ бактериофаги образовывали негативные колонии величиной 1–1,5 мм, мелкие, круглые, прозрачные и с ровными краями. На МПА фаги отличались меньшим размером, более слабой прозрачностью колоний и неровным контуром края.

Определение специфичности бактериофагов проводили методом «стекающей капли». Изучение специфичности бактериофагов проводили по отношению к представителям других родов семейства *Enterobacteriaceae*: *Escherichia* spp., *Citrobacter* spp., *Serratia* spp., *Hafnia* spp., *Yersinia* spp. Для этого на поверхность МПА и АФ в чашках Петри наносили 0,4–0,5 мл 18-часовой

исследуемой культуры. Бактериальную культуру растирали равномерно шпателем по поверхности среды для получения газона. После подсушивания газона культуры на поверхность среды наносили капли изучаемых бактериофагов и наклоняли чашки, чтобы капли стекли. В качестве контроля наносили каплю стерильного МПБ (рис. 2, III обложка).

Выделенные бактериофаги не проявили литическую активность в отношении штаммов гетерогенных культур. На среде АФ «стекающая капля» отличалась более четкой зоной образованного лизиса.

Литическую активность бактериофага оценивали по его способности вызывать лизис бактериальной культуры в жидких или плотных питательных средах. Активность по методу Аппельмана выражается максимальным разведением, в котором испытываемый бактериофаг проявил свое литическое действие. Более точным методом оценки литической активности бактериофага является определение количества активных корпускул фага в единице объема по методу Грациа.

Индикаторные культуры *K. oxytoca* ATCC 8724, *K. oxytoca* 3 выращивали на стандартном МПБ в течение 18–20 ч. Литическую активность бактериофагов определяли в жидких (по методу Аппельмана) и плотных (по методу Грациа) питательных средах.

Таблица 3. Литическая активность бактериофагов вида *K. oxytoca*Table 3. Lytic activity of bacteriophages of the species *K. oxytoca*

Название фага Name of the phage	Индикаторная культура Indicator culture	Питательная среда Nutrient medium	Активность фагов по Грациа Phage activity by Grazia
КО-3 УГСХА KO-3 UGSHA	<i>K. oxytoca</i> 3	МПА NA	2 × 10
		АФ APh	2 × 10
КО-8724 УГСХА KO-8724 UGSHA	<i>K. oxytoca</i> ATCC 8724	МПА NA	3 × 10 ⁸
		АФ APh	4 × 10 ⁸

Определение литической активности по методу Грациа (выражается числом фаговых корпускул в 1 мл). 1,5% МПА и АФ разливали по чашкам 20–30 мл. Для подавления роста воздушной микрофлоры перед разливом добавляли к расплавленному агару 0,04% спиртовой раствор генцианвиолета (0,1 мл на каждые 100 мл МПА). Чашки подсушивали в термостате в течение 18–24 ч. Затем 1 мл фага (в разведении от 10⁻⁵ до 10⁻⁹) вносили в пробирки с 2,5 мл 0,7% агара, предварительно расплавленного и остуженного до 46–48°C, туда же добавляли 0,2 мл суточной бульонной культуры, смесь тщательно перемешивали, вращением пробирки в ладонях, и выливали на поверхность 1,5% агара, чашки для затвердения оставляли на столе на 30 мин, а затем инкубировали в термостате при 37°C в течение 18–24 ч. После инкубации подсчитывали количество негативных колоний фага и умножали полученное число на степень разведения (табл. 3).

Согласно результатам, представленным в таблице 3, активность изучаемых фагов на МПА и АФ была одинаковой.

Обсуждение

В ходе исследования нами был разработан состав среды, которую можно использовать в процессе выделения бактериофагов, активных в отношении *K. oxytoca*, и изучения их биологических свойств. Данная среда позволяет выделять бактериофаги с более крупными негативными колониями, с литической активностью, не хуже, чем на МПА.

Благодарности

Выражаем благодарность Научно-исследовательскому инновационному центру по микробиологии и биотехнологии» (г. Ульяновск) за финансовую поддержку проводимых исследований.

Список литературы/References

- Бульканова Е.А., Золотухин С.Н. Выделение бактериофагов рода *Klebsiella* из сточных вод // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. 2004. № 12. С. 40–42. [Bulkanova E.A., Zolotukhin S.N. Isolation of bacteriophages of the genus *Klebsiella* from wastewater. *Vestnik Ulyanovskoi gosudarstvennoi sel'skokhozyaistvennoi akademii* = *Vestnik of Ulyanovsk State Agricultural Academy*, 2004, no. 12, pp. 40–42. (In Russ.)]
- Васильев Д.А., Золотухин С.Н., Садртдинова Г.Р. Сравнительная эффективность методов выделения бактериофагов *Klebsiella oxytoca* // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. 2015. № 4 (32). С. 68–72. [Vasilyev D.A., Zolotukhin S.N., Sadrtidinova G.R. Comparative effectiveness of methods of isolation of bacteriophages *Klebsiella oxytoca*. *Vestnik Ulyanovskoi gosudarstvennoi sel'skokhozyaistvennoi akademii* = *Vestnik of Ulyanovsk State Agricultural Academy*, 2015, no. 4 (32), pp. 68–72. (In Russ.)]
- Захаренко С.М. Бактериофаги: современные аспекты применения, перспективы на будущее // Медицинский совет. 2013. № 10. С. 72–75. [Zakharenko S.M. Bacteriophages: present and future aspects of use. *Meditsinskii sovet* = *Medical Advice*, 2013, no. 10, pp. 72–75. (In Russ.)]
- Золотухин Д.С., Васильев Д.А., Золотухин С.Н., Семенов А.М., Романова Е.М. Выделение, селекция и изучение биологических свойств бактериофагов *Hafnia alvei* // Вестник ветеринарии. 2013. № 1 (64). С. 68–70. [Zolotukhin D.S., Vasilyev D.A., Zolotukhin S.N., Semenov A.M., Romanova E.M. The isolation, selection and observation of biological characteristics of *Hafnia alvei* bacteriophages. *Vestnik veterinarii* = *Herald of Veterinary Medicine*, 2013, no. 1 (64), pp. 68–70. (In Russ.)]

5. Катмакова Н.П., Золотухин С.Н., Васильев Д.А. Поиск и селекция псевдотуберкулезных бактериофагов // Ветеринарная медицина. 2009. № 4. С. 19–20. [Katmakova N.P., Zolotukhin S.N., Vasilyev D.A. The search and selection of bacteriophages *Yersinia pseudotuberculosis* strains. *Veterinarnaya meditsina = Veterinary Medicine*, 2009, no. 4, pp. 19–20. (In Russ.)]
6. Ляшенко Е.А., Золотухин С.Н., Васильев Д.А. Разработка и применение фагового биопрепарата для диагностики клебсиеллезной инфекции // Вестник ветеринарии. 2011. № 4 (59). С. 90–92. [Lyashenko E.A., Zolotukhin S.N., Vasilyev D.A. Development and application of the bacteriophage for klebsiellos diagnosis. *Vestnik veterinarii = Herald of Veterinary Medicine*, 2011, no. 4 (59), pp. 90–92. (In Russ.)]

Автор:

Садртдинова Г.Р., ассистент кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы Ульяновской ГСХА им. П.А. Столыпина, Ульяновская область, Россия.

Author:

Sadrtdinova G.R., Assistant Professor, Department of Microbiology, Virology, Epizootology and Veterinary Sanitation Inspection, Ulyanovsk State Agricultural Academy named after P.A. Stolypin, Ulyanovsk region, Russian Federation.

Поступила в редакцию 01.07.2017
Отправлена на доработку 03.07.2017
Принята к печати 30.09.2017

Received 01.07.2017
Revision received 03.07.2017
Accepted 30.09.2017