

ВЫБОР ОПТИМАЛЬНОГО МЕТОДА ВЫДЕЛЕНИЯ БАКТЕРИОФАГОВ БАКТЕРИЙ РОДА *FLAVOBACTERIUM*

А.Г. Семанин, Г.Р. Садртдинова

ФГБОУ ВО Ульяновский государственный аграрный университет имени П.А. Столыпина, г. Ульяновск, Россия

Резюме. В статье представлены результаты исследования, связанные с подбором эффективного метода выделения бактериофагов, активных в отношении бактерий рода *Flavobacterium*. Число бактериальных штаммов, используемых в работе — 3. Все штаммы культур получены из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы ФГБОУ ВО Ульяновский государственный аграрный университет имени П.А. Столыпина и имеют характерные для данного рода (и видов) тинкториальные и биохимические свойства. Исследования состояли из 4 серий опытов. Первая серия опытов была связана с апробацией методики по выделению бактериофага без использования воздействующего фактора. В результате искомым бактериофагом выделено не было. Вторая серия опытов заключалась в апробации метода выделения с использованием индуцирующего фактора — ультрафиолетового облучения. Расстояние до объектов облучения — 0,3 м. Время экспозиции: 1, 3, 5, 10, 15 мин. Третья серия опытов также была связана с использованием индуцирующего фактора — рентгеновского облучения. В ходе работы были определены 3 рабочих режима, каждый из которых отличался длительностью экспозиции, периодичностью воздействия и полученной дозой облучения. В результате исследований, связанных с использованием индуцирующих факторов, искомым бактериофагом выделено не было. Последняя серия опытов заключалась в выделении бактериофагов из объектов внешней среды — мест естественного (возможного) существования «хозяина» (изучаемого микроорганизма) и вируса (искомого бактериофага). Из объектов внешней среды было выделено 3 изолята фага: FL-j-1, FL-pec-2, FL-aq-3. Бактериофаг FL-j-1 активен в отношении штамма *F. johnsoniae* VKM В-1426, бактериофаг FL-pec-2 активен в отношении штамма *F. pectinovorum* VKM В-1171, бактериофаг FL-aq-3 активен в отношении штамма *F. aquatile* VKPM В-8534. Дальнейшие исследования могут быть связаны с изучением свойств выделенных бактериофагов: специфичности в отношении данного рода, чувствительности, литической активности, отбором наиболее перспективных штаммов фагов, дальнейшей селекцией отобранных бактериофагов, возможности использования данных бактериофагов в методе реакции нарастания титра фага с целью индикации изучаемого микроорганизма.

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

Адрес для переписки:

Семанин Антон Геннадьевич
433430, Россия, Ульяновская область, Чердаклинский район,
пос. Октябрьский, ул. Студенческая, 8,
Ульяновский ГАУ им. П.А. Столыпина.
Тел.: 8 (84231) 5-12-68, 8 (8422) 49-55-63.
E-mail: anton-vet@mail.ru

Contacts:

Anton G. Semanin
433430, Russian Federation, Ulyanovsk region, Cherdaklinskii
district, Oktjabrskii village, Studencheskaia str., 8, Ulyanovsk State
Agrarian University named after P.A. Stolypin.
Phone: (office).
E-mail: anton-vet@mail.ru

Библиографическое описание:

Семанин А.Г., Садртдинова Г.Р. Выбор оптимального метода выделения бактериофагов бактерий рода *Flavobacterium* // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 2. С. 399–403. doi: 10.15789/2220-7619-2019-2-399-403

Citation:

Semanin A.G., Sadrtidinova G.R. Choosing a proper approach for isolating bacteriophages specific to *Flavobacterium* genus bacteria // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9, no. 2, pp. 399–403. doi: 10.15789/2220-7619-2019-2-399-403

CHOOSING A PROPER APPROACH FOR ISOLATING BACTERIOPHAGES SPECIFIC TO FLAVOBACTERIUM GENUS BACTERIA

Semanin A.G., Sadrtidinova G.R.

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

Abstract. The article presents results of research related to the selection of an effective method for isolating bacteriophages active against bacteria of the genus *Flavobacterium*. The number of bacterial strains used in the work — 3. All strains cultures were obtained from the museum of the department of microbiology, virology, epizootiology and veterinary-sanitary examination of federal state budgetary educational institution of higher education Ulyanovsk «State Agricultural University named after PA Stolypin» and have tinctorial and biochemical properties characteristic for this genus (and species). The studies consisted of 4 series of experiments. The first series of experiments was connected with the approbation of a technique for isolating a bacteriophage without using an influencing factor. As a result, the desired bacteriophages were not isolated. The second series of experiments consisted in testing the isolation method using an inducing factor—ultraviolet irradiation. The distance to the objects of irradiation is 0.3 m. Exposure time: 1 min, 3 min, 5 min, 10 min, 15 min. The third series of experiments was also associated with the use of inducing factor X-ray irradiation. In the course of the work, three operating modes were determined, each of which differed in the duration of the exposure, the periodicity of the exposure, and the dose received. As a result of studies related to the use of inducing factors, the desired bacteriophages were not identified. The last series of experiments was to allocate bacteriophages from the objects of the natural places commemorative (possible) existence of the «owner» (the studied microorganism) and viruses (bacteriophage desired). Three phage isolates were isolated from environmental objects: FL-j-1, FL-pec-2, FL-aq-3. Bacteriophage FL-j-1 is active against a strain of *F. johnsoniae* VKM B-1426 bacteriophage FL-pec-2 is active against strain *F. pectinovorum* VKM B-1171 bacteriophage FL-aq-3 strain active against *F. aquatile* VKPM B-8534. Further studies may be related to study properties of the isolated phages: study of the specificity in respect of this kind of sensitivity study, the study and higher lytic activity, selection of the most promising strains phages further selection of selected phages, as well as studying the possibility of bacteriophages from use in the method of the reaction increase titer phage for the purpose of indicating the microorganism being studied.

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

Введение

Представители рода *Flavobacterium* являются возбудителями многих заболеваний рыб («холодноводная бактериальная болезнь», «обжаренный синдром радужной форели», бактериальная жаберная болезнь) и обнаруживаются во многих объектах окружающей среды (вода, почва и т.д.) [7]. Заболевания, вызываемые данным микроорганизмом, приводят к 100% смертности у рыб и наносят существенный ущерб экономики отрасли. Механизмы вирулентности бактерий рода *Flavobacterium* по-прежнему до конца неясны. Для предотвращения массовой смертности на рыбных фермах широко применяют антибиотики. Однако частое использование антибиотиков приводит к снижению чувствительности к данным препаратам у бактерий и выработке у них резистентности.

Во избежание рисков, связанных с применением в отрасли антибиотиков, использование бактериофагов в качестве экологического метода может быть эффективным решением по снижению частоты возникновения инфекций рыб, вызванных данным патогеном. На данный момент исследователями выделено более 60 фагов, активных в отношении представителей рода *Flavobacterium*, описаны механизмы взаимодействия фагов и бактерий [6].

Цель исследования заключалась в выборе наиболее эффективного метода выделения бактериофагов бактерий рода *Flavobacterium*.

Материалы и методы

В работе использовали референс-штаммы бактерий изучаемого рода: *F. pectinovorum* VKM B-1171, *F. aquatile* VKPM B-8534, *F. johnsoniae* VKM B-1426. Данные штаммы имеют типичные для данного рода (вида) тинкториальные свойства и проявляют характерную биохимическую активность (по результатам предыдущих исследований).

Выделение бактериофагов основывали на использовании общепринятых методов выделения (с учетом особенностей изучаемого микроорганизма): температура культивирования посевов — 25°C; время культивирования посевов — до 48 ч; количество оборотов в минуту при центрифугировании — 3000 об./мин; «рабочая жидкая среда» (для манипуляций в пробирках) — Enriched Anacker and Ordal medium; «рабочая твердая среда» (для манипуляций в чашках Петри) — Enriched Anacker and Ordal medium с добавлением агар-агара.

Выделение бактериофагов без воздействия индуцирующего фактора [1]. В колбу с 50 мл

жидкой среды Enriched Anacker and Ordal medium вносили по 1,0 мл всех изучаемых штаммов (суточных). Колбу с посевом инкубировали в условиях термостата при 25°C в течение 5 суток. После этого содержимое колбы разливали по 10 мл в центрифужные пробирки и центрифугировали при 3000 об./мин в течение 15 мин. Полученный центрифугат (надсадочная жидкость) обрабатывали хлороформом (1:10) интенсивным встряхиванием пробирки в течение 30 мин. Надсадочную жидкость переносили в чистую пробирку и исследовали методом агаровых слоев по Грациа (температура культивирования — 25°C, время культивирования — 48 ч).

Выделение бактериофагов индуцирующим фактором — использование ультрафиолетового облучения [2].

Во второй серии опытов на исследуемые культуры воздействовали ультрафиолетовым облучением, являющимся индуцирующим фактором. Источник облучения лампа «Philips» с длиной волны 250 нм. Расстояние до объектов облучения — 0,3 м. Длительность облучения: 1, 3, 5, 10, 15 мин.

Схема проводимых исследований:

— 1 день: суточные культуры изучаемых штаммов сплошным газонм высевали на твердую среду Enriched Anacker and Ordal medium, подсушивали в термостате 10–15 мин, облучали. После этого чашки инкубировали в термостате при 25°C в течение суток.

— 2 день: шпателем распределяли выросшие колонии бактерий по поверхности среды, облучали. После этого чашки инкубировали в термостате при 25°C в течение суток.

— 3 день: шпателем распределяли выросшие колонии бактерий по поверхности среды, облучали. После этого чашки инкубировали в термостате при 25°C в течение суток.

— 4 день: жидкой средой Enriched Anacker and Ordal medium делали смывы с чашек, центрифугировали при 3000 об./мин — 15 мин, обрабатывали хлороформом (1:10) в течение 30 мин, отбирали надсадочную жидкость в новую пробирку. Полученную суспензию исследовали методом агаровых слоев по Грациа.

— 6 день: учитывали результаты, присутствие бактериофага фиксировали по наличию зон лизиса.

Выделение бактериофагов индуцирующим фактором — использование рентгеновского облучения [2]. Рентгеновское облучение является более мощным фактором по сравнению с ультрафиолетовым облучением. В работе использовали 3 режима.

Таблица. Результаты выделения фагов бактерий рода *Flavobacterium* различными методами
Table. Methods used to verify bacteriophages specific to *Flavobacterium* genus bacteria

Исследуемый штамм Bacterial strain examined	Метод выделения Isolation method														
	ультрафиолетовое облучение ultraviolet irradiation						рентгеновское облучение X-ray irradiation						из внешней среды from environmental source		
	параметры parameters			параметры parameters			параметры parameters			параметры parameters					
3 мин 3 min.	5 мин 5 min.	10 мин 10 min.	15 мин 15 min.	I режим mode I	II режим mode II	III режим mode III	отсутствие лизиса lack of lysis	отсутствие лизиса lack of lysis	отсутствие лизиса lack of lysis	отсутствие лизиса lack of lysis	отсутствие лизиса lack of lysis	наличие зон лизиса presence of lysis zones	наличие зон лизиса presence of lysis zones	наличие зон лизиса presence of lysis zones	
<i>F. pestinovorum</i> VKM B-1171	отсутствие лизиса lack of lysis	отсутствие лизиса lack of lysis	отсутствие лизиса lack of lysis	отсутствие лизиса lack of lysis	отсутствие лизиса lack of lysis	отсутствие лизиса lack of lysis	отсутствие лизиса lack of lysis	отсутствие лизиса lack of lysis	отсутствие лизиса lack of lysis	отсутствие лизиса lack of lysis	отсутствие лизиса lack of lysis	отсутствие лизиса lack of lysis	отсутствие лизиса lack of lysis	отсутствие лизиса lack of lysis	наличие зон лизиса presence of lysis zones
<i>F. aquatile</i> VKM B-8534	отсутствие лизиса lack of lysis	отсутствие лизиса lack of lysis	отсутствие лизиса lack of lysis	отсутствие лизиса lack of lysis	отсутствие лизиса lack of lysis	отсутствие лизиса lack of lysis	отсутствие лизиса lack of lysis	отсутствие лизиса lack of lysis	отсутствие лизиса lack of lysis	отсутствие лизиса lack of lysis	отсутствие лизиса lack of lysis	отсутствие лизиса lack of lysis	отсутствие лизиса lack of lysis	отсутствие лизиса lack of lysis	наличие зон лизиса presence of lysis zones
<i>F. johnsoniae</i> VKM B-1426	отсутствие лизиса lack of lysis	отсутствие лизиса lack of lysis	отсутствие лизиса lack of lysis	отсутствие лизиса lack of lysis	отсутствие лизиса lack of lysis	отсутствие лизиса lack of lysis	отсутствие лизиса lack of lysis	отсутствие лизиса lack of lysis	отсутствие лизиса lack of lysis	отсутствие лизиса lack of lysis	отсутствие лизиса lack of lysis	отсутствие лизиса lack of lysis	отсутствие лизиса lack of lysis	отсутствие лизиса lack of lysis	наличие зон лизиса presence of lysis zones

Схема проводимых исследований:

– 1 режим: I период облучения, длительность периода — 1,6 с, доза облучения — 2,0 мЗв;

– 2 режим: II периода, каждый по длительности 1,6 с, общая доза облучения — 4,0 мЗв;

– 3 режим: III периода, каждый период по 1,6 с, общая доза облучения — 6,0 мЗв.

После облучения пробирки с культурами инкубировали при 25°C в течении 48 ч, с фиксацией результатов каждые 4 ч. В качестве контроля использовали посев изучаемой культуры в жидкую среду Enriched Anacker and Ordal medium без дальнейшего облучения пробирки. Контрольную пробирку инкубировали при тех же временных и температурных условиях. После 48 ч инкубирования, содержимое пробирок исследовали на наличие фагов методом агаровых слоев по Грациа.

Выделение бактериофагов из объектов внешней среды [3, 4, 6]. В колбу, содержащую 0,5 л стерильной жидкой среды Enriched Anacker and Ordal medium вносили по 1 мл сточных вод и по 1 мл всех изучаемых штаммов. Колбу с посевом инкубировали в термостате в течение 5 суток при 25°C. Затем содержимое колбы разливали в стерильные центрифужные пробирки по 10 мл и центрифугировали при 3000 об./мин в течении 10 мин. После этого отбирали надосадочную жидкость и обрабатывали ее хлороформом, интенсивно встряхивая 30 мин. Отбирали надосадочную жидкость и переносили в чистую пробирку. Полученный таким образом предполагаемый фаголизат исследовали методом агаровых слоев по Грациа.

Результаты

Результаты проведенных исследований представлены в таблице и на рисунке (II обложка).

При выделении бактериофагов без использования индуцирующего фактора наличие негативных колоний не обнаружено, бактериофагов выделено не было. Использование в исследованиях индуцирующих факторов (ультрафиолетового облучения и рентгеновского облучения) также не привели к выделению искомым фагов.

В результате проведенных исследований по выделению фагов из объектов внешней среды, было выделено 3 изолята фага: FL-j-1, FL-pec-2, FL-aq-3.

Бактериофаг FL-j-1 образовывал полупрозрачные негативные колонии неправильной округлой формы, диаметр колоний — 2–4 мм, проявляет свою активность в отношении штамма *F. johnsoniae* VKM В-1426.

Бактериофаг FL-pec-2 образовывал полупрозрачные негативные колонии неправильной округлой формы, диаметр колоний — 3–7 мм, проявляет свою активность в отношении штамма *F. pectinovorum* VKM В-1171.

Бактериофаг FL-aq-3 образовывал полупрозрачные негативные колонии неправильной округлой формы, диаметр колоний — 2–5 мм, проявляет свою активность в отношении штамма *F. aquatile* VKPM В-8534.

Обсуждение

В результате проведенных исследований было установлено, что наиболее эффективным методом при выделении бактериофагов, активных в отношении бактерий рода *Flavobacterium*, является выделение фагов из объектов внешней среды. Изучение морфологии негативных колоний у выделенных бактериофагов позволяет сделать заключение о схожести морфологических признаков. Дальнейшие исследования могут быть связаны с определением специфичности данных бактериофагов в отношении изучаемого рода микроорганизма, чувствительности, изучением и повышением литической активности, а также возможности использования данных бактериофагов в реакции нарастания титра фага с целью индикации изучаемого микроорганизма.

Благодарности

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

Список литературы/References

1. Бульканова Е.А., Золотухин С.Н. Выделение бактериофагов рода *Klebsiella* из сточных вод // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. 2004. № 12. С. 40–42. [Bul'kanova E.A., Zolotukhin S.N. Isolation of bacteriophages of the genus *Klebsiella* from wastewater. *Vestnik Ulyanovskoy gosudarstvennoy sel'skokhozyaystvennoy akademii* = *Vestnik of Ulyanovsk State Agricultural Academy*, 2004, no. 12, pp. 40–42. (In Russ.)]
2. Васильев Д.А., Золотухин С.Н., Садрtdинова 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., Sadrtidnina G.R. Comparative efficiency of extraction methods of *Klebsiella oxytoca* bacteriophages. *Vestnik Ulyanovskoy gosudarstvennoy sel'skokhozyaystvennoy akademii* = *Vestnik of Ulyanovsk State Agricultural Academy*, 2015, no. 4 (32), pp. 68–72. doi: 10.18286/1816-4501-2015-4-68-72 (In Russ.)]

3. Васильев Д.А., Пульчеровская Л.П., Золотухин С.Н., Садртдинова Г.Р. Бактериофаги рода *Citrobacter* // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. 2017. № 3 (39). С. 40–45. [Vasilyev D.A., Pulcherovskaya L.P., Zolotukhin S.N., Sadrtdinova G.R. Bacteriophages of *Citrobacter* genus. *Vestnik Ul'yanskovskoy gosudarstvennoy sel'skokhozyaystvennoy akademii* = *Bulletin of Ulyanovsk State Agricultural Academy*, 2017, no. 3(39), pp. 40–45. doi: 10.18286/1816-4501-2017-3-40-44 (In Russ.)]
4. 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 pseudotuberculosis bacteriophages. *Veterinarnaya meditsina* = *Veterinary Medicine*, 2009, no. 4, pp. 19–20. (In Russ.)]
5. Christiansen R.H., Madsen L., Dalsgaard I., Castillo D., Kalatzis P.G., Middelboe M. Effect of bacteriophages on the growth of *Flavobacterium psychrophilum* and development of phage-resistant strains. *Microbial Ecology*, 2016, vol. 71, no. 4, pp. 845–859.
6. Efreitorova E.O., Pulcherovskaya L.P. Indication of *Citrobacter* bacterias in the environment using bacteriophages in the phage titer increase reaction. *Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences*, 2016, no. 10, pp. 193–196. doi: 10.18551/rjoas.2016-10.22
7. Nakai T., Park S.C. Bacteriophage therapy of infectious diseases in aquaculture. *Res. Microbiol.*, 2002, vol. 153, iss. 1, pp. 13–18.

Авторы:

Семанин А.Г., аспирант кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы Ульяновского государственного аграрного университета им. П.А. Столыпина, Ульяновская область, Россия;

Садртдинова Г.Р., к.б.н., ассистент кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы Ульяновского государственного аграрного университета им. П.А. Столыпина, Ульяновская область, Россия.

Authors:

Semanin A.G., PhD Student, Department of Microbiology, Virology, Epizootology and Veterinary Sanitation Inspection, Ulyanovsk State Agrarian University named after P.A. Stolypin, Ulyanovsk Region, Russian Federation;

Sadrtdinova G.R., PhD (Biology), Assistant Professor, Department of Microbiology, Virology, Epizootology and Veterinary Sanitation Inspection, Ulyanovsk State Agrarian University named after P.A. Stolypin, Ulyanovsk Region, Russian Federation.

Поступила в редакцию 27.04.2018
Отправлена на доработку 18.03.2019
Принята к печати 26.03.2019

Received 27.04.2018
Revision received 18.03.2019
Accepted 26.03.2019