

УДК 597.67

**ВЫДЕЛЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ
БАКТЕРИОФАГОВ, АКТИВНЫХ ПО ОТНОШЕНИЮ К БАКТЕРИЯМ
PSEUDOMONAS FLUORESCENS И *PSEUDOMONAS AERUGINOSA***

А.Э. Эльхедми, В.Н. Леонтьев

*Белорусский государственный технологический университет, Минск, Республика Беларусь
e-mail: leontiev@belstu.by*

Введение

Одним из направлений современной микробиологии и биотехнологии являются исследования бактериофагов. Это связано с возрастающим интересом с точки зрения их практического применения в различных отраслях медицины, сельского хозяйства и пищевой промышленности [1–5].

Учитывая значительную распространенность и циркуляцию в природе *Pseudomonas*, большое внимание уделяется обнаружению этих микроорганизмов в различных объектах. Микробиологические исследования показали, что бактерии рода *Pseudomonas* (*P. fluorescens*, *P. aeruginosa*) играют ключевую роль в порче молока [6], мяса убойных животных и птицы, яиц, рыбы [7–9]. *P. fluorescens* и *P. aeruginosa* – психрофильные, облигатно-аэробные микроорганизмы, способные размножаться в продуктах при холодильном хранении. Эти бактерии выделяют активные ферменты, расщепляющие белки и липиды. Являются антагонистами многих бактерий и плесени.

Поиск экологически чистых путей деконтаминации пищевых продуктов для увеличения сроков их сохранности и уменьшения порчи является актуальной задачей. Также по мере расширения коллекций бактериофагов будет увеличиваться и количество возможных способов их применения.

Цель нашей работы – выделение бактериофагов, активных по отношению к бактериям рода *Pseudomonas*, и изучение их биологических свойств.

Методы исследования

В качестве индикаторных культур использовали 9 штаммов бактерий рода *Pseudomonas*, выделенных нами ранее из белоксодержащих пищевых продуктов [9].

Фаги выделяли из образцов испорченного мяса птицы, свинины, говядины и карпа следующим образом: брали навеску исследуемого материала 20 г, наносили 20 мкл разведенной суспензии суточной культуры *Pseudomonas* sp. и инкубировали при 30°C в течение 2 суток. Затем полученный материал гомогенизировали в 10 мл физиологического раствора и осаждали клетки и грубые частицы центрифугированием при 6000 мин⁻¹ в течение 15 мин. В лизат вносили хлороформ (20:1), интенсивно встряхивали в течение 1 мин, оставляли на 20–60 мин при комнатной температуре, после чего еще раз центрифугировали для получения осветленного лизата.

Изучение биологических свойств выделенных бактериофагов проводили по методам, предложенным Гольдфарбом [1], Габриловичем [3], Золотухиным [10].

Урожай фагов определяли следующим образом: в конические колбы с 10 мл питательного бульона вносили по 0,5 мл суточной индикаторной культуры и инкубировали при 37°C с аэрацией. Спустя 2 ч, в начале экспоненциальной фазы роста, культуры инфицировали фагами в дозе 0,1 мл и продолжали культивирование еще 4–5 ч до наступления лизиса культуры. Титр фаголизата и форму негативных колоний бактериофагов определяли с помощью метода агаровых слоев по Грациа [2].

Определение спектра литического действия и видовой специфичности проводили путем нанесения лизатов на газон бактериальной культуры: на поверхность питательного агара в чашках Петри наносили 0,1 мл суточной бульонной культуры исследуемых бактерий. Равномерно распределяли суспензию по поверхности среды стерильным шпателем. Посевы

оставляли при комнатной температуре под стерильными бумажными фильтрами для подсушивания на 15–20 мин. На поверхность засеянной среды наносили по 20 мкл лизатов фагов и наклоняли чашки Петри, чтобы капли стекли, а затем инкубировали в термостате при температуре 30°C. Оценку результатов проводили через 24–48 ч по обнаружению зон лизиса и негативных колоний.

Результаты

В ходе исследований выделено 8 изолятов бактериофагов, из которых 4 активны по отношению к бактериям *P. fluorescens* (BV-4, BV-5, BV-55, BV-71) и 4 – по отношению к бактериям *P. aeruginosa* (BV-12, BV-23, BV-25, BV-57).

Негативные колонии бактериофагов, специфичных к *P. aeruginosa*, характеризовались следующими параметрами: диаметр 3,0–4,5 мм, полностью прозрачные, без зоны вторичного лизиса; а фаги, специфичные к *P. fluorescens*, имели диаметр 2,0–4,0 мм, были полностью прозрачными, без зоны вторичного лизиса (рисунок). В таблице 1 представлены результаты по определению урожая и титра выделенных бактериофагов.

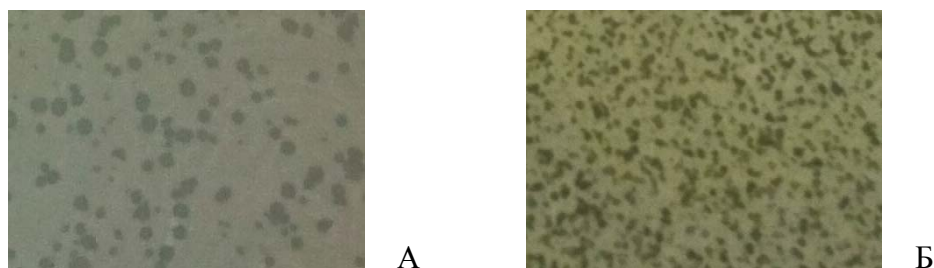


Рисунок – Морфология негативных колоний фагов BV-25 (А) и BV-55 (Б)

Таблица 1 – Урожай (выход) и титр фагов, специфичных к бактериям рода *Pseudomonas*

Штаммы фагов	BV-4	BV-5	BV-55	BV-71	BV-12	BV-23	BV-25	BV-57
Титр, БОЕ/мл	$1,9 \times 10^{10}$	$8,0 \times 10^9$	$2,6 \times 10^{10}$	$5,0 \times 10^9$	$1,3 \times 10^{10}$	$8,0 \times 10^9$	$9,0 \times 10^9$	$1,5 \times 10^{10}$
Средний урожай, БОЕ/клетка	110	25	82	5	102	88	104	55

Спектр литического действия фагов определяли с помощью 9-ти штаммов бактерий, 6 из которых относились к *P. fluorescens* и 3 – к *P. aeruginosa*. Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Спектр литического действия фагов, специфичных к бактериям рода *Pseudomonas*

Штаммы фага	Спектр литического действия	Процент лизируемых штаммов бактерий
BV-4	<i>P. fluorescens</i> -112, 130, 311	33,3%
BV-5	<i>P. fluorescens</i> -320, 220, 222	33,3%
BV-55	<i>P. fluorescens</i> -112, 320, 220 <i>P. aeruginosa</i> -150 <i>Azotobacter</i>	44,4%
BV-71	<i>P. fluorescens</i> -112, 320, 222	33,3%
BV-12	<i>P. aeruginosa</i> -410, 150	22,2%
BV-23	<i>P. aeruginosa</i> -224, 410, 150	33,3%
BV-25	<i>P. aeruginosa</i> -224, 410, 150 <i>P. fluorescens</i> -112, 320 <i>Azotobacter</i> <i>Escherichia coli</i>	55,5%
BV-57	<i>P. aeruginosa</i> -224, 410, 150	33,3%

Как видно из таблицы 2, наиболее широким спектром литической активности по отношению к исследованным культурам обладал штамм фага BV-25, который лизировал 5 из 9 испытанных штаммов: *P. aeruginosa* 224, 410, 150 и *P. fluorescens* 112, 320. Кроме того, бактериофаг BV-25 являлся космополитом, т.е. инфицировал бактерии двух видов. Бактериофаг BV-55 инфицировал 4 из 9 испытанных штаммов: *P. fluorescens* 112, 320, 220 и *P. aeruginosa* 150.

Бактериофаги BV-4, BV-5, BV-71, BV-12, BV-23 и BV-57 характеризуются более узким спектром литического действия по сравнению с фагами BV-25 и BV-55 и к тому же не являются фагами-космополитами.

Выводы

Было выделено 8 изолятов бактериофагов, образующих прозрачные негативные колонии различного диаметра от 2,0 до 4,5 мм. Титр выделенных фагов составлял от $5,0 \times 10^9$ до $2,6 \times 10^{10}$ частиц в 1 мл среды. Исследования по определению спектра литического действия бактериофагов показали, что бактериофаги BV-4, BV-5, BV-71, BV-12, BV-23 и BV-57 характеризуются узким спектром, а BV-25 и BV-55 – широким спектром литического действия. Фаги BV-25 и BV-55 были отобраны с целью дальнейшего исследования и создания биопрепарата, предотвращающего развитие бактерий рода *Pseudomonas*.

Список литературы

1. Гольдфарб, Д.М. Бактериофагия / Д.М. Гольдфарб. – М.: Медгиз, 1961. – 225 с.
2. Каттер, Э. Бактериофаги: биология и практическое применение / Э. Каттер, А. Сулаквелидзе; пер. с англ.: коллектив пер.; науч. ред. рус. изд. А.В. Летаров. – М.: Научный мир, 2012. – 636 с.
3. Габрилович, И.М. Общая характеристика бактериофагов / И.М. Габрилович // Основы бактериофагии. – Минск, 1973. – С. 5–24.
4. Quality and safety requirements for sustainable phage therapy products / JP. Pirnay [et al.] // *Pharmaceutical Research*. – 2015. – Vol. 32, № 7. – P. 2173–2179.
5. Greer, G.G. Bacteriophage control of foodborne bacteria / G.G. Greer // *Journal of Food Protection*. – 2005. – Vol. 68, № 5, 2005. – P. 1102–1111.
6. Inhibition of food-related bacteria by antibacterial substances produced by *Pseudomonas* sp. strains isolated from pasteurized milk / A.B. Ferreira [et al.] // *Brazilian Journal of Food Technology*. – 2013. – Vol. 16, № 4. – P. 326–333.
7. Effect of low temperature on the bacterial load in chicken, mutton and beef meat in relation to meat spoilage / M. Anbalagan [et al.] // *International Journal of Research in Pure and Applied Microbiology*. – 2014. – Vol. 4, № 1. – P. 1–6.
8. Леонтьев, В.Н. Порча пищевых продуктов: виды, причины и способы предотвращения / В.Н. Леонтьев, Х.М. Элькаиб, А.Э. Эльхедми // Труды БГУ. – 2013. – Т. 8, ч. 1. – С. 125–130.
9. Эльхедми, А.Э. Характеристика бактерий рода *Pseudomonas*, выделенных из пищевых продуктов / А.Э. Эльхедми, Х.М. Элькаиб, В.Н. Леонтьев // Труды БГТУ. – 2015. – № 4. – С. 251–255.
10. Золотухин, С.Н. Создание и разработка схем применения диагностических биопрепаратов на основе выделенных и изученных бактериофагов энтеробактерий: дис. ... д-ра биол. наук: 03.00.23; 03.00.07 / С.Н. Золотухин. – Ульяновск, 2007. – 341 с.

ISOLATION AND RESEARCH OF BIOLOGICAL PROPERTIES OF BACTERIOPHAGES ACTIVE AGAINST BACTERIA *PSEUDOMONAS FLUORESCENS* AND *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

A.E. Elhedmi, V.N. Leontiev

Belarusian State Technological University, Minsk, Belarus

This article presents the results of work on the isolation and the research of such biological properties of phages against bacteria from the genus *Pseudomonas*, as the lytic action and the

specificity. 9 strains of bacteria from the genus *Pseudomonas* isolated from a spoiled protein-containing food were used as indicator bacteria. The phages were isolated from spoiled meat, poultry, pork, beef and carp. The research of biological properties of the isolated phages was based on the method proposed by Goldfarb, Gabrilovich and Zolotukhin. Titer of phage lysate and the form of negative-type colonies of bacteriophages were determined by the Agar-Overlay technique of Gracia. The range of lytic action and species specificity determination were obtained by applying the lysate on the lawn of the bacterial culture.

8 isolates of phages were obtained during the investigation where 4 strains demonstrated their activity against bacteria *P. fluorescens* (BV-4, BV-5, BV-55, BV-71) and 4 – against bacteria *P. aeruginosa* (BV-12, BV-23, BV-25, BV-57). 9 strains of bacteria (where 6 strains belonged to *P. fluorescens* and 3 – to *P. aeruginosa*) determined the range of the phage lytic action. The research revealed that the broadest spectrum of lytic activity against the tested strains was possessed by the phage BV-25 and BV-55.