

УДК 619:579

## ДЕТЕКЦИЯ *AEROMONAS HYDROPHILA* В ПИЩЕВОЙ ПРОДУКЦИИ ИЗ ГИДРОБИОНТОВ С ПРИМЕНЕНИЕМ БИОСЕНСОРОВ НА ОСНОВЕ ГОМОЛОГИЧНЫХ БАКТЕРИОФАГОВ

<sup>1</sup>Васильев Д.А., <sup>1</sup>Викторов Д.А., <sup>1</sup>Насибуллин И.Р., <sup>1</sup>Золотухин С.Н.,

<sup>2</sup>Нафеев А.А., <sup>1</sup>Горшков И.Г., <sup>1</sup>Куклина Н.Г., <sup>1</sup>Барт Н.Г.

<sup>1</sup>ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина», Ульяновск, e-mail: viktorov\_da@mail.ru;

<sup>2</sup>ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный университет», Ульяновск, e-mail: nafeev@mail.ru

Контаминированные аэромонадами рыбное сырьё и продукция представляют собой источник пищевых и кормовых инфекций человека и животных. Вместе с тем в настоящее время обнаружение и типирование аэромонад является трудоёмким и длительным исследованием, затрачивающим до 120 часов. По названным причинам, актуальной задачей является разработка быстрого и точного метода, позволяющего детектировать бактерии *Aeromonas hydrophila* в частности в пищевой продукции из гидробионтов, поскольку рыба прижизненно контаминирована данным микроорганизмом как в условиях рыбоводческих прудов, так и в естественной среде обитания. Коллективом авторов разработан метод экспресс-детекции бактерий *Aeromonas hydrophila* в пищевой продукции из гидробионтов. Предлагаемый метод основан на использовании гомологичных бактериофагов, являющихся природными специфичными биосенсорами. В результате проведённых исследований были выделены и изучены бактериофаги, активные в отношении бактерий *Aeromonas hydrophila*, разработаны параметры реакции нарастания титра фага с бактериофагом Ф-43 УГСХА. Разработанная схема РНФ позволяет проводить фагодетекцию *Aeromonas hydrophila* в различных объектах в количестве от  $10^3$  м.к./мл в течение 24 часов.

**Ключевые слова:** *Aeromonas*, бактериофаги, биопрепарат, биосенсоры, индикация, детекция, реакция нарастания титра фага, гидробионты

## AEROMONAS HYDROPHILA DETECTION IN FOOD PRODUCT FROM USING HYDROBIONTS BIOSENSOR HOMOLOGOUS BACTERIOPHAGES

<sup>1</sup>Vasilev D.A., <sup>1</sup>Viktorov D.A., <sup>1</sup>Nasibullin I.R., <sup>1</sup>Zolotuhin S.N., <sup>2</sup>Nafeev A.A.,

<sup>1</sup>Gorshkov I.G., <sup>1</sup>Kuklina N.G., <sup>1</sup>Bart N.G.

<sup>1</sup>FGBOU VPO «Ulyanovsk SAA them. P.A. Stolypin», Ulyanovsk, e-mail: viktorov\_da@mail.ru;

<sup>2</sup>FGBOU VPO «Ulyanovsk State University», Ulyanovsk, e-mail: nafeev@mail.ru

Fish raw materials and products which are contaminated by *Aeromonas* are the source of food and feed infections of human beings and animals. And with it at present the detection and the typing of *Aeromonas* is a long research with a high labour content with demand up to 120 hours. Because of these reasons we can say that the urgent object is to develop a fast and an accurate method which allow to detect the bacteria *Aeromonas hydrophila* particularly in the food containing the hydrocoles, as far as the fish being alive contaminated by this microorganism both in terms of fish ponds, and in their natural habitat. Group of authors have developed a method of express-detecting of bacteria *Aeromonas hydrophila* in food products from hydrocoles. This method is based on the use of homologous bacteriophages which are natural specific biosensors. In the issue of the research we have isolated and studied the bacteriophages, which are active in relation to *Aeromonas hydrophila*, we have designed the characteristic of the reaction with the phage titer rise bacteriophage F-43 УГСХА. We also have developed the scheme which allow to conduct the detection of the phage *Aeromonas hydrophila* in different objects from  $10^3$  m.c./ml during 24 hours.

**Keywords:** *Aeromonas*, bacteriophages, biologic, biosensors, display, detection, response phage titer rise, aquatic life

История изучения бактерий рода *Aeromonas* насчитывает более ста лет. Долгое время их считали сапрофитами, но исследования последних лет позволяют отнести их к условным патогенам, вызывающим при определенных условиях заболевания людей и животных [1]. Бактерии рода *Aeromonas* широко распространены в окружающей среде, их выделяют из речной воды, сточных вод, почвы, от гидробионтов, растений, теплокровных животных [9, 10].

Актуальность разработки методов детекции бактерий рода *Aeromonas* и в частности *Aeromonas hydrophila* в пищевой продукции из гидробионтов обусловлена тем, что контаминированные аэромонадами рыбное сырьё и продукция представля-

ют собой источник пищевых и кормовых инфекций человека и животных [6, 8].

Обнаружение и типирование аэромонад является трудоёмким и длительным исследованием, затрачивающим до 120 часов [11, 12]. Типирование до рода *Aeromonas* требует применения сложных и дорогостоящих сред и проведения широкого перечня тестов, что формирует значительный процент ошибочных результатов. Внутривидовая идентификация бактерий данного рода из-за незначительных различий между видами сложна и может служить причиной получения ложных результатов анализов [3, 5, 13].

Перечисленное актуализирует необходимость разработки методов индикации бактерий рода *Aeromonas*, обладающих следующими критериями:

- быстрота исследования,
- простота в применении,
- высокая чувствительность,
- специфичность.

Метод фагодетекции полностью отвечает поставленным задачам [2, 4, 7]. Строгая специфичность бактериофагов позволяет дифференцировать отдельные виды [7]. Согласно литературным данным наборы тест-систем на основе бактериофагов для диагностики аэромонадных инфекций в настоящее время отсутствуют [1, 11, 12, 13].

Для реализации названного метода нами был разработан биопрепарат на основе выделенного и изученного бактериофага Ф43-УГСХА и параметры его применения в схеме фагодетекции.

#### Материалы и методы исследования

Для выделения бактериофагов были исследованы 103 пробы воды из водоемов Ульяновской области. В качестве индикаторной культуры использовали референс-штамм *A. hydrophila* A.h.-43, полученный из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы Ульяновской ГСХА им. П.А. Столыпина. Выделение и изучение биологических свойств фагов проводили по методам, описанным С.Н. Золотухиным (2007), Д.А. Викторovým (2011) [2].

Исследуемый материал предварительно фильтровали через бумажный фильтр для удаления механических примесей. Затем в колбу с концентрированным стерильным мясо-пептонным бульоном вносили пробы материала из такого расчета, чтобы после смешивания получить среду приемлемой концентрации. Туда же добавляли по 1,0 мл 18–24-часовой бульонной индикаторной культуры *Aeromonas hydrophila* A.h.-43. Колбу с содержимым инкубировали в термостате при 35°C (оптимальные условия для *Aeromonas hydrophila*) в течение 24–48 часов. Затем содержимое колбы в количестве 10,0 мл переносили в стерильные пробирки. С целью очистки от бактериальной микрофлоры материал центрифугировали при 3000 об/мин в течение 40 минут. Надосадочную жидкость обрабатывали хлороформом в соотношении 1:10 в течение 10 минут, прогревали в водяной бане при температуре 58–60°C в течение 30 минут, фильтровали на установку вакуумной фильтрации фирмы «Millipore» через мембранные фильтры с диаметром пор 0,2 мкм. Наличие бактериофагов в полученных субстратах определяли по методу агаровых слоев по Грациа, а также с помощью спот-теста. Наличие зон лизиса или негативных колоний на газоне индикаторной культуры указывало на присутствие бактериофага в исследуемом материале [5].

Селекцию бактериофагов и повышение их литической активности проводили пассированием фагов на бактериальной культуре штамма *A. hydrophila* A.h.-43 с периодическим пересевом типичных для данного изолята негативных колоний. Основные биологические свойства выделенных бактериофагов изучались по общепринятым методикам [3, 7]. Литическую активность определяли методами Аппельмана и Грациа. Для определения спектра литической активности применяли референс-штамм и выделенные нами ранее 14 полевых штаммов. Для определения

специфичности использовали штаммы бактерий гетерологичных родов: *Proteus*, *Morganella*, *Klebsiella*, *Bacillus*, *Citrobacter*, *Yersinia*, *Pseudomonas*, полученные из музея кафедры. Реакцию нарастания титра фага проводили по методам, изложенным в работах Васильева Д.А., Викторова Д.А. [2].

#### Результаты исследований и их обсуждение

В результате нами было выделено 5 изолятов бактериофагов, активных в отношении бактерий *A. hydrophila*. Выделенные бактериофаги на газоне индикаторной культуры имели округлые прозрачные негативные колонии диаметром 0,5–1,0 мм. Литическая активность селекционированных фагов по методу Аппельмана составила от  $10^{-5}$  до  $10^{-8}$ , по методу Грациа от  $3,0(\pm 0,2) \cdot 10^5$  до  $2,0(\pm 0,1) \cdot 10^8$  БОЕ/мл.

Для изучения спектра литической активности выделенных нами фагов мы использовали 15 имеющихся у нас штаммов бактерий *A. hydrophila*. Для этого исследуемые бактериофаги в концентрации  $10^7$ – $10^9$  БОЕ/мл наносили на газон изучаемой бактериальной культуры. По результатам исследований спектр литической активности выделенных нами бактериофагов составил от 13,3 до 86,7% из 15 имеющихся у нас штаммов бактерий вида *Aeromonas hydrophila* (рисунок).

Для изучения температурной устойчивости выделенных бактериофагов фаголизаты прогревали в ультратермостате при температуре от 58 до 66°C с интервалом 2°C в течение 30 минут [2]. По результатам проведенных исследований все изучаемые бактериофаги являлись термолабильными.

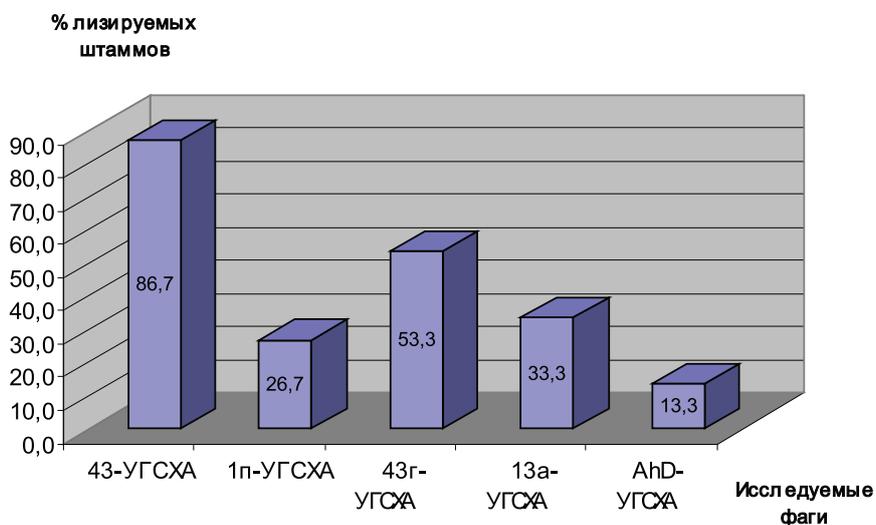
Для определения устойчивости выделенных бактериофагов к воздействию хлороформа разведения фагов обрабатывали хлороформом в соотношении 1:10 в течение 15, 30, 45 минут с обязательной постановкой контроля и определения количества негативных колоний методом агаровых слоев по Грациа [2, 3].

Исходя из результатов, приведенных в таблице 1, выделенные бактериофаги являются не устойчивыми к воздействию хлороформа в соотношении 1:10 до 45 минут (сроки наблюдения).

Для определения специфичности выделенных бактериофагов были использованы гетерологичные штаммы бактерий родов *Yersinia*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Klebsiella*, *Enterococcus*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Bacillus*, а также штаммы бактерий рода *Aeromonas*: *Aeromonas veronii biogroup sobria* ATCC 9071, *Aeromonas caviae* ATCC 15468, *Aeromonas salmonicida* ATCC 33658, полученные из музея кафедры. Специфичность

определяли методом нанесения бактериофагов в концентрации  $10^8$ – $10^9$  БОЕ/мл на газон исследуемой культуры [2]. Отсутствие лизиса на газоне бактерий гетероло-

гичных родов и видов свидетельствовало о видовой специфичности выделенных бактериофагов по отношению к *Aeromonas hydrophila*.



Спектр литической активности выделенных бактериофагов

Таблица 1

Результаты исследования устойчивости выделенных бактериофагов к обработке хлороформом

№ п/п	Штаммы бактериофагов	Титр исследуемых бактериофагов по Грациа, БОЕ/мл			
		Контроль	Время обработки хлороформом, мин		
			15	30	45
1	Фаг43-УГСХА	$2,0 \cdot 10^8$	$4,0 \cdot 10^5$	–	–
2	Фаг1п-УГСХА	$4,0 \cdot 10^6$	$5,0 \cdot 10^2$	–	–
3	Фаг43г-УГСХА	$3,0 \cdot 10^7$	$5,0 \cdot 10^3$	$4,0 \cdot 10^2$	–
4	Фаг13-УГСХА	$5,0 \cdot 10^5$	$7,0 \cdot 10^2$	–	–
5	ФагAhD-УГСХА	$1,0 \cdot 10^8$	$3,0 \cdot 10^4$	$3,0 \cdot 10^2$	–

Таблица 2

Литическая активность выделенных бактериофагов

Фаги	Литическая активность	
	по Аппельману (степень разведения)	по Грациа, БОЕ/мл
43-УГСХА	$10^{-8}$	$2,0 \cdot 10^8$
1п-УГСХА	$10^{-5}$	$4,0 \cdot 10^6$
43г-УГСХА	$10^{-7}$	$3,0 \cdot 10^7$
13а-УГСХА	$10^{-5}$	$5,0 \cdot 10^5$
AhD-УГСХА	$10^{-7}$	$1,0 \cdot 10^8$

По результатам проведённых исследований в целях разработки биопрепарата для детекции *A. hydrophila* наиболее приемлемым явился бактериофаг Ф-43 УГСХА, обладающий всеми необходимыми для проведения РНФ свойствами: титр  $2,0 \cdot 10^8$  (табл. 2), спектр литической активности 86,7%, строгая специфичность по отношению к бактерии *A. hydrophila*.

В результате серии исследований была разработана схема постановки РНФ с использованием биопрепарата бактериофага Ф-43 УГСХА для детекции бактерий *A. hydrophila*.

Исследуемый материал весом 5 г растирается в фарфоровой ступке и вносится в колбы, содержащие по 50 мл питательного бульона (МПБ). Содержимое колб

культивируется в течение 5 часов при 35°C для предварительного подращивания бактерий. На каждую исследуемую пробу отводится три пробирки: № 1 – предназначена для опытной пробы, № 2 – является контролем на свободный фаг, № 3 – контроль титра индикаторного фага. Исследуемый материал разливается по 9 мл в пробирки № 1 и № 2, пробирки № 3 содержат 9 мл МПБ. В пробирки № 1 и № 3 добавляется по 1 мл бактериофага Ф43- УГСХА в рабочем разведении (титр бактериофага 10<sup>4</sup>), а пробирки № 2 – 1 мл МПБ. Все пробы инкубируются в термостате при температуре 35°C 7 часов.

Параллельно ставится контроль стерильности сред. После инкубации из пробирок берутся пробы по 0,25 мл, вносятся в пробирки с 4,5 мл МПБ и обрабатываются фильтрованием через бактериальные фильтры. Далее содержимое пробирок исследуется методом агаровых слоев по Грациа. Чашки инкубируют 12 часов при 35°C.

Реакция считается положительной при нарастании титра фага в 5 и более раз. Результаты апробации разработанных параметров РНФ на образцах рыбы, искусственно контаминированной бактериями *A. hydrophila* представлены в табл. 3.

Таблица 3

Результаты РНФ

Концентрация индикаторной культуры, м. к./мл	Количество негативных колоний, шт.			Нарастание титра, раз	Результат РНФ
	Чашка № 1	Чашка № 2	Чашка № 3		
10 <sup>1</sup>	10	–	8	–	–
10 <sup>2</sup>	20	–	10	2	–
10 <sup>3</sup>	98	–	12	более 5	+
10 <sup>4</sup>	лизис	–	18	более 20	+
10 <sup>5</sup>	лизис	–	20	более 20	+

### Заключение

В результате проведенных исследований были выделены и изучены бактериофаги, активные в отношении бактерий *Aeromonas hydrophila*. Разработаны параметры реакции нарастания титра фага с бактериофагом Ф-43 УГСХА. Разработанная схема РНФ позволяет проводить фагодетекцию *Aeromonas hydrophila* в различных объектах в количестве от 10<sup>3</sup> м.к./мл в течение 24 часов.

### Список литературы

1. Блинов А.И. Аэромонады: выделение, идентификация и дифференциация, учебно-методические рекомендации / А.И. Блинов, Н.А. Глушанова. – Новокузнецк, 1997.
2. Васильев Д.А. Выделение бактериофагов бактерий *Pseudomonas putida* и их селекция в целях создания биопрепарата для диагностики псевдомоноза рыб / Д.А. Васильев, Д.А. Викторов, И.И. Богданов // Естественные и технические науки. – 2011. – № 2(52). – С. 79–82.
3. Васильев Д.А. Характеристика биологических свойств бактериофагов вида *Bacillus subtilis* / Васильев Д.А., Золотухин С.Н., Хайруллин И.Н., Феоктистова Н.А., Калдыркаев А.И., Юдина М.А., Мустафин А.Х. // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – Ульяновск: Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия им. П.А. Столыпина. – № 1. – 2011. – С. 79–83.
4. Дзюба Е.В. Апробация системы высокочувствительной детекции патогенных микроорганизмов в аквакультуре обыкновенного карпа *сyrprinus сarpio linnaeus*, 1758 / Е.В. Дзюба [и др.] // Известия Самарского научного центра Российской академии наук – 2012. – Т. 14, № 1(8). – С. 1883–1886.
5. Золотухин С.Н. Создание и разработка схем применения диагностических биопрепаратов на основе выделенных

и изученных бактериофагов энтеробактерий: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – Ульяновск, 2007. – 39 с.

6. Инструкция о мероприятиях по борьбе с аэромонозом карповых рыб, Минсельхозпрод России, Департамент ветеринарии, 1998.

7. 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.

8. Методические указания по лабораторной диагностике аэромоноза карпов, Госагропром СССР. – М., 1986.

9. Robson W.L., Leung A.K., Trevenen C.L. 1992. Haemolytic-uraemic syndrome associated with *Aeromonas hydrophila* enterocolitis. *Pediatr. Nephrol.* 6:221–222.

10. Singh, D.V., Sanyal S.C. 1992. Production of hemolysis and its correlation with enterotoxicity in *Aeromonas* spp. *J. Med. Microbiol.* 37:262–267.

11. Vadivelu J., Puthucheary S.D., Phipps M., Chee Y.W. 1995. Possible virulence factors involved in bacteraemia caused by *Aeromonas hydrophila*. *J. Med. Microbiol.* 42:171–174.

12. Zhang Y.L., Ong C.T., Leung K.Y. 2000. Molecular analysis of genetic differences between virulent and avirulent strains of *Aeromonas hydrophila* isolated from diseased fish. *Microbiology* 146, 999–1009.

13. Zhiyong Z., Xiaoju L., Yanyu G. 2002. *Aeromonas hydrophila* infection: clinical aspects and therapeutic options. *Rev. Med. Microbiol.* 13:1–12. 5734 NOTES J. CLIN. MICROBIOL.

### References

1. Pancakes A.I. *Aeromonas*: isolation, identification and differentiation, educational recommendations A.I. Pancakes, N.A. Glushanova, Novokuznetsk, 1997.
2. Vasiliev D.A. Isolation of bacteria *Pseudomonas putida* bacteriophages and their selection in order to create a biological product for the diagnosis pseudomonosis fish D.A. Vasiliev, D.A. Vectors, I.I. Bogdanov Natural and engineering sciences. 2011. no. 2 ( 52). pp. 79–82.

3. Vasilyev D.A. Characteristics of biological properties of bacteriophages species *Bacillus subtilis* Vasilyev D.A., Zolotukhin S.N., Khayrullin I.N., Feoktistov N.A., Kaldyrkaev A.I., Yudin M.A., Mustafin A.K. Bulletin of the Ulyanovsk State Agricultural Academy. Ulyanovsk Ulyanovsk State Agricultural Academy. P.A. Stolypin. no.1. 2011. pp. 79–83.
4. Dziuba E.V. Testing of the system highly sensitive detection of pathogens in aquaculture of common carp *Cyprinus carpio linnaeus*, 1758 E.V. Dziuba [etc.] Proceedings of the Samara Scientific Center, Russian Academy of Sciences 2012. Volume 14, no. 1 (8). pp. 1883–1886.
5. Zolotukhin S. Creation and development schemes for the application of diagnostic biologics based on bacteriophages isolated and studied enterobacteria S.N. Zolotukhin Abstract. dis... Dr. biol. Sciences. Ulyanovsk, 2007. 39.
6. Instructions on the response against *Aeromonas cyprinids* Russian Ministry of Agriculture, Department of Veterinary Medicine, 1998.
7. Cutter E. Bacteriophages: biology and applications E. Cutter, A. Sulakvelidze trans. with Engl.: staff lane.; scientific. Ed. rus. ed. A.V. Letarov. Moscow: Scientific World, 2012. 636 p.
8. Methodological guidelines for laboratory diagnosis *aeromonas carp* Gosagroprom USSR, Moscow, 1986.
9. Robson, W.L., A.K. Leung, and C. L. Trevenen. 1992. Haemolytic-uraemic syndrome associated with *Aeromonas hydrophila* enterocolitis. *Pediatr. Nephrol.* 6:221–222.
10. Singh, D. V., and S.C. Sanyal. 1992. Production of hemolysis and its correlation with enterotoxicity in *Aeromonas* spp. *J. Med. Microbiol.* 37:262–267.
11. Vadivelu, J., S.D. Puthucheary, M. Phipps, and Y.W. Chee. 1995. Possible virulence factors involved in bacteraemia caused by *Aeromonas hydrophila*. *J. Med. Microbiol.* 42:171–174.
12. Zhang, Y.L., Ong, C.T., Leung, K.Y. 2000. Molecular analysis of genetic differences between virulent and avirulent strains of *Aeromonas hydrophila* isolated from diseased fish. *Microbiology* 146, 999–1009.
13. Zhiyong, Z., L. Xiaoju, and G. Yanyu. 2002. *Aeromonas hydrophila* infection: clinical aspects and therapeutic options. *Rev. Med. Microbiol.* 13:1–12. 5734 NOTES J. CLIN. MICROBIOL.

---

**Рецензенты:**

Алешкин А.В., д.б.н., профессор, директор КИПКО, ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора», г. Москва;

Золотухин С.Н., д.б.н., профессор, декан факультета ветеринарной медицины ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА», Ульяновская область, Чердаклинский район, пос. Октябрьский.

Работа поступила в редакцию 26.02.2014.