

УДК 619:579

## РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ ФАГОИДЕНТИФИКАЦИИ И ФАГОДЕТЕКЦИИ БАКТЕРИЙ *PSEUDOMONAS FLUORESCENS*

**Васильев Д.А., Викторов Д.А., Артамонов А.М., Гринева Т.А., Ляшенко Е.А.**  
ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина», Ульяновск, e-mail: viktorov\_da@mail.ru

В проделанной работе из объектов окружающей среды (пробы прудовой воды, почвы, патологический материал, полученный от рыб с признаками заболевания псевдомонозом, сточные воды) методом накопления было выделено 5 штаммов бактериофагов, активных в отношении бактерий *Pseudomonas fluorescens*. Изучены их основные биологические свойства: спектр литической активности, специфичность, морфология негативных колоний, литическая активность по Грация. Полученные данные позволили разработать биопрепарат на основе бактериофага Pφ01F1-УГСХА, обладающего специфичностью в отношении *Pseudomonas fluorescens*, спектром литической активности 86,2%, литической активностью по Грация  $0,7 (\pm 0,1) \cdot 10^8$  БОЕ/мл. Авторами работы была разработана схема фагоидентификации методом спот-теста, позволяющая проводить исследование после выделения чистой культуры за 12–18 часов, а также схема фагодетекции методом реакции нарастания титра фага (РНФ), позволяющая за 24 часа выявлять наличие *Pseudomonas fluorescens* в пробах пищевого сырья, продуктов питания, патологического материала рыб и объектов окружающей среды при количестве клеток *Pseudomonas fluorescens* от  $10^3$  к.о.е./мл. Разработанные методы удобны для диагностики псевдомонозов рыб, вызываемых *Pseudomonas fluorescens*, в лабораториях любого уровня.

**Ключевые слова:** *Pseudomonas fluorescens*, бактериофаги, фагоидентификация, фагодетекция, реакция нарастания титра фага, псевдомонозы рыб

## ELABORATION OF METHODS OF IDENTIFICATION AND DETECTION OF PHAGE OF THE BACTERIUM *PSEUDOMONAS FLUORESCENS*

**Vasiliev D.A., Viktorov D.A., Artamonov A.M., Grineva T.A., Lashenko E.A.**  
Ulyanovsk State Agricultural Academy named PA Stolypin, Ulyanovsk, e-mail: viktorov\_da@mail.ru

In the performed work five strains of bacteriophages which are active in relation to bacterium *Pseudomonas fluorescens* were isolated from environmental objects of a similar kind as: samples of pond water, pond soil samples, pathological material derived from fish showing signs of disease pseudomonosis. Basic biological properties of these bacteriophages such as: the lytic activity spectrum, the specificity, the morphology of plaques, lytic activity by Grazia were studied. The data obtained allowed us to develop bacteriophage-based biopreparation Pφ01F1-УГСХА having specificity in point of *Pseudomonas fluorescens*, the lytic activity spectrum 86,2%, lytic activity by Grazia  $0,7(\pm 0,1) \cdot 10^8$  PFU/ml. The authors developed the scheme of phage identification by spot-test conducting research after isolation of a pure culture for 12–18 hours, and also the scheme of phage detection by phage's titer rise reaction which doesn't require prior isolation of a pure culture and allow to detect the presence of *Pseudomonas fluorescens* in 24 hours in samples of food raw materials, in the food, in fishes' pathological material and other environmental objects when the number of cells is more than  $10^3$  CFU/ml. The developed methods are useful for diagnosis of fish's pseudomonosis caused by *Pseudomonas fluorescens*, in the laboratories of any level.

**Keywords:** *Pseudomonas fluorescens*, bacteriophage, phage identification, phage detection, reaction of the rise of phage's content, fish's pseudomonosis

Бактерии *Pseudomonas fluorescens* играют значительную роль в порче пищевого сырья и продовольственных товаров (особенно яиц, мяса, рыбы, молока) [3, 10]. Данный микроорганизм является возбудителем псевдомоноза рыб, распространенного в хозяйствах, применяющих индустриальные методы рыбоводства [1, 4, 7].

Диагностику псевдомонозов рыб в настоящее время проводят путём бактериологических исследований с учетом эпизоотологических данных, клинических признаков и патологоанатомических изменений [9]. При типировании возбудителей заболевания до рода *Pseudomonas* применяется ряд тестов (оксидазная активность, тест окисления-ферментации, определение подвижности, реакция на среде Клигlera), что обуславливает определённую долю недостоверности исследования и длительность от 3,5 до 5 суток [9]. Длительное время объясняется необходимостью приме-

нения последовательного пересева на питательные среды, получения чистой культуры и проведения ряда длительных (24 ч) биохимических тестов. Для определения видовой принадлежности возбудителей, проводимой крайне редко, используются методы высевов на среды Гисса (тесты на окисление маннита, сахарозы, мальтозы, лактозы и др.). По современному данным, видовая дифференциация псевдомонад посредством определения ферментативной активности не может давать однозначных результатов [9] и, кроме того, требует длительного времени исследования (от 3,5 до 5 суток). Современные методы, такие как ПЦР и ИФА, требуют наличия дорогостоящего оборудования, расходных материалов, организованной лаборатории и специализированного персонала.

Перечисленные причины обуславливают необходимость в разработке эффективной и недорогой тест-системы для быстрой

и точной индикации и идентификации *Pseudomonas fluorescens* в патологическом материале от рыб и объектов прудов рыбо-водческого назначения. В качестве доступного для рыбоводческих хозяйств метода правомерно использовать специфические бактериофаги для проведения реакции нарастания титра фага.

**Цель исследования:** разработка схем фагоидентификации и фагодетекции *P. fluorescens* с применением биопрепарата на основе выделенного и изученного бактериофага.

#### Материалы и методы исследования

Выделение и изучение биологических свойств фагов проводили по методам С.Н. Золотухина [5], а также Е. Kutter [8].

Материалом для исследования при выделении бактериофагов являлись 76 образцов прудовой воды и патологического материала. Штамм *P. fluorescens* ATCC 13525 использовался в качестве индикаторной бактериальной культуры. Посевы инкубировали при температуре 28 °С в течение 24 часов.

Для получения негативных колоний бактериофагов использовали метод агаровых слоев по Грациа [8]. Повышение литической активности проводили пассированием на индикаторных культурах. Литическую активность определяли по методу Грациа [6]. Для определения спектра действия фагов использовали референс-штаммы *P. fluorescens* ATCC 13525, В-896, В-970, В-1470 и 28 «полевых» штаммов, вы-

деленных нами из образцов прудовой воды и патологического материала рыб. Для определения специфичности использовали референс-штаммы бактерии *P. putida* № 901 IV-89; ATCC 12633 IV-87, В-1292, В-899, 33 «полевых» штамма *P. putida*, выделенных из объектов окружающей среды, 3 референс-штамма бактерии *P. aeruginosa* № 128, № 381, № 1677, а также штаммы бактерий гетерогенных родов: *Aeromonas hydrophila*, *Proteus mirabilis*, *Morganella morganii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp.*, *Bacillus cereus*, *E. coli*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Yersinia enterocolitica*, *Stenotrophomonas maltophilia*, полученные из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ при ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина». Все штаммы обладали типичными биологическими свойствами.

Разработку схем фагодетекции и фагоидентификации проводили на основе работ В.Н. Крылова [11], С.Н. Золотухина [5], Е. Kutter [8].

#### Результаты исследований и их обсуждение

В таблице представлены основные биологические свойства выделенных бактериофагов *P. fluorescens*, на основании которых проводилась их селекция в целях разработки биопрепарата для фагоидентификации и фагодетекции названного вида бактерий. Спектр литической активности представлен на рис. 1.

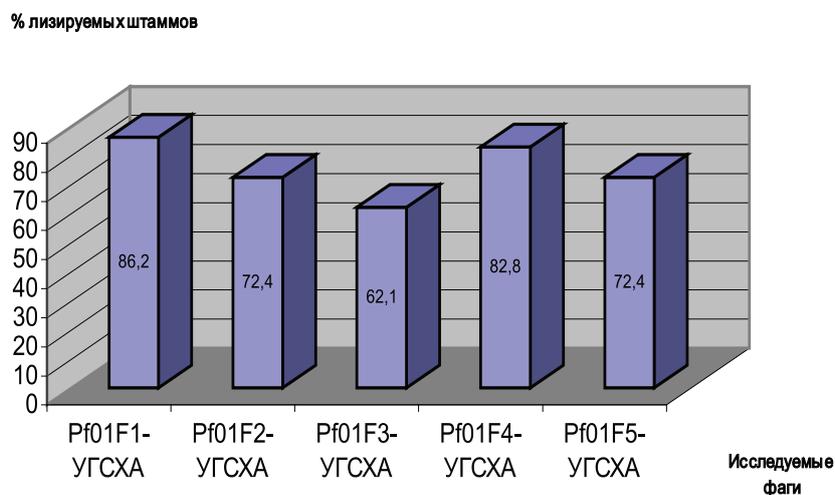


Рис. 1. Спектр литической активности выделенных бактериофагов.

#### Основные биологические свойства выделенных бактериофагов *P. fluorescens*

Свойства	Штаммы бактериофагов <i>P. fluorescens</i>				
	Pf01F1-УГСХА	Pf01F2-УГСХА	Pf01F3-УГСХА	Pf01F4-УГСХА	Pf01F5-УГСХА
Специфичность	Р. фл.	Р. фл.	Р. фл.	Р. фл.	Р. фл.
Диаметр негативных колоний	1 мм	0,5 мм	0,5 мм	2 мм	1 мм
Литическая активность по Грациа, БОЕ/мл	$0,7(\pm 0,1) \cdot 10^8$	$1,2(\pm 0,4) \cdot 10^7$	$0,3(\pm 0,2) \cdot 10^8$	$0,2(\pm 0,1) \cdot 10^9$	$1,5(\pm 0,3) \cdot 10^8$
Спектр литической активности	86,2%	72,4%	62,1%	82,8%	72,4%

Из результатов исследования нами сделан вывод, что штамм бактериофага Pf01F1-УГСХА обладает всеми необходимыми для проведения фагоидентификации и фагодетекции свойствами: титр бактериофага  $0,7(\pm 0,1) \cdot 10^8$  БОЕ/мл, спектр литической активности 86,2%, специфичность по отношению к бактерии *P. fluorescens*.

Для проведения фагоидентификации использовали спот-тест [8]. При положительной реакции фагоидентификации на сплошном бактериальном газоне в местах нанесения суспензии бактериофага Pf01F1-УГСХА обнаруживались зоны лизиса (рис. 2). Предложенный метод фагоидентификации с применением суспензии бактериофага Pf01F1-УГСХА отличается простотой выполнения, высокой чувствительностью, специфичностью, скоростью исследования. Недостатком, как и при выполнении классических бактериологических исследований, является необходимость получения чистой культуры исследуемого бактериального штамма.

В результате серии дальнейших исследований была разработана схема фагодетекции методом реакции нарастания титра

фага (РНФ) с использованием бактериофага Pf01F1-УГСХА, представленная на рис. 3.

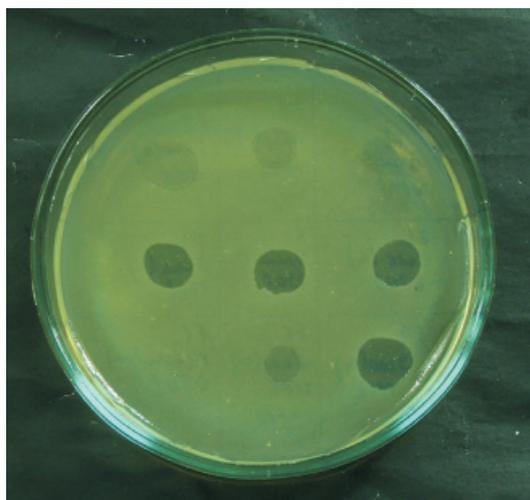


Рис. 2. Фагоидентификация бактерий *P. fluorescens* методом спот-теста (с фагами *P. putida* Psp1-УГСХА, Psp6-УГСХА, Psp101-УГСХА, *P. fluorescens* Pf01F1-УГСХА, Pf01F2-УГСХА, Pf01F3-УГСХА, Pf01F4-УГСХА, Pf01F5-УГСХА, *P. aeruginosa* F4-УГСХА).

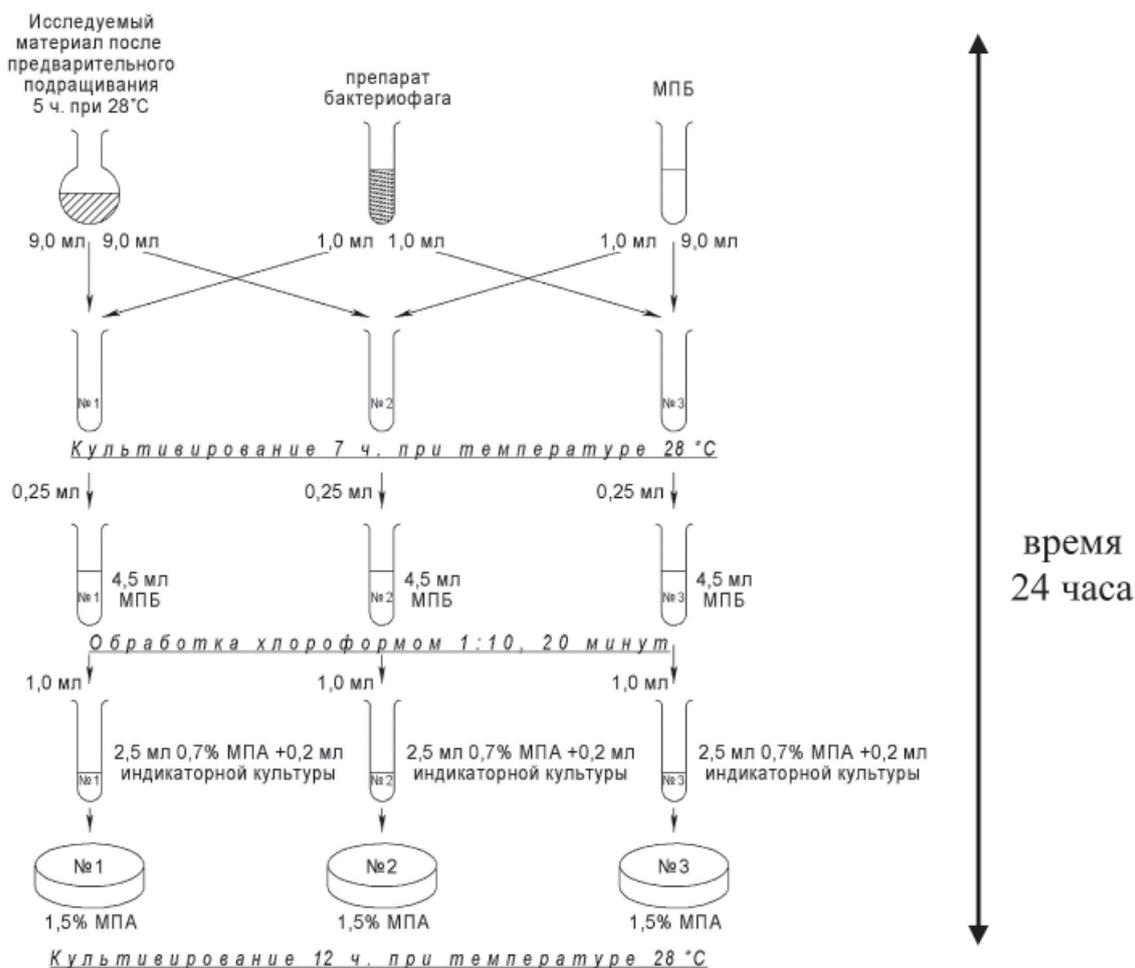


Рис. 3. Схема фагодетекции *P. fluorescens* (пояснения по тексту)

Для проведения фагодетекции исследуемый материал (образцы прудовой воды, гомогенизированный патологический материал от рыб, гомогенизированные образцы клинически здоровой рыбы) 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 28°C для предварительного подращивания искомого бактериальной микрофлоры. На каждую исследуемую пробу отводится три пробирки: № 1 – опытная проба, № 2 – контроль на свободный фаг, № 3 – контроль титра индикаторного фага. Исследуемый материал разливается по 9 мл в пробирки № 1 и № 2, пробирка № 3 содержит 9 мл МПБ. В пробирки № 1 и № 3 добавляется по 1 мл препарата бактериофага Pf01F1-УГСХА в рабочем разведении (титр бактериофага 10<sup>4</sup>), а пробирки № 2 – 1 мл МПБ. Все пробы инкубируются в термостате при температуре 28°C на протяжении 7 часов. После инкубации из пробирок берутся пробы по 0,25 мл, вносятся в пробирки с 4,5 мл стерильного МПБ и обрабатываются фильтрованием через бактериальные фильтры с диаметром пор 0,2 мкм (Millipore – Millivac). Далее содержимое пробирок исследуется методом агаровых слоев по Грациа. Чашки инкубируются 12 часов при 28°C.

Реакция считается положительной при нарастании титра бактериофага Pf01F1-УГСХА в 5 и более раз [2, 5, 8].

**Выводы:** разработанные схемы с использованием бактериофага Pf01F1-УГСХА позволяют проводить фагоидентификацию *P. fluorescens* после выделения чистой культуры и фагодетекцию в различных объектах без выделения чистой культуры при количестве клеток *P. fluorescens* от 10<sup>3</sup> к.о.е./мл. Продолжительность фагоидентификации – 12–18 часов, продолжительность фагодетекции – 24 часа.

#### Список литературы

1. Васильев Д.А. Выделение бактериофагов бактерий *Pseudomonas putida* и их селекция в целях создания биопрепарата для диагностики псевдомоноза рыб / Д.А. Васильев, Д.А. Виктор, И.И. Богданов // Естественные и технические науки. – 2011. – № 2(52). – С. 79–82.
2. Васильева Ю.Б. Разработка методов фагодиагностики бордетеллэза // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – Ульяновск: Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия им. П.А. Столыпина, 2013. – № 2. – С. 51–55.
3. Виктор Д.А. Выделение и изучение биологических свойств бактерий *Pseudomonas fluorescens* / Д.А. Виктор, А.М. Артамонов, Д.А. Васильев // Ветеринария и кормление. – М.: «ВЕТКОРМ», 2012. – № 5. – С. 8–9.
4. Вялова Г.П. Методы борьбы и профилактики псевдомоноза молоди горбуши / Г.П. Вялова, А.В. Полтева, З.К. Шкуркина // Информ. листок СахЦНТИ. – 1995. – № 38–95. – С. 4.
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. Зуева Л.П. Бактериофаги – факторы эволюции госпитальных штаммов и средства борьбы с инфекциями / Л.П. Зуева, Б.И. Асланов, А.А. Долгий, А.Е. Гончаров, А.И. Архангельский // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. – 2012. – № 1. – С. 9–13.
7. Инструкция о мероприятиях по профилактике и ликвидации псевдомоноза рыб, Минсельхозпрод России, Департамент ветеринарии, 1998.
8. 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.
9. Методические указания по лабораторной диагностике псевдомонозов рыб, Минсельхозпрод России, Департамент ветеринарии, 1998.
10. Смирнов В.В., Киприанова Е.А. Бактерии рода *Pseudomonas*. – Киев. Наукова думка, 1990. – С. 176–187.
11. Krylov V. Myoviridae bacteriophages of *Pseudomonas aeruginosa*: a long and complex evolutionary pathway // Res Microbiol. – 2003. – Vol. 154. – P. 69–75.

#### References

1. Vasil'ev D.A. Vydelenie bakteriofagov bakterij *Pseudomonas putida* i ih selekcija v celjah sozdaniya biopreparata dlja diagnostiki pсевдомоноза ryb / D.A. Vasil'ev, D.A. Viktorov, I.I. Bogdanov // Estestvennye i tehicheskie nauki. 2011. no. 2(52). pp. 79–82.
2. Vasil'eva Ju.B. Razrabotka metodov fagodiagnostiki bordetelljoza / Ju.B. Vasil'eva // Vestnik ul'janovskoj gosudarstvennoj sel'skoxozhajstvennoj akademii. Ul'janovsk: Ul'janovskaja gosudarstvennaja sel'skoxozhajstvennaja akademija im. P.A. Stolypina, 2013. no. 2. pp. 51–55.
3. Viktorov D.A. Vydelenie i izuchenie biologicheskikh svojstv bakteriofagov *Pseudomonas fluorescens* / D.A. Viktorov, A.M. Artamonov, D.A. Vasil'ev // Veterinarija i kormlenie. Moskva: «VETKORM», 2012. no. 5. pp. 8–9.
4. Vjalova G.P. Metody bor'by i profilaktiki pсевдомоноза molodi gorbushi / G.P. Vjalova, A.V. Polteva, Z.K. Shkurina // Inform. listok SahCNTI. 1995. no. 38–95. pp. 4.
5. Zolotuhin S.N. Sozdanie i razrabotka shem primeneniya diagnosticheskikh biopreparatov na osnove vydelennyh i izuchennyh bakteriofagov jenterobakterij / S.N. Zolotuhin // Avtoref. dis. ... d-ra biol. nauk. Ul'janovsk, 2007. 39 p.
6. Zueva L.P. Bakteriofagi faktory jevoljucii gosital'nyh shtammov i sredstva bor'by s infekcijami / L.P. Zueva, B.I. Aslanov, A.A. Dolgij, A.E. Goncharov, A.I. Arhangel'skij // Jepidemiologija i infekcionnye bolezni. Aktual'nye voprosy. 2012. no. 1. pp. 9–13.
7. Instrukcija o meroprijatijah po profilaktike i likvidacii pсевдомоноза ryb, Minsel'hozprod Rossii, Departament veterinarii, 1998.
8. Katter Je. Bakteriofagi : biologija i prakticheskoe primenienie / Je. Katter, A. Sulakvelidze; per. s angl.: kolektiv per.; nauch. red. rus. izd. A.V. Letarov. Moskva: Nauchnyj mir, 2012. 636 p.
9. Metodicheskie ukazanija po laboratornoj diagnostike pсевдомонозов ryb, Minsel'hozprod Rossii, Departament veterinarii, 1998.
10. Smirnov V.V., Kiprianova E.A. Bakterii roda *Pseudomonas*. Kiev. Naukova dumka, 1990. pp. 176–187.
11. Krylov V. Myoviridae bacteriophages of *Pseudomonas aeruginosa*: a long and complex evolutionary pathway / V. Krylov // Res Microbiol. 2003. Vol. 154. pp. 69–75.

#### Рецензенты:

Нафеев А.А., д.м.н., заведующий отделением особо опасных инфекций, природно-очаговых инфекций и профилактики туберкулеза, ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ульяновской области», г. Ульяновск;

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.