

**БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БАКТЕРИОФАГОВ, АКТИВНЫХ ПО ОТНОШЕНИЮ К БАКТЕРИЯМ*****PSEUDOMONAS FLUORESCENS* И *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*****А.Э. Эльхедми, В.П. Курченко\*, Т.В. Буткевич\*, С.В. Ризевский\*, В.Н. Леонтьев***Белорусский государственный технологический университет, Минск, Республика Беларусь**\*Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь**e-mail: leontiev@bstu.unibel.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]. В настоящее время ведутся интенсивные исследования возможности использования фагов для снижения контаминации пищевых продуктов патогенными бактериями.

В одной из первых публикаций, в которой тестируется способность фагов продлевать срока хранения продуктов показано, что специфичные к *P. fragi* бактериофаги, выделенные из говядины снизили число *P. fragi* в охлажденном сыром молоке и продлили срок его хранения [6]. Позднее способность фагов препятствовать гниению мяса была доказана на примере *B. thermosphacta*, который вызывает неприятный запах в испорченной свинине [7]. Обработка свинины фагами приводила к увеличению сроков ее хранения с 4 до 8 дней, за счет литической способности фагов [7]. Похожие результаты были получены для бифштексов; например, нанесение специфичных фагов *Pseudomonas* почти вдвое увеличило их срок хранения [8]. Недавно было опубликовано лабораторное подтверждение ценности нанесения фага на кожу цыплят для снижения бактериальной контаминации [9]. Авторы показали, что нанесение специфичных к *C. jejuni* фагов на кожу цыплят, экспериментально зараженных бактериями, приводило к снижению в 10–100 раз численности контаминирующих бактерий.

Учитывая значительную распространенность и циркуляцию в природе *Pseudomonas*, большое внимание уделяется обнаружению этих микроорганизмов в пищевых продуктах. 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]. Бактерии *P. fluorescens* и *P. aeruginosa* – психрофильные, облигатно-аэробные микроорганизмы, способные размножаться в продуктах при хранении в холодильных камерах. Эти бактерии выделяют активные ферменты, расщепляющие белки и липиды. Являются антагонистами многих бактерий и плесени.

Актуальной задачей является расширение коллекции бактериофагов, способных лизировать бактерии, вызывающие порчу продуктов и исследование их биологических свойств. Поиск экологически чистых путей деконтаминации пищевых продуктов с использованием различных фагов позволит увеличить срок их хранения и уменьшить порчу.

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

**Методы исследования**

1. Выделение фагов из культур бактерий.

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. Полученный материал гомогенизировали в 10 мл физиологического раствора и осаждали клетки и грубые частицы центрифугированием при  $6000 \text{ мин}^{-1}$  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  $37^\circ\text{C}$  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  $30^\circ\text{C}$ . Оценку результатов проводили через 24–48 ч по обнаружению зон лизиса и негативных колоний.

## 2. Исследование состава белков выделенных фагов.

Для поведения исследования навеску лиофильно высушенных исследуемых образцов бактериофагов смешивали с 1,5 М трис-буфером pH 8,8, раствором бромфенолового синего и диссоциирующей смеси. Герметично закрытые пробирки с образцами инкубировали при  $100^\circ\text{C}$  в течение 20 мин.

ДСН-электрофорез проводили в 12,7% разделяющем акриламидном геле. В качестве фокусирующего геля для электрофореза применяли 5% акриламидный гель. При проведении разделения в денатурирующих условиях разделяющий и фокусирующий гели дополнительно содержали ДСН. Электрофоретическую ячейку заполняли трис-глициновым электродным буфером с ДСН, pH 8,3. Разделение белков проводили при  $18\text{--}20^\circ\text{C}$ , силе тока – 16 мА. Продолжительность разделения составляла 2,5 ч.

По окончании электрофореза фиксировали белки 30% трихлоруксусной кислотой. Окрашивали раствором кумасси G 250 и промывали уксусной кислотой до исчезновения синего фона. Полученные гели сканировали. Молекулярную массу белков, входящих в фаги, определяли по калибровочному графику, построенному по белковым стандартам молекулярных масс (BIO-RAD, США). Представленные в статье дендрограммы получены в результате кластерного анализа в программе «Statistika 7».

## Результаты и обсуждение

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 1).

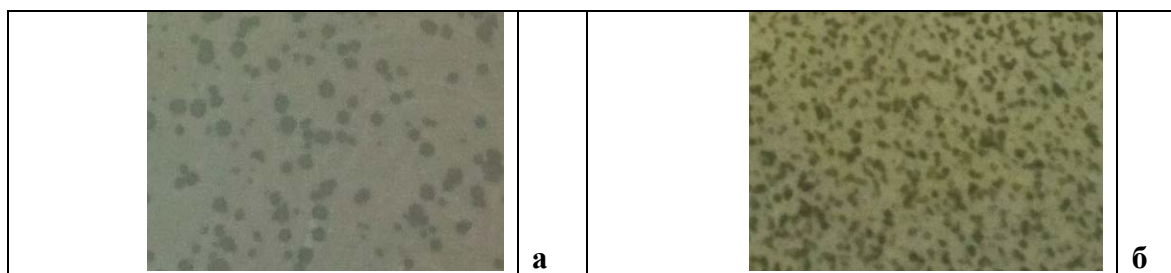


Рисунок 1 – Морфология негативных колоний фагов BV-25 (а) и BV-55 (б)

В таблице 1 представлены результаты определения урожая и титра выделенных бактериофагов.

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

Бактериофаги BV-4, BV-5, BV-55, BV-71, BV-12, BV-23, BV-25, BV-57 поливалентны, так как лизируют не только штаммы, из которых они выделены, но и другие бактерии (таблица 3).

Таблица 3 – Специфичность бактериофагов

№ п/п	Вид бактерий	BV-4	BV-5	BV-55	BV-71	BV-12	BV-23	BV-25	BV-57
1	<i>P.aeruginosa 224Me-4</i> из мяса птицы	-	-	-	-	-	+	+	+
2	<i>P.aeruginos-410Fi-7</i> из рыбы толстолобика	-	-	-	-	+	+	+	+
3	<i>P. aeruginosa-150 Gi-5</i> из жабер карпа	-	-	+	-	+	+	+	+
4	<i>P. fluorescens-112Gi-1</i> из жабер скумбрии	+	-	+	+	-	-	+	-
5	<i>P. fluorescens-311Mi-1</i> из молока	-	-	-	-	-	+	-	-
6	<i>P. fluorescens-320Mi-2</i> из молока	-	+	+	+	-	-	+	-
7	<i>P. fluorescens-130Gi-2</i> из жабер скумбрии	+	-	-	-	-	-	-	-
8	<i>P. fluorescens-220Me-2</i> из мяса говядина	-	+	+	-	-	+	-	-
9	<i>P. fluorescens-222Me-3</i> из мяса говядины	+	+	-	+	-	-	-	-
10	<i>Azotobacter</i>	-	-	+	+	-	+	+	-
11	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-	+	-

Примечание: « - »- отсутствие лизиса, « + »- наличие лизиса культуры

Для анализа результатов исследования специфичности бактериофагов по отношению к бактериям, из которых они выделены (таблица 3), был использован кластерный анализ. На рисунке 2 представлены результаты кластерного анализа встречаемости исследованных фагов в различных бактериях.

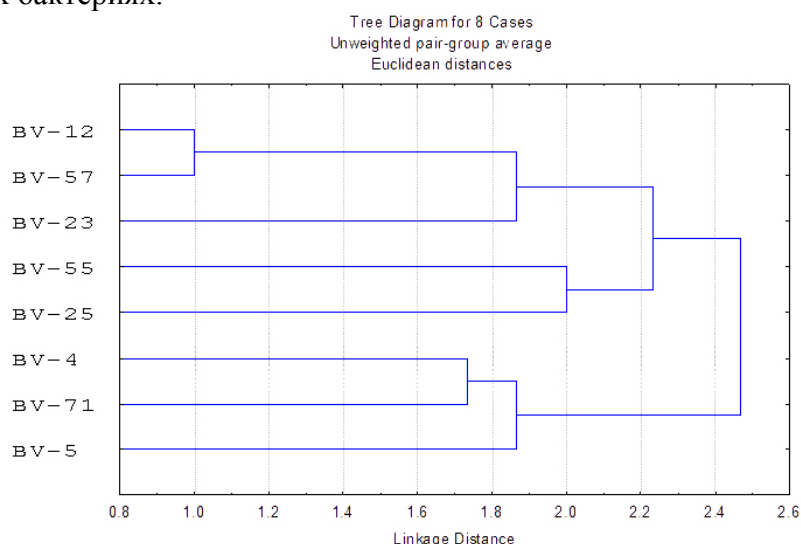


Рисунок 2 – Дендрограмма сходства фагов по их наличию в различных видах бактерий

Кластер, который образуют фаги BV-12 и BV-57, отличается близостью их содержания только в бактериях *P. aeruginosa-150 Gi-5*, *P.aeruginos-410 Fi-7*, *P.aeruginosa-224 Me-4*, которые были выделены из мяса рыбы и птицы. Эти фаги обладают узким спектром действия и лизируют только один вид бактерии – *P. aeruginosa*, из которого они были выделены (таблица 2).

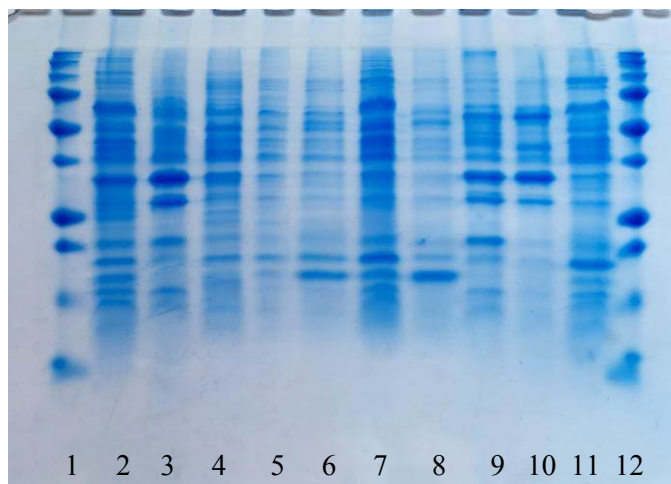
Второй ярко выраженный кластер образуют фаги-космополиты BV-55 и BV-25, которые активны по отношению к бактериям *P. fluorescens-112Gi-1*, *P. fluorescens-320Mi-2*, *P. fluorescens-130Gi-2*, *P. aeruginosa-224Me-4*, *P. aeruginosa-410Fi-7*, *P. aeruginosa-150 Gi-5*, *Escherichia coli*, *Azotobacter*. Они поливалентны, так как эффективно лизировали другие штаммы бактерий, кроме тех, из которых они были выделены.

Третью группу образуют фаги BV-4, BV-5, BV-71, выделенные из *P. fluorescens-112Gi-1*, *P. fluorescens-130Gi-2*, *P. fluorescens-220Me-2*, *P. fluorescens-222Me-3*, *P. fluorescens-320Mi-2*, *Azotobacter*. Они характеризуются низким уровнем литической активности и поливалентностью к *P. fluorescens-112*, *130*, *311*, *P. fluorescens-320*, *220*, *222*, *P. fluorescens-112*, *320*, *222*.

Биологические отличия исследованных фагов определяются особенностями их строения. В связи с этим, исследован состав белков, входящих в фаги BV-4, BV-5, BV-55, BV-71, BV-12, BV-23, BV-25, BV-57. На рисунке 3 представлена электрофорреграмма белков, содержащихся в исследуемых фагах. Для основных белков, содержащиеся в значительных количествах были определены их молекулярные массы (таблица 4). Анализ результатов показывает, что для всех фагов характерно наличие белков с молекулярными массами 68, 49, 41, 35, 28, 17 кДа. Часть фагов содержат белки с молекулярной массой 79 и 54 кДа. Эти белки в таблице 4 отмеченные жирным шрифтом являются структурообразующими для всех исследованных фагов.

Таблица 4 – Молекулярные массы основных белков исследуемых бактериофагов

Молекулярная масса, кДа в фагах							
BV-12	BV-4	BV-25	BV-23	BV-57	BV-55	BV-5	BV-71
102							
91	91						
83	83	83					
82	82						
<b>79</b>	<b>79</b>	<b>79</b>	<b>79</b>	<b>79</b>	<b>79</b>		
72		72		72			
<b>68</b>	<b>68</b>	<b>68</b>	<b>68</b>	<b>68</b>	<b>68</b>	<b>68</b>	<b>68</b>
		63		63	63	63	
57	57				57		57
<b>54</b>	<b>54</b>	<b>54</b>	<b>54</b>	<b>54</b>	<b>54</b>	<b>54</b>	
<b>49</b>	<b>49</b>	<b>49</b>	<b>49</b>	<b>49</b>	<b>49</b>	<b>49</b>	<b>49</b>
46		46				46	
45		45					
<b>41</b>	<b>41</b>	<b>41</b>	<b>41</b>	<b>41</b>	<b>41</b>	<b>41</b>	<b>41</b>
<b>35</b>	<b>35</b>	<b>35</b>	<b>35</b>	<b>35</b>	<b>35</b>	<b>35</b>	<b>35</b>
	33	33					33
30		30	30				30
<b>28</b>	<b>28</b>	<b>28</b>	<b>28</b>	<b>28</b>	<b>28</b>	<b>28</b>	<b>28</b>
<b>17</b>	<b>17</b>	<b>17</b>	<b>17</b>	<b>17</b>	<b>17</b>	<b>17</b>	<b>17</b>
15	15				15	15	
13	13		13				13
12		12					12



1 – Стандарт молекулярных масс, 2 – BV-12, 3 – BV-23, 4 – BV-25, 5 – BV-57, 6 – BV-55, 7 – BV-4, 8 – BV-5, 9 – BV-71, 10 – BV-22, 11 – BV-34, 12 – Стандарт молекулярных масс  
Рисунок 3 – Электрофореграмма белков, содержащихся в исследуемых образцах.

Необходимо отметить, что состав белков входящих в различные фаги специфичен для каждого из них и может быть использован для идентификации.

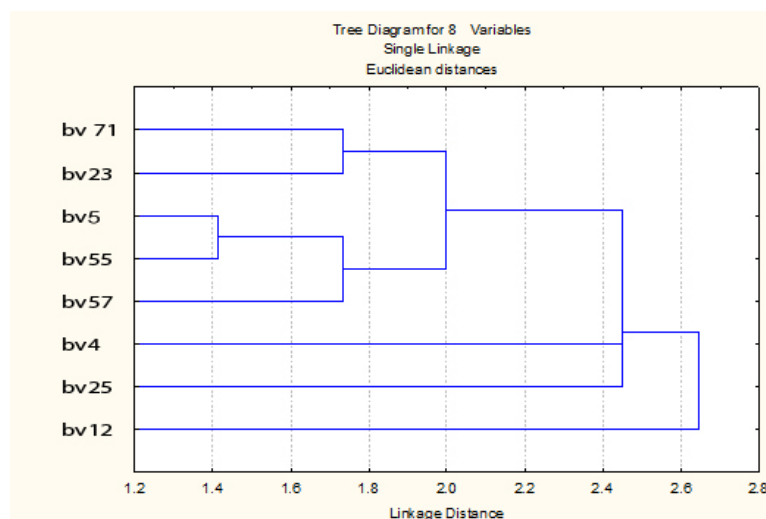


Рисунок 4 – Дендрограмма сходства фагов по наличию в них различающихся белков

Анализ исследования состава белков различных фагов с использованием кластерного анализа показал, что фаги BV-12, BV-25 и BV-4 образуют кластер с наибольшим количеством белков, входящих в их структуру. Фаги BV-57, BV-55, BV-5 образуют кластер благодаря наличию нескольких белков различающихся молекулярными массами. Для фагов BV-23 и BV-71 различие сводится к наличию низкомолекулярных белков.

#### Выводы

Таким образом, из бактерий *P. fluorescens* и *P. aeruginosa*, вызывающих порчу рыбы, мяса и молока было выделено 8 изолятов бактериофагов.

Фаги BV-12 и BV-57, выделенные из мяса рыбы и птицы отличаются близостью их инфицирования только бактерий *P. aeruginosa-150 Gi-5*, *P. aeruginosa-410 Fi-7*, *P. aeruginosa-224 Me-4*. Эти фаги обладают узким спектром действия и лизируют только один вид бактерии – *P. aeruginosa*, из которого они были выделены. Для фагов BV-4, BV-5, BV-71, выделенных из *P. fluorescens-112Gi-1*, *P. fluorescens-130Gi-2*, *P. fluorescens-220Me-2*, *P. fluorescens-222Me-3*, *P. fluorescens-320Mi-2*, *Azotobacter*. характерен низкий уровень литической активности и поливалентности к *P. fluorescens-112*, *130*, *311*, *P. fluorescens-320*, *220*, *222*, *P. fluorescens-112*, *320*, *222*. Фаги-космополиты BV-55 и BV-25 активны по

отношению к бактериям *P. fluorescens-112Gi-1*, *P. fluorescens-320Mi-2*, *P. fluorescens-130Gi-2*, *P. aeruginosa-224Me-4*, *P. aeruginosa-410Fi-7*, *P. aeruginosa-150 Gi-5*, *Escherichia coli*, *Azotobacter*. Они поливалентны, так как эффективно лизировали другие штаммы бактерий, кроме тех, из которых они были выделены. Их отобрали с целью дальнейшего исследования и создания биопрепарата, предотвращающего развитие бактерий рода *Pseudomonas*, которые вызывают порчу пищевых продуктов.

#### 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.

#### **BIOLOGICAL PROPERTIES OF BACTERIOPHAGES ACTIVE AGAINST *PSEUDOMONAS FLUORESCENS* И *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* BACTERIA**

**A.E. Elhemedi, V.P. Kurchenko\*, T.V. Butkevich\*, S.V. Rizevsky\*, V.N. Leontiev**

*Belarusian State Technological University, Minsk, Belarus*

*\*Belarusian State University, Minsk, Belarus*

*e-mail: leontiev@bstu.unibel.by*

Eight isolates of bacteriophages were isolated from bacteria *P. fluorescens* and *P. aeruginosa*. It is established that the phages BV-12 and BV-57 have a narrow spectrum of action and only one kind of lysed bacteria – *P. aeruginosa*, from which they were isolated. Phages BV-4, BV-5, BV-71 infecte *P. fluorescens* bacteria, but have a low level of lytic activity. Most broad spectrum of lytic activity against studied cultures strains was possessed by cosmopolitan phages BV-25 and BV-55. They were selected for further research for the development of a biological product, which prevents the growth of bacteria of *Pseudomonas* genus, responsible for spoilage of fish, milk and meat.