

Введение В 1896 году английский бактериолог Ernest Hankin сообщил, что воды рек Ганга и Джамна в Индии обладают значительной антибактериальной активностью [1], спустя год феномен лизиса бактерий под действием перевиваемого агента наблюдал российский ученый Николай Федорович Гамалея; в 1917 г французско-канадский микробиолог d'Herelle установил, что этот феномен связан с деятельностью вирусов бактерий - бактериофагами. [2]. В настоящее время для уничтожения возбудителей инфекционных заболеваний основными терапевтическими агентами являются антибиотики. Разработка нового препарата антибиотика, его клинические испытания и регистрация занимают многие годы и обходятся в огромные суммы, при этом массовое использование антибиотиков приводит к возникновению множественной лекарственной устойчивости бактериальных штаммов. В сложившейся ситуации достойную альтернативу антибиотикам в терапии множества заболеваний бактериального происхождения способны составить бактериофаги - вирусы, избирательно поражающие конкретный бактериальный род, вид или штамм [3]. Антибактериальный эффект препаратов бактериофагов заключается в том, что генома фага внедряется в бактериальную клетку с последующим лизисом инфицированной клетки вследствие размножения фага. Вышедшие во внешнюю среду в результате лизиса бактериофаги повторно инфицируют и лизируют другие бактериальные клетки, действуя до полного уничтожения патогенных бактерий в очаге воспаления. Бактериофаги широко применялись для лечения инфекционных заболеваний с 20-х гг. XX в. как в СССР, так и в зарубежных странах. Однако с 40-50-х гг. производство и применение фагов на Западе прекратилось вследствие начала активного применения антибиотиков, которые, на первый взгляд, действовали эффективнее. Препараты бактериофагов на сегодняшний день производятся в основном в России, Грузии и Польше. Фаговая терапия сейчас в основном проводится в стран СНГ и восточной Европы [4]. Последние данные свидетельствуют о возобновлении интереса к фаготерапии, поэтому предпринимаются усилия, направленные на возрождение практики использования препаратов бактериофагов в Франции, Германии, Великобритании, США [4, 5]. В 80-х гг. в США и западных странах вновь возрос интерес к фаготерапии: в 1996 и 1997 гг. были опубликованы обзоры работ о применении фаготерапии на животных [6; 7]. Недавно была подтверждена возможность использования генетически модифицированных бактериофагов, конъюгированных с лекарственными препаратами, для таргетной элиминации раковых клеток. Генетически модифицированный фаг избирательно связывался с определенным рецептором клетки-хозяина и доставлял к клеткам цитотоксический препарат [8]. Коллекции бактериофагов в России, и в частности, в республике Татарстан, по сравнению с Грузией, практически отсутствуют. Чтобы экспериментально определить антибактериальное действие того или иного бактериофага в качестве

альтернативы антибиотикам, необходимо иметь обширную коллекцию вирусов бактерий. Бактериофаги можно также использовать для фаготипирования – идентификации штаммов микробов с помощью определения спектра чувствительности к специфическому набору фагов. Эта методика обладает значимостью ввиду высокой специфичности многих фагов в отношении их хозяев и по-прежнему широко используется во всем мире [9]. Таким образом, целью данной работы было выделение бактериофагов, специфичных к определенным штаммам бактерий, из различных природных экологических ниш республики Татарстан. Материалы и методы исследования Материалы В работе в качестве индикаторных культур использовали штаммы *Serratia marcescens* B, *Morganella* sp., *Providencia stuartii*, *Bacillus subtilis* 9A, *Pseudomonas stutzeri*, *Micrococcus luteus* и *Salmonella typhimurium* TA из коллекции микроорганизмов кафедры микробиологии КФУ. Источником для выделения вирусов бактерий служили почвы: черноземная (из села «Куркачи», Высокогорского района и села «Борискино», Альметьевского района РТ), лесная, полевая (с. «Борискино»), городская без особых загрязнений, городская, загрязненная нефтью (из города Альметьевск, Альметьевского района); а также вода пруда (с. «Борискино»). Питательные среды Для культивирования и получения инокулята индикаторных штаммов бактерий, а также получения вирусных суспензий использовали среду МПБ (мясо-пептонный бульон) («ГНЦ ПМ», Россия) содержащую гидролизат рыбной муки - 18 г/л, NaCl – 2 г/л, pH 7.2, и среду LB (Лурия-Бертани) содержащую триптон («Ferak», Германия) - 10 г/л, NaCl («Лабтех», Россия) - 10 г/л, и дрожжевой экстракт («Хеликон», Россия) -5 г/л. Для выявления фагов в суспензии использовали плотные среды: L-агар, содержащий 1.5% агар-агара («Ferak», Германия) в LB, либо в МПБ. В качестве верхнего полужидкого агара использовали 0.7% агар-агар. Условия культивирования Культивирование бактерий и фагов проводили в течение 24 ч при 37°C с принудительной аэрацией на вибростенде (Multitron Standard, Швейцария) при 200 об/мин. Инокулят выращивали в течение 12 ч в жидкой среде LB или МПБ в идентичных условиях культивирования. Отбор фагосодержащих образцов Сбор вирусосодержащего материала образцов проводили в стерильных условиях с использованием стерильных инструментов (перчатки, контейнер, чашки, скальпель и т.д.). Почвенные образцы получили из выбранных источников с глубины 10 см от поверхности верхнего слоя почвы. Образец воды забирали из водоема на глубине 10 см. Все образцы транспортировали и хранили в холодном и темном месте с защитой от прямых солнечных или лабораторных ультрафиолетовых лучей. Получение вирусов бактерий в лабораторных условиях из образцов почвы и воды К 200 мкг почвенного образца, либо к 200 мкл исследуемой воды добавляли 700 мкл заранее приготовленного инокулята конкретного индикаторного штамма и 2 мл жидкой питательной среды. Для обеспечения инфицированности бактерий вирусами и репродукции новых

дочерних вирусных частиц смесь культивировали в течении 24 ч при 37°C с аэрацией. Далее смесь центрифугировали в течение 30 мин при 3000 об/мин (Orto Alresa, Испания). Супернатант отфильтровали через стерильные бумажные фильтры и помещали в микропробирку, прогревали в термостате при 65°C в течении 30 мин., а затем обрабатывали хлороформом (50 мкл на 1мл суспензии), осторожно встряхивая в течение 1 мин. Полученную суспензию, предположительно содержащую вирусы, хранили в холодильнике при 4°C. Наличие фагов подтверждали модифицированным методом Фишера, а затем методом Грациа [10, 11]. Метод выделения выявленных фагов из агаризованной среды Предварительно отмеченные на чашке зоны лизиса бактерий фагами вырезали стерильным шпателем и помещали в стерильную пробирку, добавляя 700 мкл инокулята штамма бактерий, лизис которого позволил выявить фаг, и 2-10 мл жидкой среды Полученную смесь выращивали в течение 24 ч., центрифугировали 15 мин при 12000 об/мин (Orto Alresa, Испания). Для освобождения смеси от бактерий в стерильных условиях надосадочную жидкость пропускали через микрофильтр диаметром пор 0.45 мкм. Полученную суспензию фагов хранили при 4°C. Содержание фагов в растворе определяли методом Грациа. Определение титра фагов методом Грациа 50 мкл 12-часовой индикаторной культуры и 100 мкл суспензии фага вносили в 3 мл 0.7 % агар, подогретый до 45°C, и наслаивали на заранее приготовленные чашки Петри с 20 мл твердого L- агара или МПА, оставляя на ровной поверхности до застывания верхнего агара. Затем чашки помещали в термостат на 16-18 ч и контролировали появление стерильных зон. Количество фаговых частиц высчитывали по формуле: $N = n / (D \times V)$, где, N – количество вирусных частиц в 1 мл исследуемого материала; n – количество негативных колоний на чашку; D – кратность разведения; V – объем высеваемой пробы, мл. Модифицированный метод (1) определения вирусов бактерий Суспензии фагов делили в две части – контрольный и опытный варианты. Контрольный вариант прогревали до 100°C в течении 30 мин, опытный вариант не обрабатывали. Разводили варианты от 10⁻¹ до 10⁻⁴ раз. 0.7 мл инокулята индикаторных бактерий добавляли в 3 мл 0.7% L- агара или МПА, смесь наслаивали на твердую среду и оставляли при комнатной температуре для застывания на 1 час. Чашку условно делили на 4 сектора и добавляли по 3-10 мкл суспензии фага из контрольного и опытного варианта в 3 повторностях на каждое разведение. Чашки инкубировали при 37°C 12 часов. Модифицированный метод (2) определения вирусов бактерий Заранее приготовленный инокулят разводили в 10 раз, измеряли оптическую плотность при длины волны 590 нм на фотоэлектроколориметре (КФК-2, Россия) и выращивали до ОП₅₉₀ = 0.8-1.0. 250 мкл инокулята добавляли в 3 мл 0.7% L- агара при температуре 45°C, смесь наслаивали в чашку на твердую среду, давали агару застыть и затем добавляли суспензию фага, как описано в предыдущем разделе. Проверка наличия умеренного фага в геноме бактерий

Наличие фага в геноме бактерий выявляли по индукции умеренного фага ультрафиолетовым облучением, либо температурной обработкой культуры при 45°C. В первом случае культуру перенесли в стерильную чашку Петри и облучили 10 мин на расстоянии 10 см от ультрафиолетовой лампы мощностью 24 Вт (Vilber Lourformat, Франция). Во втором случае культуру прогревали в темноте 10 мин при 45°C, после чего охлаждали до 37°C. Клетки бактерий (1/5 часть исходного количества) суспензировали в 10 мл L-бульона или МПБ, переносили в стерильную колбу и аэрировали 1.5 ч при 37° С. Затем при встряхивании добавляли хлороформ (50 мкл на 1 мл суспензии). В убитой данной обработкой культуре бактерий определили титр фага по методу Грациа, используя в качестве тест-культуры индикаторные штаммы. Результаты и обсуждение

Вирусы бактерий играют огромную роль в природе, сельском хозяйстве, растениеводстве, животноводстве, в круговороте природных неорганических и органических химических веществ, добыче нефти, газа и полезных ископаемых, контролируя общее и видовое количество бактерий. В настоящее время бактериофаги благодаря своим разрушительным способностям в отношении тех или иных бактерий применяются в промышленности, например, в пищевом производстве [12]. Фаготерапия получила распространение в медицине при лечении раневых, ожоговых инфекций, остеомиелита, а также дизентерии, холеры и др [13]. Фаготипирование используют для простого, быстрого и экономичного определения родов и видов бактерий. Прокариоты Бактерии и Археи являются самими многочисленными организмами в мире, их количество на земле достигает 4-6 x 10³⁰ клеток [14]. Среди этих организмов существуют значительное число бактерий, вызывающих разнообразные заболевания человека со смертельным исходом. Например, в 2011 году в мире только от инфекции *Mycobacterium tuberculosis* умерло 1.4 миллиона человек [www.who.int]. На протяжении последних 60 лет в борьбе за выживание и спасение человека от вредных бактерий антибиотики играли огромную роль. Однако, со временем почти все патогенные бактерии приобретают устойчивость к одному или нескольким антибиотикам, в результате только из-за бактерий, устойчивых к нескольким антибиотикам, в странах ЕС ежегодно умирают 25000 человек и ежегодно впустую тратится 1.5 млрд.евро [15, 16, 17, 18, 19]. Вирусы бактерий, количество которых намного превышает общее количество бактерий, могут стать отличным специфичным инструментом в борьбе против бактериальных инфекций, так как при этом ни один из них не вреден для здорового человека. Большое количество этих вирусов находится в природе - в почве, в воде, в кишечнике и тех же местах, где есть бактерии [20]. Однако, выделение бактериофагов нуждается в новых эффективных методах. Разработанный в данной работе метод необходим для создания коллекции бактериофагов, которые в дальнейшем могут быть использованы в медицине биотехнологии. В данном исследовании большое количество вирусов бактерий было получено из

чернозема, лесной и полевой почвы. В работе удалось получить вирусы *Bacillus subtilis* из всех исследуемых образцов почвы и воды, а вирусы *Salmonella* - из всех почвенных образцов (таблица). В воде количество вирусов бактерий было намного меньше, чем в почвенных образцах, и они были обнаружены только для рода *Bacillus*. В исследовании были использованы также другие индикаторные штаммы грамотрицательные бактерии рода *Proteus* (*P. mirabilis* 4, *P. Mirabilis* M), *S.marcescens* 41 и *Citrobacter amalonaticus*, однако в исследованных образцах почв и воды бактериофаги этих бактерий обнаружены не были. Это означает, что в конкретном регионе и конкретной почве не всегда найдутся бактериофаги всех штаммов бактерий, по этой причине создание коллекции бактериофагов является трудоемкой работой и требует времени. По сравнению с чистой городской почвой в нефтезагрязненной почве количество бактериофагов разных штаммов было больше. Известно, что разные бактериофаги могут заражать один и тот же вид бактерий, также один и тот же фаг может заражать все клоны одного штамма, все штаммов одного вида, при этом есть фаги, которые заражают несколько видов бактерий. Таблица 1 - Общее количество вирусов бактерий из природных образцов Альметьевского района Республики Татарстан, Россия

| Вид бактерий | Образцы почв и воды Альметьевского и Высокогорского районов Республики Татарстан | Природные образцы из с. Борискино, Альметьевского р-на Чернозем (с. Куркачи Высокогор. р-н) | Общее количество |
|-------------------------------|--|---|------------------|
| <i>Serratia marcescens</i> | Городская незагрязненная почва | Городская загрязненная почва | 2 |
| <i>Salmonella typhimurium</i> | нефтью | Чернозем | 6 |
| <i>Morganella sp.</i> | Лесная почва | Вода пруда (Сельская) | 2 |
| <i>Providencia stuartii</i> | Полевая почва | | 4 |
| <i>Micrococcus luteus</i> | | | 3 |
| <i>Bacillus subtilis</i> | | | 6 |
| <i>Pseudomonas stutzeri</i> | | | 3 |
| Всего: | | | 26 |

Мы предварительно провели проверку наличия профагов в геноме бактерии, и установили, что все вирусы проявляли литический характер, то есть, лизогения после термо- и лучевой (ультрафиолет) обработки бактерий не обнаружена. В каждом случае вода или физиологический раствор, полученный после инкубации с почвенными образцами в течении 1 ч и центрифугирования, не являлись действенными источниками обнаружения фагов или получения фаговой суспензии. Самым эффективным методом получения вирусов бактерий явился метод инкубирования природных образцов с 12-часовой культурой бактерий в свежей среде. Температурная обработка вирусных суспензий при 65°C и их обработка хлороформом для индукции гибели оставшихся после осаждения бактерий обладали антибактериальным действием, однако, пропускание суспензии через микрофильтр с диаметром пор 0.45 мкм было наилучшим методом для удаления бактерий из вирусных суспензий (рис. 1). Установлено, что модифицированный метод Грациа не был достаточно эффективным для выделения вирусов из почвы (рис. 2, все чашки кроме нижней правой), однако данный метод был эффективен при выделении вирусов из агаризованной среды и для подсчета титра фага в суспензии (рис. 3,

верхняя левая чашка). Рис. 1 - Схема выделения вирусов бактерий из природных образцов Рис. 2 - Выделение первичных бактериофагов *Morganella* sp. (верхняя левая чашка), *Bacillus subtilis* 9A (верхняя правая чашка) и *Salmonella typhimorium* TA (нижняя левая чашка) при помощи модифицированного метода Грациа Для первичного выделения фагов из природных образцов хорошо зарекомендовал себя модифицированный метод Фишера (рис. 2, нижняя правая чашка), который также подходил для подсчета титра фага в суспензиях (рис. 3, все чашки, кроме верхней левой). Нижняя часть демонстрирует увеличенные зоны лизиса. Выделение первичных вирусов при помощи модифицированного метода Фишера (нижняя правая чашка) из воды пруда (1), городской нефтезагрязненной почвы (2), городской чистой почвы (3), лесной почвы (4), полевой почвы (5), смеси почв из разных источников (6), чернозема села «Борискино» Альметьевского района (7) и чернозема села «Куркачи» Высокогорского района Республика Татарстан (8). Контроль - термообработанные вирусы (100°C, 30 мин.) в центре нижней правой чашки. Рис. 3 - Определение количества вирусов *Bacillus subtilis* 9A в суспензии при помощи метода Грациа (верхняя левая чашка); *Bacillus subtilis* 9A (верхняя правая чашка), *Morganella* sp. (нижняя левая чашка) и *Salmonella typhimorium* TA (нижняя правая чашка) при помощи модифицированного метода Фишера. Контроль - термообработанные вирусы (100°C, 30 мин.) по правому ряду всех чашек, кроме верхней левой. Нами установлено, что бактериофаги вида *Bacillus subtilis* всегда присутствуют в полевых почвах (100%), по сравнению с городской (10%) и нефтезагрязненной (5%) почвами, что означает, что фаги почвенных бактерий рода *Bacillus* характерны для природных незагрязненных почв (рисунок 4). Если принять содержание фагов штамма *Salmonella typhimurium* TA в поле за 100%, тогда в городской чистой почве их содержание составит 60%, а в лесной почве всего 5%. Это объясняется тем, что фаги кишечных бактерий распространены там, где обитают люди и животные, и, соответственно, присутствуют кишечные бактерии. Таким образом, наши результаты дают ориентир для поиска мест обнаружения бактериофагов патогенных бактерий и составляют первичную основу коллекции бактериофагов Республика Татарстан. Рис. 4 - Количество бактериофагов *Bacillus subtilis* 9A (слева) и *Salmonella typhimorium* TA (справа) в 0,2 мг образца. П - полевая, ГЧ - городская незагрязненная, ГЗ - городская нефтезагрязненная почва, Л - лесная почва. БОЕ - Бляшкообразующие единицы