

ОСОБЕННОСТИ ВЫДЕЛЕНИЯ БАКТЕРИОФАГОВ, СПЕЦИФИЧНЫХ К *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*, ИЗ СТОЧНЫХ ВОД ЖИВОТНОВОДЧЕСКИХ КОМПЛЕКСОВ

Маргарита Владимировна Киянчук^{1✉}, Александр Александрович Сухинин²

^{1,2} Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины, Санкт-Петербург, Российская Федерация

¹ асп. каф. микробиологии, вирусологии и иммунологии, асс. каф. биохимии и физиологии, kiyanchuk.margosha@yandex.ru, orcid.org/0009-0006-2884-9630

² д-р биол. наук, проф., зав. каф. микробиологии, вирусологии и иммунологии, orcid.org/0000-0002-1245-3440

РЕФЕРАТ

В связи с ростом устойчивости возбудителей инфекционных болезней к антибактериальным препаратам, включённых в схему терапевтических мероприятий животноводческих комплексов и отсутствием новых вариантов антибиотиков, всё большее внимание на себя привлекает фаготерапия. Глобальную проблему вызывают инфекционные болезни, ассоциированные с «ESKAPE» (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Enterobacter spp.*). Обнаружение фагов к данным возбудителям является важнейшим этапом в разработке фаговой терапии для её внедрения в комплекс противозoonотических мероприятий. Сточные воды содержат весьма разнообразную популяцию бактерий и связанных с ними бактериофагов, соответственно, это привлекательный источник бактериофагов против бактериальных патогенов, ассоциированных с инфекционными болезнями крупного рогатого скота. Поскольку сточные воды являются высоко контаминированным материалом, их пробоподготовка представляет важный этап при выделении бактериофагов. В данной работе представлен эффективный протокол подготовки сточных вод к выделению фагов, специфичных к *Klebsiella pneumoniae*, ассоциированной с бронхопневмонией крупного рогатого скота. Материал (n=25) подвергали многократной фильтрации с применением мембранных фильтров, имеющих диаметр пор 0,45 мкм и 0,22 мкм, и дальнейшим использованием метода накопления.

Ключевые слова: фаготерапия, *Klebsiella pneumoniae*, выделение бактериофагов, мембранные фильтры.

Для цитирования: Киянчук М.В., Сухинин А.А. Особенности выделения бактериофагов, специфичных к *Klebsiella pneumoniae*, из сточных вод животноводческих комплексов // Нормативно-правовое регулирование в ветеринарии. 2025. №1. с 37-40. <https://doi.org/10.52419/issn2782-6252.2025.1.37>

PECULIARITIES OF ISOLATION OF BACTERIOPHAGES SPECIFIC TO *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* FROM WASTEWATER OF LIVESTOCK FARMS

Margarita V. Kiyanchuk^{1✉}, Aleksandr A. Sukhinin²

^{1,2} Saint Petersburg State University of Veterinary Medicine, Saint Petersburg, Russian Federation

¹ Assistant of the Department of Microbiology, Virology and Immunology, Assist. of the Department of Biochemistry and Physiology, kiyanchuk.margosha@yandex.ru, orcid.org/0009-0006-2884-9630

² Dr. of Biological Sciences, Prof., Head of the Department of Microbiology, Virology and Immunology, orcid.org/0000-0002-1245-3440

ABSTRACT

In connection with the growing resistance of infectious agents to antibacterial drugs included in the scheme of therapeutic measures of livestock complexes and the lack of new antibiotic options, phagotherapy is attracting more and more attention. Infectious diseases associated with «ESKAPE» (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter spp.*) are a global problem. Detection of phages to these pathogens is the most important step in the development of phage therapy for its introduction into the complex of anti-zoonotic measures. Wastewater contains a highly diverse population of bacteria and associated bacteriophages and is therefore an attractive source of bacteriophages against bacterial pathogens associated with infectious diseases of cattle. Since wastewater is a highly contaminated material, its sample preparation represents an important step in the isolation of bacteriophages. This work presents an efficient protocol for the preparation of wastewater for the isolation of phages specific to *Klebsiella pneumoniae* associated with bovine bronchopneumonia. The material (n=25) was subjected to multiple filtrations using membrane filters with pore diameters of 0.45 µm and 0.22 µm and further using the accumulation method.

Key words: phagotherapy, *Klebsiella pneumoniae*, bacteriophage isolation, membrane filters.

For citation: Kiyanchuk M.V., Sukhinin A.A. Peculiarities of the isolation of bacteriophages specific to *Klebsiella pneumoniae* from wastewater of livestock complexes. Legal regulation in veterinary medicine. 2025;1:4-5. <https://doi.org/10.52419/issn2782-6252.2025.1.37>

ВВЕДЕНИЕ

Фаготерапия является интенсивно развивающейся отраслью в настоящее время. Это связано с ростом числа возбудителей инфекционных болезней, устойчивых к противомикробным препаратам, и отсутствием новых вариантов антибиотиков [3]. Однако прежде чем какой-либо фаг можно будет применить в соответствии с его биологическими свойствами, его необходимо сначала выделить. Таким образом, выделение является важным этапом при фаготерапии. Существует ряд методов, как классических, так и модифицированных, с помощью которых можно выделять фаги, выбор подходящего метода зависит от предполагаемого использования фага. Следует отметить и тот факт, что процесс выделения специфического к определённому возбудителю фага необходимо проводить постоянно с определённой периодичностью. Это связано с тем, что иммунная система распознаёт их как чужеродные и может вырабатывать нейтрализующие антитела против конкретного фага. Так же высок риск последующего развития резистентности к конкретному фагу во время проведения терапевтического курса фаготерапии [1,2]. Наиболее привлекательным источником для поиска фагов специфичных к возбудителям инфекционных болезней животных, в том числе бронхопневмонии, являются сточные воды животноводческих комплексов [1,4].

Инфекции, ассоциированные с «ESKAPE» (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Enterobacter spp.*) представляют собой глобальную проблему для животноводства из-за их обширной устойчивости к антибиотикам и способности быстро приобретать факторы резистентности [5]. Опубликовано множество разнообразных протоколов для изолирования фагов из объектов окружающей среды с целью их дальнейшего применения в терапевтических целях при инфекционных болезнях животных. Выбор метода зависит прежде всего от особенностей возбудителя. Нужно отметить также что для включения в схему противоэпизоотических мероприятий пригодны исключительно бактериофаги с литическим циклом развития [6,7].

Таблица 1. Результаты оценки эффективности пробоподготовки сточных вод животноводческих комплексов.

Table 1. Results of the assessment of the effectiveness of sample preparation of wastewater from livestock complexes.

Порядок фильтрации	Визуальная оценка	Микробная обсеменённость (КОЕ/мл)
1 (мембранные фильтры из смешанных эфиров целлюлозы с диаметром пор 0,45 мкм).	Цвет от тёмно-коричневого до шафранового. Значительная мутность, мелкие примеси.	В 8 образцах от $4,3 \times 10^3 \pm 0,83 \times 10^3$ до $38,5 \times 10^3 \pm 1,62 \times 10^3$
2 (мембранные фильтры 0,22 мкм, <i>Membrane Solutions</i>)	Цвет от шафранового до блестящего жёлтого. Мутность и примеси отсутствуют.	В 3 образцах от $1,4 \times 10^3 \pm 0,75 \times 10^3$ до $5,3 \times 10^3 \pm 0,92 \times 10^3$
3 (мембранные фильтры 0,22 мкм, <i>Membrane Solutions</i>)	Цвет светло-песочный. Мутность и примеси отсутствуют.	Отсутствует
4 (мембранные фильтры 0,22 мкм, <i>Membrane Solutions</i>)	Цвет светло-песочный. Мутность и примеси отсутствуют.	Отсутствует
5 (мембранные фильтры 0,22 мкм, <i>Membrane Solutions</i>)	Цвет льняной. Мутность и примеси отсутствуют.	Отсутствует

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для выделения бактериофагов, специфичных к гипермукоидным изолятам *Klebsiella pneumoniae*, явились сточные воды животноводческих комплексов (n=25) Ленинградской области. Отбор проводили в одноразовые стерильные контейнеры (120,0 мл, «Гермен»). Пробы доставляли для исследования в течение трёх часов с момента отбора в изотермической сумке.

В качестве индикаторных штаммов применяли изоляты *Klebsiella pneumoniae*, заблаговременно выделенные из носоглоточной слизи телят с признаками бронхопневмонии.

Первичную фильтрацию сточных вод проводили с применением вакуумной фильтрационной системы. Для получения пермеата для дальнейшей пробоподготовки были взяты стерильные мембранные фильтры из смешанных эфиров целлюлозы с диаметром пор 0,45 мкм (*Membrane Solutions*). На каждые 50,0 мл сточных вод затрачивался один фильтрационный диск. Центрифугирование проводили 30 мин 5000 об/мин в стерильной конической центрифужной пробирке с винтовой крышкой (GONGDONG, Китай). Супернатант трижды очищали при помощи стерильных шприцевых фильтрующих насадок с диаметром пор 0,22 мкм (*Membrane Solutions*). С целью первичного выделения фагов из подготовленного материала применили метод накопления [1, 8]. В флакон с 100 мл МПА вносили по 1,0 мл трёх 18-часовых бульонных культур *Klebsiella pneumoniae*, выделенных из носоглоточной слизи телят с признаками бронхопневмонии, и инкубировали 3 часа при 37,0°C. Затем вносили 20 мл исследуемого фильтрата. Флакон инкубировали 18 часов при 37,0°C, периодически перемешивая. По истечению 18 часов проводили фильтрацию с применением стерильных шприцевых фильтрующих насадок (диаметр пор 0,22 мкм).

Наличие фаговых частиц в исследуемом материале оценивали по методу Грация согласно Государственной фармакопейной статье ОФС.1.7.1.0002.15. Мясопептонный 1,5% агар (ГРМ-агар) разливали в чашки Петри (диаметром 90 мм) по 20 ± 2 мл и подсушивали в стерильных условиях. Готовили десятикратные последовательные разведения исследуемого фильтрата сточных вод в физиологиче-

ском растворе по методу Аппельмана от 10-1 до 10-5. В стерильную пробирку вносили 2,5 мл, расплавленного и остуженного до 45°C 0,7% мясопептонного агара, затем добавляли 0,1 мл фильтрата и 0,5 мл суточной бульонной культуры *Klebsiella pneumoniae*. Содержимое пробирок быстро перемешивали вращением и выливали вторым слоем на поверхность 1,5% агара в чашки Петри. После застывания верхнего слоя агара чашки инкубировали в течение 18 ч при температуре 37°C±1. Учёт проводили визуально, оценивая наличие стерильных пятен.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На каждом этапе пробоподготовки сточных вод (n=25) животноводческих комплексов проводили визуальную оценку фильтрата и анализ бактериальной загрязнённости. Визуальную оценку проводили невооружённым глазом, просматривая пермеат в проходящем свете и обращая внимание на наличие видимых примесей, изменение цвета, прозрачность. Посев 1 мкл фильтрата для анализа микробной обсеменённости проводили на МПА, с дальнейшим инкубированием при температуре

37°C 24 часа. Результаты анализа эффективности пробоподготовки приведены в таблице 1.

Стерильные пятна, свидетельствующие о наличии бактериофагов специфичным к *Klebsiella pneumoniae*, были выявлены методом Грация в образце сточных вод животноводческих комплексов. Концентрация составила $4,7 \times 105 \pm 0,125$.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведённое нами исследование показывает важность подбора оптимального метода для пробоподготовки сточных вод животноводческих комплексов для дальнейшего эффективного выделения бактериофагов, специфичных к *Klebsiella pneumoniae*, которые потенциально могут быть включены в схему противозoonотических мероприятий [9]. Целесообразно применять многоступенчатую фильтрацию с диаметром пор фильтров на этапе перед центрифугированием 0,45 мкм, в последующих – 0,22 мкм. Неоднократная фильтрация пермеата обусловлена высокой контаминацией сточных вод и наличием в них неорганических примесей.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Azeredo J., Sillankorva S. Bacteriophage Therapy: From Lab to Clinical Practice. 2018. ISBN: 978-1-4939-7394-1, doi: 10.1007/978-1-4939-7395-8
2. Dedrick R.M., Freeman K.G., Nguyen J.A., Bahadirli-Talbott A., Smith B.E., Wu A.E., et al. Potent antibody-mediated neutralization limits bacteriophage treatment of a pulmonary Mycobacterium abscessus infection. Nature Medicine. 2021;27:1357–61. doi: 10.1038/s41591-021-01403-9
3. Kenney P.O., Gómez-Duarte O.G. Low-volume enrichment method supports high throughput bacteriophage screening and isolation from wastewater. PLoS One. 2024 Apr 16;19(4):e0298833. doi: 10.1371/journal.pone.0298833. PMID: 38626205; PMCID: PMC11020952.
4. Lin Nien-Tsung et al. Isolation and characterization of phi AB2: a novel bacteriophage of Acinetobacter baumannii. Research in microbiology. 2010. vol. 161,4: 308-14. doi:10.1016/j.resmic.2010.03.007
5. Peters D.L. et al. Bacteriophage Isolation, Purification, and Characterization Techniques Against Ubiquitous Opportunistic Pathogens. Current protocols. 2022.; vol. 2,11: e594. doi:10.1002/cpz1.594
6. Schwarz C., Jacques M. Isolation of Enterococcus Bacteriophages from Municipal Wastewater Samples Using an Enrichment Step. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.). 2024; vol. 2738: 111-123. doi:10.1007/978-1-0716-3549-0_7
7. Suh G.A. et al. Considerations for the Use of Phage Therapy in Clinical Practice. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2022; vol. 66,3: e0207121. doi:10.1128/AAC.02071-21
8. Викторов Д.А., Гринева Т.А., Васильев Д. А. Выщеление и изучение биологических свойств бактериофагов *Pseudomonas chlororaphis* // Вестник Ульяновской ГСХА. 2014. №2 (26). [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://cyberleninka.ru/article/n/vschelenie-i-izuchenie-biologicheskikh-svoystv-bakteriofagov-pseudomonas-chlororaphis> (дата обращения: 16.12.2024).
9. Киянчук М. В. Оценка эффективности ингаляционного применения препаратов бактериофагов при бронхопневмонии, ассоциированной с *Klebsiella pneumoniae* / М. В. Киянчук, А. А. Сухинин // Нормативно-правовое регулирование в ветеринарии. 2024. 3. С. 31-33. doi: 10.52419/issn2782-6252.2024.3.31

REFERENCES

1. Azeredo J., Sillankorva S. Bacteriophage Therapy: From Lab to Clinical Practice. 2018. ISBN: 978-1-4939-7394-1. doi: 10.1007/978-1-4939-7395-8
2. Dedrick R.M., Freeman K.G., Nguyen J.A., Bahadirli-Talbott A., Smith B.E., Wu A.E., et al. Potent antibody-mediated neutralization limits bacteriophage treatment of a pulmonary Mycobacterium abscessus infection. Nature Medicine. 2021;27:1357–61. doi: 10.1038/s41591-021-01403-9
3. Kenney P.O., Gómez-Duarte O.G. Low-volume enrichment method supports high throughput bacteriophage screening and isolation from wastewater. PLoS One. 2024 Apr 16;19(4):e0298833. doi: 10.1371/journal.pone.0298833. PMID: 38626205; PMCID: PMC11020952.
4. Lin Nien-Tsung et al. Isolation and characterization of phi AB2: a novel bacteriophage of Acinetobacter baumannii. Research in microbiology. 2010. vol. 161,4: 308-14. doi:10.1016/j.resmic.2010.03.007
5. Peters D.L. et al. Bacteriophage Isolation, Purification, and Characterization Techniques Against Ubiquitous Opportunistic Pathogens. Current protocols. 2022.; vol. 2,11: e594. doi:10.1002/cpz1.594
6. Schwarz C., Jacques M. Isolation of Enterococcus Bacteriophages from Municipal Wastewater Samples Using an Enrichment Step. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.). 2024; vol. 2738: 111-123. doi:10.1007/978-1-0716-3549-0_7

7. Suh G.A. et al. Considerations for the Use of Phage Therapy in Clinical Practice. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2022; vol. 66,3: e0207121. doi:10.1128/AAC.02071-21
8. Viktorov D.Al., Grineva T.Al., Vasiliev D.Ar. Detection and study of biological properties of bacteriophages *Pseudomonas chlororaphis*. Bulletin of Ulyanovsk State Agricultural Academy. 2014;2 (26). (In Russ.) Available at: <https://cyberleninka.ru/article/n/vschelenie-i-izuchenie-biologicheskikh-svoystv-bakteriofagov-pseudomonas-chlororaphis> (date of reference: 16.12.2024).
9. Kiyanchuk M.V., Sukhinin A.A. Evaluation of the efficacy of inhalation application of bacteriophage preparations in bronchopneumonia associated with *Klebsiella pneumoniae*. Legal regulation in veterinary medicine. 2024;(3):31-33. (In Russ.), <https://doi.org/10.52419/issn2782-6252.2024.3.31>

Поступила в редакцию / Received: 10.01.2025

Поступила после рецензирования / Revised: 10.03.2025

Принята к публикации / Accepted: 31.03.2025