Original researches

Isolation of bacteriophages specific for *Staphylococcus aureus* var. *bovis*

Yu. V. Horiuk

State Agrarian and Engineering University in Podilya, Kamianets-Podilskyi, Khmelnytskyi region, Ukraine

Received: 30 July 2019
Revised: 05 August 2019
Accepted: 09 September 2019

State Agrarian and Engineering University in Podilya, Schevchenko Str., 13, Kamianets-Podilskyi, Khmelnytskyi region, 32300, Ukraine

Tel.: +38-097-661-79-64
E-mail: goruky@ukr.net

Cite this article: Horiuk, Yu. V. (2019). Isolation of bacteriophages specific for *Staphylococcus aureus* var. *bovis*. *Theoretical and Applied Veterinary Medicine*, 7(3), 143–146. doi: 10.32819/2019.71025

Abstract. Bacteriophages are viruses that infect bacteria, draw the increasing attention as a control of bacterial pathogens. However, developing a successful strategy on the basis of phages requires in-depth analysis of the various parameters. The results of comparison of isolation procedures of bacteriophages specific for *Staphylococcus aureus* var. *bovis* from the secretion of cows which ill with subclinical form of mastitis are presented in the article. They can be used to create a phage preparation for the prophylaxis and veterinary treatment of mastitis. The initial stock for the obtaining of bacteriophages were samples of horned cattle secretion, which were processed according to standard procedures. For the purification of phagolysate from extraneous microflora have been used two-stage filtration (pore size of 0.45 μm), heating of tubes at a temperature of $60 \pm 2^\circ\text{C}$ for 30 minutes and exposure to chloroform. The lytic activity of bacteriophages as well as the morphology of the negative colonies were studied by the Gratia method. It is established that the microflora after the first passage was represented by different species, depending on the way the samples are processed. The method of purification of staphylococcal bacteriophages from bacterial cells with trichloromethane is the most effective. Yes, only *Staphylococcus aureus* stood out for the first passage. Many phages are unstable to chloroform. Therefore, this procedure is not entirely suitable for the initial isolation of staphylococcal bacteriophage. The extraneous flora of the phagolysate under the influence of $60 \pm 2^\circ\text{C}$ for 30 minutes is represented by heat-resistant bacteria: *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Bacillus*. In the second passage, only the genus *Enterococcus* stands out. In the future, the foreign flora is not isolated. In general, the temperature treatment at the already named parameters is an efficient in quality, but long over time method. In the two-stage filtration of the phagolysate, the bacteria of the group of *Escherichia coli*, namely representatives of the genus *Klebsiella*, are isolated in the first and second passages. The use of filtration in the subsequent passage effectively purified phagolysate from extraneous microflora. The results of studies on the purification of staphylococcal bacteriophages from bacterial cells indicate the effectiveness of multi-stage filtration.

Keywords: phagolysate purification; trichloromethane; heat treatment; filtration.

Виділення бактеріофагів специфічних щодо *Staphylococcus aureus* var. *bovis*

Ю. В. Горюк

Подільський державний аграрно-технічний університет, Кам'янець-Подільський, Хмельницька обл., Україна

Анотація. Бактеріофаги – віруси, які заражають бактерії, привертають усе більшу увагу як контроль бактеріальних патогенів. Однак розроблення успішної стратегії на основі фагів вимагає глибокого аналізу різних параметрів. У статті наведено результати дослідження та порівняння методик виділення бактеріофагів, специфічних щодо *Staphylococcus aureus* var. *bovis*, із секрету корів, хворих субклінічною формою маститу, які можуть бути використані для створення фагового препарату з метою профілактики і лікування маститу. Вихідним матеріалом для одержання бактеріофагів були зразки секрету великої рогатої худоби, обробку яких здійснювали згідно зі стандартними методиками. Для очищення фаголізату від сторонньої мікрофлори використовували: двоступеневу фільтрацію (розмір пор 0,45 мкм), прогрівання пробірок за температури $60 \pm 2^\circ\text{C}$ протягом 30 хв і вплив хлороформу. Літичну активність бактеріофагів, а також морфологію негативних колоній вивчали за методом Грація. Встановлено, що мікрофлора після першого пасажування представлена різними видами, залежно від способу обробки зразків. Метод очищення стафілококових бактеріофагів від бактеріальних клітин трихлорметаном найбільш ефективний метод. Так, лише за першого пасажування виділявся *Staphylococcus aureus*. Багато фагів нестійкі до хлороформу. Тому ця методика не зовсім придатна для первісного виділення стафілококового бактеріофага. Стороння мікрофлора фаголізату за впливу температури $60 \pm 2^\circ\text{C}$ протягом 30 хв представлена термостійкими бактеріями: *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Bacillus*. У другому пасажі виділяється лише рід *Enterococcus*. В подальшому стороння мікрофлора не виділяється. Загалом температурна обробка за вищеназаних параметрів – це ефективний за якістю, але тривалий у часі метод. Під час двоступеневої фільтрації фаголізату за впливу температури $60 \pm 2^\circ\text{C}$ протягом 30 хв представлена термостійкими бактеріями: *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Bacillus*. Застосування фільтрації у подальшому пасажуванні ефективно очищувало фаголізат від сторонньої мікрофлори. Результати досліджень щодо очищення стафілококових бактеріофагів від бактеріальних клітин вказують на ефективність застосування багатоступеневої фільтрації.

Ключові слова: очищення фаголізату; трихлорметан; теплова обробка; фільтрування.

Вступ

За останні десятиліття кількість інфекцій, викликаних бактеріями з множинною антибіотикостійкістю, значно зросла (Dias et al., 2013; Horiuk et al., 2018). Тому необхідно докласти значних зусиль для розроблення нових способів боротьби з бактеріальними патогенами як на профілактичному рівні, так і для лікування інфекцій у людей і тварин. Один із цих патогенів – *Staphylococcus aureus*, який може викликати велику кількість інфекційних процесів, у тому числі і мастит у корів (Horiuk et al., 2018).

Бактеріофаги – це потенційні засоби лікування бактеріальних інфекцій (Dias et al., 2013; Horiuk et al., 2018). Їх антибактеріальні властивості досліджувалися ще в 1920-х роках як засіб ліквідації бактерій при захворюваннях людини і тварини (Hanlon, 2007). Отож доцільно застосовувати бактеріофаги для боротьби із стафілококовими інфекціями (Jensen et al., 2015). Однак вузька специфічність фагів та можливість розвитку стійкості бактерій до фага вказують на необхідність постійного пошуку нових ізолятів фагів для використання їх із терапевтичною метою (Toruzoglu et al., 2015; Kovalenko et al., 2018; Svircev et al., 2018). Отже, необхідні нові підходи для швидкого й ефективного одержання очищеного та гомогенного фаголізату з високим титром фагів.

Зазвичай здатність продукувати високий титр фагових запасів значною мірою залежить від конкретного фага і клітини-господаря (Merabishvili et al., 2009; Jensen et al., 2015). Проте існують традиційні методики, що застосовуються для нарощення та очищення фагів. Вони включають центрифугування, фільтрацію, ультрафільтрацію, осадження поліетиленгліколем тощо (Rehman et al., 2016; Lopetuso et al., 2019). Багато з перерахованих методів не мають спільного характеру, трудомісткі та здатні впливати на відновлення фагів і/або їх життєздатність. Основна вимога до цих методів полягає в тому, щоб фаголізат не містив бактерії, грибки, цвілі та залишки культурального середовища (Mahony et al., 2011).

Мета роботи – підбір методики для виділення фагів, специфічних щодо *Staphylococcus aureus* var. *bovis*, із секрету корів, хворих на субклінічну форму маститу, які можуть бути використані для створення фагового препарату для профілактики і лікування маститу.

Матеріал і методи досліджень

Виділення фагів, специфічних до виду *Staphylococcus aureus* var. *bovis*, проводили із секрету корів, хворих на субклінічну форму маститу, на молочних фермах західного регіону України. Для виділення специфічного бактеріофага, активного щодо *Staphylococcus aureus* var. *bovis*, було створено робочу колекцію мікроорганізмів, виділених від корів з ознаками маститу (Kukhtyn et al., 2016; Horiuk et al., 2018; Horiuk et al., 2019).

Мікробіологічну обробку зразків для виділення *Staphylococcus aureus* проводили з використанням BD Baird-Parker Agar згідно до стандартних методик. Ідентичність кожного бактеріального ізоляту як штаму *Staphylococcus aureus* була підтверджена гемолізом на кров'яному агарі, реакції каталази, фарбуванням за Грамом, реакцією коагулази з використанням плазми кролика EDTA та посівом на середовище з кристалічним фіолетовим для визначення біотипу (Kukhtyn, et al., 2017). Культури, необхідні для розмноження фагів, підтримувалися на МПА або МПБ.

Зразки секрету великої рогатої худоби, які служили вихідним матеріалом для виділення фагів, відібрані безсистемно, при цьому зразки молока містили соматичні клітини не менше 400 000 тис./см³.

Досліджуваний матеріал засівали в МПБ. Одночасно в живильне середовище вносили 0,2–0,5 мл або повну бактеріальну петлю добової культури *Staphylococcus aureus* var. *bovis*. Флакони з посівами ставили в термостат за 37 °C на 18–20 годин.

Після інкубації вміст флаконів пропускали через фільтри для звільнення від механічних домішок. Після цього його розливали в стерильні пробірки, центрифугували за 3 000 об./хв протягом 30 хвилин. Надосад очищували від сторонньої мікрофлори, застосовуючи один із методів:

- для двоступеневої фільтрації використовували мембранні фільтри з діаметром пор 0,45 мкм (*Sartorius*, Німечина);
- пробірки прогрівали на водяній бані за температури 60 ± 2 °C протягом 30 хвилин;
- діяли хлороформом. Для цього в пробірку вносили хлороформ у співвідношенні 1:10, струшували і витримували за кімнатної температури протягом 15 хвилин.

Отриманий фаголізат досліджували на наявність фагів. Літичну активність бактеріофагів, а також морфологію негативних колоній вивчали за методом Грація. Для цього го-

а

б

Рисунок. Лізис індикаторної культури *Staphylococcus aureus* var. *bovis* на двошаровому МПА, за методом Грація: а – морфологія негативних колоній з ознаками вторинного зростання індикаторної культури; б – морфологія негативних колоній «чистої» лінії фага.

тували 1,5 % МПА і розливали в стандартні чашки Петрі по 25,0 – 30,0 мл. Агар підсушували в термостаті протягом 30 хвилин. Окремо готували 0,7 % МПА (напіврідкий), розливали його в пробірки і стерилізували звичайним методом. У пробірки з 0,7 % МПА, розплавленим і охолодженим до 45 °С, додавали по 1 мл фаголізату і 0,2 мл добової бульйонної індикаторної культури. Вміст пробірок перемішували і наливали подвійним шаром у чашки Петрі з 1,5 % МПА. Посіви інкубували за температури (37 ± 1) °С протягом 18 – 24 год. (Haddad et al., 2016; Saglam et al., 2017).

Статистичну обробку результатів здійснювали методами варіаційної статистики з використанням програми *Statistica 6.0* (StatSoft Inc., USA). Застосовували непараметричні методи досліджень (критерії Уїлкоксона, Манна – Уїтні). Визначали середнє арифметичне (x), стандартну похибку середньої величини (SE). Різницю між порівнюваними величинами вважали достовірною за $P < 0,05$.

Результати

У разі посіву суспензії даних мікроорганізмів на двошаровому МПА, приготованому за методом Грація, бактеріофаг сформував каламутні округлі, з нерівними краями негативні колонії. Мікроскопія бляшок показала слабовиражений ріст сторонньої мікрофлори. Послідовний пересів негативних колоній фага спричинив те, що *Staphylococcus aureus* var. *bovis* були продуцентами фага, який формував поодинокі колонії з прозорими центрами (риснок).

Результати дослідження з порівняння методів очищення фаголізату від сторонньої мікрофлори наведено в таблиці.

Після першого пасажування фагів виділялася залишкова мікрофлора, представлена різними видами. Обробляючи зразки трихлорметаном після першого пасажування, виділяли лише *Staphylococcus aureus*. Під час наступних пасажувань жодних бактерій виділено не було. Температурна обробка за 60 ± 2 °С протягом 30 хв не діяла на термостійкі бактерії (*Enterococcus*, *Lactococcus*, *Bacillus*). У другому пасажі виділяли рід *Enterococcus*. В подальшому стороння мікрофлора не виділялася. Ефективним методом очищення фаголізату від сторонньої мікрофлори виявилось фільтрування – виділяли рід *Klebsiella* у перших двох пасажах. Крім того, витрати часу на застосування цього методу втричі менші порівняно з іншими методами, взятими в дослід.

Обговорення

Препарати фагів часто забруднюються сторонньою мікрофлорою, бактеріями-господарями або макромолекулами після їх загибелі (Wills et al., 2005; Klopatek et al., 2018). Тому для інактивації бактеріальної культури під час селекції фагів застосовують такі способи очищення: обробку пасажу фага трихлорметаном, прогрівання або мембранну фільтрацію (Haddad et al., 2016; Klopatek et al., 2018).

Метод очищення стафілококових бактеріофагів від бактеріальних клітин трихлорметаном виявився найбільш ефективним. Так, лише з першого пасажу виділили *Staphylococcus aureus*. Це пов'язано з великою кількістю стафілококів, оскільки вони були бактеріями-господарями і ми їх вносили додатково. Проте дослідники повідомляють про різні результати щодо сприйнятливості фагів до хлороформу (Moodley et al., 2019). Багато фагів нестійкі до хлороформу, тому більшість дослідників наполягають на визначенні чутливості бактеріофагів до нього перед початком досліджень (O'Flaherty et al., 2005; Mahony et al., 2011). Отож ця методика не зовсім придатна для первісного виділення стафілококового бактеріофага. Крім того, під час надходження в організм хлороформ піддається біотрансформації, в ході якої утворюються токсичні метаболіти, що стимулюють перекисне окиснення ліпідів, це спричинює порушення функціональних властивостей мембран, пригнічення активності мембранозв'язаних ферментів, тим самим викликаючи порушення роботи з боку внутрішніх органів і систем (Levesque et al., 1994).

Стороння мікрофлора фаголізату за впливу температури 60 ± 2 °С протягом 30 хв представлена термостійкими бактеріями: *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Bacillus*. Загалом температурна обробка за вищезазначених параметрів – це ефективний за якістю, але тривалий у часі метод (Jensen et al., 2015).

Так, під час двоступеневого фільтрування фаголізату за першого та другого пасажувань виділяли бактерії групи кишкових паличок, а саме представників роду *Klebsiella*. Наявність цих мікроорганізмів можна пояснити їх розмірами, діаметр паличок коливається в середньому в межах 0,3–1,0 мкм, що дозволяє проходити через пори бактеріального фільтра з розміром 0,45 мкм (Vos et al., 2011). Під час подальшого пасажування із застосуванням фільтрації через мембранні фільтри залишкова мікрофлора не виділялася.

Результати проведених досліджень щодо очищення

Таблиця. Ефективність методів очищення фаголізату від сторонньої мікрофлори ($X \pm SE$, $n = 9$)

Методи очищення	Вид мікрофлори	Витрати часу, хв
Перше пасажування		
Фільтрування	<i>Klebsiella</i>	10 ± 2
Температура	<i>Enterococcus</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Bacillus</i>	30 ± 5
Трихлорометан	<i>Staphylococcus aureus</i>	30 ± 5
Друге пасажування		
Фільтрування	<i>Klebsiella</i>	10 ± 2
Температура	<i>Enterococcus</i>	30 ± 5
Трихлорометан	–	30 ± 5
Третє пасажування		
Фільтрування	–	10 ± 2
Температура	–	30 ± 5
Трихлорометан	–	30 ± 5

стафілококових бактеріофагів від бактеріальних клітин вказують на ефективність застосування багатоступеневої фільтрації. Цей метод бачиться оптимальним завдяки скороченню витрат часу на проведення досліджень, порівняно з температурною обробкою, та безпечним для організму людини порівняно з впливом хлороформу.

Висновки

Установлено, що після першого пасажування фагів виділялася залишкова мікрофлора, представлена різними видами. Найбільш ефективний метод очищення стафілококових бактеріофагів від бактеріальних клітин полягає у їх знищенні трихлорметаном. Проте така методика не придатна для первісного виділення стафілококового бактеріофага. Стороння мікрофлора фаголізату за теплової обробки представлена термостійкими бактеріями: *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Bacillus*. Загалом вказаний метод ефективний за якістю, але тривалий у часі. Під час двоступеневої фільтрації фаголізату за першого та другого пасажування виділяються представники роду *Klebsiella*. За подальшого пасажування із застосуванням фільтрації через мембранні фільтри залишкова мікрофлора не виділяється. Отже, для очищення стафілококових бактеріофагів від бактеріальних клітин найефективнішим виявилось застосування багатоступеневої фільтрації.

References

- Dias, R. S., Eller, M. R., Duarte, V. S., Pereira, A. L., Silva, C. C., Mantovani, H. C., Oliveira, L. L., Silva, E. de A. M., & Paula, S. O. (2013). Use of phages against antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine. *Journal of Animal Science*, 91, 3930–3939.
- Haddad, L., Roy, J. P., Khalil, G. E., St-Gelais, D., Champagne, C. P., Labrie, S., & Moineau, S. (2016). Efficacy of two *Staphylococcus aureus* phage cocktails in cheese production. *International Journal of Food Microbiology*, 217, 7–13.
- Hanlon, G. W. (2007). Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 30(2), 118–128.
- Horiuk, Yu., Kukhtyn, M., Kovalenko, V., Kornienko, L., Horiuk, V., & Liniichuk N. (2019). Biofilm formation in bovine mastitis pathogens and the effect on them of antimicrobial drugs. *Independent Journal of Management & Production*, 10(7), 897–910.
- Horiuk, Yu. V., Kukhtyn, M. D., Perkiy, Yu. B., & Horiuk, V. V. (2018). Distribution of main pathogens of mastitis in cows on dairy farms in the western region of Ukraine. *Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies*, 20(83), 115–119.
- Jensen, K. C., Hair, B. B., Wienclaw, T. M., Murdock, M. H., Hatch, J. B., Trent, A. T., & Berges, B. K. (2015). Isolation and host range of bacteriophage with lytic activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and potential use as a fomite decontaminant. *PLoS One*, 10(7), e0131714.
- Klopatek S., Callaway T.R., Wickersham T., Sheridan T.G., Nisbet D.J. (2018) Bacteriophage utilization in animal hygiene. In: Harper D., Abedon S., Burrowes B., McConville M. (eds) *Bacteriophages*. Springer, Cham
- Kovalenko, V. L., Kovalenko, P. L., Ponomarenko, G. V., Kukhtyn, M. D., Midyk, S. V., Horiuk, Y. V., & Garkavenko, V. M. (2018). Changes in lipid composition of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* cells under the influence of disinfectants Barez®, Biochlor® and Geocide®. *Ukrainian Journal of Ecology*, 8(1), 547–550.
- Kukhtyn, M. D., Horyuk, Y. V., Horyuk, V. V., Yaroshenko, T. Y., Vichko, O. I., & Pokotylo, O. S. (2017). Biotype characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from milk and dairy products of private production in the western regions of Ukraine. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 8(3), 384–388.
- Kukhtyn, M. D., Kovalenko, V. L., Horyuk, Y. V., Horyuk, V. V., & Stravskyy, Y. S. (2016). Bacterial biofilms formation of Cattle mastitis pathogens. *Journal for Veterinary Medicine, Biotechnology and Biosafety*, 2(4), 30–32.
- Levesque, B., Ayotte, P., LeBlanc, A., Dewailly, E., Prud'Homme, D., Lavoie, R., & Levallois, P. (1994). Evaluation of dermal and respiratory chloroform exposure in humans. *Environmental Health Perspectives*, 102(12), 1082–1087.
- Lopetuso, L., Giorgio, M., Saviano, A., Scaldaferrì, F., Gasbarrini, A., & Cammarota, G. (2019). Bacteriocins and bacteriophages: therapeutic weapons for gastrointestinal diseases? *International Journal of Molecular Sciences*, 20(1), 183.
- Mahony, J., McAuliffe, O., Ross, R.P., & van Sinderen, D. (2011). Bacteriophages as biocontrol agents of food pathogens. *Current Opinion in Biotechnology*, 22(2), 157–163.
- Merabishvili, M., Pirnay, J. P., Verbeke, G., Chanishvili, N., Tediashvili, M., Lashkhi, N., Glonti, T., Krylov, V., Mast, J., Van Parys, L., Lavigne, R., Volckaert, G., Mattheus, W., Verween, G., De Corte, P., Rose, T., Jennes, S., Zizi, M., De Vos, D., & Vaneechoutte, M. (2009). Quality-controlled small-scale production of a well-defined bacteriophage cocktail for use in human clinical trials. *PLoS One*, 4(3), e4944.
- Moodley, A., Kot, W., Nalgard, S., Jakociune, D., Neve, H., Hansen, L. H., & Vogensen, F. K. (2019). Isolation and characterization of bacteriophages active against methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. *Research in Veterinary Science*, 122, 81–85.
- O'Flaherty, S., Coffey, A., Meaney, W. J., Fitzgerald, G. F., & Ross, R.P. (2005). Inhibition of bacteriophage K proliferation on *Staphylococcus aureus* in raw bovine milk. *Letters in Applied Microbiology*, 41, 247–279.
- Rehman, S., Khan, T., & Raza, S. (2016). Isolation of bacteriophage against *Staphylococcus aureus* causing mastitis. *International Journal of Advanced Multidisciplinary Research*, 3(4), 1393–1395.
- Saglam, A. G., Sahin, M., Celik, E., Çelebi, O., Akca, D., & Otlı, S. (2017). The role of staphylococci in subclinical mastitis of cows and lytic phage isolation against *Staphylococcus aureus*. *Veterinary World*, 10(12), 1481.
- Svircev, A., Roach, D., & Castle, A. (2018). Framing the future with bacteriophages in agriculture. *Viruses*, 10(5), 218.
- Topuzoglu, B., Bastan, A., & Salar, S. (2015). The effect of long term antibiotic treatment on bacteriophage titer and somatic cell count at subclinical mastitis due to *Staphylococcus aureus* in lactating dairy cows. *Veterinary Journal of Ankara University*, 62, 289–294.
- Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., & Whitman, W. B. (Eds.). (2011). *Bergey's manual of systematic bacteriology: Volume 3: The Firmicutes*. Springer Science & Business Media.
- Wills, Q. F., Kerrigan, C., & Soothill, J. S. (2005). Experimental bacteriophage protection against *Staphylococcus aureus* abscesses in a rabbit model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(3), 1220–1221.