



UDC 338.439.021.1

**Effect of Temperature on the lytic activity of Bacteriophage PHAGE SAVB14, specific for STAPHYLOCOCCUS AUREUS VARIANT BOVIS**

Y. V. Horiuk<sup>1</sup>, M. D. Kukhtyn<sup>2</sup>, V. V. Horiuk<sup>1</sup>, V. P. Mizyk<sup>1</sup>

<sup>1</sup>State Agrarian and Engineering University in Podilya, Kamianets-Podilskyi, Ukraine

<sup>2</sup>Ternopil Ivan Puluj National Technical University, Ukraine

Article info

Received 10.10.2019

Received in revised form

04.11.2019

Accepted

15.11.2019

Horiuk, Y. V., Kukhtyn, M. D., Horiuk, V. V., & Mizyk, V. P. (2019). Effect of Temperature on the lytic activity of Bacteriophage PHAGE SAVB14, specific for STAPHYLOCOCCUS AUREUS VARIANT BOVIS. *Veterinary Science, Technologies of Animal Husbandry and Nature Management*, 4, 37-40, doi: 10.31890/vtpp.2019.04.07.

Therapeutic effect in case of phagotherapy is determined by the degree of lytic activity of bacteriophages in relation to contagions. Various factors influence the lytic activity of phages including temperature, pH, shelf-life, etc. Temperature plays a considerable role in attachment, penetration, reproduction and duration of latent period. The purpose of this research was to learn the influence of different temperature on lytic activity of bacteriophage Phage SAVB14 which is active in relation to Staphylococcus aureus variant bovis. For the increase of bacteriophage titre Phage SAVB14 the strain of gold Staphylococcus aureus var. bovis 1491f (Certificate for the strain - #736, from 05.03.2019) was used which was abstracted from the sample of the secretion of mammary gland of the patient with subclinical form of mastitis. For determination of temperature influence (0, 4, 8 and 45, 55, 65 °C) aliquots were sown by a double agar in definite intervals by the generally accepted methods. The cups were incubated at temperature 37 °C during 18-24 hours. Research was repeated three times.

According to the results of research it was determined that warming up of test tubes with bacteriophages at temperature 45 °C reduced the activity of phages in 30 minutes of influence in 1,7 times. Temperature 55 and 65 °C had more harmful effect, during the influence for the first 30 minutes the amount of active phages diminished in 2,5 and 5,3 times, and for 60 minutes destroyed the bacteriophage Phage SAVB14 by 89,9 and 93,3% respectively. The obtained results testify the thermolability of Phage SAVB14 which is an important factor in making phage preparation. The most optimum terms for storage of Phage SAVB14 are temperature regime within the limits of 4 and 8 °C. In case of such temperature lytic activity diminished only in 1,5 – 1,7 times, while in case of 0 °C in 2,4 times compared to the initial amount of bacteriophages.

**Keywords:** bacteriophage Phage SAVB14, Staphylococcus aureus, influence of temperature.

**Влияние температуры на литическую активность бактериофага PHAGE SAVB14, специфического в отношении STAPHYLOCOCCUS AUREUS VARIANT BOVIS**

Ю. В. Горюк<sup>1</sup>, М. Д. Кухтин<sup>2</sup>, В. В. Горюк<sup>1</sup>, В. П. Мизык<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Подольский государственный аграрно-технический университет, г. Каменец-Подольский, Украина

<sup>2</sup> Тернопольский национальный технический университет имени Ивана Пулюя, Украина

Терапевтический эффект при фаготерапии определяются степенью литической активности бактериофагов по отношению к возбудителям инфекции. На литическую активность фагов влияют различные факторы, в том числе температура среды, pH, срок хранения и тому подобное. Температура играет значительную роль в прикреплении, проникновении, размножении и продолжительности латентного периода. Целью данного исследования было изучить влияние температуры на литическую активность бактериофага Phage SAVB14, который активен в отношении Staphylococcus aureus variant bovis. Для наращивания титра бактериофага Phage SAVB14 использовали штамм золотистого стафилококка Staphylococcus aureus var. bovis 1491f (Свидетельство на штамм № 736, от 05.03.2019), который выделен из образца секрета молочной железы коров,

больных субклинической формой мастита. Для определения влияния температуры (0, 4, 8 и 45, 55, 65 °C) аликвоты высевали путем двойного агара через определенные промежутки времени по общепринятым методикам. Чашки инкубировали при температуре 37 °C в течение 18-24 ч. Исследования проводились в трех повторях.

По результатам исследований установлено, что прогревание пробирок с бактериофагом при температуре 45 °C снижало активность фагов через 30 минут воздействия в 1,7 раза. Температура 55 и 65 °C действовала более пагубно, в течение воздействия за первые 30 минут количество активных фагов уменьшилась в 2,5 и 5,3 раза, а за 60 минут уничтожала бактериофаг Phage SAvB14 на 89,9 и 93,3% соответственно. Полученные результаты свидетельствуют о термолабильности Phage SAvB14, что является важным фактором при изготовлении фагового препарата. Наиболее оптимальными условиями для хранения фага Phage SAvB14 является температурный режим в пределах 4 и 8 °C. При данных температурах литическая активность уменьшилась только в 1,5 – 1,7 раза. Тогда как при 0 °C в 2,4 раза по сравнению с начальным количеством бактериофагов.

**Ключевые слова:** бактериофаг Phage SAvB14, *Staphylococcus aureus*, влияние температуры.

## Вплив температури на літичну активність бактериофагу Phage SAvB14, специфічного щодо *Staphylococcus aureus variant bovis*

Ю. В. Горюк<sup>1</sup>, М. Д. Кухтин<sup>2</sup>, В. В. Горюк<sup>1</sup>, В. П. Мізик<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Подільський державний аграрно-технічний університет, м. Кам'янець-Подільський, Україна

<sup>2</sup> Тернопільський національний технічний університет імені Івана Пулюя, Україна

В статті наведено результати дослідження впливу температури на літичну активність бактериофагу Phage SAvB14, специфічного щодо *Staphylococcus aureus variant bovis*. Встановлено, що бактериофаг Phage SAvB14 частково втрачає свою активність за температури вище 45 °C, що є важливим показником при виготовленні фагового препарату. Найбільш оптимальною температурою для зберігання фагу Phage SAvB14 є 4 - 8 °C.

**Ключові слова:** бактериофаг Phage SAvB14, *Staphylococcus aureus*, вплив температури.

### Вступ

Актуальність теми. Бактеріофаги (віруси, які заражають бактерії) дуже поширені в навколишньому середовищі і можуть бути джерелом недорогих протимікробних препаратів (Kukhtyn et al., 2017; Horiuk, 2018; Altamirano & Barr, 2019). Терапевтичний і протиепідемічний потенціали бактериофагів визначаються використанням тільки літичних фагів і ступенем їх літичної активності у відношенні до збудників інфекції (Fortuna et al., 2019).

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Механізм впливу бактериофагів на мікробні клітини обумовлений адсорбцією фага на клітинній поверхні, наступним проникненням фага в клітину, розмноженням бактериофагів, розривом оболонки клітини і вивільненням віріонів фага з клітини (Yoon, Barrangou-Pouey, Bredt, Klaenhammer, & Fleming, 2002; Kortright, Chan, Koff, & Turner, 2019).

Практика фаготерапії заснована на виділенні фагів з природнього навколишнього середовища. Як слід, фаг який виділяють піддають скринінгу щодо літичної активності проти патогенних бактеріальних штамів (для виявлення діапазону господарів), а потім оцінюють з використанням моделей *in vitro* та *in vivo* (Horiuk, 2019; Fortuna et al., 2019).

Крім характеристики, що заснована на біологічних властивостях, фаги повинні бути досліджені на стійкість до впливу різних умов зовнішнього середовища, щоб підтвердити їхній потенціал при виготовленні біопрепаратів. Дослідниками встановлено, що бактериофаг у відношенні до однієї і тієї ж культури, але при різних умовах може проявляти різну літичну дію, формуючи різну кількість бляшок на твердому поживному середовищі (Housby, & Mann, 2009). Найбільш важливими факторами впливу на літичну активність бактериофагів можуть бути підвищена або знижена температура, коливання рН, тривалість зберігання тощо (Merabishvili et al., 2009).

Метою досліджень було вивчити вплив різних температур (високих та низьких) на літичну активність бактериофагу Phage SAvB14, який виділений на

молочних фермах та активний щодо *Staphylococcus aureus variant bovis*.

### Матеріал і методи досліджень

Для нарощення титру бактериофагів Phage SAvB14 використовували штам золотистого стафілококу *Staphylococcus aureus var. bovis 1491f*, який виділений з зразка секрету молочної залози корів, хворих на субклінічну форму маститу та первісно депонований в Депозитарії Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів під номером 736 (Свідоцтво на штам від 05.03.2019).

Виділення фагів проводили із зразків молока з вмістом соматичних клітин більше 400 тис/см<sup>3</sup>. Первинне виділення та отримання чистих ліній бактериофагів проводили за методикою, що розроблена Oliveira et al. (Merabishvili et al., 2009).

Для визначення впливу температур на активність фагів готували розведення з розрахунку 10<sup>5</sup> БУО/мл. Кожне розведення містили у водяну баню за різних температур: 35 (контроль), 45, 55, 65 °C. Через кожні 10 хвилин проводили відбір певної аликвоти досліджуваних зразків, додавали тест-культуру і висівали методом двошарового агару. Чашки інкубували за температури 37 °C протягом 18-24 год. Дослідження проводили в трьох повторях.

Визначення здатності бактериофагів зберігати свою активність з часом проводили наступним чином. Готували розведення з розрахунку 10<sup>5</sup> БУО/мл. Кожне розведення зберігали за різних температур: 0, 4, 8 °C. Через певні проміжки часу відбирали аликвоти зразків і відсівали їх методом двошарового агару. Чашки інкубували за температури 37 °C протягом 18-24 год. Дослідження проводили в трьох повторях.

Статистичну обробку результатів здійснювали методами варіаційної статистики з використанням програми Statistica 9.0 (StatSoft Inc., USA). Застосовували непараметричні методи досліджень (критерії Уїлкоксона, Манна-Уїтні). Визначали середнє арифметичне ( $\bar{x}$ ), стандартну похибку середньої

величини (SE). Різницю між порівнюваними величинами вважали достовірною за  $P < 0,05$ .

## Результати

Результати досліджень літичної активності бактеріофагу *Phage SAvB14* за впливу температури представлені в табл. 1.

Таблиця 1

### Чутливість бактеріофагу *Phage SAvB14* до впливу температури, $\log, x \pm SE$ БУО/мл

Час впливу, хвилини	Температура, °C		
	45	55	65
0	5,1 ± 4,07	5,1 ± 4,07	5,1 ± 4,07
10	5,1 ± 4,06	4,9 ± 3,91	4,7 ± 3,66
20	4,9 ± 3,91	4,7 ± 3,67	4,5 ± 3,41
30	4,8 ± 3,77*	4,7 ± 3,60*	4,4 ± 3,31*
40	4,7 ± 3,72	4,4 ± 3,39	4,4 ± 3,34
50	4,7 ± 3,60	4,4 ± 3,08	4,4 ± 3,33
60	4,6 ± 3,57*	4,1 ± 2,40*	3,9 ± 2,83*

Примітка: \* -  $P < 0,05$  у порівнянні з початковою кількістю.

Встановлено, що витримування пробірок з бактеріофагом за температури вище 45 °C знижувало активність фагів. Так, за впливу температури 45 °C через 30 хвилин їх активність знизилася в 1,7 раза ( $P < 0,05$ ), і після 60 хвилин дії складала 4,6 ± 3,57 лог, БУО/мл. Температура 55 і 65 °C діяла більш згубно. Протягом впливу за перших 30 хвилин кількість активних фагів значно знизилася і складала 4,7 ± 3,60 та 4,4 ± 3,31 лог, БУО/мл, а за 60 хвилин знищувала бактеріофаг *Phage SAvB14* на 89,9 та 93,3% відповідно.

Для вивчення зміни літичної активності стафілококових бактеріофагів в процесі зберігання брали закриті в стерильні флакони без додавання консерванту монофаги та витримували їх за температур 0, 4 та 8 °C (табл. 2).

Таблиця 2

### Вплив температури на літичну активність бактеріофагу *Phage SAvB14* при зберіганні, $\log, x \pm SE$ , БУО/мл

Час впливу	Температура, °C		
	0	4	8
24 год	5,1 ± 4,07	5,1 ± 4,07	5,1 ± 4,07
7 днів	5,0 ± 3,97	5,1 ± 4,01	5,0 ± 3,99
14 днів	4,9 ± 3,94*	5,0 ± 3,94*	5,0 ± 3,95*
1 місяць	4,8 ± 3,78	5,0 ± 3,87	4,9 ± 3,91
3 місяці	4,7 ± 3,67*	4,9 ± 3,87*	4,8 ± 3,78*

Примітка: \* -  $P < 0,05$  у порівнянні з початковою кількістю.

З даних табл. 2 видно, що активність бактеріофагу *Phage SAvB14* протягом першої доби зберігання за низьких температур не змінювалася. В подальшому літичний вплив фагів дещо ослаб. Так, через 14 днів зберігання виявили його зниження в середньому в 1,3 ( $P < 0,05$ ) рази за температури 4 - 8 °C. Витримка протягом трьох місяців зменшила активність фагу в 1,5 – 1,7 ( $P < 0,05$ ), порівняно з початковою кількістю активних віріонів.

Дещо нижча активність спостерігалася при 0 °C - кількість фагів через 14 днів складала 4,9 ± 3,94 лог БУО/мл, через 3 місяці була в 2,4 ( $P < 0,05$ ) рази нижчою, порівняно з їх початковою кількістю. Дана температура більш згубно впливала на літичну активність бактеріофагів *Phage SAvB14*, оскільки

кількість життєздатних вірусів була меншою в 1,4 – 1,6 ( $P < 0,05$ ) разів у порівнянні з температурою 4 та 8 °C

## Обговорення

Температура є вирішальним фактором для життєдіяльності бактеріофагів (Olson, Axler, & Hicks, 2004). Вона відіграє фундаментальну роль у прикріпленні, проникненні, розмноженні та тривалості латентного періоду (у випадку лізогенних фагів). При нижчій, ніж оптимальна температура, менша кількість фагового генетичного матеріалу може проникнути в бактеріальні клітини-господарі, а отже менша кількість бактерій може бути задіяна у фазі їх розмноження. Більш високі температури можуть продовжити тривалість латентної стадії (Housby, & Mann, 2009). Крім того, температура впливає на життєздатність при зберіганні бактеріофагів. Тому в завдання нашої роботи входило визначення впливу різних температур на літичну активність бактеріофагу *Phage SAvB14*.

Результати дослідження впливу високих температур на активність бактеріофагу *Phage SAvB14* показали зниження літичної дії вже через перші 10 хвилин і через 60 хвилин впливу за температури 45 °C вона знизилася до 32,4%. Інтенсивніше процеси інактивації фагу проходили при температурах 55 і 65 °C. Через одну годину дії спостерігали лише 10,1 та 6,7% активних фагів відповідно. Ці явища можна пояснити зміною структури фагових білків під впливом високої температури. Температура інактивує фаги за рахунок денатурації нуклеїнової кислоти та білка (Yamaki, Omachi, Kawai, & Yamazaki, 2014; Wang, Cheng, Liou, & Lin, 2001). Такі ж дослідження проведені іншими вченими. Так, дослідники спостерігали, що фаги Myoviridae різко втрачали фагову активність (3.5 logs PFU mL<sup>-1</sup>) після 60 хв інкубації при 60 °C. Проте, деякі фаги можуть розвивати термостійкість завдяки мутаціям або сильним білковим взаємодіям (Kadowaki et al., 1987), що пояснює виживання фагів при високій температурі. На закінчення аналізованого періоду – 3 місяці з моменту дослідження - нами було зафіксовано зниження титру фагів до 59 %.

Протилежним чинником до термічної обробки є вплив низьких температур. Відомо, що режими зберігання бактеріофагів мають важливе значення при розробці технологічних параметрів виготовлення та зберігання біопрепаратів на основі бактеріофагів. Результати наших досліджень показали, що фаг *Phage SAvB14* здатний зберігати свою літичну активність протягом 3 місяців. Проте кращі результати отримані при його зберіганні за температури 4 та 8 °C, порівняно з 0 °C. Подальше 5-6 кратне пасажування бактеріофагів на індикаторних культурах дозволяло відновити їх вихідний титр.

Знижену активність можна пояснити тим що заморожування / відтавання може впливати на фагову ультроструктуру. Це особливо актуально для хвостових фагів з родини Myoviridae. Делікатні волокна хвоста можуть відмежуватися від головки вірусу через зміни осмотичного тиску (Jończyk, Kłak, Międzybrodzki, & Górski, 2011). Така дисоціація робить фаг неефективним як контрольний агент.

Дослідження показують (Askermann, Tremblay, & Moineau, 2004), що хвостові фаги були найбільш стійкими до зберігання. Деякі з них зберігали життєздатність навіть після 10–12 років при температурі 4 °C. У дослідженні Mullan також показана гарна стабільність фагів при зберіганні їх при температурі 4 °C протягом 6 місяців. Фаголізати *Lactococcus* sp., які зберігалися при температурі 2–5 °C, показали незначне зниження титру (на 5–10%) через 6 місяців (Mullan,

2001). Аналогічно, (Olson, Axler, & Hicks, 2004) рекомендують 4 °C в якості оптимальної температури для короткого (не довше 40 днів) зберігання фагів з стічних вод. При цьому зберігання бактеріофагів при температурах нижчих нуля не рекомендується, оскільки кристалічна структура льоду може спричинити їх руйнування, як це було раніше продемонстровано (Warren, & Hatch, 1969). Така температура вимагає внесення захисного середовища: гліцерину, 7% диметилсульфоксиду тощо.

## Висновки

Результати досліджень термічної стійкості показали, що бактеріофаг *Phage SAvB14* частково втрачав свою активність в інтервалі температур 45–65 °C, що є важливим фактором при технологічних особливостях виготовлення фагового препарату. Вибір температурних режимів зберігання препаратів бактеріофагів може впливати на їх стабільність у часі. Найбільш оптимальною температурою для зберігання фагу *Phage SAvB14* є 4 - 8 °C.

*Перспективи подальших досліджень.*  
Дослідити вплив фагу *Phage SAvB14* на біоплівки сформовані *Staphylococcus aureus variant bovis*.

## References

- Ackermann, H. W., Tremblay, D., & Moineau, S. (2004). Long-term bacteriophage preservation. *WFCC Newsletter*, 38(1), 35-40.
- Altamirano, F. L. G., & Barr, J. J. (2019). Phage therapy in the postantibiotic era. *Clinical microbiology reviews*, 32(2), e00066-18. doi: 10.1128/CMR.00066-18
- Fortuna, M. A., Barbour, M. A., Zaman, L., Hall, A. R., Buckling, A., & Bascombe, J. (2019). Coevolutionary dynamics shape the structure of bacteria-phage infection networks. *Evolution*, 73(5), 1001-1011. doi: [10.1111/evo.13731](https://doi.org/10.1111/evo.13731)
- Horiuk, Y. V. (2018). Fagothrapy of cows mastitis as an alternative to antibiotics in the system of obtaining environmentally safe milk. *Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary Sciences*, 20(88), 42-47. doi: [10.32718/nvlvet8807](https://doi.org/10.32718/nvlvet8807)
- Horiuk, Y. V. (2019). Lytic Activity of Staphylococcal Bacteriophage on Different Biotypes of *Staphylococcus aureus*. *Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary Sciences*, 21(94), 115-120. doi: [10.32718/nvlvet9421](https://doi.org/10.32718/nvlvet9421)
- Housby, J. N., & Mann, N. H. (2009). Phage therapy. *Drug discovery today*, 14(11-12), 536-540. doi: [10.1016/j.drudis.2009.03.006](https://doi.org/10.1016/j.drudis.2009.03.006)[Get rights and content](#)
- Jończyk, E., Kłak, M., Międzybrodzki, R., & Górski, A. (2011). The influence of external factors on bacteriophages. *Folia microbiologica*, 56(3), 191-200. doi: 10.1007/s12223-011-0039-8
- Kadowaki, K. I., Shibata, T., Takeuchi, K., Himeno, M., Sakai, H., & Komano, T. (1987). Identification of a temperature-resistant bacteriophage φX174 mutant. *Journal of general virology*, 68(9), 2443-2447. doi: [10.1099/0022-1317-68-9-2443](https://doi.org/10.1099/0022-1317-68-9-2443)
- Kortright, K. E., Chan, B. K., Koff, J. L., & Turner, P. E. (2019). Phage therapy: a renewed approach to combat antibiotic-resistant bacteria. *Cell host & microbe*, 25(2), 219-232. doi: [10.1016/j.chom.2019.01.014](https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.01.014)
- 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. doi: [10.15421/021759](https://doi.org/10.15421/021759)
- Merabishvili, M., Pirnay, J. P., Verbeken, G., Chanishvili, N., Tediashvili, M., Lashkhi, N. & Lavigne, R. (2009). Quality-controlled small-scale production of a well-defined bacteriophage cocktail for use in human clinical trials. *PLoS one*, 4(3), e4944. doi: [10.1371/journal.pone.0004944](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004944)
- Mullan, W. M. A. (2001). Isolation and purification of bacteriophages. [On-line]. Retrieved from: <https://www.dairyscience.info/index.php/isolation-and-purification-of-bacteriophages.html>.
- Olson, M. R., Axler, R. P., & Hicks, R. E. (2004). Effects of freezing and storage temperature on MS2 viability. *Journal of virological methods*, 122(2), 147-152. doi: [10.1016/j.jviromet.2004.08.010](https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2004.08.010)
- Wang, A., Cheng, N., Liou, Y., & Lin, K. (2001). Inactivation of bacteriophage by microwave irradiation. *J. Exp. Microbiol. Immunol*, 1, 9-18.
- Warren, J. C., & Hatch, M. T. (1969). Survival of T3 coliphage in varied extracellular environments. I. Viability of the coliphage during storage and in aerosols. *Applied and Environmental Microbiology*, 17(2), 256-261.
- Yamaki, S., Omachi, T., Kawai, Y., & Yamazaki, K. (2014). Characterization of a novel *Morganella morganii* bacteriophage FSP1 isolated from river water. *FEMS microbiology letters*, 359(2), 166-172. doi: [10.1111/1574-6968.12560](https://doi.org/10.1111/1574-6968.12560)
- Yoon, S. S., Barrangou-Pouey, R., Breidt, F., Klaenhammer, T. R., & Fleming, H. P. (2002). Isolation and characterization of bacteriophages from fermenting sauerkraut. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(2), 973-976. doi: [10.1128/AEM.68.2.973-976.2002](https://doi.org/10.1128/AEM.68.2.973-976.2002)