

УДК 619

ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БАКТЕРИОФАГОВ АКТИВНЫХ В ОТНОШЕНИИ АТИПИЧНЫХ МИКОБАКТЕРИЙ

*Г.М.Конбаева, магистрант лаборатории микробиологии РГП
«Научно-исследовательский институт проблем биологической
безопасности», тел. 8(72636)7-22-28, e-mail: ribs@biosafety.kz;*

*Б.А. Еспембетов, кандидат ветеринарных наук, заведующий
лабораторией микробиологии, тел. 8(72636)7-22-28,
e-mail: ribs@biosafety.kz;*

*Н.С. Сырым, кандидат ветеринарных наук, старший научный
сотрудник лаборатории микробиологии, тел. 8(72636)7-22-28,
e-mail: ribs@biosafety.kz*

*Республика Казахстан, РГП «Научно-исследовательский
институт проблем биологической безопасности» (НИИПББ)*

Ключевые слова: микобактерии, бактериофаг, биологический материал, штаммы, объекты внешней среды.

В статье приведены результаты исследований по изучению основных биологических свойств бактериофагов в отношении атипичных микобактерий, выделенных из объектов внешней среды.

Введение. В последние десятилетия диагностика туберкулеза во многом затрудняется проявлением неспецифических реакций у крупного рогатого скота, вследствие сенсбилизации их организма главным образом атипичными микобактериями. Отсутствие совершенных и эффективных методов дифференциации туберкулиновых реакций является причиной выбраковки среди скомпрометированного поголовья значительного количества животных, у которых на секции свойственных для туберкулеза изменений не обнаруживают и лабораторными методами диагноз не подтверждается [1, 2, 3].

Из изложенного следует, что проблема дифференциации неспецифических туберкулиновых реакций у крупного рогатого скота в регионе не решена еще полностью, что и явилось основанием для наших исследований.

В связи с этим изыскать альтернативные методы борьбы с данной проблемой, такие как применение бактериофагов, являются актуальными [4, 5, 6, 7].

Исследователями Gardner и Weiser [8] удалось изолировать из почвы фаги, действующие на атипичные микобактерии. **Опираясь** на вы-

шеизложенные факты нами из условно-благополучных по туберкулезу хозяйствующих субъектах республики выделены бактериофаги из объектов внешней среды с целью последующим изучением биологических свойств [9, 10].

Целью настоящей работы является изучение биологических свойств бактериофагов специфических к атипичным микобактериям.

Объекты и методы исследований. Для выполнения исследований были использованы: пробы, взятые из объектов внешней среды и биологический материал из различных областей Республики Казахстан. Для культивирования атипичных микобактерий и их фагов были использованы питательные среды Dubos Broth Base и Dubos Oleic Agar Base. Для изучения биологических свойств в качестве индикаторных тест-культур были использованы атипичные культуры микобактерий: *M. kansasii*, *M. avium*, *M. scrofulaceum*, *M. phlei*, *M. terrae*, *M. intracellulare*, *M. smegmatis*.

Результаты исследований. Экспериментальные исследования, по выделению бактериофагов, активных в отношении атипичных микобактерий было проведено из собранных образцов объектов внешней среды различных условно-благополучных регионов республики. В результате исследования были выделены бактериофаги специфические к атипичным микобактериям.

У выделенных фагов были изучены основные биологические свойства.

Литическую активность выделенных фагов определяли методами Аппельмана и Грация путем титрования на жидкой питательной среде. Результаты литической активности фага отражены в таблице 1.

Таблица 1 –Литическая активность противотуберкулезных фагов

Противотуберкулезные фаги	Тест-культуры микобактерий туберкулеза	Активность фагов в титре	
		По методу Аппельмана	По методу Грация
фаг - <i>M. smegmatis</i>	<i>M. smegmatis</i>	10^7	$1,1 \times 10^9$
фаг - <i>avium</i>	<i>M. avium</i>	10^8	1×10^{10}
фаг - <i>kansasii</i>	<i>M. kansasii</i>	10^8	3×10^9
фаг - <i>scrofulaceum</i>	<i>M. scrofulaceum</i>	10^9	$1,1 \times 10^{10}$
фаг - <i>phlei</i>	<i>M. phlei</i>	10^7	2×10^9
фаг - <i>terrae</i>	<i>M. terrae</i>	10^8	4×10^{10}
фаг - <i>intracellulare</i>	<i>M. intracellulare</i>	10^{10}	$1,2 \times 10^7$

Таблица 2 - Спектр литической активности противотуберкулезных фагов

<i>Противотуберкулезные фаги</i>	Количество испытанных тест-культур	Количество тест-культур, чувствительных к бактериофагу	% лизируемых культур микобактерий
фаг - smegmatis	9	M.smegmatis	60
фаг - avium	9	M.avium	50
фаг - kansasii	9	M.kansasii	10
фаг - scrofulaceum	9	M.scrofulaceum	30
фаг - phlei	9	M. phlei	20
фаг - terrae	9	M. terrae	50
фаг - intracellulare	9	M.intracellulare	50

Как видно из таблицы 1, что все выделенные бактериофаги вызывали лизис с атипичными культурами микобактерий.

Определение спектра литической активности изучаемых фагов. К основным биологическим свойствам бактериофага, относится диапазон литической активности – это спектр лизиса гомологичных фагу бактерий который проводят методом нанесения капель бактериофага на газон изучаемой культуры (таблица 2).

Исследования показали, что изучаемые фаги характеризуются различным спектром литической активности. Противотуберкулезные фаги являются моновалентными, диапазон лизиса изучаемых культур составляет в пределах от 10 - 60%.

Определение специфичности на плотной питательной среде определяли методом Отто. Результаты исследований приведены в таблице 3.

На основании полученных результатов можно сделать вывод, о том, что исследуемые фаги разных видов являются специфичными по отношению к атипичным микобактериям.

В качестве физического фактора мы изучали действие высокой температуры на бактериофаги, а в качестве химического - действие хлороформ.

Определение температурной устойчивости фагов. После прогревания активность противотуберкулезных фагов определяли по методу Грациа через каждые 10 мин. Контролем служили непрогретые бактериофаги (таблица 4).

Таблица 3 - Специфичность противотуберкулезных фагов

Виды микобактерий	Противотуберкулезные фаги							Контроль
	фаг - smegmatis	фаг - avium	фаг - kansasii	фаг - scrofulaseum	фаг - phlei	фаг - terrae	фаг - intracellulare	
M.smegmatis	+	+	+	+	+	+	+	-
M.avium	+	+	+	+	+	+	+	-
M.kansasi	+	+	+	+	+	+	+	-
M.scrofulaseum	+	+	+	+	+	+	+	-
M.phlei	+	+	+	+	+	+	+	-
M.terrae	+	+	+	+	+	+	+	-
M.intracellulare	+	+	+	+	+	+	+	-

Таблица 4 - Температурная устойчивость противотуберкулезных фагов

Температурный режим, °С	Активность фагов, подвергнутых температурной обработке, количество активных корпускул в 1 см ³						
	фаг - smegmatis	фаг - avium	фаг - kansasii	фаг - scrofulaseum	фаг - phlei	фаг - terrae	фаг - intracellulare
60 – 63	9x10 ⁹	1x10 ¹⁰	6 x 10 ⁹	1,1x10 ¹⁰	8 x 10 ⁹	4x10 ¹⁰	1,2x10 ⁷
64 – 67	1,1x10 ⁸	8x10 ⁸	1.2x10 ⁸	6 x 10 ⁸	1 x 10 ⁸	3x10 ⁸	1,1x10 ⁷
68 – 70	1,2x10 ⁶	2x10 ⁵	6x10 ⁶	2 x 10 ⁵	1,6x10 ⁶	2x10 ⁵	1,3x10 ⁶
71 – 73	1,1x10 ⁴	7 x 10 ⁵	1,2x10 ⁴	6 x 10 ⁵	1,7x10 ⁴	7x10 ⁵	1,7x10 ⁴
74 – 76	9x10 ³	1 x 10 ⁸	1,1x10 ⁷	1,1x10 ⁵	1,5x10 ⁸	1,1x10 ⁵	1,5x10 ³
77 – 79	3 x 10 ²	1 x 10 ⁴	3 x 10 ²	1,2x10 ⁴	3x10 ⁷	1 x 10 ⁷	1,3x10 ⁷
80 – 82	1x10 ¹	2,9x10 ³	1,1x10 ¹	1,9x10 ³	1x10 ⁶	2,3x10 ⁸	6 x 10 ¹
83 – 85	8x10 ⁹	2,5x10 ³	8x10 ⁹	1,5x10 ⁸	8x10 ⁹	2,3x10 ⁸	1,1x10 ⁹
86 – 88	3x10 ⁷	2x10 ²	3x10 ⁷	2x10 ²	3x10 ⁷	2x10 ⁶	3x10 ⁷
89 – 91	1,1x10 ⁶	1x10 ¹⁰	1,2x10 ⁶	1x10 ¹⁰	1,6x10 ⁶	1,2x10 ¹⁰	1,2x10 ⁶
92 – 94	-	-	-	-	-	-	-
Контроль активности	1,4x10 ⁹	1,1x10 ⁸	1,4x10 ⁹	1,3x10 ⁷	5,0x10 ⁷	1,6x10 ¹⁰	1,1x10 ⁹

Таблица 5 - Устойчивость микобактериофагов микобактерий туберкулеза к воздействию хлороформа

Противотуберкулезные фаги	Активность фагов после обработки хлороформом, количество активных корпускул в 1 см ³				Контроль активности
	10 мин	20 мин	30 мин	40 мин	
фаг - smegmatis	+	+	+	+	7
фаг - avium	+	+	+	+	2
фаг - kansasii	+	+	+	+	8
фаг - scrofulaceum	+	+	+	+	6
фаг - phlei	+	+	+	+	7
фаг - terrae	+	+	+	+	5
фаг - intracellulare	+	+	+	+	8

В результате исследований температурной устойчивости нами было установлено, что прогревание фагов в течение 30 мин при 60 С не оказывает влияния на их активность. Дальнейшее повышение температуры до 65-75 С приводит к потере активности фагов, температура в пределах 92-95 °С вызывает полную инактивацию фагов.

Для определения устойчивости фагов к воздействию хлороформа фаголизат обрабатывали хлороформом в соотношении 1:10 при постоянном встряхивании в течение 40 мин, активность фагов проверяли методом агаровых слоев через каждые 10 мин (таблице 5).

Бактериофаги проявили выраженную устойчивость к воздействию хлороформа в течение периода времени от 10 до 40 мин.

Выводы: Проведены исследования по изучению основных биологических свойств бактериофагов в отношении атипичных микобактерий, **выделенных из объектов внешней среды.**

Все изучаемые фаги имели титр $10^7 - 10^9$ по Аппельману и $10^9 - 10^{10}$ по Грациа, обладали выраженной специфичностью в отношении к атипичным микобактериям: *M. kansasii*, *M. avium*, *M. scrofulaceum*, *M. phlei*, *M. terrae*, *M. intracellulare*, *M. Smegmatis* и не проявляли активности в отношении других видов микобактерий.

Все указанные фаги сохраняли литическую активность в течение 2 месяцев, были устойчивы к нагреванию в пределах 50°С - 70°С в течение 30 мин. Фаги были устойчивы к действию 10% раствора хлороформа в течение 45 мин.

Библиографический список:

1. Созиков, В. А. Роль атипичных микобактерий в эпизоотическом процессе / В. А. Созиков // Ветеринария. – 1996. – № 3. – С. 27-31.
2. Кассич, Ю. Я. Изучение сенсibiliзирующих свойств атипичных микобактерий / Ю. Я. Кассич // Ветеринария. – 1985. – № 2. – С. 29–30.
3. Вейсфейллер Ю.К. Биология и изменчивость микобактерий туберкулеза и атипичные микобактерии. Будапешт, 1975, С.274-295.
4. Elizabeth Kutter Phage therapy: Bacteriophages as antibiotics, Evergreen State College, Olympia, WA 98505 – Nov. 15, 1997.
5. Габрилович И.М. Общая характеристика бактериофагов / Основы бактериофаги. - Минск.-1973.-С.5-24.
6. Васильев Д.А. Бактериофаги микроорганизмов, важных для растений, животных и человека. /Монография с редактированием Васильевой, Золотухина С.М. Ульяновск, 2013 г., 311 стр.)
7. Broxmeyer L, Sosnowska D, Miltner E, Chacon O, Wagner D, et al. (2002) Killing of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium tuberculosis* by a mycobacteriophage delivered by a nonvirulent mycobacterium: a model for phage therapy of intracellular bacterial pathogens. *J Infect Dis* 186:1155–1160 [[PubMed](#)].
8. Gardner, G.M., Weiser, R.S.(1947),*Proc.Soc.exp.Biol.*66,205.
9. Сырым Н.С., Еспембетов Б.А., Сансызбай А.Р. Новые подходы в терапии туберкулеза // Материалы VIII съезда фтизиатров и пульмонологов Узбекистана. Ташкент, 2015. –Стр. 137-138.
10. Сырым Н.С., Еспембетов Б.А. Разработка метода получения микобактериофага // Материалы международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы биологии, биотехнологии, экологии и биобезопасности», посвященной 80-летию заслуженного ученого, профессора В.Л.Зайцева, 2015. – С.272-276.

THE STUDY OF BIOLOGICAL PROPERTIES OF BACTERIOPHAGES ACTIVE AGAINST ATYPICAL MYCOBACTERIA

Kenbaev G. M., Espenbetov B. A., N. With. Raw

Key words: *mycobacteria, bacteriophage, biological material, strains, objects of environment.*

The article presents the results of studies on the basic biological properties of bacteriophages against atypical mycobacteria isolated from the objects of the environment.