

УДК 579.6

ПРОТЕЙНЫЕ БАКТЕРИОФАГИ: ИЗУЧЕНИЕ НЕКОТОРЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ

Рафикова Р.З., магистрант 2 курса факультета ветеринарной медицины и биотехнологии;

Зонова Ю.В., магистрант 1 курса факультета ветеринарной медицины и биотехнологии

Научные руководители: Феоктистова Н.А., кандидат биологических наук, доцент,

Васильев Д.А., доктор биологических наук, профессор ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ

Ключевые слова: *Proteus, бактериофаги, выделение, биологические свойства, культуры, деконтаминация.*

*В статье описаны результаты исследований по выделению кандидатных фагов, специфичных для бактерий рода *Proteus*. Выделено 8 изолятов фагов, у которых изучены биологические свойства (диапазон $4,2 \pm 0,2 \times 10^6$ до $1,9 \pm 0,1 \times 10^9$ БОЕ/мл и от 10^{-5} до 10^{-8} (по Апфельману)), обладают перекрестным лизисом в пределах видов *Proteus vulgaris* и *Proteus mirabilis*; не лизируют культуры гомологичного семейства и представителей гетерологичных семейств.*

Разработка экологически чистых и эффективных средств для деконтаминации продуктов питания протейными бактериофагами включает поиск и селекцию специфических бактериофагов, на основе которых и может быть сконструирован новый биопрепарат [1-2]. Для максимально эффективного и научно обоснованного применения бактериофагов в медицине, ветеринарии, сельском хозяйстве и аквакультурах требуется глубокое их изучение и систематизация на геномном уровне, а также высокая степень очистки применяемых фаговых препаратов. Аналогичные исследования в области изучения протеома бактерий и специфичных им бактериофагов представлены в ряде публикаций зарубежных ученых и отечественных ученых [3-5].

Цель работы – выделение кандидатных фагов, специфичных для бактерий рода *Proteus*, которые могут быть использованы с целью конструирования фагового биопрепарата для обработки пищевого сырья изучение их биологических свойств.

Материалы и методы. Выделение и идентификация бактерий рода *Proteus* проводилась классическими методами, с учетом инфор-

мации, полученной из литературных источников [6]. Выделение бактериофагов и изучение биологических свойств [7-13].

Результаты исследований и их обсуждение. В результате исследований нами выделено 16 новых полевых штаммов бактерий из объектов внешней среды и микробиоты патологического материала. Установлено, что эти 16 культур обладали способностью давать феномен «роения» на среде Эндо и при окраске по Граму было выявлено наличие в мазках грамотрицательных палочек с закругленными концами, не образующих спор и капсул, располагающихся одиночно и попарно. Опорными тестами для идентификации бактерии рода *Proteus* являются дезаминирование фенилаланина, реакция на сероводород, с метилротом, Фогес-Проскауэра, разжижение желатина. Определение видовой принадлежности протеев на основании изучения тинкториальных, культурально-морфологических и биохимических позволило установить принадлежность 9 изолятов к виду *Proteus vulgaris* и 7 изолятов – к *Proteus mirabilis*.

Далее были проведены исследования по оптимизации методов выделения и селекции бактериофагов специфичных к *Proteus spp.*

На 16 культур бактерий рода *Proteus*, которые мы исследовали как «лизогенные», воздействовали индуцирующим фактором (применяли воздействие на бактерии ультрафиолетовых лучей и митомицина С). Анализ литературных данных свидетельствует о том, что при действии на лизогенные культуры индуцирующим фактором продукция фага в значительной степени возрастает, поэтому применяя данную методику удастся выявить фаг в значительно большем проценте случаев, чем при изучении только спонтанной его продукции. Известно, что лизогения широко распространена среди всех систематических групп микроорганизмов, но нам не удалось выявить профаг у выделенных культур рода *Proteus*.

Применяя методику обогащения из объектов внешней среды нами были выделены 8 изолятов фагов, специфичных для бактерий рода *Proteus*.

Селекцию бактериофагов проводили десятикратным пассированием изолированных негативных колоний на МПА с перевиванием на МПБ. Оптимальное соотношение - 1:1, т.е. Время пассажа – 3,0-3,5 часа инкубирования при температуре 36 ± 2 °С. Для очистки фагов от бактериальных клеток применяли три метода: обработка хлороформом (трихлорметаном), прогревание и фильтрация с применением мембранных фильтров фирмы «Millipore Millex-GP». Установлено, что наиболее эффективным способом является многоступенчатая фильтрация.

В результате проведенных исследований была создана коллекция из восьми вирулентных бактериофагов бактерий рода *Proteus*, выделенных из объектов внешней среды (сточные воды, фекалии, смывы с клеток, почва с территории ферм). Авторами была оптимизирована схема выделения вирулентных бактериофагов из объектов внешней среды (этап высева центрифугата на газон индикаторной культуры по методу Грациа – диффузия в «мягкий» агар – заменен на «стекающую каплю» по Отто; культивирования – подобраны оптимальные температуры, временные и количественные параметры, очистки и хранения выделенных бактериофагов.

Были изучены основные биологические свойства выделенных бактериофагов рода *Proteus*, включающие спектр литического действия и показатели литической активности (диапазон $4,2 \pm 0,2 \times 10^6$ до $1,9 \pm 0,1 \times 10^9$ БОЕ/мл (по методу Грациа) и от 10^{-5} до 10^{-8} (по Аппельману)), морфологию бляшкообразующих единиц (высеве на МПА образуются негативные колонии с четким краем и прозрачным центром различного диаметра в диапазоне от $0,2 \pm 0,1$ до $0,6 \pm 0,1$ мм), биологическую активность в отношении патогенных видов энтеробактерий и других семейств. Установлено, что выделенные и селекционированные бактериофаги *Proteus* специфичны в пределах рода, обладают перекрестным лизисом в пределах видов *Proteus vulgaris* и *Proteus mirabilis*; не лизируют культуры гомологичного семейства и представителей гетерологичных семейств. Изученные биологические свойства позволяют систематизировать биологические особенности каждого из выделенных клонов вирулентных бактериофагов.

Кандидатными для создания фагового биопрепарата были признаны 3 бактериофага, у которых было изучено взаимодействие фаг-хозяин и определены факторы, оказывающие влияние на данный процесс.

Установлено, что латентный период внутриклеточного развития фага Pr - 4 УГСХА и *Proteus vulgaris* 16 УГСХА равен 25-26 минут. Среднее количество негативных колоний на чашках при высева из 4-ой пробирки с 15 по 25 минуту опыта равно 149,2, а при высева с 40 по 60 минуту из пятой пробирки – 68,62. Средняя урожайность бактериофага Р - 4 УГСХА равна $6862:149,2=46,0$ вирусных частиц на одну микробную клетку *Proteus vulgaris* 16 УГСХА.

Определено, что латентный период внутриклеточного развития фага Pr - 6 УГСХА и *Proteus vulgaris* 28 УГСХА равен 25-26 минут. Среднее количество негативных колоний на чашках при высева из 4-ой пробирки с 15 по 25 минуту опыта равно 104,9, а при высева с 40 по 60 минуту

из пятой пробирки – 46,16. Средняя урожайность бактериофага P - 6 УГСХА равна $4616:104,9=44,0$ вирусных частиц на одну микробную клетку *Proteus vulgaris* 28 УГСХА.

В экспериментах нами было выяснено, что латентный период внутриклеточного развития фага Pr - 7 УГСХА и *Proteus vulgaris* 38 УГСХА равен 25-26 минут. Среднее количество негативных колоний на чашках при высеве из 4-ой пробирки с 15 по 25 минуту опыта равно 246,6, а при высеве с 40 по 60 минуту из пятой пробирки – 67,84. Средняя урожайность бактериофага P - 7 УГСХА равна $6784:246,6=27,5$ вирусных частиц на одну микробную клетку *Proteus vulgaris* 38 УГСХА.

Библиографический список:

1. Сятчихина, Е.Н. Критерии отбора бактериальных штаммов и бактериофагов для формирования производственной коллекции, специфически лизирующих бактерии родов: *Klebsiella*, *Echerichia*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* / Е.Н. Сятчихина, П.А. Набатников, С.А. Коровкин, А.В. Катлинский, Г.М. Игнатъев // Биопрепараты. Профилактика. Диагностика. Лечение. – 2016. – Т. 16. - № 2 (58). – С.90-95.
2. Чугунова, О.Е. Изучение свойств протейных фагов / О.Е. Чугунова, Н.А. Татарникова // Пермский аграрный вестник. - № 3(15). – 2016. – С. 108-122.
3. Bacteriophages. Methods and Protocols, Volume 3 / Martha R.J. Clokie, A. M. Kropinski, R. Lavigne. - Humana Press, 2018. – 311 p.
4. Kutter, E. Bacteriophages: biology and applications / E. Kutter, A. Sulakvelidze. - Boca Raton, FL : CRC Press, 2005. - 510 p.
5. Isolation and characterization of KP34 - a novel фKMV-like bacteriophage for *Klebsiella pneumoniae* / Z. Drulis-Kawa, P. Mackiewicz, A. Kesik-Szeloch, E. Maciaszyk-Dziubinska, B. Weber-Dabrowska, A. Dorotkiewicz-Jach, D. Augustyniak, G. Majkowska-Skrobek, T. Bocer, J. Empel, A.M. Kropinski // Applied Microbiol. Biotechnol. – 2011. – Vol. 90. – P. 1333-1345.
6. Васильев, Д.А. Выделение и изучение биологических свойств бактерий рода *Proteus* / Д.А. Васильев, Н.А. Феоктистова, С.Н. Золотухин // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2017. - № 2 (38). – С. 70-76.
7. Феоктистова, Н.А. Протейные бактериофаги: изучение некоторых биологических свойств / Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2017 - № 4(40). – С. 75-80.
8. Феоктистова, Н.А. Изучение биологических свойств бактериофагов рода *Proteus* / Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2017 - № 3(39). – С. 99-105.

9. Калдыркаев, А.И. Разработка системы фаговаров бактерий *Vacillus cereus* для идентификации и мониторинга данного микроорганизма / А.И. Калдыркаев, Н.А. Феоктистова, А.В. Алешкин // Бактериофаги микроорганизмов значимых для животных, растений и человека. – Ульяновск, 2013. – С. 211-225.
10. Калдыркаев, А.И. Разработка системы фаговаров бактерий *Vacillus cereus* / А.И. Калдыркаев, Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев и др. // Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения: материалы V Международной научно-практической конференции. – Ульяновск, 2013. С. 178-185.
11. Схема идентификации *Vacillus cereus* и *Vacillus mycoides* в объектах санитарного надзора/ Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин, В.А. Макеев, А.И. Калдыркаев, К.В. Маслюкова, А.В. Алешкин, Б.И. Шморгун // Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности: материалы Третьей научно-практической конференции с международным участием. 2016. С. 88.
12. Биоиндикация *Vacillus anthracis* в пробах почвы методом постановки реакции нарастания титра фага/ С.Н. Золотухин, Д.А. Васильев, Н.А. Феоктистова, Е.И. Климушкин, К.В. Белова, Б.И. Шморгун, И.Г. Швиденко // Российский журнал Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии. 2016. № 4 (20). С. 55-64.
13. Методы идентификации *Vacillus coagulans*, включая фагоидентификацию/ Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин, К.В. Белова, К.В. Шокина, М.А. Лыдина, А.В. Алешкин, Б.И. Шморгун, И.Б. Павлова, Т.Г. Юдина // Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности: материалы Третьей научно-практической конференции с международным участием. 2016. С. 89-90.

PROTEACEAE BACTERIOPHAGES: A STUDY OF SOME BIOLOGICAL PROPERTIES

Rafikova R.Z., Zonova Yu.V.

Key words: *Proteus*, bacteriophages, allocation, biological properties, cultures, decontamination.

*In article results of researches on allocation the kandidatnykh of the phages specific to sort Proteus bacteria are described. 8 isolates of phages at which biological properties are studied (range $4,2 \pm 0,2 \times 10^6$ up to $1,9 \pm 0,1 \times 10^9$ BOE/ml and from 10^5 to 10^8 (Appelman)) are emitted, possess cross lysis within types of *Proteus vulgaris* and *Proteus mirabilis*; do not lizirut the culture of homologous family and representatives of heterological families.*