

### ПРЕДПОСЫЛКИ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ БАКТЕРИОФАГОВ *ESCHERICHIA COLI* O157:H7 И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ЦЕЛЯХ МОНИТОРИНГА ИНФЕКЦИИ, ТЕРАПИИ И БИОПРОЦЕССИНГА

**Молофеева Надежда Ивановна**, кандидат биологических наук, доцент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

**Кузьмина Наталья Сергеевна**, магистрант

**Ляшенко Елена Анатольевна**, кандидат биологических наук, доцент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ

432017, г. Ульяновск, бульвар Новый Венец, 1; 8(8422)55-95-47

e-mail: tolo-na@mail.ru

**Ключевые слова:** *Escherichia coli* O157:H, бактериофаг, биологические свойства.

В статье представлены предпосылки для выделения бактериофагов *Escherichia coli* O157:H7 и их использования в целях мониторинга инфекции, терапии и биопроцессинга, тем самым обосновано направление наших исследований по выделению и изучению биологических свойств фагов бактерий *Escherichia coli* O157:H7. Приведены результаты по выделению и изучению их биологических свойств. Выделены 2 бактериофага из сточных вод свиноводческого хозяйства Самарской области. Выделенные фаги отличались по морфологии негативных колоний. Литическая активность селекционированных бактериофагов составила по Аппельману  $10^{-5}$ – $10^{-7}$ , титр фага №1 по Грациа составила  $3,4 \times 10^9$ , фага №2 –  $1,5 \times 10^9$ . Спектр литической активности по отношению к изучаемым культурам фаг №1 – 80%, фага №2 – 100%. Селекционированные фаги являются специфичными по отношению к *E. coli* O157:H7 и не активны к представителям других видов бактерий. Степень устойчивости бактериофагов к инактивирующим факторам физического и химического воздействия проведены по методикам, предложенным И.М. Габриловичем. В результате исследований было установлено, что прогревание фагов при 60–80°C не оказало заметного влияния на содержание активных корпускул фага в 1 мл. При прогревании фагов при 81–83 °C их активность снижалась. При температуре 84–88°C количество негативных колоний насчитывалось от до  $10^1$ – $10^2$  корпускул фага. Выше 88°C в 1 мл фаголизата фага не обнаружили.

#### Введение

В первую очередь обоснуем предпосылки, заставившие нас заняться исследованиями по выделению и изучению бактериофагов бактерий *Escherichia coli* O157:H7. Достаточно хорошо известная в течение 130 лет бактерия кишечной палочки *Escherichia coli* за последние годы обернулась своей новой и достаточно кровавой стороной. Значимость и опасность для человека и животных энтерогемморагических штаммов *Escherichia coli* O157:H7 постоянно возрастает [1]. Одним из первых, официально идентифицированным случаев диагностики заболевания кровавой диареей, вызванной бактерией *E. coli* O157:H7, произошел в Канаде, в 1978 г. В Англии за период с 1989 по 1991 г.г.

из 1275 человек, бактериологически исследованных, выявлено 15% носителей кишечной палочки O157:H7, с клиническими признаками у них гемолитического уремического синдрома [2]. Величина инкубационного периода у заражённых указанным патогеном был равен 3,8–3,9 дням, и симптомы длились от 3 до более 7 дней. Во время другой вспышки массовой токсикоинфекции проявления симптомов продолжалось до 8 дней. И что самое главное – для выделения этиологических агентов из фекалий пациентов требуется проведение бактериологического исследования образцов в течение нескольких дней после появления симптомов. Уточним, что разрабатываемая и предлагаемая нами реакция нарастания титра фага (РНФ) с выделен-

ными нами бактериофагами проводится за 18 - 36 часов. Повторяем, что в США бактерия *Escherichia coli* серогруппы O157:H7 является одним из главных бактериальных патогенов пищевого происхождения, который впервые был ассоциирован с болезнями человека во время вспышки геморрагических колитов в 1982 году, а в 1994 году данный микроорганизм занесен в реестр США как подлежащее регистрации национальное заболевание. Считается, что в Соединенных Штатах эта бактерия вызывает в среднем более, чем 63000 заболеваний пищевого происхождения и до 60 случаев смерти ежегодно. Инфекция *E. coli* O157:H7 создаёт особую озабоченность в отношении детей раннего возраста и пожилых людей, поскольку эта инфекция, вызывающая гемолитическо-уремический синдром, в их возрасте может приводить к необратимым изменениям почек [3,4,5].

Помимо того, что данное заболевание имеет большую важность для здоровья нации, существенными являются экономические последствия загрязнения *E. coli* O157:H7 продуктов питания. Было подсчитано, что число госпитализаций и смертельных случаев из-за инфекций, вызванных *E. coli* O157:H7, в Соединенных Штатах может приводить к сумме 405 млн. долларов медицинских расходов и расходов по потере производительности ежегодно. Следовательно, основные издержки промышленных и сельскохозяйственных производителей продуктов питания могут заключаться в виде потери своей продукции и огласке, наносящей вред брендам, которые связаны с продукцией, загрязненной этой бактерией. Эти расходы существенно увеличиваются (из-за дополнительных судебных издержек и соглашений об урегулировании) в случае, если потребление данных продуктов питания привело к человеческой смертности или болезни, и могут заставить компанию уйти из бизнеса [6, 7, 8]. Особый аспект проблемы - это соблюдение санитарных требований. Происходившая в Шотландии в 1996 г. массовая вспышка кишечных инфекций является примером того, что может произойти при ненадлежащем приготовлении пищи и несоблюдении чистоты на кухне. Зарегистрировано около 500 случаев массовых пищевых отравлений, вызванных употреблением, по крайней мере, шести различных мясных продуктов, в которых инфекционными агентами были Stx-продуцирующие штаммы *E. coli* O157:H7 [9]. Усилия по снижению загрязнения *E. coli* O157:H7 и профилактики инфекции, главным образом, сосредоточены на промывании, применении различных антибактериальных химических средств и гамма-радиоактивном облучении для пищевого сырья, и каждый из этих методов имеет свои

практические и экологические недостатки. Относительно недавним предложением, благоприятным для окружающей среды подходом к устранению или значительному сокращению загрязнения *E. coli* O157:H7 продуктов питания, является применение литических бактериофагов как агентов биоконтроля.

Установлено, что используемый в биопротессинге коммерчески доступный препарат, состоящий из трех литических бактериофагов, специфических для *E. coli* O157:H7, значительно снижает уровни бактерий на экспериментально загрязненной говядине на 94% и на листьях салата на 87% после пятиминутного контакта. К примеру, единичная вспышка заболевания, вызванного *E. coli* O157:H7, связанная с употреблением в пищу загрязненного шпината, стоила производителям шпината 37-74 млн долларов. Таким образом, существуют очень серьезные экономические стимулы и стимулы, связанные с общественным здравоохранением, для развития новых, экологически чистых, безопасных и эффективных способов справиться с загрязнением *E. coli* O157:H7 широкого ряда продуктов питания [10, 11].

Существует ещё одна область использования бактериофагов, помимо идентификации бактерий, биопротессинга, терапии молодняка и хирургических инфекций - это понижение количества опасных бактерий в кишечнике с/ж перед их убоем, что позволяет впоследствии снизить в некоторых экспериментах к нулю количественные показатели обсеменения мясной туши штаммами *Escherichia coli* O157:H7 [12].

Ряд исследовательских групп оценивали применение фаговых коктейлей для снижения содержания различных бактериальных патогенов в животноводстве в течение коротких временных периодов. Callaway T.R и его сотрудники (2006) выделили фаг, который воздействовал на *E. coli* O157:H7 в фекальных образцах, собранных на производстве откорма скота в центральной части Соединенных Штатов. Был определен диапазон хозяйских фагов, и фаги были объединены, чтобы сформировать фаговый коктейль в исследованиях *in vivo*. Когда коктейль из фагов был введен овцам, намеренно зараженным *E. coli* O157:H7, кишечная популяция *E. coli* O157:H7 уменьшилась ( $p < 0,05$ ) в слепой и в прямой кишке, и данный результат показал, что правильно выбранные фаги могут использоваться для снижения содержания *E. coli* O157:H7 у мясных животных. Авторы пришли к выводу, что применение фаговой терапии может быть важной частью комплексной программы по снижению содержания пищевых патогенов. Raya R.R. и др. выделили у овец бактериофаг, устойчивый к колонизации *E. coli*

O157:H7, и использовали этот фаг для уменьшения популяции *E. coli* O157 у овец. In vitro, этот бактериофаг эффективно взаимодействовал с *E. coli* O157:H7. Четырем овцам ввели однократно, перорально  $10^{11}$  фага, через 3 дня после заражения их *E. coli* O157. Овцы, получившие однократную пероральную дозу фага, продемонстрировали снижение на 2-3 логарифмические единицы уровня содержания *E. coli* O157:H7 в слепой и в прямой кишке в течение 2 дней по сравнению с уровнем в контрольных группах. Та же группа исследователей позже объединила указанный фаг с ещё одним охарактеризованным недавно выделенным фагом, который имел высокую специфичность по отношению к *E. coli* O157:H7, и продемонстрировала, что данный коктейль был очень эффективен в снижении содержания *E. coli* O157:H7 на 3 логарифмических единицы по сравнению с контрольными образцами, не обработанными фагами. Авторы пришли к выводу, что фаговые коктейли являются эффективными, в снижении содержания *E. coli* O157:H7 в желудочно-кишечном тракте жвачных животных. Данные исследования показывают, что фаговая терапия может быть полезной для снижения количества *E. coli* O157:H7 у взрослых особей домашнего скота и также может быть эффективным методом уменьшения содержания *E. coli* O157:H7 у живых животных непосредственно перед убоем. Другие исследования изучили вопрос применения фагов для контроля обсемененности патогенными бактериями у молодых животных [13].

К примеру, Waddell T и др. (2000) назначали 7-8-недельным отлученным от коровы телятам курс коктейля из шести фагов продолжительностью до 7 дней перед заражением их *E. coli* O157:H7. Результаты показали, что у большинства телят, не получивших лечение, *E. coli* O157:H7 выделялась с фекалиями как минимум на протяжении 12-16 дней. В противоположность этому, получившие лечение телята прекратили выделять *E. coli* O157:H7 по прошествии 8 дней, что говорит о значительном увеличении концентрации фагов, которые находились в фекалиях животных. Увеличение количества выделяемых фагов произошло по причине репликации фагов у телят, что подтверждает тот факт, что подобный результат не наблюдался у неинфицированных телят из контрольной группы [14].

В настоящее время используются различные стратегии обработки для устранения или значительного уменьшения загрязнения *E. coli* O157:H7, начиная с простого мытья продуктов и заканчивая химической или физической деконтаминацией пищи. Данные методы различаются по их эффективности, стоимости и воздействию на вкус и эстетическую

сохранность пищи. К примеру, гамма-облучение считается одним из наиболее эффективных методов обработки, способным снизить количество *E. coli* O157:H7 и многих других бактерий на  $5 \log_{10}$ . Однако, это очень дорогой процесс и наиболее эффективные (высокие) уровни облучения могут отрицательно повлиять на органолептические свойства продуктов питания, включая их вкус и внешний вид. Другие методы связаны с применением различных антибактериальных химических средств, таких как гипохлорит кальция, которые, как сообщалось, уменьшают загрязнение.

*E. coli* в 1,5 – 2,5 logs, но многие из этих химических средств негативно влияют на окружающую среду. В дополнение к воздействию на патогенные бактерии и гамма-облучение и химические антибактериальные средства затрагивают и полезные бактерии, оказывая таким образом негативное влияние на сохранение полезных бактерий в продуктах питания. Относительно новая интервенционная стратегия, которая имеет потенциал для уменьшения этих проблем, включает в себя применение литических бактериофагов, нацеленных на специфические бактериальные патогены пищевого происхождения в различных продуктах питания [15].

Бактериофаги (или вирусы, лизирующие бактерии) – это самая распространенная форма жизни на Земле, и они являются частью микрофлоры всех существующих свежих продуктах питания. Концепция использования литических бактериофагов для повышения безопасности пищевых продуктов основывается на применении препаратов литических фагов для обработки пищи, которая может быть загрязнена бактериальными патогенами пищевого происхождения, чувствительными к данным фагам. В случае, если пища загрязнена целевым бактериальным патогеном, фаг устранит или значительным образом снизит данное загрязнение и, таким образом, сделает пищу пригодной для потребления без отрицательного воздействия на ее нормальную, полезную микрофлору. Такую стратегию называют бактериофаг-опосредованный биоконтроль (биопроессинг). В качестве наглядного примера эффективности использования бактериофага можно указать на исследования О`Флинн и др. Они изучали использование трех фагов по отдельности и в сочетании в виде коктейля для выяснения их способности лизировать *E. coli* O157:H7 в мясе. Восемнадцать кусков мяса были инокулированы  $100 \text{ мл } 10^3 \text{ КОЕ/мл}$  рифампин-устойчивыми штаммами *E. coli* O157:H7 и три фаговых коктейля ( $\text{MOI } 10^6$ ) были равномерно добавлены с помощью пипетки на девять кусков говядины. Оставшиеся девять кусков говядины были инокулированы *E. coli* O157:H7, а не

фагом и служили в качестве контрольных образцов. После инкубации в течение 1 часа обработанные и контрольные куски мяса были обогатены на ВНИ бульоне при температуре 37°C в течение 2 часов, и затем обогащенные образцы были оценены в зависимости от количества бляшек. На семь из девяти обработанных фагом образцов отсутствовала *E. coli* O157:H7, в то время, как на двух образцах *E. coli* O157:H7 присутствовала в количестве меньшем, чем 10 КОЕ/мл. Напротив, на контрольных образцах *E. coli* O157:H7 присутствовала в концентрации 10<sup>5</sup> КОЕ/мл [16].

Интерес к бактериофаг-опосредованному биоконтролю недавно получил дополнительный импульс, поскольку различные лаборатории в настоящее время занимаются разработкой программ, которые применяют бактериофаги для осуществления мониторинга за патогенами. В нескольких отчетах было подробно описано успешное применение бактериофагов для значительного снижения уровней различных патогенов пищевого происхождения в разнообразных продуктах питания. Также в Соединенных Штатах и Европе недавно были одобрены различные фаговые препараты для непосредственного нанесения на продукты питания: к примеру, один из этих FDA-проверенных препаратов является бактериофаговым коктейлем, основанным на трех *E. coli* O157:H7-специфических литических бактериофагах, которые, как сообщалось ранее, значительно снижают загрязнение *E. coli* O157:H7 на поверхностях и различных пищевых продуктах.

Таким образом, роль и значение для лабораторной диагностики инфекции, мониторинга инфекции в объектах ветеринарного надзора, контроля пищевого сырья и деконтаминации его специфическими бактериофагами, а также терапии и предубойной деконтаминации этот биологический объект не только не утратил, а, наоборот, начал привлекать к себе всё более пристальное внимание исследователей. Указанная возможность вытекает из специфичности действия фагов, которая может быть настолько выражена, что позволяет лизировать не только отдельные виды, но и серологически неотличимые штаммы в пределах одного вида. Данная способность основана на специфических возможностях рецепторов бактериофага взаимодействовать с рецепторами определённых видов (идентификация) или типов (фаготипирование) бактерий, в результате чего происходит их лизис.

Цель нашей работы - выделение искомым бактериофагов энтерогемморагических штам-

мов бактерий *E. coli* O157:H7 для дальнейшего использования в диагностики инфекции или биопроессинга.

#### **Объекты и методы исследований**

Для работы мы использовали бактериофаги на 5 референс-штаммов бактерий *E. coli* O157:H, *Proteus* 6 штаммов, *Citrobacter* 4 штамма, *Morganella* 2 штамма, *Klebsiella* 2 штамма, *Salmonella* 1 штамм, *Staphylococcus* 3 штамма, *Bacillus cereus* 3 штамма (полученные из коллекции кафедры МВЭ и ВСЭ ФГБОУ ВО Ульяновского ГАУ).

При проведении исследований использовали питательные среды, рекомендованные Молодцовой Н.И. (2016) [17].

Исследования проводились по методикам, апробированным сотрудниками кафедры МВЭ и ВСЭ ФГБОУ ВО Ульяновского ГАУ [9-14].

#### **Результаты исследований**

Первоначально для поиска свободных фагов мы применили метод, предложенный Luria S. E., однако получили отрицательный результат. Второй эксперимент был проведён по методике, предложенной и описанной К. Сульдиной и др. [17]. Результаты исследований свидетельствуют, что культуры *E. coli* O157:H7 штаммы №904, №Г-1-36, №г-214, №EDL-933, №я-12 в опытах при воздействии на них ультрафиолетовыми лучами не проявили лизогенных свойств.

Мы решили перейти к методу выделения бактериофагов *E. coli* O157:H7 из объектов ветеринарного надзора - почв, стоков ферм животноводческих предприятий.

Нами выделены 2 бактериофага из сточных вод свиноводческого хозяйства Самарской области. Для получения чистой линии фага проводили до пяти пассажей из изолированных негативных колоний. Выделенные фаги отличались по морфологии негативных колоний. Результаты опыта представлены в таблице 1.

Селекцию бактериофагов по повышению их литической активности проводили с помощью пассирования фага на бактериальной индикаторной культуре по схеме, предложенной Adams M. H. [18]. Результаты представлены в таблице 2.

В результате проведённых опытов нами были выделены и изолированы методом прогревания 2 штамма фагов *E. coli* O157:H7 №1 и №2. Исследовались свойства фагов *E. coli* O157:H7 по критериям, предложенным Феоктистовой Н.А.

Литическую активность селекционированных бактериофагов определяли по описанию Luria S. E. Титр фага №1 составил 3,4x10<sup>9</sup>. Титр фага №2 составил 1,5x10<sup>9</sup>.

Для изучения спектра литической активности двух селекционированных фагов мы использовали 5 референс штаммов *E.coli* O157:H7 - №904, №Г-1-36, №г-214, №EDL-933, №я-12.

Нужно отметить, что бактериофагов, лизирующих только один штамм, обнаружено не было. Результаты опыта представлены в таблице 3.

Опыты показали, что наиболее широким спектром литической активности по отношению к изучаемым культурам обладает штамм фага №2 -100%, а фаг №1 – 80%.

Видовая специфичность фагов используется в практике для дифференциации бактерий. Эта способность фагов определяется, прежде всего, сродством их к рецепторам лизируемых бактерий. В отличие от множественно искусственно созданных систем для определения и дифференциации различных антигенных структур бактериальной клетки, использование антител или амплификации нуклеиновых кислот (ПЦР), при использовании бактериофага мы имеем систему естественно возникшую в ходе эволюции, когда бактериофаг специфически распознаёт свои рецепторы и связывается исключительно с клетками своего бактериального хозяина. Это взаимодействие используется в целом ряде различных методик специфического определения и дифференциации штаммов бактерий хозяев бактериофагов. Одной из первых таких методик и стало фаготипирование - метод, в котором набор фагов используется для того, чтобы по их способности лизировать исследуемые бактериальные культуры и образовывать на них бляшки, тем самым различая роды, виды, а возможно и отдельные штаммы бактерий. Эти различия в восприимчивости к инфекциям бактериофаги отражают целый ряд характеристик бактерий, таких, как наличие специфических поверхностных рецепторов, систем рестрикции - модификации, резистентных профагов определённых типов т/д.

Определение видовой специфичности 2-х изучаемых бактериофагов *E.coli* O157:H7 проводили по схеме, предложенной Katrin A.

При изучении бактериофагов *E.coli* O157:H7 по отношению к представителям сопутствующих штаммов доказана их специфичность. Результаты представлены в таблице 4.

На основании полученных результатов можно сделать вывод о том, что селекционированные фаги являются специфичными по отношению к *E.coli* O157:H7 и не активны к представителям других видов бактерий.

Степень устойчивости бактериофагов к инактивирующим факторам физического воздействия проведены по общепринятым методикам [19].

Таблица 1

**Выделение бактериофагов из сточных вод**

№	Используемая бактериальная культура <i>E.coli</i> серологической группы O157	Наличие негативных колоний или лизиса
1	904	Прозрачные негативные колонии, округлые с ровными краями, 1,0-1,5
2	904	Прозрачные негативные колонии, с ровными краями, 0,5-1,0

Таблица 2

**Выделенные бактериофаги *E.coli* O157:H7**

№	Название фага	Лизис референс штаммов	Из чего Выделен
1.	№ 1	№904, №Г-1-36, №г-214, №EDL-933	Сточные воды свиноводческого хозяйства Самарской области
2.	№ 2	№904, №Г-1-36, №г-214, №EDL-933, №я-12	Сточные воды свиноводческого хозяйства Самарской области

Таблица 3

**Спектр литической активности эшерихиозных фагов по отношению к штаммам бактерий *E.coli* O157.**

№	Фаги	Кол-во испытан. Бактериальных штаммов	Из них чувствит. к фагу	Лизируемые штаммы	% лизируемых Штаммов
1	№1	5	4	№904, №Г-1-36, №г-214, №EDL-933	80
2.	№2	5	5	№904, №Г-1-36, №г-214, №EDL-933, №я-12	100

В результате исследований было установлено, что прогревание фагов при 60-80°C не оказало заметного влияния на содержание активных корпускул фага в 1 мл. При прогревании фагов при 81-83°C их активность снижалась. При температуре 84-88°C количество негативных колоний насчитывалось от до 10 - 10<sup>2</sup> корпускул фага. Выше 88°C в 1 мл фаголизата фага не обнаружили. Результаты опыта представлены в таблице 5.

Бактериофаги проявили выраженную устойчивость к воздействию хлороформа. При его воздействии на фаги в течение 40 минут существенного уменьшения фаговых корпускул в 1 мл не наблюдалось. Результаты исследований представлены в таблице 6.

**Таблица 4**  
**Специфичность выделенных бактериофагов**

№		Количество штаммов	Фаг №1	Фаг №2
1	<i>E.coli</i> O157:H7 шт. №904	1	+	+
2	<i>E.coli</i> O157:H7 шт. №Г-1-36	1	+	-
3	<i>E.coli</i> O157:H7 шт. №g-214	1	+	+
5	<i>E.coli</i> O157:H7 шт. № EDL-933	1	+	+
6	<i>E.coli</i> O157:H7 шт. №я-12	1	-	+
8	<i>Proteus</i>	6	-	-
9	<i>Citrobacter</i>	4	-	-
10	<i>Morganella</i>	2	-	-
11	<i>Salmonella</i>	1	-	-
12	<i>Klebsiella</i>	2	-	-
13	<i>Staphylococcus</i>	3	-	-
15	<i>Bacillus</i>	3	-	-

+ - лизис культуры; -- отсутствие лизиса.

**Таблица 5**  
**Температурная устойчивость бактериофагов *E.coli* O157:H7**

Температура, °С	ФАГ	
	№1	№2
60 –63	1,0x10 <sup>8</sup>	3,5x10 <sup>8</sup>
64 –66	3,3x10 <sup>8</sup>	4,3x10 <sup>8</sup>
67 –70	2,5x10 <sup>8</sup>	3,1x10 <sup>8</sup>
71 –73	1,2x10 <sup>8</sup>	1,2x10 <sup>8</sup>
74 –76	5,9x10 <sup>8</sup>	3,1x10 <sup>8</sup>
77 –80	5,4x10 <sup>8</sup>	1,5x10 <sup>8</sup>
81 –83	1,5x10 <sup>6</sup>	1,2x10 <sup>6</sup>
84 –85	3,2x10 <sup>2</sup>	1,1x10 <sup>1</sup>
86 –88	4±1,2	-
88-90	-	-
Контроль фага	4x10 <sup>8</sup>	5x10 <sup>8</sup>
Контроль культуры	Рост бактерий	Рост бактерий

**Таблица 6**  
**Устойчивость бактериофагов *E.coli* O157 к воздействию хлороформом**

№	Фаги	Обработка 15 мин	Обработка 30 мин	Обработка 40 мин.
		% выживаемости фага		
1	№1	100	100	100
2	№2	100	100	100

Обработка бактерий *E.coli* O157:H7 индикаторного штамма в течение 17 минут хлороформом приводила к их полной инактивации.

#### **Выводы**

Выделено 2 бактериофага из объектов внешней среды свиноводческих хозяйств Самарской области.

Выделенные фаги имели различную морфологию негативных колоний.

Литическая активность селекционированных бактериофагов составила по Аппельману 10<sup>-5</sup> –10<sup>-7</sup>, титр фага №1 по Грациа составила 3,4x10<sup>9</sup>, фага №2 - 1,5x10<sup>9</sup>.

Спектр литической активности по отношению к изучаемым культурам фаг №1 – 80%, фага №2 -100%. Селекционированные фаги являются специфичными по отношению к *E.coli* O157:H7 и не активны к представителям других видов бактерий.

В результате исследований было установлено, что прогревание фагов при 60-80°C не оказало заметного влияния на содержание активных корпускул фага в 1 мл. При прогревании фагов при 81-83 °С их активность снижалась. При температуре 84-88°C количество негативных колоний насчитывалось от до 10 - 10<sup>2</sup> корпускул фага. Выше 88° С в 1 мл фаголизата фага не обнаружили.

#### **Библиографический список**

1. A new perspective on lysogeny: prophages as active regulatory switches of bacteria / R. Feiner, T. Argov, L. Rabinovich, N. Sigal, I. Borovok, A. Herskovits // Nature Reviews Microbiology. – 2015. – № 13. – P. 641-650.
2. Marine tubeformmetamorphosis induced by arrays of bacterial phage tail-like structures / N. J. Shiruma, M. Pilhofer, G. L. Weiss, V. G. Hadfields, G. J. Jensen, D. K. Nevman // Science. – 2014. - № 343. – P. 529-533.
3. Communication bewet viruses guides lisis-lisogeny decisions / Z. Erez, I. Steinberger-Levy, M. Shamir, S. Doron, A. Stokar-Avihail, Y. Peleg, S. Metamed, F. Leavitt, A. Savidor, S. Albeck, G. Amitail, R. Sorek // Nature. – 2017. - № 251. – P. 488-493.
4. Bacteriophages jf the Human Gut: The «Known Unknown» of the Microbiome // Cell Host Microbe. – 2019. - № 13. – P.195-209.
5. Phage puppet masters of the marine microbial realm / M. Breitbart, C. Bonnain, K. Malki, N. F. Sawaja // Nat Microbiol. – 2018. - № 3. – P.754-766.
6. Taylor, N. M. I. Coninjections systems of bacteriophages and releted systems / N. M. I. Taylor, M. J. van Raaij, P.G. Leiman // Mol. Microbiol. – 2018. - № 108. – P. 6-15.

7. Lysogeny in nature: mechanisms, impact and ecology of temperate phages / C. Howard-Varona, K. R. Hargreaves, S. T. Abedon, M. B. Sullivan // *ISME J.* – 2017. - № 11. – P. 1511-1520.

8. Loh, B. The fascinating biology behind phage display: filamentous phage assembly / B. Loh, A. Kuhn, S. Leptihn // *Mol. Microbiol.* - 2018. - № 10. – P.115-221.

9. Long-term shedding and clonal turnover of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in diarrheal diseases / H. Karch, H. Ryßmann, H. Schmidt, A. Schwarzkopf, J. Heeseman // *J. Clin. Microbiol.* – 1995. - № 33. –P.1602–1605.

10. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype / L. W. Riley, R. S. Remis, S. D. Helgerson, H. B. McGee, J. G. Wells, B. R. Davis, R. J. Hebert, E. S. Olcott, L. M. Johnson, N. T. Hrgrett, P. A. Blake, M. L. Cohen // *N. Engl. J. Med.* – 1983. - № 308. – P. 681 – 685.

11. Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli*, particularly serogroup O157, associated with human infections in the United Kingdom / A. Thomas, H. Chart, T. Cheasty, H. R. Smith, J. A. Frost, B. Rowe // *Epidemiol. Infect.* – 1993. - № 110. – P. 591 – 600.

12. Ahmed, S. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 in central Scotland. In *Escherichia coli* O157:H7 and Other Shiga Toxin-Producing *E. coli* Strains / S. Ahmed, M. Donaghy // Washington, DC: ASM Press. – 1998. – Vol. 157. - P. 59–65.

13. Callaway, T. R. Sodium chlorate supplementation reduces *E. coli* O157: H7 populations in cattle / Callaway, T. R., Anderson, R. C., Genovese, K. J., Poole, T. L., Anderson, T. J., Byrd, J. A. & Nisbet, D. J. // *Journal of animal science.* – 2002. – T. 80. – №. 6. – C.

1683-1689.

14. Control of *Escherichia coli* O157:H7 infection of calves by bacteriophages. In: Proceedings of the 4th International Symposium and Workshop on Shiga toxin (verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* / T. Waddell, A. Mazzocco, R. P. Johnson, J. Pacan, S. Campbell, A. Perets [et al.] // Kyoto, Japan. – 2000. - 29 October–2 November. – 90 p.

15. Isolation and characterization of a new T-even bacteriophage, CEV1, and determination of its potential to reduce *Escherichia coli* O157:H7 levels in sheep / R. R. Raya, P. Varey, R. A. Oot, M. R. Dyen, T. R. Callaway, T. S. Edrington [et al.] // *Appl Environ Microbiol.* – 2006. - № 72. – P. 6405-10.

16. Naturally resident and exogenously applied T4-like and T5-like bacteriophages can reduce *Escherichia coli* O157:H7 levels in sheep guts / R. R. Raya, R. A. Oot, B. Moore-Maley, S. Wieland, T. R. Callaway, E. M. Kutter [et al.] // *Bacteriophage.* – 2011. - № 1. – P.15-24.

17. Молофеева, Н. И. Тест система ускоренной индикации бактерий *E.coli* O157:H7 / Н. И. Молофеева. - Москва, 2016. - 78с.

18. Адамс, М. Бактериофаги / М. Адамс. – Москва, 1961. – 521с.

19. Молофеева, Н. И. Температурная устойчивость бактериофагов *E.coli* O157 / Н. И. Молофеева // Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности : материалы Четвертой научно-практической конференции с международным участием к 70-летию профессора В. А. Алешкина. - 2018. - С. 54-55.

## PRECONDITIONS FOR ISOLATION OF *ESHERICHIA COLI* O157: H7 BACTERIOPHAGES AND THEIR USAGE FOR INFECTION MONITORING, THERAPY AND BIOPROCESSING

**Molofeeva N.I., Kuzmina N.S., Lyashenko E.A.**  
**FSBEI HE Ulyanovsk State Agrarian University**  
**432017, Ulyanovsk, Novyi Venets boulevard, 1; 8 (8422) 55-95-47**  
**e-mail: molo-na@mail.ru**

*Key words: Escherichia coli* O157: H, bacteriophage, biological properties.

The article presents preconditions for isolation of *Escherichia coli* O157: H7 bacteriophages and their usage for infection monitoring, therapy and bioprocessing, thereby substantiating the direction of our research on isolation and study of biological properties of *Escherichia coli* O157: H7 bacteriophages. The results on isolation and study of its biological properties are presented. Two bacteriophages from wastewater of a pig breeding farm in Samara region were isolated. The isolated phages differed in morphology of negative colonies. According to Appelman, lytic activity of the isolated bacteriophages was  $10^{-5}$ – $10^{-7}$ , the titer of phage No. 1 was  $3.4 \times 10^9$  according to Gratsia, as for phage No. 2, it was  $1.5 \times 10^9$ . The spectrum of lytic activity in relation to the studied cultures of phage No. 1 is 80%, and phage No. 2 is 100%. Selected phages are specific for *E. coli* O157: H7 and are not active for representatives of other bacterial species. The degree of resistance of bacteriophages to inactivating factors of physical and chemical effects was studied according to methods proposed by I.M. Gabilovich. As a result of the studies, it was found that heating of the phages at 60-80°C did not significantly affect the content of active phage corpuscles in 1 ml. When the phages were heated at 81–83 °C, their activity decreased. At a temperature of 84–880 °C, the number of negative colonies was counted from/to  $10^{-10}$ – $10^2$  phage corpuscles. Phagolysate was not found in 1 ml of phage above 88 °C.

### Bibliography

1. A new perspective on lysogeny: prophages as active regulatory switches of bacteria / R. Feiner, T. Argov, L. Rabinovich, N. Sigal, I. Borovok, A. Herskovits // *Nature Reviews Microbiology.* – 2015. – № 13. – P. 641-650.
2. Marine tubeformmetamorphosis induced by arrays of bacterial phage tail-like structures / N. J. Shiruma, M. Pilhofer, G. L. Weiss, V. G. Hadfields, G. J. Jensen, D. K. Newman // *Science.* – 2014. - № 343. – P. 529-533.
3. Communication bewet viruses guides lisis-lisogeny decisions / Z. Erez, I. Steinberger-Levy, M. Shamir, S. Doron, A. Stokar-Aviail, Y. Peleg, S. Metamed,

- F. Leavitt, A. Savidor, S. Albeck, G. Amitail, R. Sorek // *Nature*. – 2017. - № 251. – P. 488-493.
4. Bacteriophages of the Human Gut: The «Known Unknown» of the Microbiome // *Cell Host Microbe*. – 2019. - № 13. – P.195-209.
  5. Phage puppet masters of the marine microbial realm / M. Breitbart, C. Bonnain, K. Malki, N. F. Sawaja // *Nat Microbiol*. – 2018. - № 3. – P.754-766.
  6. Taylor, N. M. I. Conjunction systems of bacteriophages and related systems / N. M. I. Taylor, M. J. van Raaij, P.G. Leiman // *Mol. Microbiol*. – 2018. - № 108. – P. 6-15.
  7. Lysogeny in nature: mechanisms, impact and ecology of temperate phages / C. Howard-Varona, K. R. Hargreaves, S. T. Abedon, M. B. Sullivan // *ISME J*. – 2017. - № 11. – P. 1511-1520.
  8. Loh, B. The fascinating biology behind phage display: filamentous phage assembly / B. Loh, A. Kuhn, S. Leptihn // *Mol. Microbiol*. - 2018. - № 10. – P.115-221.
  9. Long-term shedding and clonal turnover of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in diarrheal diseases / H. Karch, H. Bessmann, H. Schmidt, A. Schwarzkopf, J. Heeseman // *J. Clin. Microbiol*. – 1995. - № 33. –P.1602–1605.
  10. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype / L. W. Riley, R. S. Remis, S. D. Helgerson, H. B. McGee, J. G. Wells, B. R. Davis, R. J. Hebert, E. S. Olcott, L. M. Johnson, N. T. Hrgrett, P. A. Blake, M. L. Cohen // *N. Engl. J. Med*. – 1983. - № 308. – P. 681 – 685.
  11. Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli*, particularly serogroup O157, associated with human infections in the United Kingdom / A. Thomas, H. Chart, T. Cheasty, H. R. Smith, J. A. Frost, B. Rowe // *Epidemiol. Infect*. – 1993. - № 110. – P. 591 – 600.
  12. Ahmed, S. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 in central Scotland. In *Escherichia coli O157:H7 and Other Shiga Toxin-Producing E. coli Strains* / S. Ahmed, M. Donaghy // Washington, DC: ASM Press. – 1998. – P. 59–65.
  13. Isolation and use of bacteriophage to reduce *E. coli* O157:H7 populations in ruminants / T. R. Callaway, T. S. Edrington, A. D. Braban, E. S. Kutter, R. C. Anderson, D. J. Nisbet // *Proc Int Conf Perspect Bacteriophage Preparation*. - 2006. - P. 72-83
  14. Control of *Escherichia coli* O157:H7 infection of calves by bacteriophages. In: *Proceedings of the 4th International Symposium and Workshop on Shiga toxin (verocytotoxin)-producing Escherichia coli* / T. Waddell, A. Mazzocco, R. P. Johnson, J. Pacan, S. Campbell, A. Perets [et al.] // Kyoto, Japan. – 2000. - 29 October–2 November.
  15. Isolation and characterization of a new T-even bacteriophage, CEV1, and determination of its potential to reduce *Escherichia coli* O157:H7 levels in sheep / R. R. Raya, P. Varey, R. A. Oot, M. R. Dyen, T. R. Callaway, T. S. Edrington [et al.] // *Appl Environ Microbiol*. – 2006. - № 72. – P. 6405-10.
  16. Naturally resident and exogenously applied T4-like and T5-like bacteriophages can reduce *Escherichia coli* O157:H7 levels in sheep guts / R. R. Raya, R. A. Oot, B. Moore-Maley, S. Wieland, T. R. Callaway, E. M. Kutter [et al.] // *Bacteriophage*. – 2011. - № 1. – P.15-24.
  17. Molofeeva, N.I. Test system for fast indication of *E. coli* O157: H7 bacteria / N.I. Molofeeva. - Moscow, 2016. – 78 p.
  18. Adams, M. *Bacteriophages* / M. Adams. - Moscow, 1961. – 521 p.
  19. Molofeeva, N. I. Temperature stability of *E. coli* O157 bacteriophages / N. I. Molofeeva // *Bacteriophages: theoretical and practical aspects of application in medicine, veterinary medicine and food industry: materials of the Fourth scientific-practical conference with international participation dedicated to 70<sup>th</sup> anniversary of Professor V. A. Aleshkin*. - 2018. -P. 54-55.