

FEATURES OF AGE DYNAMICS OF *E. COLI* PHAGES OF INTESTINAL MICROBIOCENOSIS OF PIGS

Skoblikov N.E., Zimin A.A.

Key words: bacteriophages, *E.coli*, pigs, age dynamics

The study investigates the titer and biodiversity of E.coli phages in intestinal microflora of pigs in first months of life. Established: the quantity and diversity peaks of coli-phages detected at 27th day; age dynamics has trend for decreasing from 4,73 – 5,46 lg PFU/g till undetected values at 66th day; most part (89,7%) of coli-phages consists of T4-type phages of Myoviridae family.

УДК 602.3:579.8

ХАРАКТЕРИСТИКА НЕКОТОРЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БАКТЕРИОФАГОВ *BACILLUS MYCOIDES*

*Феоктистова Н. А. *, кандидат биологических наук, доцент*

тел. 8(8422) 55-95-47, feokna@yandex.ru

*Макеев В. А. *, аспирант*

тел. 8(8422) 55-95-47, usxa@yandex.ru

*Васильев Д.А. *, доктор биологических наук, профессор*

8(8422) 55-95-47, dav_ul@mail.ru

*Алешкин А.В. **, доктор биологических наук*

8-495-452-18-16, ava@gabri.ru

**ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А.Столыпина»*

***Московский НИИЭиМ им. Г.Н. Габричевского»*

Ключевые слова: Бактериофаги, *Bacillus mycoides*, биопрепарат, литическая активность, спектр литического действия, специфичность действия, изменение литической активности при хранении.

В статье дана характеристика некоторых биологических свойств бактериофагов Bacillus mycoides (литическая активность, спектр литического действия, специфичность действия, изменение литической активности при хранении). На основании изученных свойств были выбраны фаги для конструирования биопрепарата для фагоиндикации и фагоидентификации бактерий Bacillus mycoides в пищевом сырье и продуктах питания.

Введение. Создание биопрепарата для фагоиндикации и фагоидентификации бактерий *Bacillus mycoides* в пищевом сырье на основе бактериофагов подразумевает изучение таких биологических свойств, как литическая активность, спектр литического действия, специфичность в пределах вида и изменение литической активности при хранении [3,5].

Литическая активность бактериофага оценивается по его способности вызывать лизис бактериальной культуры в жидких или плотных питательных средах и выражает это тем максимальным разведением, в котором испытуемый бактериофаг проявил свое литическое действие. Более точным методом оценки литической активности бактериофага является определение количества активных корпускул фага в единице объема. Однако, этот показатель от-

носительный, так как активность фага зависит от различных условий, основными из которых являются биологические особенности бактериальной клетки, которые в свою очередь зависят от физических свойств среды, ее химического состава, окружающей температуры и так далее. Поэтому активность фага всегда определяется в конкретных, стандартных условиях [4]. Видовая специфичность фагов используется в практике для дифференциации бактерий. Эта способность фагов определяется, прежде всего, родством их к рецепторам лизируемых бактерий [2]. Так как для разработки технологических параметров изготовления биопрепарата на основе фагов необходимо изучить изменение литической активности при хранении, так как срок годности биопрепарата начинает исчисляться с момента наработки фага и его укупоривания в герметично закрытые флаконы [7].

Целью наших исследований было изучение основных биологических свойств бактериофагов *Bacillus mycoides* (литическая активность, спектр литической активности, специфичность действия, изменение литической активности при хранении).

Материалы и методы исследований

В работе было использовано 12 штаммов бактерии *Bacillus mycoides*, 1 из них референс – штамм (*Bacillus mycoides* 537). Использовали также 78 штаммов бактерий *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus mesentericus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*, полученных из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина». Изучались биологические свойства 5 изолятов бактериофагов *Bacillus mycoides*, выделенных из объектов санитарного надзора Ульяновской и Самарской областей, Краснодарского края.

Изучение биологических свойств бактериофагов проводили методами, предложенными Д.М. Гольдфарбом [2], И.П. Ревенко [6], В.Я. Ганюшкиным [1], С.Н. Золотухиным [3].

Результаты собственных исследований и их обсуждение

Изучения литической активности селекционированных фагов *Bacillus mycoides* проводили методом агаровых слоев (Gracia, 1936) [6]. Накануне опыта по чашкам Петри разливали 1,5% мясопептонный агар в ламинарном боксе. Перед использованием чашки дополнительно подсушивали в термостате при 37 °С 15-20 минут. Индикаторные культуры *Bacillus mycoides* выращивались в условиях термостата в течение 18-20 часов при 37 °С на мясо-пептонном бульоне. Стерильный 0,7% мясопептонный агар, разлитый в пробирки по 2,5 мл, расплавляли на водяной бане и остужали до 46-48 °С. Исследуемый на присутствие бактериофага субстрат в количестве 1,0 мл помещали в 2,5 мл 0,7% мясопептонного агара, туда же вносили 0,2 мл индикаторной культуры. Все быстро и тщательно перемешивали вращением пробирки в ладонях и выливали на поверхность 1,5% мясопептонного агара. Смесь осторожными движениями распределяли по поверхности мясопептонного агара, чашки Петри оставляли на горизонтальной поверхности стола до полного застывания мясопептонного агара, затем инкубировали посеvy в термостате при 37 °С в течение 18 часов. Экспериментальным путем установлено, что литическая активность фагов колеблется в диапазоне от 10^6 до 10^{12} БОЕ/мл.

Результаты исследований представлены в таблице 1.

Важной характеристикой фагов *Bacillus mycoides* является диапазон их действия на штаммы бактерий в пределах вида. Для изучения спектра литического действия селекционированных фагов использовали 10 штаммов бактерий *Bacillus mycoides*, выделенных нами из проб пищевого сырья и продуктов питания и 1 штамм, полученный из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина». Исследования проводили методом нанесения фага на газон бактериальной культуры методом «стекающая капля». Экспериментальным путем установлено, что изучаемые специфичные бактериофаги имеют различный диапазон действия по отношению к 12 изучаемым

мым штаммам *Bacillus mycoides* (рис. 1). Опыты демонстрируют, что наиболее широким спектром литического действия по отношению к изучаемым культурам обладают штаммы фагов В.мус–3 и В.мус–5 серии УГСХА, совокупный процент лизиса которых составил 91,7 %. Вышеназванные фаги обладают перекрестным лизисом, в данном случае они лизируют следующие штаммы *Bacillus mycoides*, выделенные нами из пищевого сырья: *Bacillus mycoides* 1 (пряности – мускатный орех), *Bacillus mycoides* 2 (картофель), *Bacillus mycoides* 5 (лук репчатый), *Bacillus mycoides* 6 (рыба прудовая), *Bacillus mycoides* Н (пряности – корица) и референс-штамм *Bacillus mycoides* 537.

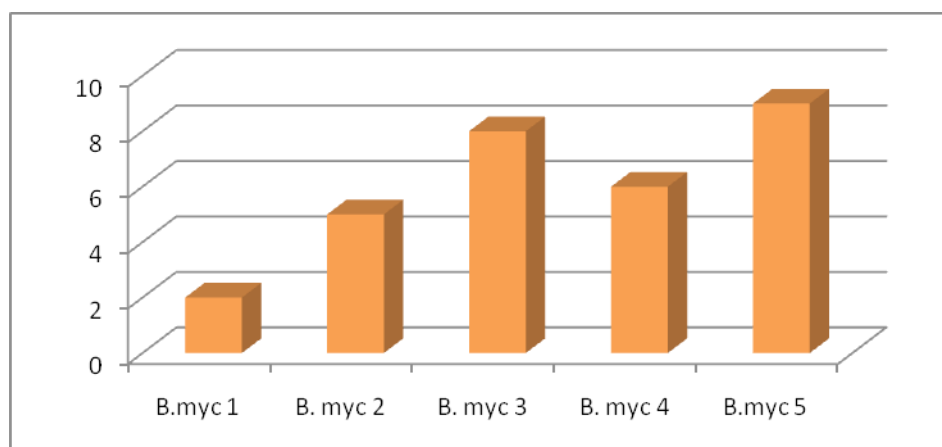


Рис. 1 – Спектр литического действия фагов *Bacillus mycoides*

Важнейшей характеристикой фага, входящего в состав биопрепарата для индикации и идентификации бактерий, является его специфичность в пределах вида. Изучение специфичности 5 выделенных изолятов бактериофагов *Bacillus mycoides* мы проводили на культурах гомологичного рода: *Bacillus subtilis* – 25 штаммов, *Bacillus mesentericus* – 20 штаммов, *Bacillus megaterium* – 4 штаммов, *Bacillus cereus* – 25 штаммов, *Bacillus thuringiensis* – 4 штамма. Эксперимент ставили, используя методику, описанную С.Н. Золотухиным (2007).

Таблица 1 - Результаты исследований спектра литического действия и литической активности фагов бактерий *Bacillus mycoides*

№	Фаги	Количество лизированных культур <i>Bacillus mycoides</i> , шт	Процент лизируемых культур, %	Количество корпускул в 1 мл фага (по Грация), БОЕ
1	В мус–1 УГСХА	2	16,7	$1,5 \times 10^9 \pm 0,4 \times 10^9$
2	В мус–2 УГСХА	5	41,7	$2,3 \times 10^6 \pm 0,7 \times 10^6$
3	В мус–3 УГСХА	8	66,7	$6,2 \times 10^{12} \pm 0,8 \times 10^{12}$
4	В мус–4 УГСХА	6	50,0	$7,8 \times 10^8 \pm 0,2 \times 10^8$
5	В мус–5 УГСХА	9	75,0	$1,6 \times 10^{10} \pm 0,6 \times 10^{10}$
Совокупный процент лизиса			91,7	

На чашки Петри с разлитым в нее 1,5% накануне мясопептонным агаром наносили газон культуры вышеназванных видов бактерий рода *Bacillus*. Бактериальный газон подсушивали в условиях термостата в течение 20-30 минут при 37 °С. Затем чашку Петри с подготовленным газоном делили на три сектора: две «опытных» дорожки и контроль на механическое повреждение газона. На «опытные» дорожки наносили по 1-2 капли исследуемого бактерио-

фага *Bacillus mycoides*, на «контрольную» дорожку – стерильный мясопептонный бульон в том же количестве, что и бактериофаги. Посевы помещали в термостат на 18 часов инкубации при 37 °С.

На чашках Петри, засеянных культурами *Bacillus subtilis*, *Bacillus mesentericus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, зон лизиса, при нанесении селекционированных нами фагов *Bacillus mycoides* В.мус–3 и В.мус–5 серии УГСХА на газон культур, обнаружено при визуальном осмотре не было. Полученные результаты свидетельствуют, что выделенные и селекционированные нами бактериофаги, строго специфичны в пределах вида *Bacillus mycoides* и могут быть компонентами биопрепарата для индикации и идентификации бактерий *Bacillus mycoides*.

Для конструирования биопрепарата нами было отобрано два фага В.мус–3 и В.мус–5 серии УГСХА, которые характеризовались высокими титрами литической активности и максимально широким совокупным спектром литического действия (рис. 2).

Последующие эксперименты были направлены на изучение изменения литической активности укупоренных во флаконы бактериофагов В.мус–3 и В.мус–5 серии УГСХА, хранящихся в условиях холодильника в течение 12 месяцев. Показатели литической активности фагов при хранении определяется по классической методике определения активности методом агаровых слоев (Gracia, 1936). Для получения достоверных данных каждый эксперимент проводили троекратно и результаты исследований подвергали статистической обработке. Эталонные культуры бактерий *Bacillus mycoides* выращивали на мясо-пептонном бульоне в течение 18 часов в термостате при 37 °С. Результаты исследований представлены в таблице 2.

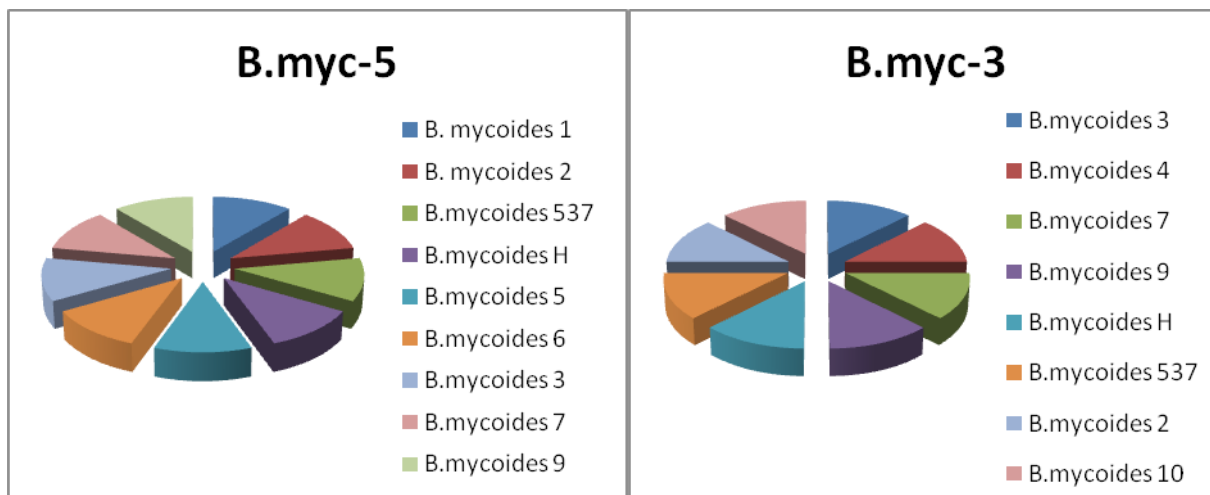


Рис. 2 – Диапазон лизиса фагов В.мус-3 и В.мус-5 серии УГСХА

Опытным путем установлено, что в течение 3 месяцев показатели литической активности исследуемых бактериофагов В.мус–3 и В.мус–5 серии УГСХА оставались без изменений, $6,2 \times 10^{12} \pm 0,8 \times 10^{12}$ и $1,6 \times 10^{10} \pm 0,6 \times 10^{10}$ БОЕ/мл фаголизата, соответственно.

Через 6 месяцев литическая активность снижалась и составила у фага В.мус–3 $4,7 \times 10^8 \pm 1,5 \times 10^8$ БОЕ/мл и у В.мус–5 УГСХА - $2,5 \times 10^8 \pm 1,7 \times 10^8$ БОЕ/мл, через 9 месяцев - $0,9 \times 10^7 \pm 0,2 \times 10^7$ и $1,1 \times 10^8 \pm 0,4 \times 10^8$ БОЕ/мл, 12 месяцев - $0,4 \times 10^7 \pm 0,1 \times 10^7$ и $1,3 \times 10^7 \pm 0,5 \times 10^7$ БОЕ/мл, соответственно.

Экспериментально установлено, что пассирование бактериофагов на исходном штамме бактерий *Bacillus mycoides* в течение 7 пассажей методом агаровых слоев (Gracia, 1936) восстанавливает литическую активность бактериофагов на 1 порядок.

Таблица 2 – Изменение литической активности фагов В.мус-3 и В.мус-5 серии УГСХА при хранении

Бактериальная культура / название фага	Временной интервал	Литическая активность, количество корпускул в 1 мл фага, БОЕ
<i>Bacillus mycoides</i> 537/ В.мус-3 УГСХА	момент укупоривания	$6,2 \times 10^{12} \pm 0,8 \times 10^{12}$
	3 месяца	$6,2 \times 10^{12} \pm 0,8 \times 10^{12}$
	6 месяцев	$4,7 \times 10^8 \pm 1,5 \times 10^8$
	9 месяцев	$0,9 \times 10^7 \pm 0,2 \times 10^7$
	12 месяцев	$0,4 \times 10^7 \pm 0,1 \times 10^7$
<i>Bacillus mycoides</i> H / В.мус-5 УГСХА	момент укупоривания	$1,6 \times 10^{10} \pm 0,6 \times 10^{10}$
	3 месяца	$1,6 \times 10^{10} \pm 0,6 \times 10^{10}$
	6 месяцев	$2,5 \times 10^8 \pm 1,7 \times 10^8$
	9 месяцев	$1,1 \times 10^8 \pm 0,4 \times 10^8$
	12 месяцев	$1,3 \times 10^7 \pm 0,5 \times 10^7$

Закключение. Проведенные исследования по изучению биологических свойств фагов *Bacillus mycoides* показали, что изучаемые бактериофаги именют различные показатели литической активности, определяемые в стандартных условиях. Литическая активность фагов В.мус–1 - В.мус–5 серии УГСХА колеблется в диапазоне от 10^6 до 10^{12} БОЕ/мл. Опыты демонстрируют, что наиболее широким спектром литического действия по отношению к изучаемым культурам обладают штаммы фагов В.мус–3 и В.мус–5 серии УГСХА, совокупный процент лизиса исследованных штаммов *Bacillus mycoides* которых составил 90,9 %. Установлено, что выделенные и селекционированные нами бактериофаги, строго специфичны в пределах вида *Bacillus mycoides* и могут быть компонентами биопрепарата для индикации и идентификации бактерий *Bacillus mycoides*. Для конструирования биопрепарата для фагоиндикации и фагоидентификации *Bacillus mycoides* нами было отобрано два фага В.мус–3 и В.мус–5 серии УГСХА, которые характеризовались высокими титрами литической активности и максимально широким совокупным спектром литического действия. Дальнейшие эксперименты были направлены на изучение изменения литической активности укупоренных во флаконы бактериофагов В.мус–3 и В.мус–5 серии УГСХА, хранящихся в условиях холодильника в течение 12 месяцев. Определено, что бактериофаги в течение 12 месяцев снижали показатели литической активности с 10^{12} до 10^7 БОЕ/мл. Согласно данным С.Н. Золотухина (2007), изменение литической активности фагов в диапазоне 10^7 – 10^9 не является критическим при конструировании биопрепарата и не отразится на его способности лизировать культуры в пищевом сырье и продуктах питания при проведении исследований по их индикации и идентификации [3].

Библиографический список

1. Ганюшкин, В.Я. Бактериофаги сальмонелл и их применение в ветеринарии / В.Я. Ганюшкин. – Ульяновск: УГСХА, 1988. – С.42–45.
2. Гольдфарб, Д.М. Бактериофагия // Д.М. Гольдфарб. – М.: Медгиз, 1961. – С. 169–187.
3. Золотухин, С.Н. Создание и разработка схем применения диагностических биопрепаратов на основе выделенных и изученных бактериофагов энтеробактерий: автореф. дис. ... докт. биол. наук: 03.00.07, 03.00.23 / Золотухин Сергей Николаевич. – Ульяновск, 2007. – С.32.
4. Каттер, Э. Бактериофаги. Биология и практическое применение / Э. Каттер, А. Сулаквелидзе. – М.: Научный мир, 2012. – С. 365–369.
5. Раутенштейн, Я.И. Изменчивость *Bacillus mycoides*. Морфология вариантов/ Я.И. Раутенштейн // Микробиология. – 1977. – №1 (16). – С.33–41.
6. Ревенко, И.П. Бактериофаги и их использование в ветеринарной практике / И.П. Ревенко. – Киев: Урожай, 1978. – С. 41–88.

7. Юдина, М.А. Диагностика картофельной болезни хлеба, вызываемой бактериями видов *Bacillus subtilis* и *Bacillus mesentericus* / М.А. Юдина, Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев, Е.О. Бахаровская [и др.] // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2011. – №1 (13). – С. 61–67.

CHARACTERISTICS OF SOME BIOLOGICAL PROPERTIES BACTERIOPHAGES BACILLUS MYCOIDES

Feoktistova N.A., Makeev V.A., Vasilyev D.A., Aleshkin A.V.

Keywords: bacteriophages, *Bacillus mycoides*, biological product, the lytic activity, spectrum of lytic activity, specificity, modification of lytic activity during storage.

The article provides a description of some of the biological properties of bacteriophages, *Bacillus mycoides* (lytic activity spectrum of lytic action, specificity, modification of lytic activity in storage). By studying the properties of phages were selected for the construction of a biological product for fagoindikatsii and fagoidentifikatsii bacteria *Bacillus mycoides* in food raw materials and food products.

УДК 602.3:579.8

ФАГОИДЕНТИФИКАЦИИ БАКТЕРИЙ BACILLUS SUBTILIS И BACILLUS CEREUS

*Феоктистова Н. А. **, кандидат биологических наук, доцент
тел. 8(8422) 55-95-47, feokna@yandex.ru

*Калдыркаев А. И. **, ассистент
тел. 8(8422) 55-95-47, usxa@yandex.ru

Васильев Д.А., доктор биологических наук, профессор
8(8422) 55-95-47, dav_ul@mail.ru

*Алешкин А.В. ***, доктор биологических наук
8-495-452-18-16, ava@gabri.ru

**ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А.Столыпина»*

***Московский НИИЭиМ им. Г.Н. Габричевского»*

Ключевые слова: бактериофаги, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, лизис, корма, пищевые продукты, фагоидентификация

Описана схема исследования проб пищевых продуктов и продовольственного сырья с целью выделения и ускоренной идентификации бактерий *Bacillus subtilis* и *Bacillus cereus* с использованием выделенных и селекционированных строго специфичных бактериофагов *Bacillus subtilis* и *Bacillus cereus* в сравнении с классической схемой выделения и идентификации бактерий рода *Bacillus* по Gordon (1973).

Введение. Роль бактериофага как средства терапии и профилактики некоторых инфекционных заболеваний в настоящее время невелика, а значение для лабораторной диагностики ряда инфекции этот биологический объект не только не утратил, а, наоборот, начал привлекать к себе все более пристальное внимание исследователей [1,3,5]. С каждым годом повышается значимость бактериофагов как высоко специфического