УДК 619:616 -07

СОЗДАНИЕ БИОПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ БАКТЕРИОФАГОВ *DESULFOVIBRIO DESULFURICANS* И ПЕРСПЕКТИВЫ ЕГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Карамышева Н. Н., ассистент, Natali – kar@inbox.ru
Васильев Д. А., доктор биологических наук, профессор,
Золотухин С. Н., доктор биологических наук, профессор
8(8422)55-95-47, fvm.zol@yandex.ru
ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А.Столыпина»

Ключевые слова: *Desulfovibrio desulfuricans, биопрепарат, бактериофаги.*
Работа посвящена созданию биопрепарата на основе бактериофагов Desulfovibrio desulfuricans и определения перспектив дальнейшего использования.

Введение. Бактерии, относящиеся к роду *Desulfovibrio,* являются основными возбудителями анаэробной коррозии металлов развивающейся в процессе их жизнедеятельности. Создание биопрепарата на основе полученных бактериофагов и внедрение его в производство может разрешить создавшуюся проблему.

Материалы и методы исследований. Штамм *Desulfovibrio desulfuricans subsp. desulfuricans (Beijerinck 1895) Kluyver et van Niel 1936 VKM B-1799* полученный из музея ИБФМ им. Г.К. Скрябина РАН Московская обл., г. Пущино, а также 9 штаммов бактерий, выделенных из объектов окружающей среды, типирование которых позволило отнести их к роду *Desulfovibrio,* бактериофаги Ddr 57 – УГСХА и Ddu 48 – УГСХА.

Работа выполнена на базе научно-исследовательского инновационного центра микробиологии и биотехнологии УГСХА.

Результаты исследований и их обсуждение.

Результаты исследования способности бактериофагов специфически лизировать бактериальные клетки использована нами при конструировании диагностического биопрепарата. Для этого на основе выделенных бактериофагов необходимо было изучить следующие их биологические свойства: спектр литической активности; специфичность действия; морфологию негативных колоний; чувствительность к воздействию хлороформа.Изучение биологических свойств выделенных бактериофагов проводили по методам, предложенным М. Адамсом (1973), Д.М. Гольдфарбом (1961), И.М. Габриловичем (1973), Е.П. Розановой (1978), С.Н. Золотухиным (2007).

При определении активности фага по методу Аппельмана в 11 пробирок равного диаметра наливают по 9 мл жидкой среды Постгейта В. В первую пробирку вносили 1мл изучаемого фага, тщательно перемешивали содержимое флакона и новой пипеткой переносили 1 мл смеси в следующую пробирку до получения полного ряда десятикратных разведений. Затем во все пробирки, начиная с последнего разведения, вносили по 0,2 мл индикаторной культуры *D. desulfuricans,* выращенной на жидкой среде Постгейта В. Пробирки инкубировали при 30°С и просматривали на наличие просветления среды и обесцвечивания черного придонного осадка в опытных пробирках и роста культуры в контрольных пробах. Учет результатов был начат через 24 часа. Среда оставалась прозрачной, а осадок поменял цвет с черного на белый в пробирках с разведениями 10^{-8} и 10^{-9}, что указывало на отсутствие роста индикаторной культуры бактерий штамма *Desulfovibrio desulfuricans subsp. desulfuricans (Beijerinck 1895) Kluyver et van Niel 1936 VKM B-1799* (таблица 1).

Таблица 1 – Литическая активность фагов *D. desulfuricans* по Аппельману

№ п/п	Название фага	Литическая активность по Аппельману
1	Ddu 48-УГСХА	10^{-9}
2	Ddr 57-УГСХА	10^{-8}

Морфологию негативных колоний бактериофагов изучали с помощью метода агаровых слоев по Грациа. В пробирку с 2,5 мл 0,7% агаризованной средой Постгейта «В», расплавленной и остуженным до 45 ºС 0,7% агаризованной средой Постгейта В вносили 0,2 мл фага в разведении 10^{-7} (для получения изолированных негативных колоний) и 0,2 мл двухсуточной бульонной культуры референс штамма *D. desulfuricans* VKM B-1799. Содержимое пробирки тщательно перемешивали вращением между ладонями и выливали на поверхность 2% агаризованной среды Постгейта В. После застывания агара чашки инкубировали в анаэростат при температуре 30ºС и атмосферном давлении «– 1 атм». Просмотр результатов осуществляли через 24-48 ч. Негативные колонии бактериофагов характеризовались следующими параметрами: Ddr 57-УГСХА. Колонии диаметром 8 мм полностью прозрачны, без зоны вторичного лизиса; Ddu 48-УГСХА колонии диаметром 6 мм характеризуются наличием прозрачного центра и мутной зоной вторичного лизиса на периферии (рисунок 1).

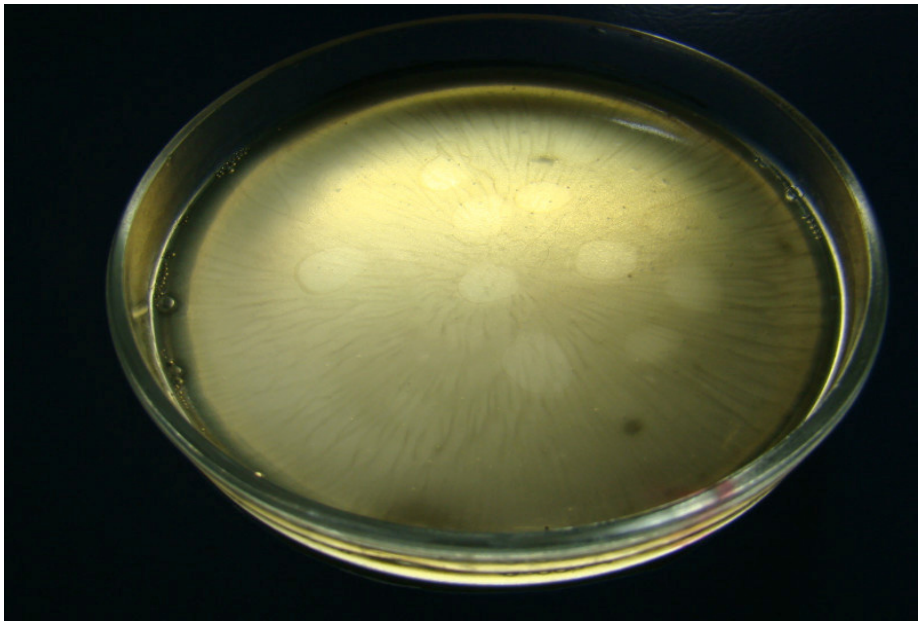

Рис. 1 – Негативные колонии бактериофагов Ddr 57-УГСХА

Определению устойчивости бактериофагов к прогреванию проводили по следующей методике: бактериофаги разводили 1:10 в жидкой среде Постгейта «В» (pH 7,2-7,4). Затем пробирки с разведенными фагами прогревали прогревали в ультратермостате при температуре от 50°С до 80°С с интервалом 5 °С в течение 30 минут. Параллельно ставили контроль – фаги, разведенные 1:10 без прогревания. После воздействия температуры активность бактериофагов определяли по методу Грациа. Учет результатов проводили по истечению 24 часов при температуре 30°С.

В результате исследований устойчивости бактериофагов к прогреванию было установлено, что прогревание фагов Ddr 57 – УГСХА и Ddu 48 – УГСХА при температуре 55-60 °С не оказало влияния на содержание активных корпускул фага в 1 мл. Дальнейшее повышение температуры приводило к снижению активности фага. При прогревании фага температурой 65 ºС количество негативных колоний насчитывалось $5x10^9$ корпускул фага. Прогревание выше

75 ºС полностью инактивировало исследуемый бактериофаг. Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Изменение титра бактериофагов при увеличении температуры культивирования.

Температура, ºС	Титр бактериофага Ddr 57-УГСХА	Титр бактериофага Ddu 48 -УГСХА
55	$3x10^9$	$2x10^9$
60	$3x10^9$	$2x10^9$
65	$5x10^8$	$4x10^8$
70	$5x10^8$	$4x10^8$
75	$5x10^8$	$4x10^8$
80	-	-
Контроль фага	$3x10^9$	$2x10^9$

Полученные данные свидетельствуют об устойчивости фагов к воздействию температуры до 75º С. При температуре от 76ºС фаги Ddr 57 – УГСХА и Ddu 48 – УГСХА теряли свою активность и полностью погибали при температуре выше 80ºС.

Определение чувствительности бактериофага и бактерий проводили путем обработки фаговой суспензии хлороформом в соотношении 1:10 при постоянном встряхивании. Контролем служила пробирка с бактериофагом, необработанным хлороформом. После воздействия хлороформа активность бактериофага определяли по методу Грациа. Бактериофаг Ddr 57 – УГСХА проявил выраженную устойчивость к воздействию хлороформа в течение 30 минут, а бактериофаг Ddu 48 – УГСХА в течение 20 минут (таблица 3).

Таблица 3 – Устойчивость выделенных фагов к воздействию хлороформа.

№	Фаг	Количество активных корпускул фага в 1 мл					Контроль
		Обработка 10 мин.	Обработка 15 мин.	Обработка 20 мин.	Обработка 30 мин.	Обработка 40 мин.	
1	Ddr 57-УГСХА	$3x10^9$	$3x10^9$	$3x10^9$	$3x10^9$	-	$3x10^9$
2	Ddu 48УГСХА	$2x10^9$	$2x10^9$	$2x10^9$	-	-	$2x10^9$

Полученный фаголизат проверяли на стерильность путем посева на среду Постгейта «В» для выявления сульфатвосстанавливающих бактерий. Исследования показали, что обработка фаголизата хлороформом с последующим центрифугированием освобождает его от бактериальных клеток при сохранении активного фага. Для проверки активности фаголизата суточную культуру сульфатвосстанавливающих бактерий высевали на жидкую среду Постгейта «В» с дрожжевым экстрактом и на 12 ч помещали в термостат при 30°С. Затем в культуру бактерий, находящуюся в ранней экспоненциальной фазе роста, вносили фаголизат в количестве 1 мл на 9 мл культуры и дополнительно инкубировали в течение 12 ч. Через 12 ч делали высев на агаризованную среду Постгейта «В». Чётко выраженные негативные пятна появлялись через 24 ч.

Спектр литической активности является характерной особенностью штаммов фага, и его используют для их идентификации. Определение спектра литической активности проводили методом нанесения фага на газон бактериальной культуры (С. Н. Золотухин, 2007). Для изучения спектра литической активности двух селекционированных фагов (Ddu 48 – УГСХА, Ddr 57 – УГСХА), были использованы 1 референс штамм и 9 полевых штаммов *D. desulfuricans*.

На поверхность агаризованной среды Постгейта «В» в чашках Петри пастеровской пипеткой наносили 3-4 капли 24-х часовой бульонной культуры исследуемых микроорганизмов. Затем равномерно распределяли по поверхности среды стерильным шпателем. Чашки оставили при комнатной температуре для подсушивания на 15-20 минут. На поверхность засеянной среды по секторам наносили бактериофаг, а затем инкубировали в анаэробных условиях при температуре 30 °С, оценку результатов проводили через 24-48 ч. Результаты опытов показали, что штамм фага Ddr 57 – УГСХА, лизировал 8 из имеющихся у нас 10 штаммов (80%), фаг Ddu 48 – УГСХА лизировал 6 из 10 штаммов (60%) (таблица 4).

Таблица 4 – Спектр литической активности фагов по отношению к штаммам

№ п/п	Название фага	Количество испытанных штаммов	Количество лизируемых штаммов	Процент лизируемых штаммов
1	Ddr 57-УГСХА	10	8	80%
2	Ddr 57-УГСХА	10	8	80%
3	Ddu 48 - УГСХА	10	6	60%
4	Ddu 48 -УГСХА	10	6	60%

Видовая специфичность фагов используется в практике для дифференциации бактерий. Эта способность фагов определяется, прежде всего, сродством их к рецепторам лизируемых бактерий.

Определение видовой специфичности изучаемых бактериофагов (Ddu 48 – УГСХА, Ddr 57 – УГСХА) проводили путём нанесения фага на газон культуры. На поверхность в чашках Петри пастеровской пипеткой наносили 3-4 капли 24-х часовой бульонной культуры исследуемых микроорганизмов. Затем равномерно распределяли по поверхности среды стерильным шпателем. Чашки оставляли при комнатной температуре для подсушивания на 15-20 минут. На поверхность засеянной среды пастеровской пипеткой легким прикосновением капли наносили бактериофаги Ddu 48 – УГСХА, Ddr 57 – УГСХА и наклоняли, чтобы капли стекли, а затем инкубировали в анаэростате при температуре 30 °С. Оценку результатов проводили через 24-48 часа. Выбор видового состава бактерий, для проверки специфичности фага, обусловлен способностью данных бактерий к анаэробному типу дыхания.

В результате изучения специфичности бактериофагов по отношению к представителям других родов и видов бактерий: – установили строгую специфичность фагов. Опыт по определению специфичности бактериофагов (Ddr 57 – УГСХА, Ddu 48 – УГСХА) показал, что оба бактериофага строго специфичны по отношению к *D. desulfuricans* и не лизируют другие виды и роды бактерий (таблица 5).

Таблица 5 – Специфичность, выделенных бактериофагов

№ п/п	Вид бактерий	Ddr 57-УГСХА	Ddu 48 -УГСХА
1	*Desulfovibrio desulfuricans*	+	+
2	*Desulfovibrio sulfodismutans*	–	–
3	*Desulfovibrio gigas*	–	–
4	*Desulfovibrio spp.*	–	–
5	*Clostridium perfringens*	–	–
6	*Fusobacterium nucleatum*	–	–
7	*Lactobacillus spp.*	–	–
8	*Bacillus cereus*	–	–

Примечание – «–»– отсутствие лизиса, «+»– наличие лизиса культуры.

Заключение. Таким образом, проведённые исследования по изучению биологических свойств бактериофагов Ddr 57 – УГСХА, Ddu 48 – УГСХА показали, что полученные фаги отвечают все технологическим параметрам для изготовления биопрепарата с целью профилактики коррозии металлов.

Библиографический список

1. Bodily H., Updyke E.L., Mason J.O. (ed). Diagnostis procedures for bacterial, mycotis and parasitis infections, 5 th ed., American Public Health Association, Inc., New York, 2007.

2. Back A.E., Oberhoter T.R., J.Clin Microbiol, 7, 312-313 (2008).

3. У.Хейс «Генетика бактерий и бактериофагов» М.1965г.

УДК 579.66

КЛАССИФИКАЦИЯ ПРАКТИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ БИОПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ БАКТЕРИОФАГОВ

Климовский А.Б., кандидат физико-математических наук,
начальник управления, администрация города Ульяновска
тел. 8 (9510) 95-16-58, andrew@klimovsky.ru
Викторов Д.А., кандидат биологических наук,
Васильев Д.А., доктор биологических наук, профессор
Тел. 8(8422) 55-95-47, dav_ul@mail.ru
ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А.Столыпина»

Ключевые слова: *бактериофаги, биопрепараты, практическое применение, классификация, схема.*

В работе предлагается принцип классификации практического применения препаратов на основе бактериофагов по трем основаниям, каждое из которых имеет несколько значений.

Актуальность темы

Одним из ведущих направлений современной микробиологии и биотехнологии являются исследования бактериофагов. Это связано с всё больше возрастающим интересом к бактериофагам с точки зрения их практического применения в целях диагностики, профилактики и лечения инфекционных заболеваний в различных отраслях медицины, сельского хозяйства и промышленности [1, 2, 3].

Однако, несмотря на то, что в большинстве случаев перспективы разработки и применения препаратов на основе бактериофагов предопределяются их конкретными потребительскими свойствами, обуславливающими их безопасность, высокую эффективность, дешевизну и простоту в применении, остаётся актуальной проблема выявления новых сфер их практического применения, решение которой позволит рассмотреть инновационные направления дальнейшего развития биотехнологий, основанных на использовании бактериофагов.

Авторами предлагается принцип классификации применения бактериофагов по трем основаниям – цель применения (для чего применяется), объект применения (на ком (чем) при-