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.

BASIC BIOLOGICAL PROPERTIES PHAGES BACTERIA BACILLUS MYCOIDES

Feoktistova N.A., Makeev V.A., Vasiliev D.A., Alyoshkin A.V.

Keywords. Bacteriophages, Bacillus mycoides, biological product, lytic activity, the spectrum of lytic action, specificity, modification of lytic activity during storage.

The paper presents the characteristics of the basic biological properties of bacteriophages Bacillus mycoides (lytic activity, the spectrum of lytic activity, specificity, modification of lytic activity during storage), the study of which is necessary 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

Научные исследования проводятся при финансовой поддержке государства в лице Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках реализации федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы (соглашение от №8267 от 10.08.2012).

PA3PABOTKA CUCTEMЫ ФАГОВАРОВ BACILLUS CEREUS

А.И. Калдыркаев, ассистент
ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А.Столыпина»
тел. 8(8422) 55-95-47, изха@уапdех.ru

Н.А. Феоктистова, кандидат биологических наук, доцент
ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А.Столыпина»
тел. 8(8422) 55-95-47, feokna@yandex.ru

Д.А. Васильев, доктор биологических наук, профессор
ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А.Столыпина»
8(8422) 55-95-47, dav_ul@mail.ru

А.В. Алешкин, доктор биологических наук
Московский НИИЭиМ им. Г.Н. Габричевского»
8-495-452-18-16, ava@gabri.ru

С.В. Мерчина, кандидат биологических наук, доцент
ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А.Столыпина»

Ключевые слова. Bacillus cereus, мониторинг, бактериофаги, система фаговаров, идентификация, биологические свойства, фаготипирование.

Работа посвящена разработке системы фаговаров В. сегеи . Разработана схема фаготипирования штаммов В. сегеиs, делящая все изученные штаммы данного микроорганизма на 18 фаговаров. Выделено 57 фагов В. сегеиs. Изучены основные биологические свойства 57 изолятов фагов В. сегеиs: определено 4 типа негативных колоний, литическая активность выделенных фагов составила от 10^5 до 10^{10} по методу Аппельмана и от $1.8\times10^7\pm0.4\times10^7$ до $4\times10^{12}\pm1.8\times10^{12}$ по методу Грациа, все выделенные бактериофаги проявляли свою литическую активность только в отношении вида В.сегеиs, причем 2 из них FBc-7 и FBc-28 обладали максимальным спектром, лизируя 12.4 % тестируемых штаммов бацилл.

Введение. Бактерии Bacillus cereus относятся к грамположительным факультативно-анаэробным, подвижным, спорообразующим, палочковидным бактериям, широко
распространенным в окружающей среде и имеющим фенотипические и генетические
признаки, сходные с рядом других видов бактерий рода Bacillus: B. mycoides, B. pseudomycoides, B. thuringiensis и B. anthracis (Rasko et al., 2005; Han et al., 2006; Auger et al., 2009).
Бактерии В. сегеus способны при определенных условиях вызывать у человека широкий
спектр заболеваний, включающих пищевые токсикоинфекции, системные и местные
гнойные инфекции, а у животных – мастит крупного рогатого скота (Musa et al., 1999; Brett
et al., 2005; Darbar, Harris and Gosbell, 2005; Avashia et al., 2007; Abusin et al., 2008).

Для лабораторной диагностики инфекции, вызванных бактериями В. сегеиз в настоящее время применяют классические методы бактериологической диагностики с использованием селективных питательных сред, позволяющие типировать микроорганизмы по биохимическим свойствам. За рубежом применяются дорогостоящие серологические (ИФА) и молекулярные (ПЦР) диагностические методы. Одним из альтернативных методов является фаго диагностика. В связи с этим разработка методов индикации и идентификации В. сегеиз на основе специфичных фагов, позволяющих проводить дифференциацию до вида, а так же внутри вида на биотипы и фаговары, является актуальной и перспективной.

Начиная с 2006 года сначала в США, а потом и в Европе все более широкое распространение получает теория использования бактериофаг-опосредованного биоконтроля в сфере санитарно-эпидемиологических мероприятий, проводимых в сельском хозяйстве, пищевой промышленности, пунктах общественного питания, ЛПУ и организованных коллективах (Алешкин и др., 2012). W.J. Lee (2011) и Ј.Н. Lee (2012) продемонстрировали возможность включения специфических бактериофагов, литически активных в отношении бактерий В. сегеиз, в процедуры по деконтаминации продуктов питания. В Российской Федерации на сегодняшний день отсутствуют данные о созданных фаговых биопрепаратов, в том числе диагностических, специфичных в отношении бактерий В. сегеиз. Разработка бактериофаговой тест-системы позволит не только ускорить процедуру по идентификации бактерий В. сегеиз в продуктах питания и клинических образцах, но и даст возможность дифференцировать бациллы внутри

данного вида на фаговары и фаготипы.

Поэтому целью нашей работы было разработка системы фаговаров бактерий В. cereus для идентификации и мониторинга бактерий В. cereus в объектах санитарного надзора.

Материалы и методы. Исследования по выделению и изучению биологических свойств бактериофагов бактерии В. cereus проводились в период с 2007 года по 2012 год на базе кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина».

Объекты исследований. 105 штаммов бактерий В. сегеиs, из них 3 референсштамма Bacillus cereus №8035, №96, №2527 . Штаммы бактерий рода Bacillus: В. subtilis - 8 штаммов из них 2 референс-штамма №6633 и $L_{\rm 2}$, В. mycoides - 8 штаммов из них 2 референс-штамма № 537 и H; В. thuringiensis - 3 штамма из них 1 референс-штамм В. thuringiensis var. kurstaki;вид В. mesentericus - 8 штаммов из них 1 референс-штамм № 66; В. megaterium - 8 штаммов из них 1 референс-штамм № 182; В. pseudoantracis - 3 штамма из них 1 референс-штамм.

Штаммы бактериофагов – 57 изолята бактериофагов В. cereus, выделенные из проб почвы различного хозяйственного назначения Приволжского федерального округа, Южного федерального округа, Центрального федерального округа.

Выделение и изучение биологических свойств бактериофагов проводили методами, предложенными Д.М. Гольдфарбом (1961), Дж. Мейнеллом (1965), С. Лурия, Д. Дарнелом (1970), И.П. Ревенко (1978), В.Я. Ганюшкиным (1988), С.Н. Золотухиным (2007). Селекцию бактериофагов и повышение их литической активности проводили по методике, описанной С.Н. Золотухиным (2007).

Результаты исследований и их обсуждение.

Первый этап исследования был посвящен выделению фагов бактерий В. cereus. В первой серии опытов мы исследовали штаммы В. cereus на содержание профага без индуцирующего фактора по методике, предложенной С. Лурия и Д. Дарнелла (1970) в модификации А.Г. Шестакова (2010).

Во второй серии экспериментов на культуры В. cereus оказывалось воздействие индуцирующим фактором — ультрафиолетовыми лучами, по методике Дж. Мейнелла (1965). В результате проведенного комплекса исследований лизогенных штаммов В. сеreus среди тестируемых культур не обнаружено.

В третьей серии экспериментов проводили выделение бактериофагов из объектов окружающей среды по методике Д.М. Гольдфарба (1961) в оригинальной модификации И.П. Ревенко (1978). По литературным данным, наиболее эффективно в качестве источника выделения бактерий рода Bacillus использовать пробы почвы, так как они являются почвенными сапрофитами. В результате исследования 388 проб почвы различного хозяйственного назначения Приволжского федерального округа, Южного федерального округа, Центрального федерального округа, нам удалось выделить 57 изолятов бактериофагов бактерий В. сегеus.

Четвертым этапом наших исследований было изучение основных биологических свойств (морфологии негативных колоний; специфичности действия; литической активности и ее изменения при хранении; спектра литического действия) выделенных бактериофагов В. cereus.

Экспериментальным путем было установлено, что негативные колонии, образуемые 57 изолятами фагов В. сегеиѕ, имели различный тип колоний. Согласно данным Ревенко И.П. (1978) морфология негативных колоний — это важный признак дифференциации фагов на умеренные и вирулентные. В нашем случае было выявлено 4 типа негативных колоний различающихся по размеру, форме и прозрачности.

Литическая активность выделенных фагов составила от 10^{15} до 10^{10} по методу Аппельмана и от $1,8\times10^7\pm0,4\times10^7$ до $4\times10^{12}\pm1,8\times10^{12}$ по методу Грациа. Определение спектра литической активности проводили методом нанесения фага на газон бактериальной культуры (Адамс М, 1961; Ганюшкин В.Я., 1988). Установлено, что спектр литической активности фаготипов бактериофагов В.сегеus находился в интервале от 0,9 до 12,4 % от всего количества изучаемых бактериальных штаммов. Причем, наиболее широким спектром литического действия по отношению к изучаемым культурам обладали штаммы бактериофагов: FBc-1 − 9,5 %, FBc-4 − 11,4 %, FBc -7 − 12,4 %, FBc-28 − 12,4 %. Кроме того имелись «нетипирующиеся» штаммы бактерий В. сегеus №3, №10, №24, №34, №40, №44, №58, №63, №73, №86, №96, которые не лизировались ни одним из имеющихся бактериофагов.

Изучение специфичности 57 выделенных изолятов бактериофагов В. cereus проводили на культурах гомологичного рода: В. mesentericus, В. subtilis, В. mycoides, В. megaterium, В. mesentericus В. thuringiensis, В. pseudoanthracis. Самой важной характеристикой выделенных фагов была специфичность по отношению к штаммам В. сеreus и отсутствие способности лизировать культуры других видов Bacillus, которые по биохимическим свойствам сходны с исследуемыми культурами. В результате исследований установлено, что бактериофаги обладают выраженной специфичностью только по отношению к бактериям вида В. cereus.

В результате проведенных исследований, была выявлена особенность селекционированных бактериофагов, связанная с избирательным лизисом тестируемых штаммов бацилл, позволившая объединить бактериофаги и бактерии во взаимосвязанные группы. Перекрест фагов не допускался, каждый фаг имел лизис строго внутри своей группы фаговаров. Фаг, обладающий более широким спектром литической активности исключался и далее не рассматривался. В результате такого отбора были исключены фаги FBc – 2; 5; 13; 29; 39; 53;54 серии УГСХА. Таким образом, отобранные фаги были разделены на 18 групп (табл. 1). В последующем на их основе предложили схему фаготипирования, позволяющую идентифицировать бактерии В. cereus на 18 фаговаров (табл. 2). Алгоритм фаготипирования может быть представлен следующим образом: чашку Петри делят бактериологическим карандашом на сектора, предварительно нумеруя группы бактериофага наносимого на газон. На поверхность МПА засеянного газоном исследуемой культуры пипеткой в намеченный сектор наносят каплю фага, дав ей впитаться в поверхность газона. В каждой чашке обязательно оставляют сектор, на который аналогичным образом наносится МПБ (для контроля). Результат учитывают по лизису исследуемой культуры. Лизируемые культуры сравниваются со схемой фаготипирования (табл. 3) и тестируемому штамму бацилл присваивается название группы фага, которой он лизируется (например, фаговар 1-Тип Вс - № штамма).

Заключение. Выделено 57 фагов В. cereus. Изучены основные биологические свойства 57 изолятов фагов В. cereus: определено 4 типа негативных колоний (3 виру-

лентных и 1 умеренный), литическая активность выделенных фагов составила от 10^{-5} до 10^{-10} по методу Аппельмана и от $1.8\times10^7\pm0.4\times10^7$ до $4\times10^{12}\pm1.8\times10^{12}$ по методу Грациа, все выделенные бактериофаги проявляли свою литическую активность только в отношении вида В.cereus, причем 2 из них FBc-7 и FBc-28 обладали максимальным спектром, лизируя 12.4% тестируемых штаммов бацилл. Разработана схема фаготипирования штаммов В. сereus, делящая все изученные штаммы данного микроорганизма на 18 фаговаров.

Применение схемы фаговаров бактерий В. cereus позволит осуществлять более детальную дифференциацию отдельных биотипов и фаговаров внутри вида, а так же проводить мониторинг данного микроорганизма.

Таблица 1. Характеристика фаговаров B. cereus

| Фаговары В. cereus Название раскитериюфагов угсха Морфология колоний Название лизируемых штаммов В. cereus 1-Фаг Вс FBc − 7 УГСХА 2 тип №88035, №96, 4, 8, 18, 12, 17, 18, 20, 37, 42, 49, 50, 54 FBc − 28 УГСХА 4 тип 1, 2, 4, 8, 18, 12, 17, 18, 20, 21, 37, 42, 49, 50 4-Фаг Вс FBc − 3 УГСХА 2 тип 5, 6, 16, 25, 29, 30, 31, 33 FBc − 56 УГСХА 1 тип 16, 31, 33 FBc − 1 УГСХА 2 тип №2527, 53, 64, 82, 85, 87, 90, 95, 98, 100 3-Фаг Вс FBc − 17 УГСХА 4 тип 38, 65, 82, 101 4-Фаг Вс FBC − 30 УГСХА 4 тип 56 FBC − 44 УГСХА 2 тип 102 6-Фаг Вс FBC − 30 УГСХА 2 тип 9, 27, 55, 77 FBC − 47 УГСХА 2 тип 9, 27, 55, 77 FBC − 47 УГСХА 2 тип 19, 28, 32, 36, 57, 68, 71, 80 8-Фаг Вс FBC − 14 УГСХА 2 тип 7, 15, 39, 41, 74, 89 FBC − 38 УГСХА 4 тип 75 FBC − 55 УГСХА 3 тип 75 10-Фаг Вс FBC − 15 УГСХА 3 тип 23 FBC − 18 УГСХА 3 тип 23 < | | ида 1: ларактерие | | | | | | | | |
|---|-------------------------|-----------------------|------------|--------------------------------|--|--|--|--|--|--|
| 1-Φαε Βε FBC - 7 YICXA 2 τιπ 37, 42, 49, 50, 54 2-Φαε Βε FBC - 28 YICXA 4 τιπ 1, 2, 4, 8, 18, 12, 17, 18, 20, 21, 37, 42, 49, 50 2-Φαε Βε FBC - 3 YICXA 2 τιπ 5, 6, 16, 25, 29, 30, 31, 33 3- Φαε Βε FBC - 6 YICXA 4 τιπ 16, 31, 33 5- Φαε Βε FBC - 1 YICXA 2 τιπ Ne2527, 53, 64, 82, 85, 87, 90, 95, 98, 100 6- Φαε Βε FBC - 17 YICXA 4 τιπ 38, 65, 82, 101 5- Φαε Βε FBC - 30 YICXA 4 τιπ 56 7- Φαε Βε FBC - 30 YICXA 2 τιπ 9, 27, 55, 77 7- Φαε Βε FBC - 33 YICXA 2 τιπ 9, 27, 55, 77 9- Φαε Βε FBC - 14 YICXA 2 τιπ 19, 28, 32, 36, 57, 68, 71, 80 9- Φαε Βε FBC - 14 YICXA 2 τιπ 7, 15, 39, 41, 74, 89 10-Φαε Βε FBC - 21 YICXA 1 τιπ 75 10-Φαε Βε FBC - 9 YICXA 1 τιπ 23 10-Φαε Β | | бактериофагов | негативных | Название лизируемых штаммов | | | | | | |
| FBC - 28 YΓCXA 4 τιπ 1, 2, 4, 8, 18, 12, 17, 18, 20, 21, 37, 42, 49, 50 FBC - 3 YΓCXA 2 τιπ 5, 6, 16, 25, 29, 30, 31, 33 FBC - 6 YΓCXA 1 τιπ 16, 31, 33 FBC - 56 YΓCXA 4 τιπ 13, 25, 26, 29, 30 N°2527, 53, 64, 82, 85, 87, 90, 95, 98, 100 FBC - 1 YΓCXA 4 τιπ 38, 65, 82, 101 4- Φαε Βε FBC - 50 УГСХА 3 τιπ 22, 76, 83 5- Φαε Βε FBC - 43 УГСХА 4 τιπ 56 FBC - 44 УГСХА 2 τιπ 102 6- Φαε Βε FBC - 30 УГСХА 2 τιπ 9, 27, 55, 77 FBC - 47 УГСХА 4 τιπ 9, 72 7- Φαε Βε FBC - 33 УГСХА 2 τιπ 7, 15, 39, 41, 74, 89 FBC - 38 УГСХА 4 τιπ 75 FBC - 21 УГСХА 1 τιπ 75 FBC - 9 УГСХА 1 τιπ 75 FBC - 15 УГСХА 3 τιπ 23 | 1-Фаг Вс | <i>FBc</i> – 7 УГСХА | 2 тип | | | | | | | |
| 2-Φαε Βε FBC – 6 YΓCXA 1 τμπ 16, 31, 33 FBC – 56 YΓCXA 4 τμπ 13, 25, 26, 29, 30 3- Φαε Βε FBC – 1 YΓCXA 2 τμπ Nº2527, 53, 64, 82, 85, 87, 90, 95, 98, 100 4- Φαε Βε FBC – 17 YΓCXA 4 τμπ 38, 65, 82, 101 4- Φαε Βε FBC – 50 YΓCXA 3 τμπ 22, 76, 83 5- Φαε Βε FBC – 43 YΓCXA 2 τμπ 56 FBC – 30 YΓCXA 2 τμπ 9, 27, 55, 77 FBC – 47 YΓCXA 4 τμπ 9, 72 7- Φαε Βε FBC – 33 YΓCXA 2 τμπ 19, 28, 32, 36, 57, 68, 71, 80 8- Φαε Βε FBC – 14 YΓCXA 2 τμπ 7, 15, 39, 41, 74, 89 FBC – 38 YΓCXA 4 τμπ 75 FBC – 21 YΓCXA 1 τμπ 75 FBC – 55 YΓCXA 3 τμπ 75 10-Φαε Βε FBC – 9 YΓCXA 1 τμπ 23 FBC – 15 YΓCXA 3 τμπ 23 | | <i>FBc</i> – 28 УГСХА | 4 тип | | | | | | | |
| $FBC - 56 \text{ YΓCXA} \qquad 4 \text{ TMR} \qquad \qquad 13, 25, 26, 29, 30$ $3 - Φαε \textbf{BC} \qquad FBC - 17 \text{ YΓCXA} \qquad 2 \text{ TMR} \qquad \qquad 38, 65, 82, 101$ $4 - Φαε \textbf{BC} \qquad FBC - 50 \text{ YΓCXA} \qquad 3 \text{ TMR} \qquad \qquad 22, 76, 83$ $5 - Φαε \textbf{BC} \qquad FBC - 43 \text{ YΓCXA} \qquad 2 \text{ TMR} \qquad \qquad 56$ $FBC - 44 \text{ YΓCXA} \qquad 2 \text{ TMR} \qquad \qquad 102$ $6 - Φαε \textbf{BC} \qquad FBC - 30 \text{ YΓCXA} \qquad 2 \text{ TMR} \qquad \qquad 9, 27, 55, 77$ $FBC - 47 \text{ YΓCXA} \qquad 4 \text{ TMR} \qquad 9, 72$ $7 - Φαε \textbf{BC} \qquad FBC - 33 \text{ YΓCXA} \qquad 2 \text{ TMR} \qquad 19, 28, 32, 36, 57, 68, 71, 80$ $8 - Φαε \textbf{BC} \qquad FBC - 33 \text{ YΓCXA} \qquad 2 \text{ TMR} \qquad 14, 52$ $9 - Φαε \textbf{BC} \qquad FBC - 21 \text{ YΓCXA} \qquad 1 \text{ TMR} \qquad 75$ $FBC - 55 \text{ YΓCXA} \qquad 1 \text{ TMR} \qquad 75$ $FBC - 55 \text{ YΓCXA} \qquad 1 \text{ TMR} \qquad 75$ $FBC - 9 \text{ YΓCXA} \qquad 1 \text{ TMR} \qquad 75$ $FBC - 15 \text{ YΓCXA} \qquad 1 \text{ TMR} \qquad 23$ $FBC - 15 \text{ YΓCXA} \qquad 3 \text{ TMR} \qquad 23$ | | <i>FBc</i> – 3 УГСХА | 2 тип | 5, 6, 16, 25, 29, 30, 31, 33 | | | | | | |
| 3- Φαε Bc $FBC - 1 																																		$ | 2-Фаг Вс | <i>FBc</i> – 6 УГСХА | 1 тип | 16, 31, 33 | | | | | | |
| FBC - 1 YI CXA 2 TWI 100 FBC - 17 YI CXA 2 TWI 38, 65, 82, 101 4- Φαε Βε FBC - 50 YI CXA 3 TWI 22, 76, 83 5- Φαε Βε FBC - 43 YI CXA 4 TWI 56 FBC - 44 YI CXA 2 TWI 102 6- Φαε Βε FBC - 30 YI CXA 2 TWI 9, 27, 55, 77 FBC - 47 YI CXA 4 TWI 9, 72 7- Φαε Βε FBC - 33 YI CXA 2 TWI 19, 28, 32, 36, 57, 68, 71, 80 8- Φαε Βε FBC - 14 YI CXA 2 TWI 7, 15, 39, 41, 74, 89 7- Φαε Βε FBC - 38 YI CXA 4 TWI 75 7- Φαε Βε FBC - 21 YI CXA 1 TWI 75 7- Φαε Βε FBC - 9 YI CXA 1 TWI 23 7- Φαε Βε FBC - 15 YI CXA 3 TWI 23 | | <i>FBc</i> – 56 УГСХА | 4 тип | 13, 25, 26, 29, 30 | | | | | | |
| 4- Φαε Βc FBC – 50 YΓCXA 3 τμπ 22, 76, 83 5- Φαε Βc FBC – 43 YΓCXA 4 τμπ 56 FBC – 44 YΓCXA 2 τμπ 102 6- Φαε Βc FBC – 30 YΓCXA 2 τμπ 9, 27, 55, 77 FBC – 47 УГСХА 4 τμπ 9, 72 7- Φαε Βc FBC – 33 УГСХА 2 τμπ 19, 28, 32, 36, 57, 68, 71, 80 8- Φαε Βc FBC – 14 УГСХА 2 τμπ 7, 15, 39, 41, 74, 89 FBC – 38 УГСХА 4 τμπ 14, 52 9- Φαε Βc FBC – 21 УГСХА 1 τμπ 75 FBC – 55 УГСХА 3 τμπ 75 10-Φαε Bc FBC – 9 УГСХА 1 τμπ 23 FBC – 15 УГСХА 3 τμπ 23 | 3- Фаг Вс | <i>FBc</i> – 1 УГСХА | 2 тип | | | | | | | |
| 5- Φαε Βε FBC - 43 YΓCΧΑ 4 τιπ 56 FBC - 44 YΓCΧΑ 2 τιπ 102 6- Φαε Βε FBC - 30 YΓCΧΑ 2 τιπ 9, 27, 55, 77 FBC - 47 YΓCΧΑ 4 τιπ 9, 72 7- Φαε Βε FBC - 33 YΓCΧΑ 2 τιπ 19, 28, 32, 36, 57, 68, 71, 80 8- Φαε Βε FBC - 14 YΓCΧΑ 2 τιπ 7, 15, 39, 41, 74, 89 FBC - 38 YΓCΧΑ 4 τιπ 14, 52 9- Φαε Βε FBC - 21 YΓCΧΑ 1 τιπ 75 FBC - 55 YΓCΧΑ 3 τιπ 75 10-Φαε Βε FBC - 9 YΓCΧΑ 1 τιπ 23 FBC - 15 YΓCΧΑ 3 τιπ 23 | | <i>FBc</i> – 17 УГСХА | 4 тип | 38, 65, 82, 101 | | | | | | |
| 5- Φαε Βc FBC – 44 УГСХА 2 тип 102 6- Φαε Βc FBC – 30 УГСХА 2 тип 9, 27, 55, 77 7- Φαε Βc FBC – 47 УГСХА 4 тип 9, 72 7- Φαε Βc FBC – 33 УГСХА 2 тип 19, 28, 32, 36, 57, 68, 71, 80 8- Φαε Bc FBC – 14 УГСХА 2 тип 7, 15, 39, 41, 74, 89 FBC – 38 УГСХА 4 тип 14, 52 9- Φαε Bc FBC – 21 УГСХА 1 тип 75 FBC – 55 УГСХА 3 тип 75 10-Фαε Bc FBC – 9 УГСХА 1 тип 23 FBC – 15 УГСХА 3 тип 23 | 4- Фаг Вс | <i>FBc</i> – 50 УГСХА | 3 тип | 22, 76, 83 | | | | | | |
| FBC – 44 YΓCXA 2 τιπ 102 $6 - Φαε$ Bc $FBC - 30$ УГСХА 2 τιπ 9, 27, 55, 77 $FBC - 47$ УГСХА 4 τιπ 9, 72 $7 - Φαε$ Bc $FBC - 33$ УГСХА 2 τιπ 19, 28, 32, 36, 57, 68, 71, 80 $8 - Φαε$ Bc $FBC - 14$ УГСХА 2 τιπ 7, 15, 39, 41, 74, 89 $4 - 40$ | 5 Φαν Β ε | <i>FBc</i> – 43 УГСХА | 4 тип | 56 | | | | | | |
| 6- Φαε Βc FBc – 47 УГСХА 4 тип 9, 72 7- Φαε Βc FBc – 33 УГСХА 2 тип 19, 28, 32, 36, 57, 68, 71, 80 8- Φαε Βc FBc – 14 УГСХА 2 тип 7, 15, 39, 41, 74, 89 FBc – 38 УГСХА 4 тип 14, 52 9- Φαε Βc FBc – 21 УГСХА 1 тип 75 FBc – 55 УГСХА 3 тип 75 10-Фαε Вс FBc – 9 УГСХА 1 тип 23 FBc – 15 УГСХА 3 тип 23 | J- Ψαε Β ι | <i>FBc</i> – 44 УГСХА | 2 тип | 102 | | | | | | |
| FBC – 47 УГСХА 4 тип 9, 72 7- Φαε Bc FBC – 33 УГСХА 2 тип 19, 28, 32, 36, 57, 68, 71, 80 8- Φαε Bc FBC – 14 УГСХА 2 тип 7, 15, 39, 41, 74, 89 FBC – 38 УГСХА 4 тип 14, 52 9- Φαε Bc FBC – 21 УГСХА 1 тип 75 FBC – 55 УГСХА 3 тип 75 10-Фαε Bc FBC – 9 УГСХА 1 тип 23 FBC – 15 УГСХА 3 тип 23 | 6- Maz Rc | <i>FBc</i> – 30 УГСХА | 2 тип | 9, 27, 55, 77 | | | | | | |
| 8- Φαε Βc FBC – 14 УГСХА 2 тип 7, 15, 39, 41, 74, 89 FBC – 38 УГСХА 4 тип 14, 52 9- Φαε Βc FBC – 21 УГСХА 1 тип 75 FBC – 55 УГСХА 3 тип 75 10-Фαε Вс FBC – 9 УГСХА 1 тип 23 FBC – 15 УГСХА 3 тип 23 | ο- Ψα <i>ε</i> Β | <i>FBc</i> – 47 УГСХА | 4 тип | 9, 72 | | | | | | |
| B - Φαε Bc $FBC - 38 УГСХА$ $4 тип$ $14,52$ $9 - Φαε Bc$ $FBC - 21 УΓСХА$ $1 тип$ 75 $FBC - 55 УГСХА$ $3 тип$ 75 $10 - Φαε Bc$ $FBC - 9 УΓСХА$ $1 τип$ 23 $FBC - 15 УГСХА$ $3 тип$ 23 | 7- Фаг Вс | <i>FBc</i> – 33 УГСХА | 2 тип | 19, 28, 32, 36, 57, 68, 71, 80 | | | | | | |
| FBC – 38 УГСХА 4 τип 14, 52 $9-Φαε$ Βc FBC – 21 УГСХА 1 τип 75 $10-Φαε$ Βc FBC – 9 УГСХА 1 τип 23 $FBC - 15$ УГСХА 3 тип 23 | 8- Φα2 Rc | <i>FBc</i> – 14 УГСХА | 2 тип | 7, 15, 39, 41, 74, 89 | | | | | | |
| 9- Φαε Βc FBc – 55 УГСХА 3 тип 75 10-Φαε Bc FBc – 9 УГСХА 1 тип 23 FBc – 15 УГСХА 3 тип 23 | ο- Ψυ ε Βι | <i>FBc</i> – 38 УГСХА | 4 тип | 14, 52 | | | | | | |
| FBC - 55 УГСХА 3 тип 75 10-Фаг ВС $FBC - 9$ УГСХА 1 тип 23 $FBC - 15$ УГСХА 3 тип 23 | 9- Фаг Вс | <i>FBc</i> – 21 УГСХА | 1 тип | 75 | | | | | | |
| 10-Фаг Вс FBc — 15 УГСХА 3 тип 23 | | <i>FBc</i> – 55 УГСХА | 3 тип | 75 | | | | | | |
| <i>FBc</i> – 15 УГСХА 3 тип 23 | 10-Фаг Вс | <i>FBc</i> – 9 УГСХА | 1 тип | 23 | | | | | | |
| FRC = 18 VFCYA 2 THE | | <i>FBc</i> – 15 УГСХА | 3 тип | 23 | | | | | | |
| 11- das Be | 11- Фаг Вс | <i>FBc</i> – 18 УГСХА | 2 тип | 92 | | | | | | |
| <i>FBc</i> – 49 УГСХА 1 тип 92 | | <i>FBc</i> – 49 УГСХА | 1 тип | 92 | | | | | | |

| 12- Фаг Вс | <i>FBc</i> – 41 УГСХА | 1 тип | 46, 51 | | | | | |
|-------------------|-----------------------|-------|----------------------------|--|--|--|--|--|
| | <i>FBc</i> – 46 УГСХА | 2 тип | 51, 94 | | | | | |
| 13- Фаг Вс | <i>FBc</i> – 23 УГСХА | 2 тип | 84 | | | | | |
| | <i>FBc</i> – 37 УГСХА | 1 тип | 84 | | | | | |
| 14- Фаг Вс | <i>FBc</i> – 19 УГСХА | 2 тип | 45, 59 | | | | | |
| | <i>FBc</i> – 52 УГСХА | 4 тип | 45, 62 | | | | | |
| 15- Фаг Вс | <i>FBc</i> – 27 УГСХА | 1 тип | 60, 70, 88, 91, 97 | | | | | |
| 16- Фаг Вс | <i>FBc</i> – 20 УГСХА | 2 тип | 66, 78, 79 | | | | | |
| 17- Фаг Вс | <i>FBc</i> – 34 УГСХА | 2 тип | 43, 81 | | | | | |
| 18- Фаг Вс | <i>FBc</i> – 51 УГСХА | 2 тип | 35, 47, 48, 61, 67, 93, 99 | | | | | |

Таблица 2. Схема фаготипирования

| | | _ | r - | Ċ. | _ | _ | _ | | _ | _ | | | _ | r | _ | _ | _ | _ |
|------------|-------|-------|----------|-------|----------|-------|----------|-------|------------------|----------|-------|--------|-------|--------|-------|--------|-------|--------|
| Типы фагов | | | | | | | | | | Bc | Bc | Bc | Bc | Bc | Bc | Bc | Bc | Вс |
| Фаговары | Вс | Bc | 3-Тип Вс | Вс | 5-Тип Вс | Вс | 7-Тип Вс | Вс | ВС | B | B L | | пВ | B - | B | B | B - | B |
| (фаготипы) | 1-Тип | 2-Тип | Z. | 4-Тип | Z. | 6-Тип | 로 | 8-Тип | 9-Тип | 10-Тип (| 1-Тип | 12-Тип | 3-Тип | 14-Тип | 5-Тип | 16-Тип | 7-Тип | 18-Тип |
| бактерии | 1 | Z-T | 3-T | 4-T | | 5.T | 7-1 | 1-8 | 1 - 6 | 10 | 17 | 12 | 13- | 14- | 15 | 16- | 17. | 18- |
| 1-Тип Вс | + | - | _ | _ | - | _ | _ | _ | _ | - | _ | _ | _ | _ | _ | - | _ | _ |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2-Тип Вс | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 3-Тип Вс | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 4-Тип Вс | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 5-Тип Вс | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 6-Тип Вс | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 7-Тип Вс | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 8-Тип Вс | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 9-Тип Вс | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 10-Тип Вс | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 11-Тип Вс | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - |
| 12-Тип Вс | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - |
| 13-Тип Вс | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - |
| 14-Тип Вс | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - |
| 15-Тип Вс | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - |
| 16-Тип Вс | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - |
| 17-Тип Вс | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - |
| 18-Тип Вс | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + |

Примечание – «+» - лизис; «-» - отсутствие лизиса.

Библиографический список

1. Алешкин, А.В. Бактериофаги как пробиотики и средства деконтаминации пищевых продуктов / А.В. Алешкин, Н.В. Воложанцев, Э.А. Светоч, В.А. Алешкин, С.С. Афанасьев, А.И. Борзилов, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин, А.В. Караулов, Х.М. Галимзянов,

- Ю.Ф. Космачев, И.А. Киселева, М.С. Афанасьев, Е.О. Рубальский, М.О. Рубальский // Астраханский мед. журнал. 2012. №3 (7), С.31-39
- 2. Ганюшкин, В.Я. Бактериофаги сальмонелл и их применение в ветеринарии / В.Я. Ганюшкин. Ульяновск: СХИ. 1988. С.42–45.
- 3. Гольдфарб, Д.М. Бактериофагия // Д.М. Гольдфарб. М.: Медгиз,1961. С. 169– 187.
- 4. 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.
 - Лурия, С. Общая вирусология / С. Лурия, Д. Дарнелл. М., Мир, 1970. С.36–47.
- 6. Ревенко, И.П. Бактериофаги и их использование в ветеринарной практике / И.П. Ревенко. Киев: Урожай, 1978. С. 41–88.
- 7. Шестаков, А.Г. Усовершенствование методов выделения, идентификации и индикации бактерий Pseudomonas aeruginosa: дис. . . канд. биол. наук: 03.00.07, 03.00.23 / Шестаков Андрей Геннаьевич. Саратов, 2010. 22 с.
- 8. Abusin, S. 2008. Bacillus cereus endocarditis in a permanent pacemaker / S. Abusin, A. Bhimaraj and S. Khadra // Cases Journal. 2008. №1. P. 95 -98
- 9. Auger, S. Biofilm formation and cell surface properties among pathogenic and non-pathogenic strains of the Bacillus cereus group / S. Auger, N. Ramarao, C. Faille, A. Fouet, S. Aymerich, M. Gohar // Appl. Environ. Microbiol. − 2009. –№ 10. P. 1128.
- 10. Avashia, S. B. Fatal pneumonia among metalworkers due to inhalation exposure to Bacillus cereus containing Bacillus anthracis toxin genes / S. B. Avashia, W. S. Wiggens, C. Lindley, A. H. Hoffmaster, R. Drumgoole, T. Nekomoto, P. J. Jackson, K. K. Hill, K. Williams, L. Lehman, M. C. Libal, P. P. Wilkins, J. Alexander, A. Tvaryanas, and T. // Betz.Clin. Infect. − 2007. − № 44. − P.414−416.
- 11. Brett, M. M. Soft tissue infections by spore-forming bacteria in injecting drug users in the United Kingdom / M. M. Brett, J. Hood, J. S. Brazier, B. I. Duerden, J. M. Hahné // Epidemiol. Infect. − 2005. − № 133.−P.575−582.
- 12. Darbar, A. Necrotizing infection due to Bacillus cereus mimicking gas gangrene following penetrating trauma / A. Darbar, I. A. Harris, I. B. Gosbell // J. Orthop. Trauma. -2005. -Ne19. -P. 353-355.
- 13. Han, C. S. Pathogenomic sequence Analysis of Bacillus cereus and Bacillus thuringiensis Isolates Closely Related to Bacillus anthracis / C. S. Han, G. Xie, J. F. Challacombe, M. R. Altherr, S. S. Bhotika, N. Brown, D. Bruce, C. S. Campbell, M. L. Campbell, J. Chen, O. Chertkov, C. Cleland // Journal of Bacteriology. 2006. –V. 188(900). P. 3382–3390.
- 14. Musa, M.O. Fulminant septicaemic syndrome of Bacillus cereus: three case reports/ M. O. Musa, A.I. Douri, M. Khan, S. Shafi, T. Al Humaidh, A. Al Rasheed // J. Infect. 1999. –Nº 39. P.154–156.
- 15. Rasko, DA. Genomics of the Bacillus cereus group of organisms / D.A. Rasko, M.R. Altherr, C.S. Han, J. Ravel // FEMS Microbiol Rev. 2005. № 29. P.303–329.

DEVELOPMENT OF BACILLUS CEREUS FAGOVAROV

Kaldyrkaev A.I., Feoktistova N.A., Vasiliev D.A., Alyoshkin A.V., Merchina S.V.

Keywords: Bacillus cereus, monitoring, bacteriophages fagovarov system, identification, biological properties, phage typing.

The work is devoted to development of fagovarov B. cereus. The scheme of phage-typing strains of B. sereus dividing all the studied strains of the pathogen by 18 fagovarov. Allocated 57 phages B. cereus. Studied the basic biological properties of 57 isolates of phage B. cereus: defined four types of negative colonies isolated phage lytic activity ranged from 10-5 to 10-10 by the method of Appelman and $1.8 \times 107 \pm 0.4 \times 4 \times 107$ to $1012 \pm 1.8 \times 1012$ method Grazia all isolated phages showed their lytic activity only against species B.cereus, wherein two of them FBc-FBc-7, and 28 had maximum spectrum lysing 12.4% of tested strains of bacilli.

УДК 602.3:579.8

Научные исследования проводятся при финансовой поддержке государства в лице Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках реализации федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы (соглашение от №8267 от 10.08.2012).

ПАРАМЕТРЫ ПОСТАНОВКИ РЕАКЦИИ НАРАСТАНИЯ ТИТРА ФАГА ДЛЯ ИНДИКАЦИИ БАКТЕРИЙ РОДА PROTEUS В ОБЪЕКТАХ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Н.А. Феоктистова, кандидат биологических наук, доцент ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А.Столыпина» тел. 8(8422) 55-95-47, feokna@yandex.ru М.А. Юдина, ассистент ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина» тел. 8(8422) 55-95-47, feokna@yandex.ru Д.А. Васильев, доктор биологических наук, профессор ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А.Столыпина» 8(8422) 55-95-47, dav_ul@mail.ru С.Н. Золотухин, доктор биологических наук, профессор ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А.Столыпина» 8(8422) 55-95-47, fom.zol@yandex.ru

Ключевые слова: индикация, бактерий рода Proteus, объекты ветеринарно-са-