

лимеразной цепной реакции при идентификации возбудителя бордетеллеза животных. // Естественные и технические науки. – 2010. - № 5 – С. 230-232.

3. Васильев Д.А., Мاستиленко А.В. Сверкалова Д.Г. Васильева Ю.Б. Выделение и идентификация *Bordetella bronchiseptica* от животных // Естественные и технические науки. – 2010. - № 5 – С. 233-235.

4. Васильев Д.А., Золотухин С.Н., Никишина Н.М. Учебно-методическое пособие по методам общей бактериологии. -Ульяновск, 1998. – 151 с.

5. Габрилович И.М. Общая характеристика бактериофагов / И.М. Габрилович // Основы бактериофагии. – Минск. – 1973. – С. 5-24.

6. Гольдфарб Д.М. Бактериофагия / Д.М. Гольдфарб // М.: Медгиз. – 1961. – 225 с.

7. Золотухин С.Н. Разработка оптимальных количественных параметров соотношения культуры и фага для получения препаратов с высокой активностью / С.Н. Золотухин, Л.П. Пульчеровская, Д.А. Васильев // Вестник УГСХА. – 2004. – № 12. – С. 50-53.

8. Bjornstad O.N. Evolution and emergence of *Bordetella* in humans / O.N. Bjornstad, E.T. Narvill // Trends Microbiol. – 2005. – N 13. – P. 355-359.

9. Karataev G.I., Lapajeva I.A., Ryabinina O.P., Mebel S. Detection of a new bacteriophage in *Bordetella*.//FEMS- symposium Pertussis. Berlin, GDR.- 1988.- p.20.

10. Mattoo S. Role of *Bordetella bronchiseptica* fimbriae in tracheal colonization and development of a humoral immune response / S. Mattoo, J.F. Miller, P.A. Cotter // Infect. Immun. – 2000. – N 68. – P. 2024-2033.

DEVELOPMENT OF METHODS OF ALLOCATION AND SELECTION OF BACTERIOPHAGES BORDETELLA BRONCHISEPTICA

Vasileva Y.B., Vasilev D.A., Semanina E.N.

Key words: *Bordetella bronchiseptica*, allocation of phages, properties of bacteriophages

The article considers the question on the development of methods of allocation of bacteriophages, active in respect of Bordetella bronchiseptica. There are the results of own scientific researches of biological properties of the selected bacteriophages: morphology negative colonies, lytic activity, the spectrum of lytic action, the specificity of action, thermal stability, resistance to the action of the chloroform and the change of lytic activity during storage.

УДК 619:616

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ДИФФЕРЕНЦИРОВАНИЯ УМЕРЕННЫХ И ВИРУЛЕНТНЫХ БАКТЕРИОФАГОВ

**Викторов Д.А., кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник,**

Тел. 9084775573, viktorov_da@mail.ru

Васильев Д.А., доктор биологических наук, профессор

Тел. 8(8422) 55-95-47, dav_ul@mail.ru

Золотухин С.Н., доктор биологических наук, профессор

Тел. 9272703480, fvm.zol@yandex.ru

Гринева Т.А., соискатель,

Тел. 9033201410, e-mail: tag78@mail.ru
 Горшков И.Г., научный сотрудник,
 Тел. 9170572024, i.o.gun@mail.ru
 Куклина Н.Г., научный сотрудник,
 Тел. 9176192488, ul_nk@mail.ru
 Насибуллин И.Р., соискатель, Тел. 9053484611, nir72@mail.ru
 Парамонова Н.А., аспирант кафедры МВЭиВСЭ
 Тел. 9170590057, paramonnat@rambler.ru
 Артамонов А.М., соискатель кафедры МВЭиВСЭ
 Воротников А.П., студент факультета ветеринарной медицины
 Тел. 9279807993, vorot.ru@mail.ru
 Антошкин П.А., студент факультета ветеринарной медицины
 Тел. 9603604787, vita1468@mail.ru
 ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А.Столыпина»

Ключевые слова: Умеренные бактериофаги, вирулентные бактериофаги, лизогения, дифференцирование, микробиология

По данным ряда исследователей, разделение бактериофагов на умеренные и вирулентные условно и относительно. Однако показатели умеренности/вирулентности бактериофагов целесообразно выражать так называемым коэффициентом лизогенизации – отношением количества лизогенизированных бактериальных клеток к общему количеству бактерий, подвергнутых единичному циклу фаговой инфекции. Коллективом авторов разработана и апробирована методика дифференцирования умеренных и вирулентных бактериофагов, основанная на выявлении образования лизогенных клеток.

Актуальность.

Критерии умеренности / вирулентности бактериофагов играют существенную роль при их селекции для использования в составе терапевтических препаратов и средств дезинфекции, поскольку воздействие умеренных бактериофагов на культуру фагочувствительных бактериальных клеток приводит к её частичной лизогенизации, результатом которой является появление фагорезистентных вариантов. По этой причине в состав биопрепаратов важно подбирать наиболее вирулентные (литические) бактериофаги. Однако к настоящему времени отсутствуют достоверные методы, позволяющие дифференцировать умеренные бактериофаги от вирулентных. Кроме того, согласно мнению многих авторов (Ревенко, 1978; Хейс, 1965) разделение бактериофагов на умеренные и вирулентные весьма условно и относительно.

Предлагаемая методика основана на отличительной особенности умеренных бактериофагов обуславливать лизогенизацию отдельных клеток чувствительной бактериальной культуры, то есть интегрироваться в генетический аппарат бактерии в виде профага, не вызывая при этом лизис; и позволяет с достаточной объективностью оценивать критерии умеренности / вирулентности бактериофагов.

Ход исследования:

Для исследования готовится мясопептонный агар, разливается в стерильные чашки Петри и тщательно подсушивается при 37 °С не менее 24 часов в целях избавления от капель конденсата и усиления гигроскопических свойств поверхности агара. Суспензию 24-часовой индикаторной культуры бактерий титруют в мясопептонном бульоне до третьего разведения. Исходная суспензия 24-часовой индикаторной культуры бактерий и каждое из трёх полученных разведений засеваются газоном на отдельные подготовленные чашки Петри с подсушенным мясопептонным агаром. Для этого суспензия в количестве 0,7 мл с помощью стерильной пипетки вносится на поверхность МПА и равномерно распределяется по поверхности агара покачивающими движениями, после чего излишек суспензии удаляется стерильной пипеткой,

а чашки переворачиваются крышкой вниз и подсушиваются в термостате при оптимальной для исследуемой бактериальной культуры температуре около 10-30 минут. После полного подсыхания остатков суспензии, полученные четыре чашки с различным разведением бактерий разделяются на сектора, в которые отдельно вносятся по 50 мкл исследуемых суспензий бактериофагов в виде капель. Аналогичным образом проводится засев бактериофагов на чашки Петри со стерильным мясопептонным агаром – для контроля на отсутствие жизнеспособных бактерий в исследуемых фаговых суспензиях. Чашки термостатируются при оптимальной для размножения фагов и индикаторных бактерий температуре в течение 18-24 часов.

Индикаторная культура бактерий должна быть гомогенной, не содержать в своём составе постороннюю микрофлору. Препараты бактериофагов должны быть полностью освобождены от бактериальных клеток надлежащими способами обработки.

Для того, чтобы избежать растекания и взаимного перемешивания нанесённых на поверхность агара капель суспензий исследуемых бактериофагов, агар целесообразно разрезать стерильным скальпелем таким образом, чтобы сектора были отделены друг от друга пространством в 2-3 мм (рис. 2, 3).

Схема исследования представлена на рисунке 1.

Оценка результатов:

При оценке результатов, во-первых, учитывается отсутствие роста бактерий на контрольной чашке, куда были засеяны бактериофаги без посева бактериального газона. При обнаружении роста бактериальных колоний на контрольной чашке, результаты исследования нельзя считать достоверными, так как наличие жизнеспособных бактериальных клеток в фаголизате может ввести в заблуждение при оценке роста лизогенных бактерий в опытных чашках. В данном случае исследование следует повторить, предварительно применив дополнительные способы обработки фаголизата.

Необходимо отметить, что разграничение бактериофагов на умеренные и вирулентные относительно и во многом зависит от особенностей бактериальной тест-культуры и других условий (Ревенко, 1978).

На секторах опытных чашек должен наблюдаться лизис бактериального газона в области нанесения капель испытуемых бактериофагов. Кроме того, в зоне лизиса в той или иной степени может присутствовать рост бактерий, утративших чувствительность к данному бактериофагу вследствие лизогенизации, то есть интеграции профага в генетический аппарат бактериальных клеток, что указывает на умеренность бактериофага. В случае, если во всех четырёх опытных чашках в зоне лизиса определённого бактериофага роста лизогенных бактерий не наблюдается ни в форме менее интенсивного бактериального «газона», ни в форме отдельных колоний лизогенных клеток, данный бактериофаг считается вирулентным. Бактериофаг, в зоне лизиса которого наблюдается рост колоний лизогенных бактерий, считается умеренным. Причём, степень вирулентности / умеренности бактериофагов оценивается тем наименьшим разведением исходной бактериальной суспензии, при котором наблюдается полный лизис газона без роста лизогенных бактерий. То есть, чем при большей концентрации бактериальных клеток на «газоне» наблюдается полный лизис, без роста лизогенных бактерий, тем данный бактериофаг более вирулентен.

Вывод: Таким образом, было экспериментально установлено, что процесс образования фагорезистентных клеток в культуре чувствительных бактерий зависит, во-первых, от степени вирулентности/умеренности бактериофага, во-вторых, от множественности фаговой инфекции. Очевидно, что с понижением множественности фаговой инфекции возрастает частота лизогенизации.

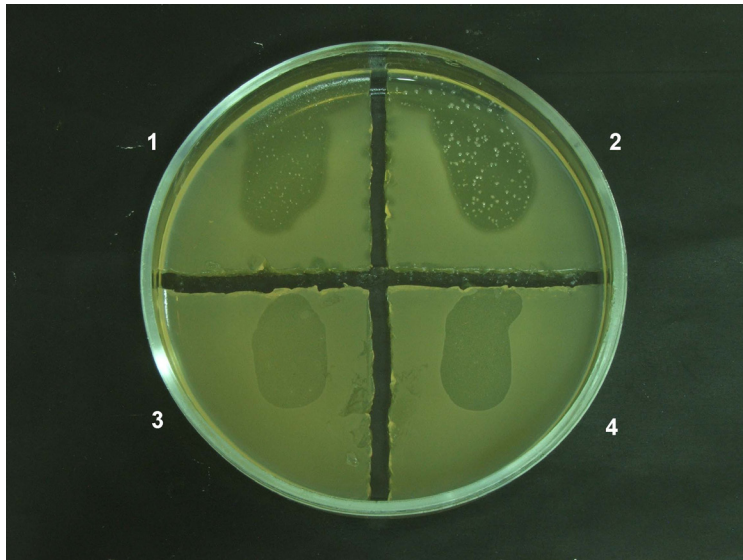


Рис. 2. Лизис бактериального газона (без разведения) 24-часовой индикаторной культуры *Pseudomonas putida* ATCC 12633 штаммами бактериофагов:

- 1 – *Psp102-УГСХА* (неполный лизис, в зоне которого бактериальный газон менее чёткий);
- 2 – *Psp101-УГСХА* (неполный лизис, формирование отдельных колоний лизогенных бактерий);
- 3 – *Psp6-УГСХА* (неполный лизис, в зоне которого бактериальный газон менее чёткий);
- 4 – *Psp1-УГСХА* (неполный лизис, в зоне которого бактериальный газон менее чёткий).

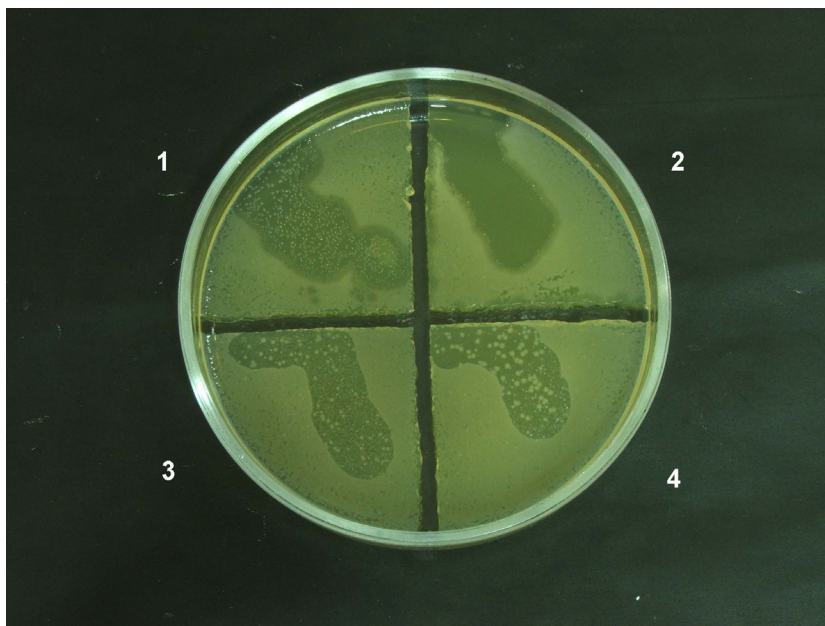


Рис. 3. Лизис бактериального газона (разведение -3) 24-часовой индикаторной культуры *Pseudomonas putida* ATCC 12633 штаммами бактериофагов:

- 1 – *Psp102-УГСХА* (неполный лизис, формирование отдельных колоний лизогенных бактерий);
- 2 – *Psp101-УГСХА* (полный лизис);
- 3 – *Psp6-УГСХА* (неполный лизис, формирование отдельных колоний лизогенных бактерий);
- 4 – *Psp1-УГСХА* (неполный лизис, формирование отдельных колоний лизогенных бактерий).

Библиографический список

1. Азизбекян Р.Р. Изменение наследственности бактерий путем фаговой конверсии / Р.Р. Азизбекян // В кн. Микробиология. Генетика микроорганизмов. Итоги науки и техники ВИНТИ АН СССР. – М., 1974. – Т.3. – С. 191-233.

2. Висконти Р. Генетика бактериофага / Р. Висконти // В кн.: Онтогенез вирусов. – М., 1956. – 141 с.
3. Выделение и анализ фагоустойчивых мутантов *Pseudomonas putida* с помощью новых бактериофагов / В.Н. Крылов [и др.] // Генетика. – 1981. – Т.17, №2. – С.239-245.
4. Выделение и общая характеристика группы умеренных фагов *Pseudomonas aeruginosa* / А.С. Яненко [и др.] // Микробиология. – 1979. – Т.48, №1. – С.109-113.
5. Габрилович И.М. Общая характеристика бактериофагов / И.М. Габрилович // Основы бактериофагии. – Минск. – 1973. – С. 5-24.
6. Гольдфарб Д.М. Бактериофагия / Д.М. Гольдфарб // М.: Медгиз. – 1961. – 225 с.
7. Жиленков Е.Л. Изучение начальных стадий взаимодействия умеренного фага phi04 с клеткой *Pseudomonas aeruginosa* / Е.Л. Жиленков // Микробиология. – 1997. – Т.66, №4. – С. 532-538.
8. Каттер Э. Бактериофаги : биология и практическое применение / Э. Каттер, А. Сулаквелидзе; пер. с англ.: коллектив пер.; науч. ред. рус. изд. А.В. Летаров. – Москва: Научный мир, 2012. – 636 с.
9. Крылов, В.Н. Роль горизонтального переноса генов бактериофагами в возникновении патогенных бактерий / В.Н. Крылов // Генетика. – 2003. – Т.39. - №5. – С. 595-619.
10. Ревенко И.П. Бактериофаги и их использование в ветеринарной практике. – Киев: Урожай. – 1978. – С. 41-88.
11. Стент Г. Молекулярная биология вирусов бактерий / Г. Стент – М.: Мир, 1965. – 452 с.
12. Хейс У. Генетика бактерий и бактериофагов / У. Хейс – М.: «Мир», 1965. – С. 288-294.
13. Adams M. H. Bacteriophages / M.H. Adams – Interscience Publishers, Inc., New York, 1959. – 473 p.
14. Burnet F.M. Induced lysogenicity and mutation of bacteriophage within lysogenic bacteria / F.M. Burnet, D. Lush. // Australian J. Exptl. Biol. Med. Sci. – 1936. – V.14. – P. 27-38.
15. Djordjevic M. Quantitative analysis of a virulent bacteriophage transcription strategy / Djordjevic M. [et al.] // Virology. – 2006. – Т. 354. – С. 240.
16. Holloway B. W. Lysogenic conversion in *Pseudomonas aeruginosa* / B.W. Holloway, G.N Cooper. // J. Bacteriol. – 1962. – V.84. – P. 321-324.
17. Nechaev S. Bacteriophage-induced modifications of host RNA polymerase / Nechaev S., Severinov K. // Annual Review of Microbiology. – 2003. – Т. 57. – P. 301-322.
18. Severinova E. Localization of the *Escherichia coli* RNA polymerase β' subunit residue phosphorylated by bacteriophage t7 kinase gp0.7 / Severinova E., Severinov K. // Journal of Bacteriology. – 2006. – Т. 188. – N 10. – P. 3470-3476.

DEVELOPMENT OF A TECHNIQUE OF THE DIFFERENTIATION OF THE MODERATE AND VIRULENT BACTERIOPHAGES

Viktorov D.A., Vasilev D.A., Zolotukhin S.N., Grineva T.A., Gorshkov I.G., Kuklina N.G., Paramonova N.A., Artamonov A.M., Vortnikov A.P.

Key words: *Temperate phages virulent bacteriophages lysogenicity, differentiation, microbiology*

According to some researchers, the division of bacteriophages in the moderate and virulent is conditional and relative. However, the moderation/virulence of bacteriophages is appropriate to express by the so-called coefficient of lysogenization – ratio of the number of lysogenized bacterial cells to the total number of bacteria, subjected to a single cycle of phage infection. The group of authors developed and tested the technique of the differentiation of the moderate and virulent phages, based on the detection of formation of lysogenic cells.