

## ОСОБЕННОСТИ ВЫДЕЛЕНИЯ ФАГОВ БАКТЕРИЙ *VACILLUS ANTHRACIS*

Н.А. Феокистова, кандидат биологических наук, доцент  
Д.А. Васильев, доктор биологических наук, профессор  
С.Н. Золотухин, доктор биологических наук, профессор  
А.И. Калдыркаев, кандидат биологических наук  
М.А. Лыдина, кандидат биологических наук  
Е.И. Климушкин, аспирант  
К.В. Белова, студент  
ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина»  
8(8244) 55-95-47, feokna@yandex.ru

**Ключевые слова:** бактерий *Vacillus anthracis*, бактериофаги, почва, выделение, лизогения.

Описаны методы, направленные на выделение фагов бактерий *Vacillus anthracis*. В результате их применения удалось выделить 1 специфический бактериофаг, используя методику выделения бактериофага из объектов окружающей среды.

**Введение.** Несмотря на значительное снижение уровней заболеваемости сибирской язвой в Российской Федерации, современная ситуация не расценивается исследователями как благополучная. На фоне действия разнообразных факторов риска по-прежнему регистрируются эпизоотии среди животных и эпидемические очаги среди населения.

Сохранению нестабильности способствует наличие стационарно неблагополучных по сибирской язве пунктов, число которых, как показали проведенные ранее исследования, превышает 35 тысяч. Практически каждый пятый населенный пункт страны является неблагополучным, а на их территориях имеются многочисленные захоронения трупов животных, павших от сибирской язвы, относящиеся в соответствии с действующей классификацией предприятий и сооружений к объектам I класса опасности [6].

Известно, что постановка диагноза на сибирскую язву базируется на эпизоотологических, клинических данных и результатах бактериологического исследования. Вскрытие недопустимо, а методы прижизненной диагностики (сериологические и аллергические) пока не вошли в практику, отчасти и из-за скоротечной гибели животных.

Согласно методическим указаниям по лабораторной диагностике сибирской язвы у животных и людей, а также для обнаружения

данного возбудителя в сырье животного происхождения и объектах внешней среды использовали ветеринарные бактериофаги «К-ВИЕВ», «Гамма-МВА» и ныне нарабатываемый «Fah-VНИИВВиМ» [1].

Выделение новых бактериофагов, специфичных к возбудителю сибирской язвы, и изучение их биологических свойств позволит расширить знания в области биологии фагов, в дальнейшем сконструировать биопрепараты, имеющие практическое значение.

Цель - выделить новые бактериофаги *Vacillus anthracis*.

Для решения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- провести эксперименты по выделению бактериофагов методом индукции штаммов *Vacillus anthracis*;

- провести эксперименты по выделению бактериофагов из объектов окружающей среды.

**Материалы и методы исследований.** Вакцинные штаммы *Vacillus anthracis*-СТИ и *Vacillus anthracis* 55-ВНИИВВиМ, авирулентные штаммы *Vacillus anthracis* –Шуя-15 и *Vacillus anthracis* 34 F<sub>2</sub> полученные из музея НИИЦМиБ ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина».

Выделение бактериофагов проводили с использованием методик, опробованных сотрудниками кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ ФГБОУ ВПО

«Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина» [2-5, 7-10].

**Результаты и их обсуждение.** В первой серии опытов на культуры *Bacillus anthracis* – Шуя-15 и *Bacillus anthracis* 34 F<sub>2</sub>, исследуемые как «лизогенные», мы воздействовали индуцирующим фактором (применялось воздействие на бактерии ультрафиолетовых лучей).

По литературным данным при обработке лизогенных культур индуцирующими факторами продукция фага в значительной степени возрастает, потому с помощью этого метода удается выявить фаг в значительно большем проценте случаев, чем при изучении только спонтанной его продукции [8].

В качестве источника ультрафиолетовых лучей применялась бактерицидная лампа, 80 % энергии которой приходится на длину волны 2537 Å. Исследуемые культуры (*Bacillus anthracis* – Шуя-15 и *Bacillus anthracis* 34 F<sub>2</sub>) находились в экспоненциальной фазе роста, разводилась в соотношении 1:100 в фосфатном буфере с pH 7,6. 2 мл взвеси помещали в чашку Петри и облучали в течение 20 (25, 30, 35, 40) секунд на расстояние 40 (45, 50, 55, 60) см. Облученные культуры засеивались на мясо-пептонный бульон комнатной температуры (20-22 °C) в соотношении 1:100.

Все процедуры производились в полутемном помещении с учетом предохранения облученных бактерий от фотореактивации. Все посева инкубировали при 37 °C 5 часов, после чего делали высев методом агаровых слоев.

В наших исследованиях не удалось выделить фаги *Bacillus anthracis* – Шуя-15 и *Bacillus anthracis* - 34 F<sub>2</sub>, то есть мы не обнаружили перехода профага в свободный фаг у имеющихся штаммов антракса по вышеизложенной методике, поэтому дальнейшие исследования были посвящены выделению бактериофагов из объектов внешней среды.

На возможность сохранения возбудителя сибирской язвы в почве влияют детально изученные природно-климатические факторы, такие как особенности гидрогеологии, ландшафтно-географические зоны, характер почв и т.д. [6].

Для проведения исследований мы брали пробы почвы различных территорий Ульяновской, Самарской областей и Республики Татарстан лесной, лесостепной и степной, почвы различного хозяйственного назначения (огород, грунтовая дорога - улица, двор частного дома). Всего было использовано 69 проб.

Первоначально готовили разведения почвы в мясо-пептонном бульоне в соотношении 1:10, добавляли в концентрации 10<sup>4</sup> КОЕ /мл по 1,0 мл штаммов бактерий *Bacillus anthracis* – Шуя-15, *Bacillus anthracis* - 34 F<sub>2</sub>, *Bacillus anthracis*-СТИ и *Bacillus anthracis* 55-ВНИИВВuM. Колбы с пробами почв ставили в термостат на 24 часа при температуре 37 °C. Затем пробы фильтровали через ватно-марлевый фильтр для освобождения от механических примесей. После этого содержимое колбы разливали в стерильные пробирки, центрифугировали при 3000 об./мин в течение 30 минут, далее прогревали в водяной бане при 60 °C в течение 45 минут с целью подавления роста грамотрицательных бактерий.

Исследуемые фильтраты исследовали на наличие фага методом нанесения «дорожки» на газон культуры, который был предварительно нанесен на мясо-пептонный агар в чашках Петри и «подсушен» в термостате в течение 35-40 минут. В качестве контроля на газон культуры наносили стерильный мясо-пептонный бульон с целью получения достоверного результата по выявлению присутствия фага в исследуемом субстрате.

**Выводы.** В результате проведенных исследований нами были выделены 4 бактериофага, специфичные для штаммов *Bacillus anthracis* – Шуя-15, *Bacillus anthracis* - 34 F<sub>2</sub>, *Bacillus anthracis*-СТИ и *Bacillus anthracis* 55-ВНИИВВuM из одной и той же пробы. При дальнейшей работе с выделенными бактериофагами нами установлено, что это один и тот же бактериофаг, специфичный для всех культур, используемых как индикаторные. Результаты исследований свидетельствуют, что бактерии *Bacillus anthracis* не распространены в окружающей среде. Методику выделения бактериофагов из объектов внешней среды мы считаем наиболее перспективной для получения вирулентных фагов с целью создания специфичных бактериофагов.

На современном этапе возникла необходимость разработки критериев и алгоритма действий для оценки эпизоотолого-эпидемиологической опасности сибиреязвенных захоронений, находящихся на территории Российской Федерации. Применение бактериофагов в методологии оценки риска позволит в будущем выявить степень опасности каждого такого захоронения, реализовать дифференцированный подход к планированию мероприятий, направленных на ее снижение, а также использовать полученные результаты для прогнозирования дальнейшего развития ситуации.

### Библиографический список:

1. Бакулов, И.А. Сибирская язва (антракс). Новые страницы в изучении «старой» болезни / И.А. Бакулов, В.А. Гаврилов, В.В. Селиверстов. – Владимир, Изд.-во «Посад», 2001. – С. 141-142.
2. Васильев, Д.А. Характеристика биологических свойств бактериофагов вида *Bacillus subtilis* / Д.А. Васильев Д.А., Н.А. Феоктистова М.А. Юдина [и др.] // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2011. - № 1. - С. 79-83.
3. Золотухин, С.Н. Выделение и селекция клонов бактериофагов патогенных энтеробактерий / С.Н. Золотухин, Д.А. Васильев, Л.С. Каврук [и др.] // В сборнике: Профилактика, диагностика и лечение инфекционных болезней, общих для людей и животных. - 2006. - С. 227-230.
4. Калдыркаев, А.И. Разработка системы фаговаров бактерий *Bacillus cereus* для идентификации и мониторинга данного микроорганизма / А.И. Калдыркаев, Н.А. Феоктистова, А.В. Алешкин // В книге: «Бактериофаги микроорганизмов значимых для животных, растений и человека». - Ульяновск, 2013. - С. 211-225.
5. Капырина, Н.А. Идентификация возбудителя листериоза с помощью бактериофага. / Н.А. Капырина, И.А. Бакулов // Симпозиум «Профилактика и меры борьбы с лептоспирозом и листериозом с/х животных». Новочеркасск, 1972. - С. 76-78.
6. Картавая, С.В. Оценка эпизоотолого-эпидемиологической опасности сибиреязвенных захоронений на территории Российской Федерации / автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата медицинских наук / ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. – Москва, 2015. – С. 3-4.
7. Садеева, Н.Т. Выделение фагов бактерий вида *Bacillus cereus* / Н.Т. Садеева, Н.А. Феоктистова, М.А. Юдина [и др.] // В сборнике: Актуальные проблемы инфекционной патологии и биотехнологии: материалы V-й Всероссийской (с международным участием) студенческой научной конференции. – Ульяновск: ГСХА, 2012. - С. 14-17.
8. Феоктистова, Н.А. Методы выделения бактериофагов рода *Bacillus* / Н.А. Феоктистова, В.А. Макеев, М.А. Юдина [и др.] // Вестник ветеринарии. - 2011. - Т. 59. - № 4. - С. 88-89.
9. Феоктистова, Н.А. Выделение и изучение биологических свойств бактериофагов рода *Proteus*, конструирование на их основе биопрепарата и разработка параметров практического применения / автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова. - Саратов, 2006. – С. 9-12.
10. Феоктистова, Н.А. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов бактерий *Bacillus subtilis* / Н.А. Феоктистова // В книге: «Бактериофаги микроорганизмов значимых для животных, растений и человека». - Ульяновск, 2013. - С. 186-197.

## FEATURES OF ALLOCATION OF PHAGES OF BACTERIA OF *BACILLUS ANTHRACIS*

N. A. Feoktistova, D. A. Vasilyev, S. N. Zolotukhin, A.I. Kaldirkaev, M. A. Lydina, E.I. Klimushkin, K.V. Belova

**Keywords:** *bacteria Bacillus anthracis, bacteriophages, soil, allocation, lizogeniye.*

*Summary: the methods directed on allocation of phages of bacteria of Bacillus anthracis are described. As a result of their application it was succeeded to allocate 1 specific bacteriophage, using a technique of allocation of a bacteriophage from objects of environment.*