

ПОДБОР ПЕРСПЕКТИВНОГО ПРОИЗВОДСТВЕННОГО ШТАММА *VACILLUS ANTHRACIS* ДЛЯ КОНСТРУИРОВАНИЯ ФАГОВОГО БИОПРЕПАРАТА

Феоктистова Наталья Александровна, кандидат биологических наук, доцент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

Васильев Дмитрий Аркадьевич, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

Климушкин Евгений Иванович, аспирант кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

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

432017, г. Ульяновск, б. Новый Венец, 1; 8(8422)55-95-47; e-mail: feokna@yandex.ru

Ключевые слова: вирулентный бактериофаг, *Bacillus anthracis*, биологические свойства, специфичность, литическая активность, спектр литического действия, изменение литической активности при хранении.

В статье представлены результаты исследований по подбору перспективного производственного авирулентного штамма *Bacillus anthracis* для культивирования специфического вирулентного бактериофага. Установлено, что при культивировании на штамме *Bacillus anthracis* Шуя-15 литическая активность составляет $1,0 \times 10^8 \pm 0,1 \times 10^8$ БОЕ в 1 мл фаголизата; при высеве на мясо-пептонном агаре (МПА) образуются негативные колонии с четким краем и прозрачным центром, что чрезвычайно важно при их визуальном подсчете в случае постановки реакции нарастания титра фага (РНФ).

Введение

Специфическое взаимодействие бактериофагов с бактериальной клеткой-хозяином дает непосредственную возможность использовать их для идентификации и индикации бактерий гомологичного вида. В отличие от множества искусственно созданных систем для определения и дифференциации различных структур бактериальных клеток, основанных на использовании антител (серологические реакции различных типов) или на амплификации нуклеиновых кислот (ПЦР), здесь мы имеем систему, возникшую в ходе эволюции, когда бактериофаг специфически распознает свои рецепторы на бактериальной клеточной стенке, адсорбируется на ней, связываясь исключительно с клетками гомологичного хозяина и дает литическую продуктивную инфекцию [1].

Согласно нормативным документам по лабораторной диагностике сибирской язвы у животных и людей, а также для обнаружения данного возбудителя в сырье животного происхождения и объектах внешней среды ранее использовали ветеринарные биопрепараты: «Бактериофаг сибиреязвенный «К» ВИЭВ» (ТУ 46-21-123-75), «Бактериофаг

сибиреязвенный «Гамма-МВА» (ТУ 46-21-181-75), предлагаемые в 60-х годах XX века, и ныне применяемые «Бактериофаг ВНИ-ИВВиМ сибиреязвенный диагностический» (ТУ 10-09.39-90), «Бактериофаг диагностический сибиреязвенный Гамма А-26 жидкий» (ТУ 9386-013-01897080-2009), диагностическая эффективность которых, по мнению авторов, и по настоящий день не подлежит сомнению. Однако выделение новых бактериофагов, специфичных к возбудителю сибирской язвы, и изучение их биологических свойств позволит не только расширить знания в области биологии фагов, но и сконструировать в дальнейшем новый биопрепарат с более широким спектром действия по сравнению с аналогами [2].

В сфере биотехнологии актуальны задачи, связанные с конструированием новых бактериофаговых биопрепаратов и усовершенствованием технологического процесса их изготовления, включая отбор и использование высокочувствительных бактериальных штаммов - продуцентов.

Целью наших исследований был подбор перспективного производственного

штамма *B. anthracis* для культивирования специфического бактериофага.

Задачи исследований:

- изучение литической активности сибиреязвенного бактериофага на бактериальных штаммах коллекции,
- определение спектра литического действия сибиреязвенного бактериофага на бактериальных штаммах коллекции,
- выявление специфичности действия сибиреязвенного бактериофага на бактериальных штаммах коллекции,
- изучение возможных изменений показателей литической активности сибиреязвенного бактериофага при хранении на потенциально перспективных производственных бактериальных штаммах коллекции.

Объекты и методы исследований

Вакцинные штаммы *B. anthracis*-СТИ и *B. anthracis* 55-ВНИИВВиМ, авирулентные штаммы *B. anthracis* – Шуя-15 и *B. anthracis* 34 F₂, 12 штаммов бактерии *B. mycoides*, 52 штамма бактерий *B. cereus* и *B. thuringiensis*, *B. subtilis* – 6 штаммов, *B. mesentericus (pumilus)* – 8 штаммов, *B. coagulans* – 3 штамма, полученные из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина».

Сибиреязвенный бактериофаг, выделенный и селекционированный авторами в 2015 году.

Изучение биологических свойств изучаемого бактериофага проводили с использованием методик, апробированных сотрудниками кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина» в ходе собственных многолетних исследований [3-12].

Литическая активность бактериофага и спектр литического действия определяли методом Аппельмана на питательном бульоне для культивирования микроорганизмов (ФС 42-0049-00) (Адамс, 1961), концентрацию фаговых частиц – методом А. Gratia (Gratia, 1936) на двухслойном МПА (производства ФГУН ГНЦ ПМБ г. Оболенск, Московская область). Основные биологические свойства бактериофагов изучали по схеме,

предложенной Золотухиным С.Н. [13].

Контроль специфической активности препаратов бактериофагов проводили с помощью специально подобранных наборов контрольных штаммов. Концентрацию микробных клеток определяли с помощью оптического стандарта мутности (ОСО 42-28-85 на 10 ед. производства ГИСК им. Л.А. Тарасевича).

Результаты исследований

Каждая культура *B. anthracis*, которую мы использовали для подбора перспективного производственного штамма для разработки нового сибиреязвенного бактериофага (вакцинные штаммы *B. anthracis*-СТИ и *B. anthracis* 55-ВНИИВВиМ, авирулентные штаммы *B. anthracis* – Шуя-15 и *B. anthracis* 34 F₂), хранилась в виде столбика мягкого 0,7 % мясо-пептонного агара, засеянного уколом при температуре 2-4°C. При данном способе хранения индикаторная культура нуждается в относительно регулярных пересевах 1 раз в 3-4 месяца.

Литическая активность бактериофага определялась методом титрования на жидкой среде (метод Аппельмана) и посевом в верхнем слое мягкого агара (метод агаровых слоев). Посев последовательных разведений фагового препарата с целью повышения точности эксперимента проводили в двух повторностях.

Изучение литической активности методом Аппельмана проводили по следующей схеме: набирали ряд из 12 пробирок, содержащих по 4,5 мл мясо-пептонного бульона (МПБ). В первую из них добавляли сибиреязвенный бактериофаг в количестве 0,5 мл, тщательно перемешивали другой пипеткой и в количестве 0,5 мл переносили в следующую пробирку, из второй - 0,5 мл в третью и т.д. В 10 пробирках сибиреязвенный бактериофаг разводили 1:10; 1:100; 1:1000 и т.д. до 10⁻¹⁰ (из этой пробирки после перемешивания выливали 0,5 мл разведения с целью соблюдения количественного единства в эксперименте). В 11 пробирок, включая и контроль культуры, содержащих только 4,5 мл МПБ, вносили 0,2 мл суточной культуры анализируемых бактериальных культур, в 12 пробирку с 4,5 МПБ добавляли только 0,5

мл сибиреязвенного бактериофага, затем ставили все 12 пробирок в термостат при показателях температуры 37°C, после чего учитывали результаты через 18 часов культивирования.

Учет вели в титрах, вызывающих полный лизис бактериальной культуры и в процентах, сопоставляя суммарное количество баллов в опытной и контрольной пробах.

За титр бактериофага при определении методом Аппельмана принимали то наибольшее разведение его, которое вызывает полный лизис соответствующих микроорганизмов – *B. anthracis*.

Результаты исследований представлены в табл. 1.

Литическую активность выделенных бактериофагов оценивали также по их способности вызывать лизис бактериальной культуры на плотной питательной среде методом агаровых слоев. Накануне опыта по чашкам Петри разливали 1,5%-ный мясо-пептонный агар (МПА) в ламинарном боксе. Перед использованием чашки дополнительно подсушивали в термостате при 37°C 15-20 минут. Индикаторную культуру выращивали в условиях термостата в течение 18-20 часов при 37°C на МПБ. Стерильный 0,7% МПА, разлитый в пробирки по 2,5 мл, расплавляли на водяной бане и остужали до 46-48°C. Затем в пробирку с 2,5 мл 0,7%-ного МПА вносили 0,2 мл индикаторной культуры и 0,2 мл бактериофага разведений бактериофага, приготовленных следующим образом (на-

бирается ряд из 10 пробирок, содержащих по 4,5 мл МПБ; в первую из них добавляется сибиреязвенный бактериофаг в количестве 0,5 мл, тщательно перемешивается другой пипеткой и в количестве 0,5 мл переносится в следующую пробирку, из второй - 0,5 мл в третью и т.д. В серии пробирок бактериофаг разводится 1:10; 1:100; 1:1000 и т.д. до 10⁻¹⁰ (из этой пробирки после перемешивания выливаем 0,5 мл разведения с целью соблюдения количественного единства в эксперименте).

Содержимое каждой пробирки с 0,7%-ным МПА, 0,2 мл фага и 0,2 мл индикаторной культуры быстро и тщательно перемешивали вращением в ладонях и выливали на поверхность 1,5%-ного МПА. Смесь осторожными движениями распределяли по поверхности МПА, чашки Петри оставляли на горизонтальной поверхности стола до полного застывания верхнего слоя МПА, затем инкубировали посеы в термостате при 37°C в течение 18 часов.

Результаты исследований представлены в таблице 1 и на рисунках 1-3.

Важной характеристикой изучаемого бактериофага *B. anthracis* является спектр литического действия в пределах вида. Для изучения данного показателя использовали 4 штамма бактерий *B. anthracis*. Применялась методика «стекающая капля» (рисунок 4). На чашку Петри с накануне разлитым в нее 1,5%-ным МПА наносили газон исследуемой культуры (*B. anthracis*-СТИ, *B. anthracis* 55-ВНИ-

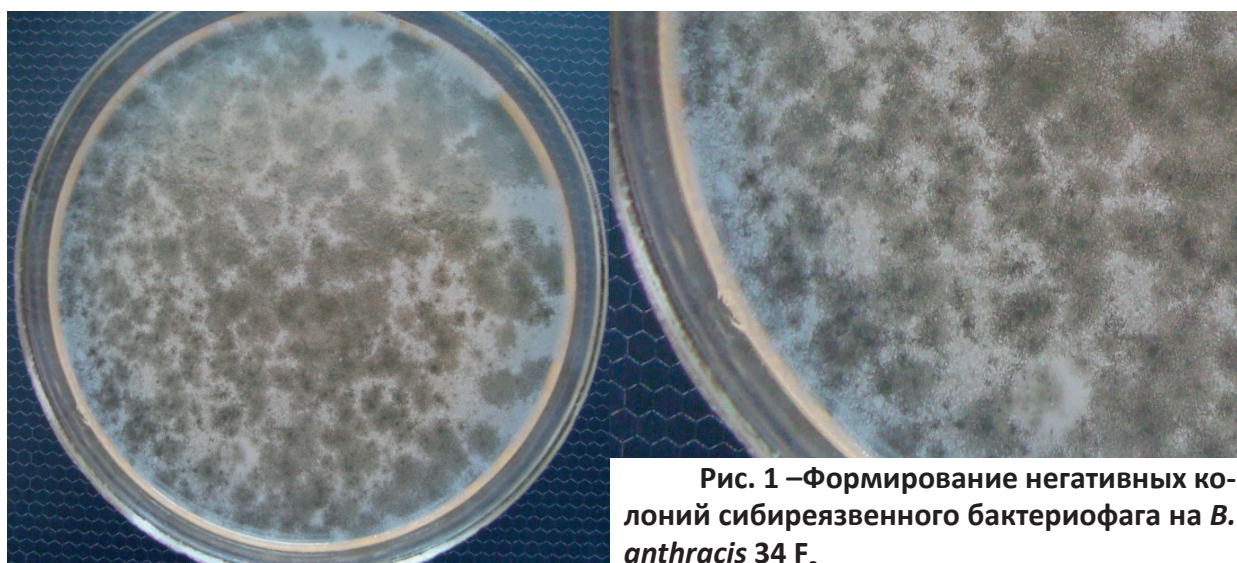


Рис. 1 –Формирование негативных колоний сибиреязвенного бактериофага на *B. anthracis* 34 F₂

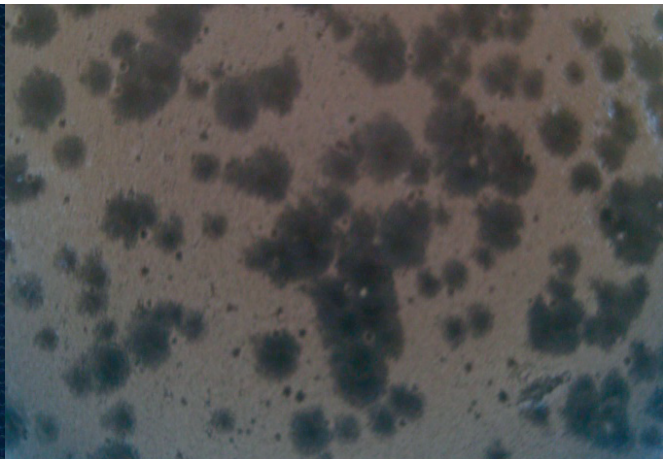
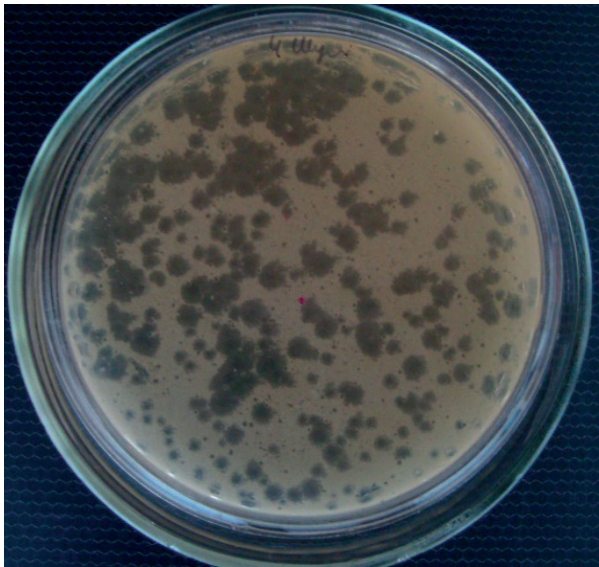


Рис. 2 - Формирование негативных колоний сибиреязвенного бактериофага на *B. anthracis* Шуя-15

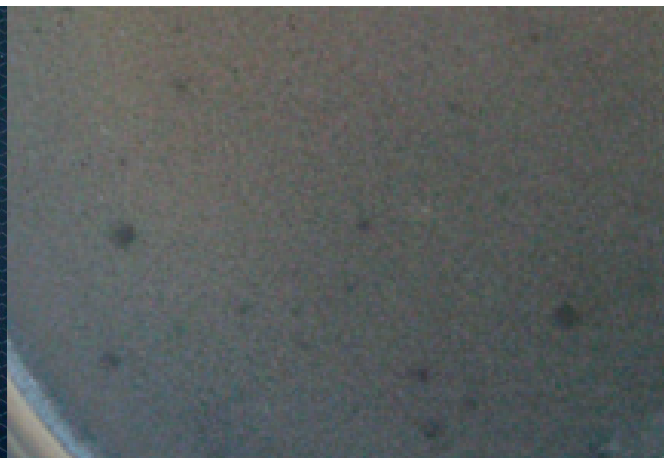


Рис. 3 - Формирование негативных колоний сибиреязвенного бактериофага на *B. anthracis*-СТИ

ИВВиМ, *B. anthracis* Шуя-15 и *B. anthracis* 34 F₂). Бактериальный газон подсушивали в условиях термостата в течение 20-30 минут при 37°C. Затем чашку Петри с подготовленным газоном делили на два сектора: «опытная» дорожка и контроль на механическое повреждение газона. На «опытную» дорожку наносили по 1-2 капли исследуемого сибиреязвенного бактериофага, на «контрольную» дорожку – стерильный МПБ в том же количестве, что и сибиреязвенный бактериофаг.

Посевы помещали в термостат на 18 часов инкубации при 37°C. Опыт демонстрирует (табл. 1), что спектр литического действия изучаемого сибиреязвенного бактериофага на четырех штаммах составляет 100 %.

Важнейшей характеристикой бактери-

офага, составляющего биопрепарата для индикации и идентификации бактерий, является его специфичность в пределах вида. Изучение специфичности выделенного бактериофага *B. anthracis* мы проводили на культурах гомологичного рода: *B. mycoides* – 12 штаммов, *B. cereus* – 50 штаммов, *B. thuringiensis* – 2 штамма, *B. subtilis* – 6 штаммов, *B. mesentericus* (*pumilus*) – 8 штаммов, *B. coagulans* – 3 штамма. Наиболее важной, по мнению авторов, характеристикой выделенного и селекционированного сибиреязвенного фага была специфичность по отношению к штаммам *B. anthracis* и отсутствие способности лизировать культуры *B. mycoides*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, которые составляют группу близкородственной ассоциации бацилл, получивших в литературе название «группа «*Bacillus cereus*»» [10,14].

Исследования проводили методом нанесения фага на газон бактериальной культуры методом «стекающая капля». Экспериментальным путем нами установлено, что на чашках Петри, засеянных культурами *Bacillus subtilis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus mesentericus* (*pumilus*), *Bacillus coagulans*, зон лизиса при нанесении выделенного и селекционированного нами сибиреязвенного фага на газон вышеназванных культур при визуальном осмотре обнаружено не было. Полученные результаты свидетельствуют, что выделенный и селекционированный нами бактериофаг строго специфичен в пределах вида *B. anthracis* и может составлять биопрепарат для индикации и идентификации возбудителя сибирской язвы.

Опытным путем установлено, что в течение 3 месяцев показатели литической активности исследуемого бактериофага осталась без изменений, на штамме *Bacillus anthracis* Шуя-15 - $1,0 \times 10^8 \pm 0,1 \times 10^8$ БОЕ в 1 мл фаголизата, на штамме *Bacillus anthracis* 55-ВНИИВВиМ - $1,9 \times 10^6 \pm 0,1 \times 10^6$ БОЕ в 1 мл фаголизата, на штамме *Bacillus anthracis*-СТИ - $1,4 \times 10^7 \pm 0,1 \times 10^7$ БОЕ

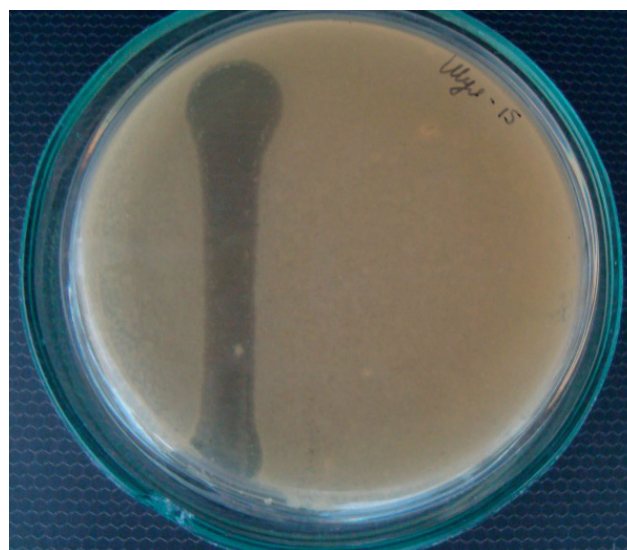


Рис. 4 – Метод определения спектра литического действия «стекающая капля» сибиреязвенного бактериофага на *B. anthracis* Шуя-15

в 1 мл фаголизата, на штамме *Bacillus anthracis* 34 F₂ - $3,0 \times 10^8 \pm 0,1 \times 10^8$ БОЕ в 1 мл фаголизата. Исследования сибиреязвенного бактериофага, укупоренного в стерильные флаконы без добавления консерванта, который хранился в условиях бытового холодильника (2-4°C), про-

Таблица 1

Основная характеристика биологических свойств изучаемого сибиреязвенного бактериофага

№	Название изучаемого биологического свойства бактериофага	Результат изучения характерных биологических свойств сибиреязвенного бактериофага на бактериальной культуре			
		<i>B. anthracis</i> Шуя-15	<i>B. anthracis</i> 55-ВНИИВВиМ	<i>B. anthracis</i> -СТИ	<i>B. anthracis</i> 34 F ₂
1	Литическая активность, БОЕ (бляшкообразующих единиц) / мл (по методу агаровых слоев)	$1,0 \times 10^8 \pm 0,1 \times 10^8$	$1,9 \times 10^6 \pm 0,1 \times 10^6$	$1,4 \times 10^7 \pm 0,1 \times 10^7$	$3,0 \times 10^8 \pm 0,1 \times 10^8$
2	Литическая активность (по методу Аппельмана)	10^{-7}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
3	Спектр литического действия	Лизис культур – <i>B. anthracis</i> -СТИ, <i>B. anthracis</i> 55-ВНИИВВиМ, <i>B. anthracis</i> -Шуя-15 и <i>B. anthracis</i> 34 F ₂			
4	Специфичность	Не лизирует – <i>B. mycoides</i> – 12 штаммов, <i>B. cereus</i> – 50 штаммов, <i>B. thuringiensis</i> – 2 штамма, <i>B. subtilis</i> – 6 штаммов, <i>B. mesentericus</i> (<i>pumilus</i>) – 8 штаммов, <i>B. coagulans</i> – 3 штамма.			
5	Показатель литической активности при хранении в условиях бытового холодильника 2-4 °С в течение 3 месяцев	$1,0 \times 10^8 \pm 0,1 \times 10^8$	$1,9 \times 10^6 \pm 0,1 \times 10^6$	$1,4 \times 10^7 \pm 0,1 \times 10^7$	$3,0 \times 10^8 \pm 0,1 \times 10^8$

водили методом агаровых слоев (табл.1).

Выводы

Проведенные исследования по изучению основных показателей биологических свойств сибиреязвенного бактериофага позволили установить, что изучаемый бактериофаг при культивировании на различных штаммах *B. anthracis* имеет литическую активность, которая не изменяется при хранении в условиях бытового холодильника (2-4°C) без добавления консерванта. На основании полученных данных установлено, что для достижения поставленной цели в качестве перспективного производственного штамма рекомендовано применять штамм *B. anthracis* Шуя-15, на котором при высеве на МПА образуются негативные колонии с четким краем и прозрачным центром, что чрезвычайно важно при визуальном подсчете колоний в случае постановки реакции нарастания титра фага. Культивирование изучаемого бактериофага на вышеназванном штамме дает литическую активность - $1,0 \times 10^8 \pm 0,1 \times 10^8$ БОЕ в 1 мл фаголизата. При аналогичных исследованиях показатель на штамме *B. anthracis* 34 F₂ составляет $3,0 \times 10^8 \pm 0,1 \times 10^8$ БОЕ в 1 мл фаголизата. Однако визуальная характеристика негативных колоний, полученных на индикаторной культуре данного бактериального штамма, возможно, затруднит оценку результатов в РНФ. Поэтому применение штамма *B. anthracis* 34 F₂ в качестве перспективного и производственного возможно при условии сравнения показателей в случае постановки РНФ на обоих штаммах.

Показатели использования двух остальных вакцинных сибиреязвенных штаммов для указанной нами цели выявили их недостаточность.

Установлено, что выделенный и селекционированный нами бактериофаг строго специфичен в пределах вида *B. anthracis* и не лизирует культуры *B. subtilis*, *B. mycoides*, *B. megaterium*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mesentericus* (*pumilus*), *B. coagulans*. Выше названные характеристики сибиреязвенного бактериофага, выделенного и селекционированного авторами в 2015 году, свидетельствуют, что он может быть использован для конструирования биопрепарата по фагоинди-

кации и фагоидентификации бактерий *Bacillus anthracis*.

Полученные данные расширяют представление о методических подходах к конструированию и изготовлению фаговых препаратов. Они включают подбор перспективного производственного бактериального штамма из коллекции штаммов-продуцентов по репродукции бактериофагов при сохранении их основных биологических свойств, требуемых при использовании РНФ. Практическая значимость работы определяется разработанными эффективными микробиологическими и технологическими приемами, позволяющими адаптировать процессы изготовления бактериофага к условиям массового производства биопрепаратов. Создание нового комплексного фагового препарата расширяет арсенал антибактериальных сибиреязвенных средств.

Научные исследования проводятся при финансовой поддержке государства в лице Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере (программа «УМНИК»).

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. - 281 с.
2. Биологические свойства сибиреязвенного бактериофага / Н.А. Феоктистова, Е.И. Климушкин, Д.А. Васильев, К.В. Белова // Вестник ветеринарии. - 2015. - № 3 (74). - С. 46-49.
3. Калдыркаев, А.И. Разработка системы фаговаров бактерий *Bacillus cereus* для идентификации и мониторинга данного микроорганизма / А.И. Калдыркаев, Н.А. Феоктистова, А.В. Алешкин // Бактериофаги микроорганизмов значимых для животных, растений и человека. - Ульяновск, НИИЦ-МиБ, 2013. - С. 211-225.
4. Характеристика биологических свойств бактериофагов вида *Bacillus subtilis* / Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин, И.Н. Хайруллин, Н.А. Феоктистова, А.И. Калдыркаев, М.А. Юдина, А.Х. Мустафин // Вестник Улья-

новской государственной сельскохозяйственной академии. - 2011. - № 1. - С. 79-83.

5. Садеева, Н.Т. Выделение фагов бактерий вида *Bacillus cereus* / Н.Т. Садеева, Е.В. Меркулова, 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.

7. Феоктистова, Н.А. Методы выделения бактериофагов рода *Bacillus* / Н.А. Феоктистова, В.А. Макеев, М.А. Юдина, А.И. Калдыркаев // Вестник ветеринарии. - 2011.- № 4 (59). - С. 88-89.

8. 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, НИИЦМиБ, 2013. - С. 186-197. (315 с.)

9. Феоктистова, Н.А. Распространение *Bacillus cereus* и *Bacillus mycoides* в объектах санитарного надзора / Н.А. Феоктистова, А.И. Калдыркаев, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2014. - № 1 (25). - С. 68-76.

10. Биосенсорная детекция бактерий рода *Bacillus* в молоке и молочных продуктах

для предупреждения их порчи / Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин, Н.А. Феоктистова, А.В. Алешкин // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2013. - №4 (24). - С. 36-43.

11. Феоктистова, Н.А. Разработка схемы исследования материала с целью выделения и ускоренной идентификации бактерий видов *Bacillus subtilis* и *Bacillus cereus* / Н.А. Феоктистова, А.И. Калдыркаев, А.Х. Мустафин // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. - 2011. - Т. 4. - № 32-1. - С. 288-290.

12. Юдина, М.А. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов бактерий вида *Bacillus mesentericus* / М.А. Юдина, Н.А. Феоктистова // Бактериофаги микроорганизмов значимых для животных, растений и человека. - Ульяновск, НИИЦМиБ, 2013. - С. 197-211.

13. Золотухин, С.Н. Создание и разработка схем применения диагностических биопрепаратов на основе выделенных и изученных бактериофагов энтеробактерий: автореф. дисс. .. д-ра биологических наук / С.Н. Золотухин. - Ульяновск, 2007. - 39 с.

14. Васильев, Д.А. Бактериофаги рода *Bacillus*: монография / Д.А. Васильев, Н.А. Феоктистова, С.Н. Золотухин, А.В. Алешкин - Ульяновск, УГСХА им. П. А. Столыпина, НИИЦМиБ, 2013. - 80 с.