

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФГБОУ ВПО «УЛЬЯНОВСКАЯ ГСХА им. П.А. СТОЛЫПИНА»
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИННОВАЦИОННЫЙ ЦЕНТР
МИКРОБИОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ

ВАСИЛЬЕВ Д.А., ФЕОКТИСТОВА Н.А.,
ЗОЛОТУХИН С.Н., АЛЕШКИН А.В.

БАКТЕРИОФАГИ РОДА BACILLUS

УЛЬЯНОВСК
2013

УДК 579.01:578
ББК 28.4

Васильев Д.А., Феоктистова Н.А., Золотухин С.Н., Алешкин А.В.
Бактериофаги рода *Bacillus*. Научное издание. – Ульяновск: УлГСХА
им. П.А. Столыпина, НИИЦМиБ, 2013. – 80 с.: Ил. 3.
ISBN: 978-5-905970-12-2

Рецензент: д.б.н. Ильина Наталья Анатольевна

В книге приводится анализ литературы по бактериофагам рода *Bacillus*, включая фаги *Bacillus anthracis*, написанный на материалах научных публикаций в полувековом разрезе. Описана морфология и ультраструктура бациллярных вирусов, дана характеристика наиболее изученным бактериофагам, приведены данные по распространению и применению фагов *Bacillus*.

Книга рассчитана на вирусологов, микробиологов, биологов, биофизиков, биохимиков, работающих с бактериальными вирусами, а также на студентов и аспирантов, биологических и медицинских специальностей.

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

Печатается по решению научно-технического совета Ульяновской ГСХА им. П.А. Столыпина (протокол № 1 от 5 февраля 2013 года).

© Васильев Д.А., Феоктистова Н.А., Золотухин С.Н., Алешкин А.В., 2013
© УлГСХА им. П.А. Столыпина, НИИЦМиБ, 2013

MINISTRY OF AGRICULTURE OF THE RUSSIAN FEDERATION
FSBI HPE «ULYANOVSK SAA N.A. P.I. STOLYPIN»
RESEARCH-AND-DEVELOPMENT INNOVATIVE CENTER
OF MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY

VASYLYEV D.A., FEOKTISTOVA N.A.,
ZOLOTUKHIN S.N., ALESCHKIN A.V.

BACTERIOPHAGES BACILLUS

ULYANOVSK
2013

Vasylyev D.A., Feoktistova N.A., Zolotukhin S.N., Aleschkin A.V.
Bacteriophages Bacillus. Scientific Issue. – Ulyanovsk: USAA n.a. P.A. Stolypin,
RDICMB, 2013. – 80 p.: Pic. 3.
Reviewer: DPhil. Ilyina Natalya Anatolyevna

The book presents a survey of literature devoted to bacteriophages Bacillus, including phages of Bacillus anthracis, based on scientific publications issued during half of the century.

Morphology and ultrastructure of the bacillary viruses is described, characteristic features of the most fully-studied phages are presented and the data on Bacillus phage area of distribution and utilization is given.

The book is aimed at virologists, microbiologists, biologists, biophysicists, biochemists who work with bacterial viruses and also at students and postgraduates of biological and medical specialty.

The research is performed with the financial support of the government represented by the Ministry of Education and Science within the federal target program «Scientific and Scientific-Educational Personnel of Innovative Russia» for 2009-2013 (agreement № 8267 from 10.08.2012).

ПРЕДИСЛОВИЕ

В настоящее время интерес к вирусам бактерий – бактериофагам значительно вырос, благодаря их возросшей практической значимости. Широкие слои населения воспринимают бактериофаги как некое «биологическое оружие», способное убивать бактериологическую клетку, и, в итоге избавлять, человека от очередной микробной напасти. В определённой степени они правы. Бактериофаги могут создать систему профилактики бактериальных инфекций, которая включает несколько позиций:

- бактериофаг-опосредованный биоконтроль – использование фагов для борьбы с бактериями, поражающими сельскохозяйственные растения и животных (включая рыб и пчёл) на этапе, предшествующем их попаданию на перерабатывающие заводы (овощи, фрукты и т.д., до сбора урожая; мясной и молочный скот, домашняя птица и т.д. до забоя);

- фаговый биопроектинг – применение бактериофагов для деконтаминации овощей, фруктов, мяса, рыбы и т.д. в процессе их заводской переработки перед упаковкой готовой к употреблению продукции;

- профилактический прием бактериофагов животных, птицы, рыбы, пчёл, человека в качестве пробиотической биологически активной добавки к кормам для снижения риска развития спорадических случаев и эпизоотических вспышек инфекций;

- фагоидентификация и индикация потенциально опасных микроорганизмов.

Несколько лет назад на базе научно-исследовательского инновационного центра микробиологии и биотехнологии при ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина» была сформирована научная группа сотрудников (Д.А. Васильев, Н.А. Фе-

октистова, С.Н. Золотухин, А.В. Алешкин, А.И. Калдыркаев, М.А. Юдина, Н.А. Романова, В.А. Макеев, Е.И. Климушкин, А.Х. Мустафин) и начата разработка темы НИР по изучению бактериофагов бактерий рода *Bacillus*. Изначально, мы не стремимся заниматься бактериями *Bacillus anthracis*, вызывающими заболевание известное как сибирская язва. Однако, наш взгляд, значительный интерес представляют другие представители этого рода, которые способны вызывать пищевые токсикозы (*Bacillus cereus*, *Bacillus mycoides*), являются фито- и энтомопатогенами (*Bacillus mesentericus (pumilus)*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus larvae*, *Bacillus alvae*, *Bacillus thuringiensis* и т.д.). Бактериофаги микроорганизмов вышеназванных видов также представляют значительный интерес, как для биологической науки, так и для практического использования.

Целью данной работы является попытка анализа и систематизации научных публикаций, посвященных бактериофагам рода *Bacillus*, выполненные российскими и зарубежными учеными. В монографии представлен анализ литературы по бактериофагам рода *Bacillus*, включая фаги *Bacillus anthracis*, написанный на материалах научных публикаций в полувековом разрезе. Описана морфология и ультраструктура бациллярных вирусов, дана характеристика наиболее изученным бактериофагам, приведены данные по распространению и применению фагов бактерий рода *Bacillus*.

Предлагаемые материалы готовились в срочном порядке к предстоящей конференции по бактериофагам (Ульяновск, 2013), поэтому коллектив авторов приносит извинения специалистам, профессиональный интерес которых вызывают бактериофаги рода *Bacillus*, чьи результаты исследований не упомянуты в данном издании. Это вызвано не снисходительным отношением к научным работам, а невозможностью систематизировать и проанализировать весь объем научных публикаций по данному направлению.

В дальнейшем мы планируем второе издание данной монографии, более расширенное. Поэтому просим Вас, наши читатели, все замечания отправлять по электронному адресу – feokna@yandex.ru, которые будут рассмотрены и учтены в дальнейшей работе.

ВВЕДЕНИЕ

Бактериофаги являются одним из наиболее подходящих объектов для глубокого изучения краеугольной биологической проблемы взаимоотношения вируса с бактериальной клеткой и для решения других важнейших проблем современной биологии. В частности, расшифровки природы наследственного вещества у живых организмов, тонкой структуры генов и сущности генетического кода, молекулярной основы спонтанных и индуцированных (вызванных искусственно) мутационных изменений и т.п. Бактериофаги являются моделью для проведения радиобиологических исследований, а также для первичного отбора химиотерапевтических средств и некоторых антибиотиков против вирусных заболеваний и злокачественных опухолей. Некоторые бактериофаги применяют в медицинской практике для профилактики или лечения заболеваний (например, дизентерии, холеры). Фаги служат объектами и «моделями» при изучении многих имеющих теоретическое и практическое значение вопросов общей и молекулярной биологии, биохимии, генетики, медицины и др. Наконец, с выходом человека на космические орбиты, фаги стали использовать для важнейших биологических исследований по влиянию космического пространства на различные биологические процессы.

Повышение интереса к бактериофагам связано и с тем, что оно стало весьма актуальным для целого ряда производств, основанных на использовании жизнедеятельности микроорганизмов – антибиотической, молочной и ферментной промышленности, производства вакцин, бактериальных удобрений, препаратов энтомопатогенных бактерий и т.п. В этих производствах бактериофаги с точки зрения технологов проявляют себя как вредители,

лизирующие культуры и тем самым нарушающие технологические процессы, что в конечном счете наносит значительный экономический ущерб.

В связи с возрастающим вниманием к вопросам экологии и охраны окружающей среды фаги, как устойчивые во внешней среде организмы, которые, к тому же, можно сравнительно легко обнаруживать и количественно учитывать, в последнее время используют в качестве модели для определения загрязненности вирусами воды и воздуха на санитарно значимых территориях.

Фаги, бактериофаги (phages, bacteriophages) [греч. phagos – пожирающий] – вирусы бактерий, под действием которых бактерии погибают (происходит явление растворения микробов) или изменяют свои морфологические свойства. Бактериофаги являются паразитами представителей почти всех групп прокариотических организмов от крошечных *Dellovibrios*, которые сами паразитируют на других бактериях, до некоторых крупных сине-зеленых водорослей. Они чрезвычайно разнообразны по своей химической и генетической структуре, размеры их геномов варьируют в пределах 2 порядков. Наиболее известные фаги - P1, P2, P4, лямбда (см. Лямбда фаг), Mu-1, N4, X174, X80, R17, T1-T7 (*E. coli*); P22 (*Salmonella typhimurium*, *Corynebacterium diphtheriae*), SP82, 29 (*Bacillus subtilis*). Впервые фаги описаны Ф. Туортом в 1915 г., а термин «фаг» предложен Ф. Д'Эррелем в 1917 г.

ГЛАВА 1

ФАГИ БАКТЕРИЙ РОДА BACILLUS

1.1. РАСПРОСТРАНЕНИЕ БАКТЕРИЙ РОДА BACILLUS

Аэробные спорообразующие бактерии объединены в род *Bacillus*, включенный в семейство *Bacillaceae*. Основными признаками этого рода являются: образование эндоспор, наличие каталазы, в большинстве случаев положительная окраска по Граму (Bergey's manual, 1993).

Бациллы распространены повсеместно, большинство их обитает в почве. Они участвуют в круговороте веществ в природе. Благодаря наличию разнообразных ферментов вызывают деградацию сложных органических соединений. Нестабильность биологических свойств аэробных споровых бактерий, обусловленная их приспособляемостью к условиям обитания, на протяжении всей истории изучения бацилл, была и остается одной из главных причин нечеткой таксономии внутри рода и многочисленных попыток ее усовершенствования. Для организмов этого рода предлагалось более 150 наименований. Многие виды переименовывались четыре-пять раз (Васильев, 2013).

Спорообразующие бактерии стали важным объектом исследований в связи с развитием консервной промышленности. Было выполнено много работ по изучению устойчивости и выживаемости бактериальных спор при различных методах консервирования продуктов. Различные виды аэробных спорообразующих бактерий, особенно термофильные формы, вызывают порчу консервированных продуктов, например, сгущенного молока, а также различных кондитерских изделий. Бактерии вида *Bacillus coagulans*, особенно их термофильные формы, обладающие способностью развиваться в кислой среде, вызывают порчу томатов (Раутенштейн, 1982).

Из спорообразующих микроорганизмов значительную долю остаточной микрофлоры мясных и мясо-растительных консервов обычно составляют термофильные бациллы (*Bacillus polymyxa*, *Bacillus asterosporus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermoliquefaciens*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus aerothermophilus*), а также, мезофильные бациллы (*Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus mesentericus* и др. имеющие очень термоустойчивые споры (Meyer, 1901).

Два вида бактерий рода *Bacillus* входят в группу микроорганизмов, вызывающих плоскокислую порчу консервов – *Bacillus coagulans* (*Bacillus thermoacidurans*) и *Bacillus stearothermophilus*. Споры вышеназванных микроорганизмов были найдены в консервированных овощах и молочных консервах, при благоприятных условиях они могут прорасти и привести к порчи продуктов. Развитие в консервированных продуктах бактерий видов *Bacillus coagulans* (*Bacillus thermoacidurans*) и *Bacillus stearothermophilus* приводит к изменению pH, бомбаж консервов не происходит, как при контаминации содержимого бактериями вида *Clostridium thermosaccharolyticum* (Затула, 1973).

Бактерии вида *Bacillus stearothermophilus* относительно широко распространены в окружающей среде – выделяются из почвы, горячих источников, песка пустынь, арктических вод, продуктов питания. Оптимальная температура роста 65 °C (Donk, 1920).

Бактерии вида *Bacillus coagulans* (Hammer, 1915) редко выделяются из почвы, однако являются частыми контаминантами продуктов, отличающихся повышенной кислотностью среды (консервированные томатный сок, силос, лечебные кремы и антациды) [133, 135].

Весьма распространенными формами спорообразующих бактерий, вызывающих порчу консервированных продуктов, являются также бактерии *Bacillus subtilis* (выделены Ehrenberg C.G. в 1835 году) и *Bacillus mesentericus*. Эти виды бактерии широко распространены в почве и воздухе, постоянно загрязняют пищевые продукты, а также материалы и сырье, используемые для их выработки. Описаны случаи порчи консервов с бомбажем банок, при которых отмечалось массовое распространение бактерий видов *Bacillus subtilis* и *Bacillus mesentericus*. По наблюдениям многих авторов, процент порчи консервированных про-

дуктов находится в прямой зависимости от обсемененности их спорообразующими бактериями перед стерилизацией, особенно часто это обнаруживается в овощных консервах, загрязненных почвенной микрофлорой. Среди них нередко преобладают солеустойкие (галофильные) и кислотоустойчивые формы с выраженными ферментативными свойствами (Галкина, 1977).

Промышленно-стерильными считают консервы, содержащие жизнеспособные клетки негазообразующих непатогенных и нетоксигенных аэробных бацилл *Bacillus subtilis*. В промышленно-стерильных консервах не должно содержаться патогенных и токсигенных микроорганизмов, а также возбудителей порчи консервов: термофильных бацилл, газообразующих мезофильных бацилл. Допустимое количество клеток микроорганизмов в 1 г консервируемого продукта, не нарушающее его микробиологической стабильности в процессе хранения и не представляющее опасности для здоровья человека, составляет $1:10^1 - 1:10^3$. При порче пищевых продуктов происходит ферментативный распад белковых и липидных компонентов с образованием вредных соединений. Поэтому использование в пищевой и консервной промышленности некоторых добавок, например агара и желатина, способствует в ряде случаев порче ряда кулинарных изделий и продуктов [134].

Аэробные спорообразующие бактерии неоднократно являлись причиной порчи консервируемых продуктов крови. Отмечены случаи смертельных исходов при использовании испорченной консервированной крови и плазмы главным образом бактериями *Bacillus subtilis* и *Bacillus mesentericus*. В этих случаях основная роль в порче подобных продуктов принадлежит таким ферментам, как гемолизины (Васильев, 2013).

Бактерии *Bacillus subtilis* и *Bacillus mesentericus* являются возбудителями болезней печеного хлеба и макарон. Разрушение структуры хлеба и разложение содержащихся в нем веществ, связано с продуцированием этими видами бактерий активных протеолитических и амилолитических ферментов. Спороносным бактериям, особенно их термофильным формам, отводится значительная роль в процессах самосогревания зерна (Феоктистова, 2011).

Некоторые виды спорообразующих бактерий, обладающие выраженными протопектиназными и протеолитическими свой-

ствами, обладают фитопатогенным действием. Ткани пораженных растений и плодов подвергаются мацерации, болезнь выражается в побурении или загнивании.

Бактерии *Bacillus mesentericus* – фитопатогенные бактерии, поражающие различные растения: лен, тыкву, кукурузу, свеклу, плоды апельсина, абрикоса, кабачков и других растений, клубни картофеля, семенники капусты, коробочки хлопчатника. Также известно, что бактерии *Bacillus mesentericus* могут вызвать бактериоз початков кукурузы, при искусственном заражении ими происходило типичное побурение. Из загнивших плодов томатов были выделены штаммы спорообразующих бактерий относящихся к видам *Bacillus subtilis* и *Bacillus mesentericus* (Юдина, 2013).

Другой группой спорообразующих бактерий, вызывающих поражения растений, являются бактерии *Bacillus macerans* (выделены Schardinger в 1905 году), *Bacillus polymyxa* (выделены Prazmowski в 1880 году). Эти виды бактерий вызывают бактериоз льна. Описаны поражения картофеля, моркови, лука, огурцов и других растений и плодов, вызываемые бактериями *Bacillus macerans*, *Bacillus polymyxa*. Ведущим фактором в этиопатогенезе этих поражений являются ферменты, разлагающие пектин и протопектин [132, 136].

Распространенными возбудителями порчи различных пищевых и кулинарных изделий, а также молочных продуктов являются часто встречающиеся в природе спорообразующие бактерии, объединяемые в вид *Bacillus cereus*. В литературе описаны случаи пищевых отравлений, вызванных этими бактериями, которые, как правило, не смертельны. Пищевые расстройства и токсические явления, развивающиеся после потребления в пищу подвергшихся порче продуктов, связывают с действием ферментов группы фосфолипаз. Бактерии этого вида постоянно обнаруживаются при анализах пищевых продуктов, особенно полуфабрикатов и готовых кулинарных изделий. Источником загрязнений данными микроорганизмами являются воздух и различные предметы окружающей среды. При хранении пищевых продуктов в отсутствие холода всегда создаются благоприятные условия для развития и массового размножения бактерий (Феоктистова, 2007).

Трансформация спор бактерий вида *Bacillus cereus* в вегетативные формы и их размножение протекают при температуре 10-

49 °С и рН 4,9-9,3. При хранении пищи в холодильнике (0-4 °С) бактерии вида *Bacillus cereus* не размножаются. Их размножению также препятствует кислая среда и высокая концентрация сахара. Схожими с *Bacillus cereus* характеристиками обладают еще несколько бактерий этого рода, в том числе *Bacillus thuringensis*, *Bacillus subtilis* и *Bacillus licheniformis* (Полховский, 1970, Азизбе-кян, 1972, 1978, 1980).

Пищевое отравление, вызываемое бактериями вида *Bacillus cereus*, имеет как общеклинические проявления: тошноту и абдоминаль-ные боли, так и превалирующие симптомы, на основании которых в настоящее время выделяют две формы заболеваний: диарейную и токсикозоподобную (рвотную). Диарейная форма практически идентична проявлениям пищевого отравления, вызванного бакте-риями вида *Clostridium perfringens*. Клиническая картина развива-ется через 24 ч после употребления контаминированного продукта. Диарея (частая, водянистая, с большим количеством слизи) наблю-дается в течение 6-15 ч без присоединения рвоты. Температура тела, как правило, не повышается. Диарейная форма развивается при поступлении в организм больших количеств бактерий вида *Bacillus cereus* – более 10^6 микробных клеток, которые продуцируют энтеро-токсин диарейного типа. Токсикозоподобная (рвотная) форма пи-щевое отравления имеет чрезвычайно короткий инкубационный период – 0,5-6,0 ч и характеризуется тошнотой и рвотой, длящейся до 24 ч. Симптоматика данного типа отравления очень похожа на бак-териальный токсикоз, вызванный бактериями вида *Staphylococcus aureus*. В «виновном» продукте и рвотных массах регистрируется специфический термостабильный токсин. Возникновение конкрет-ной формы пищевого отравления зависит от внешних условий раз-множения бактерий, определяющих возможность проявления ток-сигенного потенциала бактерий вида *Bacillus cereus*. Диагностика пищевого отравления, вызванного *Bacillus cereus*, основана на изо-ляции и идентификации аналогичных штаммов и оценке общего количества бактерий в материалах от больного и в подозреваемом пищевом продукте (Ахундова, 1967; Васильев, 2013).

Диарейный тип пищевого отравления чаще возникает при употреблении некачественных мяса, молока, овощей и рыбы. Токсикозоподобная (рвотная) форма заболевания связана, как правило, с контаминацией крупяных, картофельных и мака-

ронных блюд, салатов, пудингов, соусов. Во всех случаях интенсивному накоплению бактерий и стимулированию токсинообразования способствует нарушение температурных условий и сроков хранения готовых к употреблению блюд и скоропортящихся продуктов. Особенно интенсивное размножение бактерий вида *Bacillus cereus* происходит при температуре выше 15 °С (Марчина, 2003, Tallent, 2012).

Бактерии вида *Bacillus licheniformis* (выделены Weigmann в 1898 году), входят в условную группу *Bacillus subtilis* – *mesentericus*, они были выделены из проб хлеба, пораженного картофельной болезнью хлеба. Бактерии вида *Bacillus licheniformis* выделяют также при септицемиях, перитонитах, офтальмологических гнойных осложнениях, выкидышах, а также пищевых отравлениях, связанных с потреблением в пищу молочных и мясных продуктов, в том числе детского питания, овощей. Клиника отравлений, вызванных бактериями вида *Bacillus licheniformis* счень схожа с симптомами пищевого токсикога, вызванного бактериями *Bacillus cereus* (выделены Frankland, G.C. и Frankland P.F. в 1887 году) [132, 137].

Н. Станчева (1997), изучая состав липолитических микроорганизмов, выделенных из свежего овечьего молока машинной дойки, установила, что процент контаминации молока бациллами (*Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*) составляет 24, 24 %, за которыми следуют представители рода *Micrococcus*. Проведены исследования 114 образцов сырого молока на наличие бацилл и установили, что бациллы (*Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*) можно выделить даже после прогрева в течение 10 минут при 80 °С. S.Gaillard, I.Lequerinel, P. Mafart (1998), определяя содержание спорообразующих бактерий в пробах молока, установили, что после термической обработки молока чаще обнаруживались *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus coagulans*.

Н. Berkel, R. Hodlok (1976), С.В. Мерчина (2003) выделяли спорообразующие бактерии *Bacillus cereus* из вареных колбас. По данным S. Noriyasu, K. Haruhiko (1998), при изучении более 100 образцов пастеризованной ветчины в 21 % проб обнаруживались бактерии рода *Bacillus* и наиболее распространенными являлись *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*. В сообщении С.Klug et al. (1998) приводятся данные о наличии спорообразую-

щих аэробных бактерий в некоторых партиях колбас различных сортов, высказывается мнение, что причиной контаминации колбас являются добавляемые специи. Бактериологическое исследование более 100 проб различных специй (лавровый лист, перец, корица, сухой чеснок, сухая горчица) показало, что спорообразующие аэробные бактерии, более чем в половине случаев обнаруживаются в количестве до 8500 бактерий на 1 г пробы.

Бактерии вида *Bacillus cereus* были выделены из проб хрустящего ямса, находящегося на складах (Rasko et. al., 2005).

Интересные результаты получил I. Molska (1996), анализируя случаи диареи неизвестной этиологии. Объектом исследования были пробы пищевых продуктов, которые употреблялись не сразу после приготовления, а хранились при комнатной температуре некоторое время. В 25 % проб были выделены бактерии вида *Bacillus cereus*, их количество составило более 10^6 КОЕ /г. I. Molska (1996) провел бактериологическое исследование порченных пищевых продуктов и установил, что одной из причин порчи является контаминация их *Bacillus cereus*.

Проведя бактериологическое исследование более 6300 проб продуктов, M. Mazas et al. (1995) обнаружили достаточно частое по сравнению с другими выделение бацилл, и с этим они связывают определенный процент зарегистрированных пищевых токсикоинфекций. Результаты, полученные A. Renata et al. (1998) при исследовании обсемененности блюд быстрого приготовления бактериями вида *Bacillus cereus*, получили следующие результаты: из 90 проб в 11,1 % случаев были выделены вышеуказанные микроорганизмы. Наиболее часто этот возбудитель выделяли из рыбных блюд.

Большое количество исследований посвящено определению спорообразующих бактерий в пищевых продуктах, в том числе и тех, которые употребляются в пищу без термической обработки. Так, В.А. Мирзоева (1959) подчеркивает существенную роль *Bacillus subtilis* и *Bacillus mesentericus* в порче молочных продуктов, кондитерских изделий, сахарных сиропов, консервов, зерновых, хлебных и других продуктов. Л. Петрова (1975) приводит подробные данные о дифференциации спорообразующих аэробных бактерий, выделенных из мясных полуконсервов: 26 % из числа выделенных культур составили *Bacillus subtilis*. С.П. Аска-

лонов и А.И. Ильченко (1962) обращают внимание на то, что *Bacillus mesentericus* может обсеменять различные пищевые продукты (хлеб, мясо и др.), вызывая нередко их порчу.

Методом флюоресцентной микроскопии определяли наличие *Bacillus subtilis* в колбасах, кондитерских изделиях, рыбных продуктах. Важным обстоятельством является то, что обычные методы термической обработки не всегда устраняют из продуктов питания бактерии указанной группы, поскольку их споры не гибнут даже после обработки при 120 °С в течение 1 ч (Adeyanju, 1988). Так, С. Jonescu (1966) установил наличие *Bacillus subtilis* в молоке в количестве 10^3 микробных клеток в 1 мл. При пастеризации молока число указанных бактерий несколько уменьшилось, однако в половине исследованных бутылок даже после обработки все же оно составило 10^3 микробных клеток в 1 мл. Pisu, Stazzi (1952), обследуя партии сырого и пастеризованного молока, обнаружил бактерии рода *Bacillus*, в частности виды *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* и др. Некоторые штаммы проявляли высокую термостойчивость.

G. Lott (1972), рассматривая роль психрофильных бактерий, утверждает, что в молочных продуктах особенно опасны бактерии родов *Clostridium* и *Bacillus*. На 10^7 - 10^8 психрофиллов приходится 10^4 - 10^5 спорообразующих.

H. Berkel и R. Hodlok (1976) выделяли спорообразующие бактерии из вареных колбас. Изолированные культуры отнесены к видам первой морфологической группы: *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis*.

Ю.Г. Костенко и соавт. (1978) показали, что в пастеризованных консервах «шейка ветчинная» спорообразующим аэробным бактериям принадлежит значительный удельный вес в общей микрофлоре.

Микробиологическое исследование большого количества проб мясного фарша провела Е.П. Динчева (1970) в Болгарии. При исследовании более 200 партий фарша установлено, что общее количество бактерий колебалось в пределах 10^6 - 10^{10} клеток/г. После хранения фарша при температуре 4 °С в течение 48 ч количество бактерий увеличиваюь в два – восемь раз. Спорообразующие аэробные бактерии, преимущественно бациллы, обнаружены в трети проб (31,5 % проб).

P.Garry, I.Vendeuvre, M. Bellon-Fontaine (1998) приводят результаты анализа микрофлоры, содержащейся в тесте, пшеничной муке и зернах пшеницы. Из образцов охлажденного теста и пшеничной муки выделены и идентифицированы 95 штаммов бацилл. Среди 53 штаммов, выделенных из охлажденного теста, 24 штамма – *Bacillus subtilis*, 17 – *Bacillus cereus*, 10 – *Bacillus pumilis*, 2 – *Bacillus licheniformis*. Из пшеничной муки выделены *Bacillus pumilis* – 11 штаммов, *Bacillus subtilis* – 10, *Bacillus brevis* и *Bacillus cereus* по два, *Bacillus coagulans*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium* – по одному. Из пшеницы выделили *Bacillus circularis* – 6, *Bacillus subtilis* – 3, *Bacillus cereus* – 1, *Bacillus licheniformis* – 1 штамм. Таким образом, исследованные продукты существенно отличались по числу и видам выделенных из них штаммов бацилл.

Множество проб самых различных пищевых продуктов исследовали M.Mazas, J. Gonzalez et al. (1995). Проведя бактериологическое исследование более 6300 проб продуктов, они обнаружили достаточно частое по сравнению с другими видами выделение бактерий рода бацилл. Хотя в этой работе авторы не указывают, какое количество из выделенных бактерий данной группы обладало токсическими свойствами, однако из других публикаций известно, что именно с этими бактериями они связывают определенный процент зарегистрированных пищевых токсикоинфекций.

Таким образом, приведенные данные литературы свидетельствуют о том, что спорообразующие аэробные бактерии достаточно часто обнаруживаются в различных пищевых продуктах, в том числе в употребляемых в пищу без термической обработки. Ряд авторов обращает внимание на встречаемость в пищевых продуктах токсигенных культур этой группы, наличие у них факторов патогенности.

Среди аэробных спорообразующих бактерий типично патогенным для человека и животных является только возбудитель сибирской язвы. Остальные виды этих бактерий вирулентными свойствами для теплокровных, по-видимому, не обладают. Имеющиеся сообщения о выделении различных видов спороносных бактерий при разнообразных инфекционных поражениях или болезнях не могут служить достоверным основанием для заклю-

чений о патогенности этих бактерий для животных и человека. Вызываемые культурами некоторых видов спороносных бактерий воспалительные поражения могут рассматриваться как результат неспецифического действия активного комплекса ферментов. Энтомопатогенные штаммы данной группы бактерий также практически безвредны для человека и животных (Бакулов, 2001).

Особо пристальное внимание исследователей, работающих в области генетики бацилл, привлекают проблемы создания векторных систем, что может способствовать решению как теоретических, так и прикладных задач. При конструировании рекомбинантных молекул могут быть использованы такие генетические структуры, как геномы плазмид и умеренных фагов.

1.2. ГЕНЕТИКА БАЦИЛЛЯРНЫХ ФАГОВ

Фагам, как и всем другим живым существам, свойственна не только наследственность родительских признаков, но и их изменчивость. Изменения бывают генотипическими, которые наследственно закреплены и передаются потомству фага, и фенотипическими, которые проявляются временно при наличии определенных условий и в дальнейшем обычно исчезают.

В генетике фагов обычный тип того или иного фага, встречающегося в природе, принято называть «диким» типом. Если же у фага данного вида обнаруживается какой-либо новый признак или характерная особенность, то ее обозначают определенным символом (буквой), которая ставится при названии (символе) фага (Ревенко, 1968)

Фаги грамположительных бактерий имеют меньший набор потенциальных сайтов связывания, чем фаги грамотрицательных бактерий, способные использовать широкий спектр различных молекул во внешних мембранах их хозяев. Большинство охарактеризованных фагов грамположительных бактерий связываются с видоспецифичными гликозилированными тейхоевыми кислотами, которые погружены в пептидогликановый слой. Геномы большинства описанных бактерий содержат несколько профагов, которые принадлежат к небольшому количеству семейств близкородственных фагов. Так, умеренные фаги *Bacillus subtilis*

– это вирусы с длинными хвостами, относимые к четырем группам – I-IV с геномами около 40, 40, 126 и 60 т.п.н. соответственно. Фаги группы III, в частности, кодируют собственную ДНК-полимеразу и тимидилат-синтазу (Каттер, 2012).

Бактериофаг G – огромный литический миовирус, инфицирующий *Bacillus megaterium*, самый крупный охарактеризованный бактериофаг, с размером генома большим, чем у некоторых бактерий. 667 открытых рамок считывания, идентифицированные в его 498 т.п.н. геноме, кодируют множество разных интересных гомологов ферментов известных метаболических путей, но, как и у других крупных фагов, секвенированных к настоящему времени, масса его генов уникальна, и их функции неизвестны. 74 % предсказанных белков фага не имеют гомологии с другими фаговыми белками, что существенно (Pedulla et al., 2003). Фаг G также кодирует 17 тРНК и свою собственную альфа-субъединицу РНК-полимеразы, но в форме множества рамок, из которых конечный белок собирается посредством комбинирования мРНК путем сплайсинга и вырезания интенов – сегментов, которые удаляются на белковом уровне после трансляции. Было показано, что его ДНК сильно гликозилирована – около двух остатков сахара на каждое основание цитозина, однако ферментов, отвечающих за эту модификацию, в геноме Питтсбургского изолята фага обнаружить не удалось.

Бактериофаг ø29 – довольно небольшой вирулентный фаг (19285 п.н.), инфицирующий *Bacillus subtilis*. Для него характерен концевой белок, ковалентно связанный с 5'-концами генома с помощью фосфодиэфирных связей, участвующий в очень необычном механизме репликации генома, который был детально изучен. Хорошо исследованы также морфогенез и упаковка ДНК ø29. Фаг кодирует ДНК-полимеразу В-типа, сходную с ферментом фага T4, PRD1 и аденовирусов. Особая и до сих пор уникальная упаковочная РНК, кодируемая 174 основаниями фага, необходима для упаковки ДНК *in vitro*; шесть копий обнаружены прикрепленными к хвосто-головному коннектору (портальному белку). Белок коннектора также играет важную роль в формировании вытянутой формы головки этого фага.

Бактериофаг ø105 и SPβ – наиболее часто используемые трансдуцирующие фаги для *Bacillus subtilis*. Их геномы длиной в 39,2 и

120 т.п.н. соответственно; последний имеет участок генома в 27 т.п.н., несущественный для функций фага, который может быть замещен длинной вставкой гетерологической ДНК.

Бактериофаг SPO1 и его родственники – это крупные вирулентные миовирусы *Bacillus subtilis* (145 т.п.н., включая 12,4 т.п.н. концевой избыточности), в ДНК которых гидроксиметилдезоксиуридин (hmdU) заменяет тимидин. Несмотря на установленное наличие необычного азотистого основания, хозяйская ДНК не деградирует в ходе инфекции (как это происходит в случае с T4), и нет признаков, что требуется замена Т на hmdU для выключения синтеза и транскрипции хозяйской ДНК. Предположительно, hmdU ускоряет транскрипцию средних генов SPO1 и связывание TF1 - SPO1-специфичного ДНК-связывающего белка, синтезируемого в больших количествах сразу после инфекции, который улучшает эффективность репликации, но не является необходимым для нее. ДНК SPO1 реплицируется как длинный конкатемер с единственной копией терминальной избыточности; этот конкатемер разрезается с образованием выступающих односторонних 5'-концов, которые затем достраиваются. Большой кластер генов участвует в выключении хозяйской репликации и экспрессии и подавляет клеточное деление. SPO1 не выключает синтез рибосомальной РНК и не деградирует клеточную ДНК. Как и T4, SPO1 имеет очень сложный верион, включающий по крайней мере 53 различных полипептида, гены которых составляют почти половину генома. Однако никаких признаков генетического родства между SPO1 и T4 нет. Последовательность генома SPO1 была определена в Питтсбургском университете, но не так много известно о морфогенезе и инфекционном процессе SPO1 или о функциях его отдельных генов, за исключением тех, что участвуют в сложных процессах регуляции и репликации ДНК.

Бактериофаг *B. thuringiensis* 1-97. З.М. Кочкиной (1981) был изучен ряд физико-химических свойств нуклеиновых кислот двух фагов, выделенных из одной культуры *Bacillus thuringiensis* 1-97, различающихся по морфологии частиц и обозначенных 1-97 с «воротничком» и 1-97А. В работе она использовала фаговые суспензии с титром $1-2 \times 10^{12}$ БОЕ/мл, очищенные и сконцентрированные методом колоночной хроматографии на ДЕАЕ-целлюлозе с волокнистой основой и последующими двумя циклами диффе-

рещиального центрифугирования. Разделение фагов до гомогенных препаратов проводили посредством колоночной хроматографии на ДЕ-52. На основании чувствительности к ДНКазе, устойчивости к щелочи и положительной реакции на дезоксирибозу показано, что нуклеиновый компонент обоих фагов представлен дезоксирибонуклеиновой кислотой. Установлено, что ДНК этих фагов заметно различаются по спектру поглощения, величине гиперхромного эффекта, $T_{пл}$ характеру кривой тепловой денатурации.

Препараты ДНК фага 1-97А имели УФ-адсорбционный спектр, характерный для нативных фаговых ДНК, с отношениями поглощений E_{260}/E_{280} и E_{260}/E_{230} близкими к 2. Однако, препараты ДНК фага 1-97 с «воротничком» характеризуются низким спектральным отношением E_{260}/E_{280} , которое во всех случаях равнялось 1,74-1,81. Кривые тепловой денатурации ДНК обоих фагов в стандартном буфере свидетельствуют о наличии упорядоченной спирализованной структуры (величина гиперхромного эффекта составляет 30-40 %, $\Delta T=5-7^\circ$). Дополнительным доказательством наличия двухтяжевой структуры у ДНК фагов является реакция с формальдегидом. Показано, что только при инкубации денатурированной нагреванием ДНК с формальдегидом наблюдался типичный сдвиг максимума, а также гиперхромный эффект, характерный для однотяжевой структуры. Нуклеиновые кислоты изучаемых фагов принадлежат к ДНК с выраженным АТ-типом (32 и 38 % ГЦ).

Одной из важных биохимических характеристик фагового генома является характер распределения нуклеотидов по длине молекулы ДНК. Для установления характера распределения пар ГЦ по длине молекулы использовался спектральный метод Фалькоу (1968), который позволяет дифференцировать разупорядочение участков, богатых АТ, от участков с преобладающим содержанием пар ГЦ в интервале плавления ДНК. Показано, что распределение пар ГЦ у ДНК фага 1-97А имеет гауссовый характер, тогда как ДНК фага 1-97 с «воротничком» делится на гетерологические сегменты с различным нуклеотидным составом. Дополнительным критерием характеристики фагов может служить поведение фаговых ДНК при обработке рестрикционными эндонуклеазами. В данном исследовании были использованы рестриктазы EcoRI и

HindIII. Показано, что ДНК фагов 1-97А и 1-97 с «воротничком» также различаются по характеру рестрикции. Если ДНК фага 1-97 с «воротничком» оба фермента разрезают на 10 фрагментов, то ДНК фага 1-97А разрезается рестриктазой EcoRI на 6 фрагментов, а HindIII – на 22 фрагмента (Кочкина, 1981).

В отдельных случаях фактор, вызывающий образование вирулентных мутантов, весьма специфичен. Как уже отмечалось, антибиотик ванкомицин вызывает образование вирулентных мутантов только у продуцента энтобактерина – *Bacillus thuringiensis sub sp. Galleria* и не вызывает у других серотипов этого вида, но они также чувствительны к данному антибиотику (Раутенштейн, 1982).

1.3. МОРФОЛОГИЯ БАЦИЛЛЯРНЫХ ФАГОВ

Долгое время фаги были модельным объектом для изучения сборки молекулярных компонентов в сложные функциональные структуры. Для исследований применяли генетические, биохимические, электронномикроскопические и криоскопические, а также рентгенокристаллографические и ядерно-магнитно-резонансные подходы. Крупные фаги-миовирусы – это самые сложные из известных вирусных частиц, внешне чем-то напоминающие космические станции. 53 белка обнаружены с помощью PAGE частиц фага *Bacillus subtilis* SPO1, морфогенетические свойства которого до сих пор полностью не исследованы (цит. по Каттер, 2012).

Часть бактериофагов рода *Bacillus* относится к семейству Tectiviridae (двуцепочечная ДНК). Состав ДНК хвостатых фагов обычно напоминает состав ДНК их бактерий-хозяев. Однако некоторые ДНК (в том числе фаг T4) содержат необычные модифицированные основания, например 5-гидроксиметилцитозин. Фаговые геномы являются большими, сложными и обычно организованными во взаимозаменяемые стандартные блоки или модули. Вирусная частица представителей данного семейства обладает жесткой белковой оболочкой, в которой находится крупная липопротеиновая везикула. Кроме того, у фагов, размножающихся на бактериях рода *Bacillus*, есть апикальные шипы. После

того как фаг адсорбируется на бактериальном хозяине или после экспериментальной обработки фага хлороформом везикула преобразуется в подобную хвосту трубочку (приблизительно 60 нм длиной), которая служит устройством для ввода нуклеиновой кислоты внутрь клетки-хозяина. Это интересный пример конвергентной эволюции, поскольку трубочка выполняет ту же функцию, что и хвосты хвостатых фагов. Несмотря на небольшой размер семейства, тективирусы инфицируют полностью неродственных друг другу бактериальных хозяев.

Фаг λ и P22 формируют жизнеспособные и нежизнеспособные гибриды со многими другими, морфологически несвязанными фагами энтеробактерий и представителей рода *Bacillus* (с Ми, P1, P4, T4 и SPP1; P22 с P1, Fels 1, Fels2 и P221) (Ackermann, 1987).

В США в качестве одного из способов деконтаминации *Bacillus cereus* применяют бактериофаг BCP78, принадлежащий к семейству Siphoviridae, выделенный из пищевого сырья (Lee, 2012).

Значительное сходство объединяет лямбдоидных колифагов, инфицирующих грамотрицательных бактерий, с фагами, поражающими грамположительных молочнокислых бактерий и виды рода *Bacillus*. (Briissow, Desiere, 2001) и псевдомонадного фага D3 (Desiere et al., 2001).

SP β c2: Lazarevic с соавторами (1999) секвенировали геном размером 134,416 н.п., принадлежащий умеренному сифовирусу SP β c2 *Bacillus*, который принадлежит к тем немногим умеренным фагам, которые кодируют несколько собственных ферментов нуклеотидного метаболизма. Его гены рибонуклеотидредуктаз несут интроны группы IA2. Как и у большей части других больших фагов, большинство рамок считывания SP β c2 не имеют значимой гомологии с генами, находящимися в современных базах данных. При этом фаг обладает шестью участками протяженностью около 7000 н.п., которые на 90 % идентичны хозяйскому геному *Bacillus subtilis*. В отличие от этого вируса, ни один из крупных вирулентных фагов не обладает подобными сегментами гомологии с хозяином.

Эволюция патогенности – это не единственная функция профаговой ДНК в бактериальном геноме. Профаги также могут стать оружием лизо-генных клеток в борьбе за свою экологическую нишу. Например, некоторые бактериофаги претерпели ра-

дикальную редукцию генома вплоть до того, что от него остались одни хвостовые гены – бактериоцины. В других случаях профаги стали векторами переноса генов для своих бактериальных хозяев. Примером служит профаг PBSX *Bacillus subtilis*, который потерял некоторые гены морфогенеза головки, однако сохранил способность строить вирусные частицы (Wood et al., 1990). Более мелкие, чем в норме, фаговые головки не могут вместить ДНК профага, но они захватывают случайные кусочки бактериальной ДНК.

Ввиду ограниченного числа секвенированных последовательностей от родственных фагов, сравнительная геномика литических фагов находится все еще в недоразвитом состоянии. Тем не менее, исследования геномов фагов уже набирают обороты для семейств T4 и T7, в том числе и инфицирующих различных бактерий и полученных в разных географических регионах, а также для нескольких семейств других вирулентных фагов грамположительных бактерий с низким содержанием GC пар (например, фагов, родственных c2-подобным и sk1-подобным, *Lactococcus* фагов c2 и sk1, *Bacillus* фагов φ29 и группы из 138-kb фагов Myoviridae от бактерий родов *Listeria*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, и *Lactobacillus*) (Каттер, 2012).

Подовирусы, родственные фагу Ф29 *Bacillus subtilis*, обладают вытянутым икосаэдрическим капсидом и коротким хвостом. Это семейство включает фагов бактерий рода *Bacillus*: B103, M2, PZA, и GA-1 и менее близких стрептококкового фага CP-1 и фага *Mycoplasma* P1. Их геномы по размеру примерно в половину меньше генома T7-подобных фагов, например, геном Ф29 содержит только 19,285 н.п. Эти фаги кодируют свои собственные ДНК-полимеразы, последовательности которых были использованы для построения общей филогенетической карты Ф29 и T7 групп подовирусов (Chen, 2002). Большинство геномов фагов *Bacillus subtilis* GA-1 и PZA обнаруживают мозаичность расположения гомологичных участков. Общность их генетических карт нарушается только одной инверсией участка ДНК, который у фага PZA имеет схожую последовательность со стрептококковым фагом CP-1.

Бактериофаг SPO1 – это миовирус, содержащий геном размером 140 т.п.н., с терминальной избыточностью в 12 т.п.н. Его геном

включает гидроксиметилурацил вместо тимина. Выделенный в 1960-х годах из почвы в Осаке (Япония), он является более хорошо изученным крупным фагом грамположительных бактерий с точки зрения и генетики, и физиологии. Он во многом схож с T4: по размеру, структуре, жизненному циклу, очень активной рекомбинации, наличию нитронов и использованию необычного пиримидинового основания. Описано большое число близких ему фагов, таких как SP82 и фЕ. Фаг SPO1 обладает несколькими метаболическими ферментами, непохожими на соответствующие ферменты T4. Определение последовательности генома SPO1 совсем недавно было завершено в Питсбургском институте бактериофагов. Эта последовательность по составу ближе к фагу лактобацилл LP65 и фагу листерий A511, чем к T4. Данный факт позволит извлечь значительную пользу из накопленных результатов генетического анализа, полученных на данной системе, включая изучение генов, летальных для хозяина, и транскрипционного процесса, для сравнительного анализа фагов грамположительных бактерий с низким содержанием GC, близких к фаг SPO1.

Сравнительная геномика группы фагов, родственных фаг SPO1, уже позволяет сделать некоторые предварительные выводы. Как и в случае фагов семейства Siphoviridae грамположительных бактерий с низким уровнем GC, фаги семейства Myoviridae той же группы хозяев демонстрируют «градиент родства». Миофаги LP65 и fri, инфицирующие один и тот же вид хозяев (*L. plantarum*), обладают значительным сходством последовательности ДНК. Фаг LP65 *Lactobacillus* по последовательности кодируемых белков имеет заметную гомологию с фагом SPO1 *Bacillus* и фагом *Staphylococcus* K, в основном в своих структурных генах, однако эта связь не прослеживается на уровне нуклеотидных последовательностей. Наконец, геномная карта LP65 в районе структурных генов схожа с таковой у Siphoviridae из надсемейства 1-фагов, однако степень сходства на уровне аминокислотной последовательности слабая.

Как и в случае других фаговых групп (например, Sfi21-подобных Siphoviridae, T4-подобных Myoviridae), структурные гены образуют наиболее консервативный кластер в геноме фага SPO1-подобных миовирусов, за которым следуют гены репликации ДНК. Некоторые вставки, делеции и замены генов были

найденны в центральной части генома, в том числе и перемещение генов в другие области хромосомы. В то же время, большие неконсервативные кластеры генов были найдены в правом и левом плече данного линейного генома. В сущности, генные кластеры LP65, расположенные вслед за ДНК-репликативным модулем, не имеют прямой связи с фагами К и SPO1, а больше похожи на ДНК хозяина и его профагов. Этот участок должен, таким образом, кодировать родо- или даже видоспецифические функции. Генный кластер, расположенный выше структурных генов, показывает больше совпадений с записями баз данных, чем другое плечо LP65, но его функции пока неизвестны. Соответствующая часть генома фага К в значительной степени содержит рамки, гомологи которых отсутствуют в базах данных (Каттер, 2012).

Независимые проекты секвенирования Myoviridae грамположительных бактерий с низким процентом GC пар в ДНК, связанные с потребностями фаговой терапии, ферментативными процессами в производстве пищи и фундаментальными научными целями, открывают ряд близкородственных фагов, которые попадают в один род предварительно описанной фаговой группы: SPO1-подобный род, определенный у фагов *Bacillus subtilis*. Высокая степень сходства структурного и репликационного модулей фагов SPO1, К и A511 и более дальние связи с кластером структурных генов между SPO1-подобными фагами и лямбдаподобными Siphoviridae из одной группы хозяев предполагает существование очень консервативных линий фагов. Следовательно, исследователи не надеются обнаружить бесконечное число вариаций фаговых типов, как минимум, внутри этой, относительно интенсивно исследуемой группы бактерий. Есть еще аргументы, которые говорят в пользу того, что фаги обладают ограниченной вариабельностью внутри данной группы бактерий. Филогенетическая связь хозяев коррелирует со степенью родства их фагов, которые, несмотря на интенсивные исследования, например, в области пищевой промышленности, приводящие к описанию большого числа новых вирусов этих бактерий, укладываются в ограниченное число генетических линий.

Бактериофаг № 1 *Bacillus mycoides*. Головка фага № 1 представляет собой октаэдр. На плоскости она располагается, как правило, гранью октаэдра, вследствие чего в проекции головка

чаще всего имеет гексагональную форму. В некоторых случаях видны все грани октаэдра. Капсид головки образован хорошо различимыми капсомерами. На каждой грани октаэдра капсомеры располагаются по правилу плотнейшей упаковки шаров на плоскости и образуют характерный гексагональный узор, т. е. один капсомер окружают шесть соседних. Такие же результаты были получены Б.К. Вайнштейном и Н.А. Киселевым (1964) при изучении структуры фага № 1.

При более тщательном изучении капсида А.С. Тихоненко (1968) удалось установить форму и строение отдельных капсомеров. Они представляют собой полые короткие трубки гексагональной формы и состоят из структурных единиц. Структурные единицы хорошо различимы на отдельных капсомерах при разрушении капсида головки. На изолированных капсомерах видно, что большинство из них построены из шести структурных единиц. Реже встречаются капсомеры, образованные четырьмя структурными единицами. Иногда создается впечатление, что капсомеры имеют пентагональную форму. Однако, исходя из того, что капсид фага № 1 имеет форму октаэдра, следует ожидать, что капсомеры, образующие грани октаэдра, построены из шести структурных единиц, тогда как вершину октаэдра образуют капсомеры тетраэдрной формы. Присутствие капсомеров пентагональной формы, по всей вероятности, можно объяснить либо разрушением структуры капсомера в процессе приготовления препарата, либо недостаточным выявлением тонких деталей их строения.

Непосредственный подсчет капсомеров, располагающихся на одной «поверхности» головки фага № 1 (4 грани), дал в среднем цифру 446, что составляет для всей поверхности 892 субъединицы. Для подтверждения сделанных подсчетов проводилось вычисление количества капсомеров на поверхности головки другим путем. Определив число капсомеров, располагающихся на ребре октаэдра головки, можно подсчитать количество капсомеров на всей поверхности головки. У фага № 1 на ребре различается 16 капсомеров. Подсчет общего числа капсомеров дает цифру 904. Следует отметить, что эта величина должна быть несколько уменьшена за счет того, что в вершине, к которой прикрепляется стержень отростка, несомненно имеется отверстие. Таким образом, количество капсомеров на поверхности головки, получен-

ное при подсчете различными путями, совпадает и составляет примерно 900 (Тихоненко, 1961).

Длина ребра октаэдра равна 810-840 Å. Если эти цифры разделить на 16 (количество капсомеров), то отсюда следует, что диаметр капсомера равен приблизительно 50-55 Å. Непосредственный промер отдельных капсомеров дает 60-70 Å. Отросток фага № 1 так же, как и у Т-четных фагов, имеет сложное строение. Он состоит из наружного чехла и внутреннего стержня. Отросток интактного фага, как правило, слегка изогнут и несколько расширяется к концу - проксимальная часть (140 Å) уже дистальной (170 Å). Наружный чехол отростка представляет собой спираль, построенную из отдельных морфологических субъединиц. Отдельные витки спирали создают отчетливо выраженную поперечную исчерченность чехла. По данным Б.К. Вайнштейна и Н.А. Киселева (1964) и по подсчетам А.С. Тихоненко (1966), в растянутом чехле отростка фага № 1 насчитывается около 50 поперечных полос. В сокращенном состоянии витки спирали, образующей чехол, становятся шире, и чехол укорачивается примерно в два раза. Спиралевидное строение сокращенного чехла особенно четко различимо в тех случаях, когда он лишен стержня. Каждый виток спирали сокращенного чехла фага № 1 состоит из 12 морфологических субъединиц, которые хорошо видны, если трубка чехла лежит торцом. Зная размеры отдельных структурных элементов частицы фага, можно вычислить объем чехла в растянутом и сокращенном состоянии. Объем сокращенного чехла без базальной пластинки, вычисленный по формуле полового цилиндра, равен $2,3 \times 10^7 \text{ Å}^3$. Объем растянутого чехла также без базальной пластинки, вычисленный по формуле усеченного конуса с последующим вычитанием величины объема, занимаемого стержнем, равен $2,4 \times 10^7 \text{ Å}^3$ (Тихоненко, 1961). Из приведенных расчетов видно, что объемы чехла, находящегося в различных состояниях, совпадают. Это свидетельствует о том, что чехол отростка, укорачиваясь, не разрушается, а сокращается. Сокращение чехла сопровождается перегруппировкой субъединиц и переходом к более плотной упаковке, поэтому внешний вид сокращенного чехла отличается от растянутого. По всей вероятности, сокращение чехла сопровождается изменением конформации субъединиц.

Как указывалось выше, принято считать, что сокращение чехла происходит скачкообразно, т. к. никому не удавалось наблюдать промежуточные этапы сокращения. А.С. Тихоненко и Н.Н. Беляевой (1967) удалось зафиксировать промежуточные стадии сокращения чехла отростка. Чехол отростка фага № 1 так же, как и фага T2, образован спирально скрученным тяжем, однако растянутых спиралей чехла фага № 1, которые наблюдаются у фага T2, обнаружено не было. По всей вероятности, это объясняется тем, что субъединицы, составляющие спираль чехла фага № 1, менее прочно связаны между собой, чем субъединицы, образующие спираль чехла фага T2. При разрушении связей, удерживающих витки спирали фага № 1, в компактном состоянии, по-видимому, одновременно разрушаются связи между отдельными морфологическими субъединицами образующими спираль чехла, и поэтому чехол распадается либо на отдельные фрагменты, либо сразу на составляющие его элементы – морфологические субъединицы.

Стержень отростка представляет собой жесткую структуру в виде полой трубки, состоящей из плотно упакованных морфологических субъединиц. Посредством стержня осуществляется связь головки с отростком, так как наружный чехол начинается от стержня на расстоянии около 120 \AA от головки. Вблизи головки на стержне имеется утолщение в виде воротничка или муфты. Внутри головки, в месте прикрепления к ней стержня, различается плотная к электронам структура в виде мембраны, вероятнее всего, непосредственно связанная со стержнем. Возможно, эта структурная деталь является своеобразным клапаном и

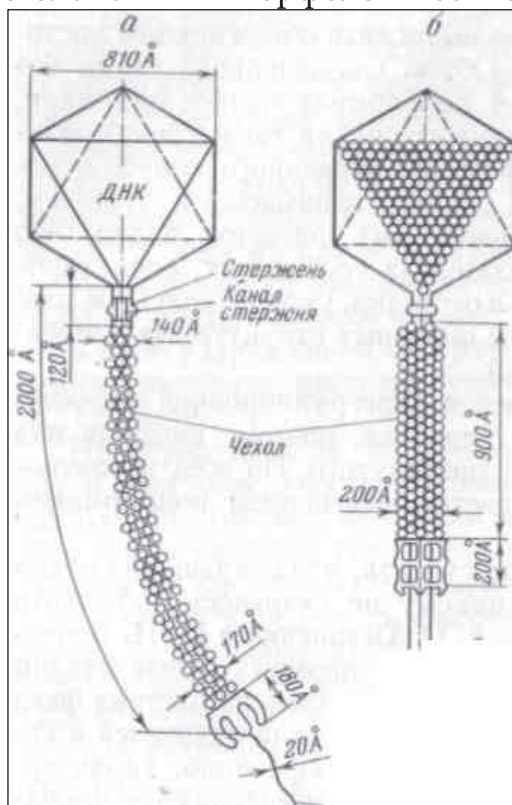


Рис. 1. Схематическое изображение фага № 1 *Bac. myosoides*: а – интактная частица, б – частица с сокращенным чехлом отростка (Тихоненко, 1968)

играет важную роль в механизме передачи нуклеиновой кислоты из головки в бактериальную клетку. Такая мембрана внутри головки обнаруживается почти у всех фаговых частиц, независимо от длины и структурной организации их отростка. Отросток заканчивается базальной пластинкой с шестью закругленными зубцами или выростами. В боковой проекции их различается три. Структура базальной пластинки, в особенности ее выросты, очень лабильна и поэтому в некоторых случаях она выглядит полуразрушенной. Базальная пластинка несколько шире отростка. От нее отходит одна тонкая нить. При сокращении чехла базальная пластинка подтягивается вместе с ним кверху, но при этом ее выросты становятся тоньше и острее. Они соединены между собой двумя поперечными дисками. По мнению А.С. Тихоненко (1968), чехол отростка удерживается в растянутом состоянии какими-то лабильными структурами, располагающимися на базальной пластинке и фиксирующими ее на конце стержня. При разрушении этих структур, наступающем после контакта с бактериальной клеткой или в результате каких-либо внешних воздействий, базальная пластинка освобождается от связи со стержнем и начинается сокращение чехла, в процессе которого меняется форма выростов базальной пластинки.

Бактериофаг Н19 *Bacillus mycoides*, активный в отношении того же штамма *Bacillus mycoides*, что и фаг № 1, имеет отросток, чехол которого способен к сокращению. Однако, этот фаг по размерам и некоторым деталям строения отличается от фага № 1. Он имеет более крупную головку в виде изометрического многогранника, геометрическую форму которого пока точно установить не удалось. Скорее всего, головка этого фага имеет форму икосаэдра. Капсид головки построен из отдельных капсомеров, но более мелких, чем у фага № 1. К одной из вершин многогранника прикрепляется отросток, вернее его стержень. Отросток фага Н19 состоит из наружного чехла и внутреннего стержня. Верхний конец чехла отростка закреплен на стержне несколько отступая от головки. Нижний – прикреплен к базальной пластинке. У фага Н19 базальная пластинка имеет довольно сложное строение и по конфигурации отличается от базальной пластинки фага № 1. Ее диаметр несколько больше диаметра чехла отростка, выросты базальной пластинки у несокращен-

ного отростка, как правило, собраны компактно, в виде чашечки. От центра базальной пластинки отходит одна тонкая нить (Тихоненко, 1968).

Так же как и у фага № 1, несокращенный отросток фага Н19 слегка изогнут, и толщина его чехла неравномерна на всем протяжении; проксимальная часть уже дистальной. Чехол отростка построен из хорошо различимых субъединиц, спирально оплетающих стержень. Сокращение чехла отростка сопровождается перегруппировкой морфологических субъединиц, из которых он построен. Субъединицы при сокращении ориентируются таким образом, что чехол отростка приобретает вид трубки, образованной из нескольких продольных тяжей. Чехол отростка фага Н19 сокращается не столь интенсивно, как у фага № 1, у которого он укорачивается примерно вдвое. Чехол фага Н19, сокращаясь, укорачивается всего лишь на одну треть. При сокращении вместе с чехлом кверху подтягивается и базальная пластинка. Выросты базальной пластинки у сокращенного чехла теряют свою компактную форму и разлохмачиваются, приобретая вид распустившегося цветка. По всей вероятности, изменение формы базальной пластинки при сокращении чехла фага Н19 вызывается теми же причинами, что и у фага № 1. Стержень отростка фага Н19 представляет собой полую жесткую трубку, построенную из отдельных морфологических субъединиц.

А.С. Тихоненко (1968) отмечает, что при негативном контрастировании фага Н19 фосфорновольфрамовой кислотой в препаратах чаще наблюдаются частицы с опустевшими головками и сокращенными отростками. При контрастировании уранилацетатом препараты содержат главным образом частицы с растянутым отростком и заполненной головкой. В таких препаратах редко встречаются частицы фага с сокращенным отростком. Это наблюдение относится не только к фагу Н19, но и к фагу № 1 *B. mусoides*. Поэтому при необходимости исследования интактных частиц этих фагов для контрастирования целесообразней использовать уранилацетат.

Бактериофаги *Bacillus subtilis*. На различных индикаторных культурах *Bacillus subtilis* штамма Marburg P.P. Азизбеяном и А.С. Кривиским (1966) из образцов почвы Москвы были выделены различные вирулентные и умеренные фаги. При изучении в

электронном микроскопе материала из негативных колоний этих фагов во всех случаях обнаруживались одновременно два резко отличающихся друг от друга типа фагов с сокращающимся чехлом (Азизбемян с соавтр., 1966). Одни обладали крупной, другие – мелкой головкой. В то время как фаги с крупной головкой несколько отличаются между собой размерами головки и отростка в зависимости от образцов почвы, из которых они выделялись, фаги с мелкой головкой по размерам и морфологии всегда были идентичны и сопутствовали любому фагу с крупной головкой. Фаги с крупной головкой были обозначены AR1, AR2, AR3; фаг с мелкой головкой - phi. Фаги с крупной головкой AR1, AR2, AR3 отличаются от фагов № 1 и H19 *Bacillus mycoides* только строением базальной пластинки. Их базальная пластинка значительно шире отростка. У интактных фаговых частиц базальная пластинка выглядит мохнатой. При сокращении чехла базальная пластинка подтягивается вместе с сокращенным чехлом кверху, и ее мохнатые выросты становятся жестче и острее. Они отходят от верхней поперечной пластинки и соединяются между собой нижней поперечной пластинкой. На сокращенном чехле базальная пластинка также значительно выступает за его пределы. Головка этих фагов имеет форму изометрического многогранника и, скорее всего, представляет собой икосаэдр. Капсид головки состоит из отдельных капсомеров, которые имеют вид полых трубок (Тихоненко, 1968).

Такое же строение головки, отростка и базальной пластинки имеют другие фаги ***Bacillus subtilis* SP8**, описанный Davison (1963), и ***Bacillus subtilis* SP50**, изученный Eiserling, Boy de la Tour (1965). Эти авторы отмечают, что головка изученных ими фагов *Bacillus subtilis* скорее всего имеет форму икосаэдра. Также ими указывается на то, что капсид головки построен из полых капсомеров диаметром около 70 Å. По расчетам, приведенным в статье Eiserling, Boy de la Tour (1965), капсид головки фага SP50 состоит из 492 капсомеров.

Бактериофаг SP3 *Bacillus subtilis*, описанный Eiserling (1967), несколько отличается от фагов AR1, AR2 и AR3 и фагов SP8 и SP50 строением базальной пластинки, которая по форме напоминает базальную пластинку фага H19 *Bacillus mycoides*, описанного выше.

Бактериофаг AR1, AR2 и AR3. Фаг AR1 несмотря на сходство по общей структурной организации, несколько отличается от фагов AR2 и AR3 по размерам головки и отростка. Как сокращенный, так и растянутый чехол отростка фага AR1 короче соответственно растянутого и сокращенного чехла фагов AR2 и AR3, которые по размерам почти одинаковы (Тихоненко, 1968). Таким образом, фаги AR1, AR2, AR3 несколько отличаются друг от друга размерами своих структурных элементов. При сравнении изученных нами фагов AR1, AR2, AR3 с фагами SP3, SP8, SP50 *Bacillus subtilis*, описанными в литературе, становится очевидным, что их размеры также не идентичны, что подтверждает большое разнообразие природных форм близких по строению фагов. Сокращение чехла отростка фагов AR1, AR2, AR3 сопровождается перегруппировкой составляющих его морфологических субъединиц, и сокращенный чехол структурно и по размеру отличается от растянутого. У фага AR3 так же, как и у фага № 1 *Bacillus mycoides*, было обнаружено частичное сокращение чехла отростка, дистальная часть которого приобрела ультраструктуру, характерную для сокращенного чехла, тогда как проксимальная сохранила еще структуру растянутого чехла.

Бактериофаг phi с мелкой головкой, как было установлено из проведенных Н.Н. Беляевой и Р.Р. Азизбековым (1967) исследований, спонтанно и после индукции выделяется различными лизогенными штаммами Marburg *B. subtilis* и по своим свойствам является дефектным фагом.

Бактериофаг AR9. Своеобразную морфологию имеет фаг AR9, активный в отношении марбурговского штамма SHgW *Bacillus subtilis*. Морфология фага AR9 подробно изучена сотрудником лаборатории электронной микроскопии Института молекулярной биологии АН СССР Н. Н. Беляевой (1967). Головка фага AR9 представляет собой многогранник с хорошо различимыми капсомерами и вероятнее всего имеет форму икосаэдра. Этот фаг – самый крупный из всех изученных в настоящее время фагов. Диаметр его головки равен 1500 Å. Отросток имеет чехол, способный к сокращению. Внутри чехла проходит полый стержень, состоящий из хорошо различимых в поле электронного микроскопа субъединиц. На конце отростка имеется небольшая базальная пластинка, по ширине примерно равная чехлу отростка

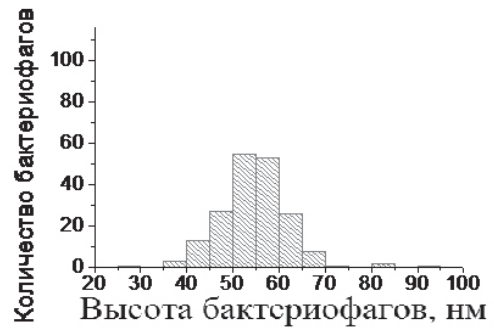
в дистальной части (около 370 Å). От базальной пластинки отходят три мощные сильно извитые жгутоподобные фибриллы, состоящие из субъединиц. Каждая фибрилла заканчивается своеобразными структурами в виде присоски, состоящей из четырех различных на плоскости зубцов. Уникальная особенность фага AR9 заключается в необычных дополнительных структурах, связанных с его отростком, которые, по всей вероятности, играют важную роль в процессе взаимодействия с клеткой хозяина. Несокращенный чехол отростка имеет сигарообразную форму, которую придают ему большое количество тончайших волокон, по-видимому, отходящих от морфологических субъединиц чехла отростка. У несокращенного чехла отростка они располагаются снизу вверх и закрепляются на воротничке стержня, находящегося у основания головки. Длина несокращенного отростка фага AR9 около 2700 Å. Ширина его неравномерна. В дистальной части она равна 370 Å, в проксимальной около 290 Å. На чехле отростка хорошо различима поперечная исчерченность. Несокращенный чехол состоит из 54 поперечных полос, образованных морфологическими субъединицами. При сокращении чехол отростка укорачивается более чем вдвое (1200 Å) и становится равномерным по ширине на всем протяжении (570 Å). В результате сокращения чехла обнажается стержень отростка шириной 140 Å с внутренним каналом диаметром 75 Å.

Необычное строение частиц, сходное по ряду деталей с фагом AR9, было описано Eiserling (1967) у фага **PBS1 Bacillus subtilis**. Из работ Kellenberger et al. (1965) и Frankel, Joys (1966), известно, что фаг PBS1 адсорбируется только на жгутах клеток *Bacillus subtilis*. Возможно, этим объясняется столь сложное строение частиц фагов, подобных PBS1 и AR9.

1.4. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ФАГ-КЛЕТКА НА ПРИМЕРЕ БАЦИЛЛЯРНЫХ ФАГОВ

С.В. Краевский (2011) в следующем эксперименте рассмотрел взаимодействие фаг – клетка на примере грамположительных бактериальных клеток *Bacillus thuringiensis* 393 с фагом Vf, представленные Государственным Исследовательским Центром Прикладной Микробиологии и Биотехнологий (Оболенск).

Исследуемые клетки имели форму палочек, длина которых (3-8 мкм в зависимости от возраста) в несколько раз больше ширины (около 1 мкм), а высота (или диаметр) клеток на поверхности слюды составляла около 500 нм.



На рисунке 2 представлена гистограмма распределения частиц бактериофага по высотам. Поскольку при нанесении бактериофагов на подложку и их высушивании может происходить их разрушение и даже выход РНК, что наблюдал Краевский (2011) и на других бактериофагах, то распределение по высотам получилось довольно широким. Учитывая эффект воздействия кантилевера на частицы бактериофагов во время сканирования, диаметр головки бактериофагов к клеткам *Bacillus thuringiensis* можно оценивать по верхней границе распределения, т.е. 60 – 70 нм.

Процедура приготовления образцов для нанесения на подложку отличалась тем, что при инкубировании клеток с фагом в термостате использовали шейкер для дополнительной аэрации. Как и предполагалось, для аэробной клетки это является критическим условием для наблюдения процесса лизиса клетки.

На оригинальных фотографиях Краевского (2011) (рис. 3) можно увидеть, что клеточная стенка клеток *Bacillus thuringiensis* инкубированных с бактериофагом Vf (рис.3 b) в течении 120 мин без аэрации не сильно изменилась по сравнению с контролем (рис. 3 а).

При аэрации заключительную литическую стадию с выходом бактериофагов наблюдали через 60 мин термостатирования (рис. 3. d). Кроме того, поверхность клетки претерпевает критические изменения: обнаружено, что на ней образуются поры размером порядка 60-80 нм, что сопоставимо с размером бактериофага.

Дополнительные исследования, иллюстрирующие особенности взаимодействия фага и хозяина в естественных условиях, ограничивающих рост клеток, были сделаны на спорулирующих бактериях. Например, фаги φE и φ29 являются литическими, когда инфицируют растущую *Bacillus subtilis*. Хотя каждый фаг мо-

жет оказаться в споре только в определенный, очень ограниченный отрезок времени и персистировать в пассивном состоянии, которое позволит при пробуждении споры сформировать инфекционный центр (Sonenshein and Roscoe, 1969). В более поздних работах было показано, что фаг $\phi 29$ несет последовательности, узнаваемые ДНК-трансферазой, ответственной за упаковку геномной ДНК в проспору, в результате чего при инфекции спорулирующего хозяина геном данного фага с высокой вероятностью попадает в спору (Каттер, 2012).

Для фага *Bacillus subtilis* SP82G McAllister (1970) показал, что скорость ввода ДНК в клетку является постоянной по мере входа всего генома и очень сильно зависит от температуры в то время как вторая ступень переноса генома фага T5 проходит нормально даже в экспериментах, где ДНК уже высвобождена из своего капсида (Letellier et al., 2004).

Миовирусы, хотя и обладают сократимыми хвостами, в действительности не пронзают ими внутреннюю мембрану клеток, и для входа ДНК по-прежнему остается важным трансмембран-

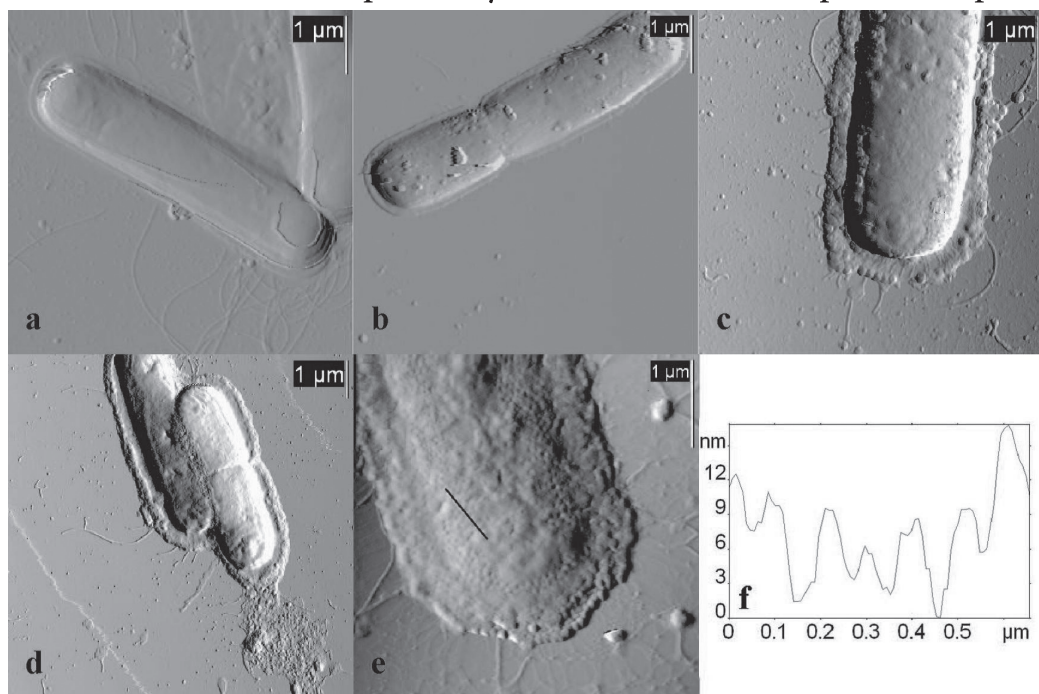


Рис. 3. АСМ изображения клеток *B. thuringiensis* не смешанные с фагами (а), инкубированные с бактериофагом Vf при температуре 30 °С без аэрации в течение 2 часов (б), инкубированные с бактериофагом Vf при температуре 30 °С на шейкере в течение 5 мин (с) и 60 мин (д,е). (f) АСМ профиль вдоль черной линии с картинки (е), иллюстрирует шероховатость инфицированной клетки (Краевский, 2011)

ный потенциал. В целом, как отмечает Molineux (2001), ясно, что широко применяемая метафора «иглы для подкожной инъекции» является неточной и механизмы, дающие энергию для переноса, отличаются у разных фагов.

Фаг SPO1 *Bacillus subtilis* кодирует шесть РНК-связывающих белков. Кластер из 24 генов образует модуль «захвата хозяина», который занимает большую часть терминальных избыточных последовательностей SPO1, он отвечает за выключение транскрипции и трансляции хозяйских генов, а также нарушение других хозяйских функций (Stewart et al., 1998). Chelm и коллеги (1982) разработали систему, которая позволила им изучать в деталях факторы, влияющие на переход от транскрипции ранних генов, которая использует главный клеточный σ -фактор, σ^{55} , к использованию продукта отсроченно-раннего гена *gr28*, который перенаправляет транскрипцию на средние гены. В свою очередь белки *gr33* и *gr34* продуцируются для активации транскрипции поздних генов. *Gr28* недостаточно эффективен для перенаправления полимеразы для выключения ранней транскрипции *in vivo*; SPO1 транскрипционные модуляторы *gr 44*, *50* и *51* также необходимы для нормального перехода от раннего паттерна транскрипции к среднему, как и для выключения синтеза хозяйских ДНК, РНК и белка (Sampath, Stewart, 2004). Их воздействие очень сложное и должно быть в большей степени регуляторным, нежели прямым, эти белки тем или иным способом влияют на экспрессию всех известных ранних и средних генов SPO1.

Л.И. Бурцева, О.И. Рязанкина, С.Н. Щелкунов (1981) провели исследование явления «фагоносительства» спор для системы *Bacillus subtilis* 168-фаг SPP1. Выявлено наличие двух максимумов захвата фагового генома спорами: при инфекции клеток фагом через 5 и 9 ч после начала роста культуры (частота захвата соответственно $6,0 \times 10^{-2}$ и $3,0 \times 10^{-1}$). При этом множественность инфекции фагом клеток не влияет на время инфекции при котором происходит максимальный захват спорами фаговых геномов. Это указывало на то, что эффективность захвата фаговых геномов спорами в основном, зависит от физиологического состояния бактериальной клетки.

Трансфекция компетентных клеток *Bacillus subtilis* ДНК фага SPP1 и последующий рост клеток на питательной среде с антифаговой сывороткой не позволяет выявить споры – «фагоносители».

1.5. ЛИЗОГЕНИЯ НА ПРИМЕРЕ БАЦИЛЛЯРНЫХ ФАГОВ

Концепция лизогении имеет сложную историю. Первые исследователи бактериофагов в 1920-х и 1930-х годах заявляли, что найдены фаги, «неправильно» взаимодействующие со своими хозяевами, и были убеждены, что бактерии способны к спонтанной генерации фагов, которых многие ученые долго принимали скорее за бактериальный фермент, нежели за живой вирус.

Когда Макс Дельбрюк и его коллеги начали свою работу, они ограничили себя набором колифагов T1-T7, ни один из которых не способен к лизогенизации хозяев, и Дельбрюк посчитал ранние сообщения за методологическую ошибку. Тем не менее, феномен нельзя было более отрицать после работ Lwoff A., Gutmann A. (1950); благодаря микроскопическому исследованию отдельных клеток *Bacillus megatherium* в микрокаплях ученые продемонстрировали, что клетки могут продолжать деление в среде, лишенной фага, без следов фаговой продукции, но случайная клетка способна лизировать спонтанно и высвобождать фагов. Львов назвал это внутриклеточное состояние фагового генома профагом и позднее показал, что облучение лизогенных клеток ультрафиолетом может приводить к выходу профагов из состояния покоя и инициировать клеточный лизис. В названии лизогенного бактериального штамма профаг заключается в скобки; например, K(P1) означает, что штамм K несет профага P1 (Каттер, 2012).

Литический процесс очень сильно зависит от метаболического аппарата клетки. В большинстве случаев на него влияет, в каких условиях клетка находилась незадолго до инфекции, в каком энергетическом статусе она пребывает, какие питательные вещества и другие факторы доступны в ходе инфекционного процесса (Kutter et al., 1994). Фаг *Bacillus subtilis* SPO1, выключающий функции геномов хозяина, в целом делает инфицированные клетки неспособными отвечать на значительные из-

менения окружающей среды после инфекции. Энергетический статус клетки также значительно влияет на установление лизогении и, в некоторых случаях, на индукцию профагов в лизогенных штаммах.

Лизогенизация бактериальных клеток умеренными фагами может приводить к изменению ряда свойств бактерии, прежде всего к приобретению ими устойчивости к тому фагу, который обусловил лизогенное состояние, и к родственным ему фагам. Фагорезистентность является следствием инфекционного иммунитета клетки, связанного с присутствием в ней определенного профага. Кроме того, могут изменяться и другие особенности бактерий, например, у почвенной палочки *Bacillus megatherium* наиболее четко выражены изменения в строении колоний, у пигментообразующих бактерий наблюдается изменение пигмента и т. п. Такой вид изменчивости получил название лизогенной конверсии (Ревенко, 1968).

В опытах В.В. Сахаровой с соавтр. (1978) с выращиванием культуры *Bacillus megatherium* в хемостате было установлено, что у этой лизогенной культуры в результате спонтанной индукции лизируется около $6,0 \times 10^5$ БОЕ/мл среды, это приводит к уменьшению биомассы. Не зная истинной причины, исследователь отнес бы снижение биомассы только за счет действия других факторов. При выращивании этой же культуры в периодических условиях Н.П. Фадеевой с соавтр. (1968) было выявлено, что в результате спонтанной изменчивости у нее возникают варианты, резко различающиеся по способности к спонтанной индукции умеренного фага. При выращивании одних вариантов титр умеренного фага достигал 10^8 , других 10^2 и менее, а у некоторых наличие умеренного фага не выявлялось. От варианта, выделенного из односпоровой культуры, у которого выделение умеренного фага не обнаруживалось возникали спонтанно варианты, выделяющие умеренные фаги в больших количествах. Эти особенности лизогенных культур должны быть учтены при селекции производственных штаммов, при анализе дефектных ферментации, а также при интерпретации результатов научных исследований (Раутенштейн, 1982, Фадеева, 1968).

Я.И. Раутенштейн (1982) считает, что лизогенные культуры не только одного и того же вида, но даже у разных штаммов одного

вида могут существенно различаться по количеству содержащихся у них фагов, по морфологическим, серологическим и химическим свойствам, спектру литического действия, по способности к спонтанной и экспериментальной индукции профагов, по стабильности связи последних с клеткой и по образованию вирулентных мутантов. Наличие экологических рас среди культур одного и того же вида может в ряде случаев быть связано с тем, что они содержат разные профаги. Это явление особенно четко проявляется среди культур вида *Bacillus thuringiensis*. При фаголизисе разных серотипов этого вида, как правило, выявляются специфичные для каждого фаги.

Невольно встает вопрос – почему при столь широком распространении лизогении при использовании многих культур фаголизис не наблюдается. Дело в том, что лизогенные культуры не только одного и того же вида, но даже у разных штаммов одного вида могут существенно различаться по количеству содержащихся у них фагов, по морфологическим, серологическим и химическим свойствам, спектру литического действия, по способности к спонтанной и экспериментальной индукции профагов, по стабильности связи последних с клеткой и по образованию вирулентных мутантов. Наличие экологических рас среди культур одного и того же вида может в ряде случаев быть связано с тем, что они содержат разные профаги. Это явление особенно четко проявляется среди культур *Bacillus thuringiensis*. При фаголизисе разных серотипов этого вида, как правило, выявляются специфичные для каждого фаги. Существенные различия по особенностям лизогении выявлены и среди клубеньковых бактерий. Среди исследованных нами актиномицетов имелись явно лизогенные, но у которых не наблюдалось возникновения вирулентных мутантов (Азизбекян, 1978; Каттер, 2012).

1.6. ДЕЙСТВИЕ ХИМИЧЕСКИХ И ФИЗИЧЕСКИХ АГЕНТОВ НА БАЦИЛЛЯРНЫЕ ФАГИ

Изучение функциональной роли структурных белков фага представляет собой большой интерес для понимания интимного механизма взаимодействия фага с бактерией. Если роль нуклеиновой кислоты как инфекционного начала с точностью

установлена, то вопрос о роли отдельных белковых структурных элементов фага до сих пор не вполне ясен. Относительно сложное строение отростка и наличие, по крайней мере, четырех различных белков у фага дает основание полагать, что роль его белкового компонента не ограничивается только функцией защиты нуклеиновой кислоты от внешних воздействий. Поэтому изучение функциональной роли и ультраструктуры белковых элементов фага представляет интерес как с точки зрения дальнейшего раскрытия механизма фаговой инфекции, так и для понимания общих закономерностей формирования белков в клетке (Hershey, 1952).

По сравнению с фагом T2 фаг *Bacillus mycoides* № 1 более лабилен и довольно легко повреждается не только под действием каких-либо агентов, но и в процессе приготовления электронно-микроскопических препаратов. Эти повреждения главным образом выражаются в том, что чехол отростка переходит в сокращенное состояние.

Повышение рН до 9,0 не вызывает существенных изменений в структуре фага № 1. Лишь у незначительного числа вирионов появляются опустевшие головки и чехол некоторых отростков переходит в сокращенное состояние, хотя подавляющее большинство частиц ничем не отличается от контрольных. Дальнейшее повышение рН до 9,0-10,0 вызывает опустошение капсида и сокращение чехла отростка почти у всех вирионов. В некоторых случаях наблюдается отрыв отростка от головки, отделение чехла от стержня или сползание чехла со стержня к дистальной части отростка. На микрофотографиях хорошо различимо тонкое строение сокращенного чехла и стержня, состоящих из морфологических субъединиц. Такие препараты становятся очень вязкими, что связано с массовым выходом ДНК фага из головки во внешнюю среду. Морфологически это выражается в появлении на электронно микроскопических препаратах опустевших головок фага и тончайших нитей ДНК. При этих же значениях рН базальные пластинки, как правило, сохраняются закрепленными на сокращенных чехлах отростка. При рН 11,0-11,5 в препаратах начинают преобладать пустые оболочки головки и стержни отростка, большей частью без наружных чехлов. Кроме того у стержней отростка обнаруживается тенденция к агрегированию

путем образования структуры в виде длинных полых трубок, соответствующих по диаметру стержню, но намного превышающих его длину. В суспензии фага, обработанной щелочью при рН 12,0-12,5, остаются только пустые оболочки головки, многие из которых выглядят полуразрушенными, распадающимися на составляющие их морфологические субъединицы. Установлено, что капсомеры капсида имеют вид многогранных полых коротких трубок. Чехол и стержень отростка в этих условиях, по всей вероятности, разрушаются на составляющие их более мелкие морфологические субъединицы.

Таким образом, наиболее устойчивым структурным элементом фага *Bacillus mycoides* № 1 к щелочам оказался капсид головки, затем стержень отростка; наименее устойчивым – чехол отростка, который начинает гидролизироваться при сравнительно низких значениях рН. Постепенное разрушение отдельных структурных элементов фага в зависимости от значений рН указывает на разнокачественность структурных белков, образующих различные элементы фаговой частицы. Эти свойства белков делают возможным разделение фага на отдельные фракции, состоящие из определенных структурных элементов (Тихоненко, 1968).

Для инактивации вирусов и фагов исследователи давно стали применять поверхностноактивные вещества – детергенты. Работами Френкель-Конрата (1956) было показано, что детергенты вызывают разделение белка и нуклеиновой кислоты вируса табачной мозаики. Это дало возможность автору провести опыты по реконструкции вирусных частиц из отдельных компонентов. Однако работ по изучению действия детергентов на фаги в сочетании с морфологическим контролем почти нет.

А. С. Тихоненко (1962) было проведено электронномикроскопическое изучение влияния додецилсульфата натрия на структуру фага № 1 *Bacillus mycoides*. Доказано, что он легко разрушается даже при действии невысоких доз (0,1 %) додецилсульфата натрия. Довольно низкая концентрация этого детергента вызывает опустошение головки фага, что сопровождается выходом ДНК наружу. Обработанная детергентом суспензия фага № 1 сразу становится очень вязкой. Одновременно с этим додецилсульфат натрия вызывает сокращение чехла отростка и постепенное его разрушение. Разрушающее действие детерген-

та увеличивается с увеличением времени воздействия. Чехол часто можно видеть перемещенным ближе к дистальному концу отростка или полностью отделившимся от стержня. Кроме того, чехол отростка обнаруживает явную тенденцию к распаду витков его спирали на морфологические субъединицы, укорачиваясь при этом подлине. У некоторых частиц после разрушения на стержне остается только небольшой фрагмент чехла. У большинства частиц остается голый стержень, прикрепленный к пустой головке. Отделившиеся от стержня чехлы склонны к агрегации. В таких случаях длина агрегированных чехлов значительно превышает длину одного сокращенного чехла. Не исключена вероятность того, что эти длинные агрегаты чехлов образуются путем самоорганизации распавшихся морфологических субъединиц возле небольших фрагментов чехла, которые в этом случае являются как бы центрами кристаллизации, как это имеет место при реконструкции капсида у вируса табачной мозаики (Fraenkel-Conrat, 1956).

При разрушении чехла целиком обнажается внутренний полый стержень отростка, структура которого очень устойчива к действию этого детергента. Он соединен с опустевшей белковой оболочкой головки. Пустой капсид головки часто выглядит разорванным, в результате чего он теряет многогранную форму. Однако его структурная организация сохраняется. При этом отчетливо различаются отдельные составляющие его капсомеры в виде полых многогранных коротких трубок (рис. 4). Более высокие концентрации додецилсульфата натрия (0,3-0,5 %) вызывают полное разрушение чехла отростка, и он исчезает как морфологическая структура. Капсид головки и стержень отростка остаются неразрушенными. Даже повышением концентрации детергента до 1 % не удается вызвать распад стержня и капсида головки на отдельные субъединицы. Таким образом, при воздействии додецилсульфата натрия наиболее лабильной белковой структурой у фага № 1 является чехол отростка (Тихоненко, 1968).

По литературным данным фаг № 1 *Bacillus mycoides* при воздействии многократного замораживания и оттаивания оказался малоустойчивым устойчив к этому воздействию. Сразу же после первого замораживания и оттаивания происходит разрушение частиц фага, которое выражается в освобождении ДНК из голов-

ки и сокращении чехла отростка. Часто наблюдаются частицы, у которых чехол сползает со стержня (Тихоненко, 1968).

Своеобразная реакция на температурное воздействие обнаруживается у фагов *Bacillus mycoides* № 1 и Н19. Эти фаги довольно чувствительны к нагреванию. При температуре 50-60 °С начинается интенсивное разрушение частиц фага № 1, сопровождающееся выходом ДНК в окружающую среду. В препаратах видны переплетения тонких нитей ДНК, обрамляющих сетку. Чехол отростка у всех частиц сокращается, и головки выглядят пустыми. Такие же изменения наблюдаются и у частиц фага Н19. При 70 °С чехол отростка фага № 1, как правило, начинает сползать со стержня и постепенно разрушаться. Некоторые частицы фага полностью лишаются чехла и состоят из капсида и стержня отростка. Дальнейшее повышение температуры до 80 °С сопровождается интенсивным распадом структуры чехла отростка. Вместе с чехлом происходит разрушение базальной пластинки отростка. Повышение температуры до 90 °С вызывает более интенсивное разрушение капсида головок, и они больше не обнаруживаются в препарате морфологически, в то время как стержни отростка сохраняются. Однако и они в процессе обработки претерпевают сильное изменение, которое наиболее четко обнаруживается при нагревании суспензии фагов № 1 и Н19 до 100 °С. При температуре 90-100 °С структура стержня отростка не только не разрушается, а наоборот, начинает постепенно удлиняться. Эффект удлинения структуры стержня наиболее сильно выражен у фага № 1. Если при нагревании суспензии фага № 1 до 90 °С в препаратах появляются образования, по строению и диаметру соответствующие стержню фага, но превышающие примерно в два раза длину нормального стержня, то при 100 °С стержнеподобные структуры очень сильно удлиняются, иногда достигая нескольких микрон. Кроме того, эти структуры обнаруживают тенденцию агрегировать друг с другом по всей длине, образуя пучки. При нагревании суспензии фага № 1 и Н19 до 90-100 °С происходит распад стержней как на короткие фрагменты, так и на отдельные субъединицы. При остывании суспензии морфологические субъединицы стержня, по-видимому, самоорганизуются в полые трубки разной длины (полистержни), которые по строению и диаметру тождественны стержню отростка.

Различная длина возникающих стержнеподобных структур обусловливается, по всей вероятности, бесконтрольным процессом самоорганизации, который определяется электростатическими и термодинамическими свойствами идентичных субъединиц, приводящими их к полимеризации или кристаллизации (Тихоненко, 1967).

Итак, различные химические и физические воздействия вызывают у фагов деструктивные изменения, выражающиеся, в первую очередь, в разделении белкового и нуклеинового компонентов. Затем происходит постепенное разрушение белковых компонентов фага. Одни разрушаются при более мягких воздействиях, для разрушения других необходимы более жесткие условия обработки. Белки, чувствительные к определенному воздействию, по всей вероятности, распадаются на мелкие структурные единицы, в то время как устойчивые белки разрушаются на более крупные фрагменты.

1.7. РАСПРОСТРАНЕНИЕ И ПРИМЕНЕНИЕ БАЦИЛЛЯРНЫХ ФАГОВ

В природных условиях фаги встречаются в тех местах, где есть чувствительные к ним бактерии. Чем богаче тот или иной субстрат (почва, вода, выделения человека и животных и т. д.) микроорганизмами, тем в большем количестве в нем встречаются соответствующие фаги. Так, фаги, лизирующие клетки всех видов почвенных микроорганизмов, находятся в почвах. Особенно богаты фагами черноземы и почвы, в которые вносились органические удобрения. Фаги, активные против разных видов кишечной, дизентерийной, тифозной и паратифозной палочек, часто встречаются в содержимом кишечника человека и животных, сточных водах и загрязненных водоемах. Фаги фитопатогенных микроорганизмов успешнее всего выделяются из остатков растений, пораженных этими микробами (Красильников, 1974).

Высокие концентрации фагов, сравнимые с таковыми в морских средах обитания, были показаны и для наземных экосистем. Например, наполненный корнями слой почвы на полях, засеянных сахарной свеклой, содержит 10^7 фаговых частиц на грамм, согласно результатам трансмиссионной электронной микроско-

пии (Ashelford, 2003), а реконструирующие данную среду эксперименты позволили предположить, что эта цифра по техническим причинам занижена почти в десять раз. Фаги непатогенных бактерий, например видов рода *Bacillus*, легко выделить из почвы, компоста, силоса и гниющей соломы, что предполагает тесную связь данного фага с растениями (Sharp et al., 1986). Эти фаги очень разнообразны и характеризуются штаммовой специфичностью внутри видов *Bacillus*.

В большинстве случаев технология фагового дисплея используется в медицинской и фармацевтической областях, причем фаговые системы применяются исключительно для идентификации пептида с нужными характеристиками связывания. Клонированный ген переносят затем в высокоэффективную систему экспрессии, позволяющую наработать большие количества белка для практических целей. Для использования в системах детекции эти молекулы должны быть каким-то образом помечены, чтобы акты связывания можно было обнаружить, и измерить их количество. Этот подход был успешно использован для создания целого ряда тест-систем, включая наборы для разработки анализа для специфической индикации присутствия спор бактерий рода *Bacillus* (Zhou et al., 2002).

Turnborough (2003) показал, что как очищенный меченый пептид, так и меченые пептид-экспонирующие фаговые частицы могут быть успешно использованы для специфического обнаружения спор *Bacillus* с помощью люминесцентной микроскопии. Однако было отмечено, что сложная структура частицы нитчатого фага мешает эффективному связыванию с поверхностью некоторых типов спор, что может ограничивать возможности прямого использования рекомбинантных фаговых частиц в такого рода анализе (цит. по Каттер, 2012).

Часто используемый в санитарной микробиологии быстрый тест на наличие бактериальной контаминации образца – это детекция высвобождаемой при лизисе бактерий АТФ с помощью люциферазы светлячка (Stanley, 1989). Линейная зависимость между числом гидролизуемых молекул АТФ и количеством испускаемого ферментом света позволяет определить точное содержание АТФ в образце. Поскольку количество АТФ в бактериальной клетке при определенных условиях роста остается достаточно

постоянным (около 10^{-15} г на клетку), количество излучаемого света можно считать пропорциональным числу бактериальных клеток, находящихся в образце. Обычно для этого анализа используются неспецифические агенты, лизирующие бактерии, поэтому этот метод позволяет оценить лишь общий уровень микробной контаминации образца, нежели выявить конкретных патогенных бактерий в нем. При использовании вместо химического лизирующего агента бактериофагов или рекомбинантных фаговых эндолизинов тест приобретает необходимую специфичность. Schuch et al. (2002) описали основанный на освобождении АТФ метод выявления спор *Bacillus anthracis*. В качестве лизирующего агента использовали клонированный белок-лизин. Метод позволял обнаруживать споры в образце в течение 10 минут с момента индукции прорастания. При 60-минутной инкубации с момента добавления лизина удавалось детектировать от 100 спор в образце. По причине высокого уровня фона порог определения при анализе продуктов питания этим методом составляет на практике около 10^4 клеток, и, очевидно, такие большие количества патогенных бактерий редко присутствуют в пищевых образцах (цит. по Каттер, 2012).

Применяемые для фагопрофилактики и фаготерапии инфекционных болезней бактериофаги как биопрепараты представляют собой фильтраты полностью лизированной тем или иным фагом соответствующей бульонной культуры бактерии, расфасованные во флаконы или ампулы с обозначением вида фага, его титра, срока годности, учреждения, выпустившего препарат, а иногда и способа его применения.

Впервые различные фаги применили д'Эрелль и другие исследователи при кишечных инфекциях у человека. Довольно широко фаги применяют в хирургической и акушерско-гинекологической практике при инфекционных процессах, вызванных стафилококками, стрептококками, анаэробными клостридиям и другими бактериям, а также в офтальмологии и стоматологии (Ревенко, 1968).

В настоящее время вопросами фаготерапии занимаются во многих лабораториях мира, о чем свидетельствуют публикации последних лет. Их анализ позволяет отметить следующее. Далеко не каждый фаг может быть использован в лечебных целях.

Этой точки зрения придерживается большинство специалистов в области фаготерапии. Конструированию лечебного препарата должны предшествовать подробные исследования биологических, иммунохимических и физико-химических свойств фагов. С учетом этих характеристик производится скрининг наиболее перспективных для лечения бактериальных вирусов (Жиленков, 2002; Попов, 2003).

Еще во второй половине XX века Н. И. Смирнова (1968) исследовала фаги против энтомопатогенных бактерий – возбудителей американского и европейского гнильцов пчел (ларвейного, альвейного фагов), которые были выделены из больных личинок пчел. Препараты альвейного и ларвейного бактериофагов применяли на пасеках Рязанской, Тульской и Харьковской областей, Краснодарского края, Башкирской АССР в виде подкормки с сахарным сиропом (100 мл фага на 1 л сиропа). На одну пчелосемью скармливали по 0,8-1,0 л фагового сиропа. Препарат давали три раза через 3 дня. В результате фагопрофилактики заболеваемость пчелиных семей европейским гнильцом снизилась в 4,0-4,4 раза по сравнению с контрольными семьями и с предыдущим сезоном, причем фаг как профилактическое средство был значительно эффективнее биомицина. В качестве лечебных препаратов альвейный и ларвейный фаги применяли из расчета соответственно 100 и 50 мл на 1 л сахарного сиропа 3 раза через 5 дней по 0,8-1,0 л па пчелосемью в течение всего летнего сезона. Лечебная эффективность фагов приближалась к таковой от применения биомицина, пенициллина. Таким образом, было доказано, что альвейный и ларвейный фаги можно использовать в качестве профилактических и лечебных препаратов при гнильцовых заболеваниях пчел.

Интенсивное исследование литических ферментов бактериофагов привлекло внимание клиницистов к их апробации в качестве лечебных агентов. В обращение был введен термин «энзиобиотики» (ферментативные антибиотики, как правило, фагового происхождения). Было установлено, что ПЛФ PlyG, полученный из фага у *Bacillus anthracis*, способен лизировать как взрослые клетки, так и споры *Bacillus anthracis*. При обсуждении перспектив терапевтического использования ПЛФ бактериофагов потенциальное беспокойство вызывает опасность выработки ней-

трализирующих антител. В отличие от антибиотиков, которые в подавляющем большинстве – неиммуногенные малые молекулы, ферменты могут стимулировать иммунный ответ при эпизодическом и систематическом приеме. Однако в случае грамположительных бактерий ПЛФ осуществляют свое действие очень быстро и за отведенный промежуток времени успевают оказать терапевтический эффект. Но даже в этом случае для излечения от инфекции требуются множественные инъекции или постоянная инфузия фермента в организм в течение некоторого времени (Мирошников, 2006).

С использованием умеренного фага 105 Кренева Р.А. (1985) впервые показала существование у *Bacillus subtilis* склонной к ошибкам, мутагенной, зависящей от ряда *rec* – генов *sos* -репаративной системы, индукция которой при УФ-облучении клеток или тепловой обработке мутанта *tsi-23* приводит к увеличению уровня УФ-мутагенеза у фага. Эта система оказалась сравнительно неспецифичной, так как она стимулирует мутагенное действие на внеклеточный фаг «репаративных» мутагенов: УФ-излучения и азотистой кислоты. В то же время она не активна в отношении фиксации мутаций, индуцированных «репликативными» мутагенами (O-метилгидроксиламином, гидроксиламином). Используя трансформирующую ДНК, она обнаружила также, что эта мутагенная система действует не только на внехромосомную ДНК фага 105, но и участвует в фиксации УФ- и индуцированных мутаций в самой бактериальной хромосоме, в которую предмутацционные повреждения попали при интеграции поврежденной *in vitro* до ДНК.

Мутагенная *sos* – система *Bacillus subtilis* напоминает соответствующую ветвь *sos*-системы репарации *E. coli*, но является, по-видимому, менее мощной, так как максимальный уровень с-мутаций у фага 105, облученного УФ-светом, УФ-лучами и обработанного не несколько ниже, чем у инактивированного этими же агентами фага X. Кроме того, у *Bacillus subtilis* в УФ-облученных клетках *uvr+* эта система появляется и исчезает быстрее, чем у *E. coli*. Возможно, именно более преходящий характер УФ-индукции этой системы у *Bacillus subtilis* и объясняет антимуtagenный эффект предварительного УФ-облучения клеток сенной палочки, в то время как у *E. coli* предварительное

УФ-облучение заметно увеличивают потенциал для фиксации мутаций, вызванных реферативными мутагенами. Несмотря на эти различия, она утверждает, что гипотеза Сикара об отсутствии мутагенных *sos*-систем у трансформируемых видов бактерий является неправильной.

Анализируя вышеизложенное, необходимо отметить, что анализ литературных данных, представленных выше, свидетельствует, что фаги бактерий рода *Bacillus* представляют интерес исследователей в различных областях биологии.

ГЛАВА 2 СИБИРЕЯЗВЕННЫЕ БАКТЕРИОФАГИ

2.1. ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ

Бактерии *Bacillus anthracis* – возбудители острого инфекционного заболевания животных и людей - на протяжении длительного периода вызывают у исследователей неизменный интерес, обострившийся после прецедента использования спор данного микроорганизма в качестве агента биотерроризма в США в 2001 году (Попов, 2003 (а), 2006).

Помимо возможности применения возбудителя сибирской язвы в качестве агента биотерроризма, существует постоянная угроза проявления многочисленных стойких почвенных очагов данной инфекции (Bush, 2001).

Общность филогенетического происхождения представителей группы *Bacillus cereus*, почти полная гомология генома и схожесть некоторых фенотипических признаков, проявление которых подвержено внутривидовой вариабельности, – все это в некоторых случаях делает идентификацию *Bacillus anthracis* затруднительной даже при использовании самого современного арсенала бактериологических, биохимических и молекулярно-генетических методов исследования (Селянинов, 2008)

Оценка надежности различных тестов идентификации сибиреязвенного микроба требует изучения вариабельности фенотипических признаков, лежащих в их основе не только на уровне штаммов, но и внутри их популяций. Это и диктует необходимость разработки более чувствительных методов определения различий в фенотипических свойствах отдельных составляющих популяции (Ezzell, 1990).

Сложность генетической идентификации *Bacillus anthracis* обусловлена значительной гомологией геномов представителей группы *Bacillus cereus* и наличием четырех различных вариантов плазмидного состава штаммов возбудителя сибирской язвы. Объективная и достоверная молекулярно-генетическая идентификация сибиреязвенного микроба и его дифференциация от других представителей группы *Bacillus cereus* может осуществляться лишь при использовании праймеров как к плазмидным, так и к специфическим хромосомным локусам. Отсутствие мультиплексной амплификационной тест-системы, способной осуществлять детекцию штаммов сибиреязвенного микроба с любым плазмидным составом и надежно дифференцировать их от близкородственных сапрофитов, снижает роль быстрого и высокочувствительного метода ПЦР в исследовании проб материала от больных людей, животных и из объектов внешней среды на наличие *Bacillus anthracis* (Thome, 1985, Цыганкова, 2007).

По-прежнему находят применение и традиционные методы дифференциации *Bacillus anthracis* от спорообразующих почвенных бацилл. Как известно, бактериофаги *Bacillus anthracis* распространены довольно широко. Они обнаружены в почве, сточных водах, испражнениях животных, длительно хранящихся музейных сибиреязвенных культурах. Феномен фаголизиса – растворения бактерий под воздействием фага – используют для дифференциации возбудителя сибирской язвы от анаэробных сапрофитных бацилл (Бакулов, 2001, Еременко, 2009).

В настоящее время 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 используют фаги «К-ВИЭВ», «Гамма-МВА» и «Fah-ВНИИВВиМ», фаг «Гамма А-26» биофабричного производства (Маринин, 2007).

В экспериментах по определению фагочувствительности культур возбудителя сибирской язвы вирулентных и вакцинных штаммов использовали вышеназванные фаги, а также специально изготовленные в ВГНКИ серии этих фагов (Н.Г. Ипатенко, 1987, 1989, 1995, 2000). Из 244 эпизоотических сибиреязвенных штаммов 95% были чувствительными к коммерческим фагам «К-ВИЭВ» и «Гамма-МВА» и 97% к фагу «Fah-ВНИИВВиМ»; 11

оказались устойчивыми к фаголизису. Бактериофаги, изготовленные в ВГНКИ, лизировали 239 эпизоотических штаммов (98 %). Вакцинные сибиреязвенные штаммы были чувствительными ко всем испытуемым фагам (100 %). Испытуемые фаги не лизировали культуры аэробных сапрофитных бацилл (23 штамма). Следовательно, этот метод можно использовать для дифференциальной диагностики сибирской язвы от родственных бацилл при лабораторных исследованиях.

Несмотря на то, что видоспецифические сибиреязвенные бактериофаги широко используются для идентификации *Bacillus anthracis*, вопросы внутривидового типирования изучены недостаточно. А.И. Бакулов с соавт. (2001) изучали чувствительность 89 штаммов *Bacillus anthracis*, выделенных от людей, крупного и мелкого рогатого скота, лошадей, а также из кожевенного сырья и сточных вод сырьеперерабатывающих предприятий, к 10 видоспецифическим бактериофагам («Гамма», Ф4, Ф9, Ф28, Ф47, Ф47/1, Ф49, Ф56, Ф59, ФЮИ). Изучаемые штаммы были разделены на 3 группы: 69 (77,53%) штаммов – чувствительные ко всем бактериофагам; 3 (3,37%) штамма – устойчивые ко всем бактериофагам; 17 (19,1%) штаммов – гетерогенные по чувствительности к бактериофагам (П.Г. Васильев, Ю.И. Иванов и др., 1998). Таким образом, установлена принципиальная возможность внутривидового типирования *Bacillus anthracis* по спектру чувствительности к видоспецифическим сибиреязвенным бактериофагам (Бакулов с соавт., 2001).

Эффективность фаговых лизинов – бактериологических ферментов в уничтожении патогенных бактерий означает, что они могут быть ценным инструментом для контроля над бактериями – агентами биологического оружия. Для выявления эффективности данного подхода Schuch et al. (2002) идентифицировали литический фермент фага гамма, специфичного к *Bacillus anthracis* (Watanabe et al., 1975). В дополнение они клонировали ген лизина фага «Гамма» и идентифицировали примерно 700 н.п. ОРС (открытой рамки считывания), кодирующей продукт, размером 26 кДа, очень похожий по размеру и функциям на различные фаговые лизины бактериофагов таких групп микроорганизмов, как *Bacillus*, *Listeria* и *Mycobacteria*. Гамма-лизин, описанный как PlyG, был очищен до однородного состояния с помощью двустадий-

ной хроматографии, и затем была изучена *in vitro* и *in vivo* его активность против штамма возбудителя сибирской язвы, чувствительного к «Гамма-фагу». Было обнаружено, что всего лишь 100 ед. PlyG вызывали (через три секунды после начала воздействия) снижение в 5000 раз числа жизнеспособных клеток в суспензии *Bacillus anthracis*, содержащей 10^7 КОЕ/мл. Такая летальная активность была обнаружена в жидкой питательной среде, в фосфатном буфере и в меньшей, но все же, в значительной степени, в крови человека. Впоследствии обнаружено, что этот фермент активен против десяти штаммов *Bacillus anthracis* из различных клональных типов, выделенных по всему миру. Кроме того, лизин «Гамма-фага» был активен против 5 мутантных штаммов *Bacillus anthracis* с отсутствующими либо капсулой, либо токсин-содержащей плазмидой, но неактивен против спор.

В последних исследованиях было убедительно доказано, что на прорастание эндоспор *Bacillus anthracis* оказывают влияние различные вещества (например, L-аланин, тирозин и аденозин), некоторые из которых (например, L-аланин), могут инициировать прорастание эндоспор (Hills, 1949; Ireland, 2002; Titball, 1987). Таким образом, возможно, что сочетание применения *in vitro* агентов, индуцирующих прорастание спор, и PlyG может быть использовано для уничтожения новых вегетативных клеток, образовавшихся в результате прорастания эндоспор. Исследования, связанные с вирулентными штаммами *Bacillus anthracis*, ограничены сравнительно малым числом лабораторий с соответствующей инфраструктурой (то есть имеющих право работать с особо опасными инфекциями и возбудителями первой группы патогенности, имеющих сертификат уровня BSL 3). Поэтому генетически близкие патогенам виды, такие как *Bacillus cereus*, часто используются для проведения предварительных исследований, для оценки степени эффективности различных антимикробных агентов против *Bacillus anthracis*. Прежде чем определить эффективность PlyG при лечении инфекций *Bacillus anthracis in vivo*, Каттер Э. (2012) использовал летальный для мышей штамм *Bacillus cereus*, обладающий такой же чувствительностью к гамма-фагу, как и дикий изолят *Bacillus anthracis*. Девять из десяти мышей, инфицированных интраперитонеально суспензией *Bacillus cereus* с концентрацией 10^7 КОЕ/

мл, умерли от сепсиса в течение четырех часов после введения. И напротив, 13 из 18 (72%) инфицированных бактериями мышей, которых лечили введением через 15 минут после инфицирования 100 мг PlyG, выжили, а смерть трех из пяти погибших животных была отсрочена более чем на 24 часа. Увеличение дозы или увеличение количества введений фермента, возможно, могут дать лучший результат. Совместная работа по определению эффективности PlyG *in vivo* против *Bacillus anthracis* в данный момент осуществляется нами с помощью сертифицированной (уровень BSL-3) лаборатории.

2.2. ХАРАКТЕРИСТИКА СИБИРЕЯЗВЕННЫХ ФАГОВ

К настоящему времени описаны несколько видов фагов *Bacillus anthracis*, которые отнесены к трем семействам по классификации H-W. Ackermann (1974).

Бактериофаги **CP-51** и **CP-54** принадлежат семейству *Myoviridae*. Вирион каждого из этих бактериальных вирусов включает изометричную головку диаметром около 120-122 нм и сокращающийся хвостовой отросток длиной 198-200 нм (A1-морфотип). Аппарат адсорбции фагов – базальная пластинка и фибриллы длиной около 40 нм. Литическая активность CP-51 и CP-54 быстро снижается при хранении препаратов. В геноме (ДНК) фага CP-51 тимин полностью замещен на 5-hydroxymethyluracil.

Гамма-фаг отнесен к семейству *Siphoviridae* и морфотипу B1. Поданным японских исследователей, диаметр икосаэдрической головки равен 52 нм, длина несокращающегося отростка – 185 нм. В работе H-W. Ackermann (1974) констатируется, что вирион включает головку диаметром 59 нм и хвостовой отросток длиной 217 нм. Содержание ГЦ-пар в геноме фага составляет 36 мол.%. В состав вириона входят десять белков с молекулярной массой от 12 до 140 kd (Watanabe, 1975).

Бактериофаг AP50 – липидсодержащий бактериальный вирус с гексагональным вирионом без хвостового отростка (семейство *Tectiviridae*). Диаметр вириона составляет 80 нм. В отличие от других известных бациллярных фагов, геном AP50 представлен рибонуклеиновой кислотой (РНК). Показано, что в состав оболочки

AP50 входят фосфатидилэтаноламин, фосфатидиловая кислота (phosphatide acid), кардиолипин и фосфатидилглицерин. Инфекционный процесс в системе фаг-клетка характеризуется продолжительным латентным периодом (55 мин) и высокой урожайностью, составляющей 310 частиц на одну клетку (Nagy, 1976).

Следует отметить, что сибиреязвенные бактериальные вирусы были открыты еще в 30-е годы XX века. Тем не менее, до настоящего времени ни один го фагов не исследован детально в соответствии со всеми рекомендациями Международного комитета по таксономии вирусов (Ackermann, 1974).

Бактериофаг *Bacillus anthracis* OZR-1, депонирован 15.01.2007 г. в коллекции микроорганизмов ОАО «Институт инженерной иммунологии» (Россия, 142380, Московская область, Чеховский район, пос. Любучаны), регистрационный номер Jп-08. Штамм бактериофага OZR-1 получен из лизогенной культуры *Bacillus cereus* штамм ИИИ-32 методом индукции профага воздействием ультрафиолетового облучения с помощью облучателя Viber Lourmat при длине волны 260 нм в течение 105 секунд по методу Lwoff A. (цит по Мейнелл, 1967).

Морфологические признаки. Головка 51-53 нм, хвостовой отросток 20-40 нм. На газоне чувствительных бактериальных культур *Bacillus anthracis* фаг OZR-1 образует круглые, прозрачные пятна лизиса 2 мм в диаметре. Центр прозрачный, край четкий, вторичный рост отсутствует.

Тип нуклеиновой кислоты штамма фага - ДНК.

Физико-химические свойства. Фаг не инактивируется при нагревании суспензии в течение 30 мин при 56 °С. Пределы допустимых значений рН, при которых литическая активность фага не изменяется, составляют 6,4-8,7. Устойчив к облучению ультрафиолетом в течение 5 мин при длине волны 260 нм.

Литический спектр бактериального вируса. Для оценки круга штаммов-хозяев фага была использована коллекция вакцинных штаммов *Bacillus anthracis* и близкородственных микроорганизмов, всего 32 штамма: *Bacillus anthracis* СТИ-1, *Bacillus anthracis* Sterne 34F2, *Bacillus anthracis* 2-я вакцина Ценковского, пять штаммов *Bacillus thuringiensis*, 3 штамма *Bacillus brevis*, 3 штамма *Bacillus subtilis*, 11 штаммов *Bacillus cereus*, *Bacillus antracoides* 217, *Bacillus megaterium* 1412. Бактериофаг OZR-1 лизирует вакцин-

ные сибиреязвенные штаммы *Bacillus anthracis* СТИ-1, *Bacillus anthracis* Ценковского II, *Bacillus anthracis* Sterne 34F2. Диапазон специфичности – лизирует *Bacillus anthracis*.

Бактериальный штамм для поддержания и размножения бактериофага – вакцинный штамм *Bacillus anthracis* СТИ-1 (депонирован 01.10.1993 г. в коллекции микроорганизмов ОАО «Институт инженерной иммунологии» (Россия, 142380, Московская область, Чеховский район, пос. Любучаны), регистрационный номер 1/10-93).

Оптимальные условия размножения. Штамм фага размножается на чувствительной культуре *Bacillus anthracis* СТИ-1 в жидкой и на плотной питательных средах, включающих 1,5 % панкреатического перевара мяса (ГРМ-бульон), при температуре $35 \pm 0,5$ °С, вызывая при этом просветление среды после 4-6-часовой инкубации, а на простом питательном агаре, образуя негативные прозрачные колонии правильной формы после 16-18-часовой инкубации.

Способ размножения: при воспроизведении фага в клетке-хозяине продолжительность латентного периода составляет 30-35 мин, урожайность – 200-220 частиц на одну клетку.

Условия хранения. Бактериофаг *Bacillus anthracis* OZR-1 сохраняет литические свойства в течение 3 лет хранения при температуре (4-6)°С в лиофилизированном состоянии в герметически закрытой ампуле (Попов и др., 2006).

Бактериофаг *Bacillus anthracis* Ф-2 депонирован 05.02.2007 г. в коллекции микроорганизмов ОАО «Институт инженерной иммунологии» (Россия, 142380, Московская область, Чеховский район, пос. Любучаны), регистрационный номер Jn-09.

Штамм бактериофага Ф-2 получен из сточных вод г. Пущино.

Морфологические признаки. Головка икосаэдрической формы 82-94 нм, сокращающийся хвостовой отросток 158-162 нм. На газоне чувствительных бактериальных культур *Bacillus anthracis* фаг Ф-2 образует круглые, прозрачные пятна лизиса диаметром 2-3 мм. Центр прозрачный, край четкий, вторичный рост отсутствует.

Тип нуклеиновой кислоты штамма фага – ДНК.

Физико-химические свойства. Фаг не инактивируется при нагревании суспензии в течение 30 мин при 56 °С. Пределы значе-

ний рН, при которых литическая активность фага не изменяется, составляют 6,0-8,5. Устойчив к облучению ультрафиолетом в течение 10 мин при длине волны 260 нм.

Литический спектр бактериального вируса. Для оценки круга штаммов-хозяев фага была использована коллекция вакцинных штаммов *Bacillus anthracis* и близкородственных микроорганизмов, всего 32 штамма: *Bacillus anthracis* СТИ-1, *Bacillus anthracis* Sterne 34F2, *Bacillus anthracis* 2-я вакцина Ценковского, 5 штаммов *Bacillus thuringiensis*, 3 штамма *Bacillus brevis*, 3 штамма *Bacillus subtilis*, 11 штаммов *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracoides* 217, *Bacillus megaterium* 1412. Бактериофаг Ф-2 лизирует сибиреязвенные штаммы: *Bacillus anthracis* СТИ-1, *Bacillus anthracis* Sterne 34F2, *Bacillus anthracis* 2-я вакцина Ценковского. Диапазон специфичности - лизирует *Bacillus anthracis*.

Бактериальный штамм для поддержания и размножения бактериофага – вакцинный штамм *Bacillus anthracis* СТИ-1.

Оптимальные условия размножения. Штамм фага размножается на чувствительной к нему культуре *Bacillus anthracis* СТИ-1 в жидкой и на плотной питательных средах, включающих 1,5 % панкреатического перевара мяса (ГРМ-бульон), при температуре $37 \pm 0,5$ °С, вызывая при этом просветление среды после 6-8 часовой инкубации, а на плотной питательной среде образуя негативные прозрачные колонии правильной формы после 16-18-часовой инкубации.

Способ размножения: при воспроизведении фага в клетке-хозяине (штамм СТИ-1) продолжительность латентного периода составляет 40-50 мин, урожайность – 130-160 частиц на одну клетку.

Условия хранения. Бактериофаг Ф-2 сохраняет литические свойства в лиофильно высушенном состоянии в герметически закрытой ампуле при температуре хранения 4-6 °С в течение 3 лет. Периодичность пересевов 3 года (Попов и др., 2006).

Бактериофаг *Bacillus anthracis* ФАУТ депонирован 19.02.2007 г. в коллекции микроорганизмов ОАО «Институт инженерной иммунологии» (Россия, 142380, Московская область, Чеховский район, пос. Любучаны), регистрационный номер Jn-10.

Штамм бактериофага *Bacillus anthracis* ФАУТ получен из лизогенной культуры *Bacillus cereus* штамм ИИИ-47 методом ин-

дукции профага воздействием ультрафиолетового облучения с помощью облучателя Viber Lourmat при длине волны 260 нм в течение 70 с по методу Lwoff A.

Морфологические признаки. Головка икосаэдрической формы 80-82 нм, хвостовой отросток 270-280 нм. На газоне чувствительных бактериальных культур *Bacillus anthracis* фаг ФАУТ образует круглые, прозрачные пятна лизиса 2 мм в диаметре. Центр прозрачный, край четкий, вторичный рост отсутствует.

Тип нуклеиновой кислоты штамма фага – ДНК.

Физико-химические свойства. Фаг не инактивируется при нагревании суспензии в течение 30 мин при 56 °С. Пределы значений рН, при которых литическая активность фага не изменяется, составляют 6,0-8,0. Устойчив к облучению ультрафиолетом в течение 10 мин при длине волны 260 нм.

Литический спектр бактериального вируса. Для оценки круга штаммов-хозяев фага была использована коллекция вакцинных штаммов *Bacillus anthracis* и близкородственных микроорганизмов, всего 32 штамма: *Bacillus anthracis* СТИ-1, *B. anthracis* Sterne 34F2, *Bacillus anthracis* 2-я вакцина Ценковского, 5 штаммов *Bacillus thuringiensis*, 3 штамма *Bacillus brevis*, 3 штамма *Bacillus subtilis*, 11 штаммов *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracoides* 217, *Bacillus megaterium* 1412. Бактериофаг *Bacillus anthracis* ФАУТ лизирует сибиреязвенные штаммы: *Bacillus anthracis* СТИ-1, *Bacillus anthracis* Sterne 34F2, *Bacillus anthracis* 2-я вакцина Ценковского. Диапазон специфичности: лизирует *Bacillus anthracis*.

Бактериальный штамм для поддержания и размножения бактериофага вакцинный штамм *Bacillus anthracis* СТИ-1.

Оптимальные условия размножения. Штамм фага размножается на чувствительной культуре *Bacillus anthracis* СТИ-1 в жидкой и на плотной питательных средах, включающих 1,5 % панкреатического перевара мяса (ГРМ-бульон), при температуре 33±0,5 °С, вызывая при этом просветление среды после 6-8-часовой инкубации, а на простом питательном агаре образуя негативные прозрачные колонии правильной формы после 16-18-часовой инкубации.

Способ размножения: при воспроизведении фага в клетке-хозяине продолжительность латентного периода составляет 48-60 мин, урожайность – 140-160 частиц на одну клетку.

Условия хранения. Бактериофаг *Bacillus anthracis* ФАУТ в лиофилизированном состоянии в герметически закрытой ампуле сохраняет литические свойства в течение 3 лет хранения при температуре 4-6 °С. Периодичность пересевов 3 года (Попов и др., 2006).

Бактериофаг *Bacillus anthracis* R/D хранится в официальной коллекции музея микроорганизмов – депозитарии России при ФГУН ГНЦ ПМБ (Федеральное государственное учреждение науки Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии) под номером Ph-6.

Морфологические признаки. Бактериофаг *Bacillus anthracis* R/D-Ph-6 характеризуется следующими свойствами: имеет икосаэдрическую головку диаметром 55 нм, не имеет хвостового отростка и принадлежит к морфотипу С (Askermann, 1987). В литературе не описаны сибиреязвенные фаги аналогичной морфологии. На газоне культуры *Bacillus anthracis* СТИ-1 фаг формирует крупные прозрачные негативные колонии диаметром 2-3 мм.

Тип нуклеиновой кислоты штамма фага – ДНК.

Физико-химические свойства. Бактериофаг *Bacillus anthracis* R/D-Ph-6 не инактивируется при температуре 55 °С в течение 45 минут. Литическая активность фага не изменяется в пределах рН 5,7-8,0. Фаг устойчив к антибиотику хинозолу.

Биологические свойства. Одиночный цикл размножения характеризуется продолжительностью минимального латентного периода, равного 50-60 мин. Урожайность варьирует от 70-150 фаговых частиц на одну инфицированную клетку. Адсорбционная способность фага: при температуре 37 °С за 10 минут адсорбируется 98 % фага.

Литический спектр бактериального вируса. Спектр литического действия: лизирует 99 % изученных сибиреязвенных штаммов и не проявляет литической активности к 160 штаммам близкородственных бацилл: *Bacillus cereus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus anthracoides*, *Bacillus mesentericus*, *Bacillus brevis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus thuringiensis*. Бактериофаг *Bacillus anthracis* R/D-Ph-6 стабильно сохраняет литическую активность при длительном хранении (3 года). Осмотический шок инактивирует 35 % фаговых частиц.

Способ размножения. Размножается на клетках *Bacillus anthracis* на плотной питательной среде ГРМ-агаре (по ФС42-3377-97, ТУ-9398-020-78095-326-2006) и в жидкой питательной среде ГРМ-бульоне (по ФС 42-3278-97, ТУ-9398-021-78095-326-2006).

Способ хранения. Суспензия фага R/D-Ph-6 хранится в жидком виде 2 года и лиофильном (сухом) виде при температуре (+4 °С - +8 °С) в течение 3-х лет (Дятлов с соавтр., 2007).

Бактериофаг диагностический сибиреязвенный «Гамма А-26» жидкий разработан в ФГУЗ СтавНИПЧИ, представляет собой стерильный фильтрат фаголизата бульонной культуры сибиреязвенного штамма *Bacillus anthracis* 228/8, содержащий взвесь частиц фага «Гамма А-26», обладающих лизирующим действием в отношении штаммов *Bacillus anthracis*. Выпускается ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора» в ампулах (1 мл) по 10 шт.

Морфологические признаки. Размер литического пятна бактериофага «Гамма А-26» – 10 мм.

Физическо-химические свойства. Препарат сибиреязвенного бактериофага «Гамма А-26» имел рН 6,6 и содержал $4,7 \times 10^9$ фаговых частиц/мл.

Известно, что существующие сибиреязвенные бактериофаги различаются по широте спектра лизируемых ими штаммов возбудителя сибирской язвы, а также по специфичности их действия. Феномены чувствительности и фагорезистентности представляют интерес не только с точки зрения надежности теста фаголизабельности при идентификации сибиреязвенных культур, но и как основа метода выделения штаммов *B. anthracis* с разной чувствительностью к действию бактериофагов.

В строго контролируемых опытах использовали чистые культуры *Bacillus anthracis* 47 штаммов и гетерологичные микроорганизмы: *Bacillus cereus* (25 штаммов), *Bacillus subtilis* (15 штаммов), *Bacillus thuringiensis* (12 штаммов), *Bacillus megaterium* (10 штаммов), *Bacillus anthracoides* (7 штаммов) и *Bacillus mesentericus* (3 штамма). Испытуемые штаммы были получены из коллекций «ГКПМ» ГИСК им. Л.А. Тарасевича, «ГКПБ» ФГУЗ «Микроб», «ГКПМ» ФГУН ГНЦ ПМБ, коллекции микроорганизмов ФГУЗ ИркутскНИПЧИ.

Контрольным препаратом служил бактериофаг диагностический сибиреязвенный жидкий «Fah ВНИИВВиМ», производства РАСН ГНУ ВНИИ ветеринарной вирусологии и микробиологии. Бактериофаги были отконтролированы в ФГУН «ГИСК им. Л.А. Тарасевича». Препараты оценивали по физическим свойствам (внешний вид, рН), специфической активности, специфичности и воспроизводимости. Представленные серии бактериофагов соответствовали требованиям нормативной документации. По физическим свойствам испытуемый и контрольный препараты представляли собой прозрачную жидкость светло-желтого цвета.

Сводные данные о диагностической ценности опытного и контрольного бактериофагов представлены в таблице 1. В результате проведенных сравнительных испытаний на четырех базах (ФГУН ГИСК им. Л.А. Тарасевича, ФГУЗ РосНИПЧИ «Микроб», ФГУЗ ИркутскНИПЧИ, ФГУП ГНЦ ПМБ, Оболенск) показана диагностическая равноценность испытуемого бактериофага сибиреязвенного «Гамма А-26» и препарата сравнения бактериофага сибиреязвенного «Fah ВНИИВВиМ». Установлено, что бактериофаг «Гамма А-26» лизировал 97,9 % штаммов *Bacillus anthracis* из 47 исследованных. Устойчивым к бактериофагу был один штамм *Bacillus anthracis* ПС-4от. С помощью препарата сравнения процент правильно идентифицированных чистых культур штаммов *Bacillus anthracis* к числу исследованных составил 89,4 %.

Табл. 1. Сводные данные о диагностической ценности опытного и контрольного бактериофагов

Показатели	Количество штаммов	Результаты исследований	
		бактериофаг диагностический сибиреязвенный «Гамма А-26»	сибиреязвенный бактериофаг «Fah ВНИИВВиМ»
Процент (Р±р) правильно идентифицированных штаммов <i>B. anthracis</i> к числу исследованных	47	97,9±2,1	89,4±4,5
Процент (Р±р) отрицательных результатов при исследовании гетерологичных микроорганизмов	72	95,8±2,3	98,6±1,4
Воспроизводимость – процент (Р±р) совпадений результатов исследования положительных и отрицательных проб	20	100±0	100±0
Скорость учета результатов, процент правильности идентификации штаммов	119	(5±1) ч (предварительный учет) 100 % (18±2) ч (окончательный учет) 100 %	(5±1) ч (предварительный учет) 100 % (18±2) ч (окончательный учет) 100 %

Биологические свойства. При изучении литического спектра бактериофагов «Гамма А-262» и «Fah ВНИИВВиМ» в отношении 72 штаммов гетерологичных микроорганизмов показано, что 69 штаммов были резистентны к сибиреязвенному бактериофагу «Гамма А-26», а два штамма *Bacillus cereus* и один штамм *Bacillus subtilis* var. *mesentericus* лизировались испытуемым препаратом. Бактериофаг «Fah ВНИИВВиМ» не лизировал 71 штамм гетерологичных микроорганизмов и лизировал штамм *Bacillus subtilis* var. *mesentericus*. Установлено, что специфичность бактериофага «Гамма А-26» составила – 95,8%, «Fah ВНИИВВиМ» – 98,6%. Следует отметить, что фаголизабельность не является строго специфичным видовым признаком, так как возбудитель сибирской язвы входит в группу близкородственных бацилл и имеет ряд общих свойств с другими ее представителями. По данным П.Г. Васильева с соавт. (1999) умеренные бактериофаги, названные сибиреязвенными в связи с выделением их из лизогенных штаммов *B. anthracis*, оказались способными лизировать культуры штаммов близкородственных бацилл (Саяпиной с соавт., 2011).

Полученные Л.В. Саяпиной с соавт. (2011) данные явились основанием для внесения изменений в нормативную документацию. В проект технических условий дополнительно включен метод постановки пробы при определении спектра литической активности бактериофага, а именно, для получения более четкого литического пятна рекомендовано растереть исследуемую культуру на агаровой пластинке диаметром до 1,5 см. При проведении контроля по проекту ТУ, представленному авторами, при нанесении капли культуры без растирания, из-за малого «газона» роста культуры невозможно было определить степень лизиса. В Инструкцию по применению внесено дополнение: «Ввиду наличия генетического родства сибиреязвенного микроба с другими представителями рода *Bacillus*, допускается лизис гетерологичных штаммов не более, чем у 5 %, от числа исследуемых». В связи с этим применение сибиреязвенного бактериофага должно использоваться в комплексе с другими методами идентификации микроорганизмов рода *Bacillus*, изложенными в МУК 4.2.2413-08 «Лабораторная диагностика и обнаружение возбудителя сибирской язвы» (2008).

В 1970 году И.П. Павловой было проведено сравнительное изучение ряда фагов *Bacillus anthracis* (γ , α s, BA-9, L₇, Саратов, K) и *Bacillus cereus* (Z, H, 500, L₁₅, O₂₈), выделенных из почвы, а также из лизогенных штаммов. При этом изучали морфологию негативных колоний фагов, одиночные циклы их развития, чувствительность к различным физико-химическим воздействиям (температуре, различным концентрациям цитрата натрия, мочевины, хлороформа, УФ-облучению, осмотическому шоку), имеющим таксономическое значение на тот период исследований. Изученные фаги различались по форме негативных колоний, которые, однако, соответствовали форме колоний фагов других спороносных бацилл. С другими свойствами фагов характер негативных колоний не коррелировал. Сибиреязвенные фаги обладали большей биологической активностью, чем фаги *Bacillus cereus*. Об этом свидетельствовали большая скорость их адсорбции, более короткий латентный период и высокая урожайность. Менее биологически активными оказались фаги *Bacillus anthracis* (Саратов и K), выделенные из лизогенных штаммов (*Bacillus anthracis*).

2.3. ПРИМЕНЕНИЕ СИБИРЕЯЗВЕННЫХ БАКТЕРИОФАГОВ

В 70-80 годы XX века во многих странах начали применять фагоидентификацию возбудителя сибирской язвы. Э. Н. Шляхов и Е. В. Груз (1967) испытали сибиреязвенный фаг BA-9, обладающий широким диапазоном действия. Для ветеринарно-лабораторной практики ре-комендовался фаг «Гамма-МВА». Этот препарат выпускается в ампулах по 1 мл с титром не ниже 10^7 . Срок годности один год.

Для идентификации выделенной культуры *Bacillus anthracis* ее высевают в шесть пробирок со скошенным МПА без конденсационной влаги, равномерно размазывая посевной материал по агару маленьким шпателем. Посевы выдерживают в термостате 15 мин при температуре 37 °С, а затем в четыре пробирки вносят по одной капле неразведенного фага «Гамма-МВА», давая ей стечь по центру косяка среды. В две контрольные пробирки фаг не вносят. Через несколько минут все пробирки помещают в термостат на 6-18 ч. Если в опытных пробирках по ходу стекания капли фага остается

чистый агар, обрамленный по краям бордюром из бактериальной культуры, то эта культура является сибиреязвенной. Если же дорожка лизиса отсутствует, и рост микробов будет таким же, как в контрольных пробирках, результат считается отрицательным. В отдельных случаях фаг дает не полный лизис культуры, а с наличием вторичных сибиреязвенных колоний (цит по Ревенко, 1978).

В.Г. Поповым с соавтр. (2006) был предложен препарат для нейтрализации спор и вегетативных клеток *Bacillus anthracis*, представляющий собой водный раствор, содержащий в качестве действующего начала смесь бактериофагов *Bacillus anthracis* OZR-1, *Bacillus anthracis* Ф-2, *Bacillus anthracis* ФАУТ при соотношении активностей (БОЕ/см³) *Bacillus anthracis* OZR-1: *Bacillus anthracis* Ф-2: *Bacillus anthracis* ФАУТ=1:(0,2-1):(0,1-1) и активатор прорастания спор L-аланин. Так как бактериофаги не действуют на покоящиеся споры *Bacillus anthracis*, препарат дополнительно содержит активатор прорастания спор, в данном случае - L-аланин, который способствует переходу покоящихся спор в стадию активации и последующего прорастания в вегетативные клетки.

Выделенные ранее сибиреязвенные бактериофаги «Гамма», «К-ВИЭВ», «ВА-9» лизируют некоторые штаммы близкородственных бацилл, что является отрицательным фактором в диагностике сибиреязвенной инфекции. Сибиреязвенные бактериофаги, активные к *Bacillus anthracis* и не лизирующие близкородственные бациллы, в настоящее время не известны (объект изобретения на штамм прототипа не имеет). Поэтому поиск и выделение сибиреязвенного фага, лизирующего сибиреязвенные штаммы и неактивного к близкородственным бациллам, является актуальным исследованием (Антонов, 1986).

Известны способы идентификации возбудителя сибиреязвенной инфекции, основанные на выявлении фенотипических признаков вида: антигенная структура, биохимические свойства.

Недостатки этих способов связаны с нестабильностью фенотипических свойств микроорганизмов, что требует при идентификации вида изучения комплекса фенотипических признаков, и окончательный результат возможен на четвертые-седьмые сутки (Обносова, 1978).

Идентификация возбудителя с помощью фага является важным критерием для диагностики различных инфекций. Фаги,

специфически лизирующие определенный вид микроорганизмов, применяют в практике как диагностические. Преимущества фагодиагностики заключается в том, что она на несколько суток опережает биохимические, серологические, генетические способы диагностики, не требует выделения чистой культуры бактерий, технически проста и доступна. Для целей фагодиагностики необходимы фаги, равно активные на всех представителях вида бактерий. Этим требованиям удовлетворяют высоковирулентные расы фагов, которые выделяются из сточных вод или клинических материалов (Матвеева, 1964; Русалеев, 1990).

Задача исследований В.Г. Попова с соавтр. (2006 (а)) – получение нового штамма видоспецифического бактериофага для идентификации бактерий *Bacillus anthracis*, не лизирующего близкородственные бациллы, и препарата на его основе для диагностики сибиреязвенной инфекции. Поставленная задача решалась тем, что был предложен новый штамм бактериофага *Bacillus anthracis* R/D-Ph-6, используемый для получения препарата для диагностики сибиреязвенной инфекции, жидкий препарат, содержащий суспензию частиц видоспецифического бактериофага *Bacillus anthracis* R/D-Ph-6 с литической активностью 10^{10} БОЕ/см³ и стабилизирующую добавку при следующем содержании компонентов, мас. %:

- суспензия частиц бактериофага *Bacillus anthracis* R/D-Ph-6 с литической активностью 10^{10} БОЕ/см³ – 10,0-20,0;
- 1%-ный раствор хинозола – 0,5-1,0;
- физиологический раствор – остальное.

Сухой препарат в качестве стабилизирующей добавки содержит сахарозу, желатин, хинозол при следующем содержании компонентов (мас. %):

- сахароза – 35,0-40,0;
- желатин – 6,0-10,0;
- хинозол – 0,03-0,06;
- сухая масса частиц бактериофага *Bacillus anthracis* R/D-Ph-6 с литической активностью 10^{10} БОЕ/см³ – остальное.

Применение фагов в лечебных целях при ряде инфекционных заболеваний практикуется более ста лет (Barrow, 1997). Однако, по фаготерапии *Bacillus anthracis* опубликовано лишь несколько работ, в период с 1922 по 1933 годы. Интерес к этому направлению значительно снизился с появлением антибиотиков. Кроме

того, положительный лечебный эффект при фаготерапии *Bacillus anthracis* наблюдался не всегда. Одна из причин первых неудач – недостаточная изученность природы бактериальных вирусов. Другая – случайный, эмпирический выбор фагов для лечебных целей. Следует также отметить, что многие исследователи не учитывали методические нюансы культивирования фагов и особенности способов их хранения (Онищенко, 1999).

В России проблемы разработки лечебных фаговых препаратов находятся в центре внимания многих научно-исследовательских институтов. Конструирование лечебных образцов бактериальных вирусов проводится с ориентацией на определенные требования. Препарат должен включать только вирулентные фаги с широкими спектрами по отношению к штаммам конкретного патогена. Фаги должны воспроизводиться в клетке-хозяине с высоким выходом дочерних фаговых частиц. Литическая активность препарата должна быть стабильной при длительном его хранении. Препарат должен включать фага, существенно отличающиеся друг от друга по механизму взаимодействия с клеткой – хозяином. Применение таких комбинаций при лечении уменьшает вероятность генерации фагоустойчивых форм в популяции патогена (Попов, 2006 (б); Онищенко, 2010).

Исследование биологических и биохимических свойств фагов, в частности молекулярных аспектов рецепторной специфичности, может обеспечить новое направление в области фаготерапии. В данном случае речь идет о разработке фаговых препаратов, включающих фаги с разной рецепторной специфичностью, а также отдельные элементы фагов, отвечающих за ингибирование молекулярных механизмов клеточных функций. Использование в этом случае фагов (клетка полностью перестает функционировать) более эффективно по сравнению с другими антимикробными агентами. Наглядным примером использования такого подхода стало недавнее открытие, показавшее, что рекомбинантный белок лизин, полученный из «Гамма фага» *Bacillus anthracis*, можно использовать для специфического ингибирования прорастания и спорообразования. Появление возросшего числа секвенированных геномов бактериофагов и биоинформатики, позволяет прогнозировать с некоторой степенью достоверности функции некоторых генов бактериофагов (Попов, 2003)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Многочисленными научными работами доказано, что всестороннее изучение бактерий рода *Bacillus* не должно ограничиваться только *Bacillus anthracis*. Контаминация пищевого сырья и продуктов питания бактериями *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus mesentericus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus mycoides* на всех этапах технологического процесса – это серьезная проблема пищевых производств. Пищевые токсикозы, вызванные вышеназванными бактериями, характеризуются острым течением болезни и могут вызвать летальный исход.

Широкое распространение бактерий рода *Bacillus* в пищевых продуктах объясняется тем, что это почвенные сапрофиты, для которых характерен процесс спорообразования при неблагоприятных условиях жизнедеятельности, что позволяет им сохраняться в пищевом сырье, продуктах питания при всех технологических режимах производства пищи.

В настоящее время индикация и идентификация вышеназванных бацилл на перерабатывающих предприятиях в сырье животного и растительного происхождения проводится в настоящий момент только бактериологическими методами. Это трудоемкие и материалоемкие методики, дающие результаты через 2-5 суток. Усовершенствование этих методик и изыскание простого и доступного метода индикации и идентификации названных микроорганизмов – актуальная тема для исследований, результаты которых позволят повысить эффективность применения контрольных мер по системе ХАССП на перерабатывающих предприятиях мясной, молочной, рыбной и др. продукции, а также сделать данные исследования экономически более выгодными.

Возможность фагоидентификации вытекает из специфичности действия фагов, которая может быть настолько выражена, что позволяет дифференцировать не только отдельные виды, но и серологически неотличимые штаммы в пределах одного вида. Определяя фаговары бактерий, вызывающих пищевую токсикоинфекцию, можно не только распознать подлинный источник возбудителя инфекции, но и проследить сложный путь возбудителя от источника к восприимчивому организму. Так, в Канаде в промежуток с 1986 по 1993 было отобрано 146 изолятов *Bacillus cereus*, причастных к 18 вспышкам пищевого отравления. Из них 142 штамма было разделено на 17 фаговаров (Ahmed R., 1995).

Интерес для наших исследований представляют бактерии *Bacillus subtilis* и *Bacillus mesentericus* – возбудители картофельной болезни хлеба. Их основная масса начинает накапливаться в зерне еще во время уборки, попадая в него с пылью и частицами почвы, развивается в процессе приготовления хлеба и вызывает его порчу. Употребление такого хлеба в пищу может привести к пищевому отравлению. Обнаружение этого заболевания на хлебокомбинатах неизменно приводит к их временному закрытию и огромным материальным потерям.

В настоящее время известные методы определения контаминированности зерна *Bacillus subtilis* и *Bacillus mesentericus* имеют известные недостатки. Метод пробной лабораторной выпечки трудоемок и в случае заражения штаммами, имеющими низкую амилолитическую активность, даже при значительных концентрациях не дает положительных. Известен экспресс-метод диагностики картофельной болезни по активности споровых бактерий в хлебопекарном сырье и показателях бактерий в протеолитическом отношении, не являются информативными в плане количественной оценки зараженности и также часто представляют искаженную картину о реальной степени зараженности сырья.

Для подтверждения наличия *Bacillus cereus* в пищевых продуктах и клинических образцах зарубежом пытаются использовать серологические (ИФА) и молекулярно-генетические (ПЦР) методы (Tallent, 2012). Наиболее распространенный (классический) метод идентификации этого вида бацилл основан на выделении чистой культуры на МУР среде Мозеля – желточный агар с ман-

нитом, полимиксином и феноловым красным, и ее последующем биохимическом тестировании. Однако нестабильность ферментативных реакций *Bacillus cereus* затрудняют межвидовую дифференциацию бактерий первой морфологической группы рода *Bacillus* и, кроме того, требуют серьезных временных затрат (Селянинов, 2008; Ефимочкина, 2010). В связи с этим, вопрос о разработке ускоренного достоверного метода идентификации бактерий *Bacillus cereus* все еще остается актуальным.

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 А.В. и др., 2012) продемонстрировали возможность включения специфических бактериофагов, литически активных в отношении бактерий *Bacillus cereus*, в процедуры по деконтаминации продуктов питания. В Российской Федерации на сегодняшний день отсутствуют данные о созданных фаговых биопрепаратах, в том числе диагностических, специфичных в отношении бактерий *Bacillus cereus*. Разработка бактериофаговой тест-системы позволит не только ускорить процедуру по идентификации бактерий *Bacillus cereus* в продуктах питания и клинических образцах, но и даст возможность дифференцировать бациллы внутри данного вида на фаговары.

С помощью специфичных фагов можно выявлять в пищевых продуктах бактерии *Bacillus cereus*, которые являются причиной пищевых отравлений. Бактерии вида *Bacillus cereus* способны вызывать диарейный синдром у человека по истечении 6-18 ч, первично обусловленный несколькими видами токсинов и, впоследствии, размножением данного микроорганизма в кишечнике. Бактерии вида *Bacillus cereus* продуцируют гемолизин, негемолитический энтеротоксин и энтеротоксин. Продукция этого комплекса токсинов вызывает цитотоксический эффект и секрецию жидкости в кишечнике, при постановке биопробы на мышьях наблюдается некроз кожи в месте введения и гибель. Доказано, что выделенные нами классическим методом бактерии вида *Bacillus cereus* можно идентифицировать за 4 суток, используя схему выделения и дифференциации бацилл первой морфоло-

гической группы (Gordon, 1973), применение методик фагоиндикации сокращает время исследования до 25 часов. Так, реакция нарастания титра фага позволяет менее чем за сутки обнаружить бактерии вида *Bacillus cereus* в пробах жидкой и плотной консистенции в концентрации 100 и 1000 м.к. /г., соответственно.

Запланированная нами научно-исследовательская работа включает 3 основных этапа.

Первый этап научной работы – это изучение распространения бактерий *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus mesentericus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus megaterium*, в объектах санитарного надзора бактериологическим методом:

- изучение биологических свойств и микробиологических тестов, характерных для бактерий данного рода, создание дифференциально-диагностических сред и схемы ускоренной дифференциации бактерий *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus mesentericus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus megaterium*.

На втором этапе работы будут разработаны схемы фагоиндикации и фагоидентификации бактерий *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus mesentericus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus megaterium*:

- выделение и селекция бактериофагов, активные в отношении вышеназванных бактерий;

- изучение основных биологических свойств (литическая активность и ее спектр, специфичность, изменение литической активности при хранении) выделенных бактериофагов;

- конструирование биопрепаратов для индикации и идентификации бактерий *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus mesentericus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus megaterium* в пищевом сырье и продуктах питания;

- разработка схемы ускоренной фагоидентификации бактерий *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus mesentericus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus megaterium*,

- разработка схемы фагоиндикации бактерий *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus mesentericus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus megaterium* в объектах санитарного надзора методами реакции нарастания титра фага и фаготетразоловым методом,

- подготовлена нормативно-техническая документация по фагоиндикации и фагоидентификации.

На заключительном этапе исследований, на основании разработанных схем, методов, тестов будет проведён анализ распространённости бактерий *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus mesentericus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus megaterium* в пищевом сырье и продуктах питания в условиях их технологии производства. Будут даны рекомендации по индикации и идентификации бактерий видов *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus mesentericus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus megaterium*, бактериологическим и фагологическим методами.

Известно, что фаготипирование является надежным методом дифференциации бактерий (Сергиенко, 1936; Калдыркаев с соавт., 2011). В ряде случаев фаги используются для быстрого определения видовой принадлежности бацилл, в частности, *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*. Проверенные Э.К. Африкяном (1973) исследования показали, что специфика фаголизиса может быть использована для разграничения и идентификации сводных видов – подродов. Фаги спорообразующих бактерий изучены недостаточно, несмотря на их большое значение в фаголизисе производственных культур, идентификации и типировании отдельных видов бацилл, а также в эволюции бактерий. Поэтому нами также предполагается разработка системы фаговаров для идентификации и мониторинга бактерий *Bacillus cereus* в объектах санитарного надзора.

Применение фаговых бациллярных биопрепаратов позволит контролировать микробиологическую чистоту сырья растительного и животного происхождения при приемке на перерабатывающее предприятие, осуществлять контроль параметров технологического процесса производства продуктов питания, применяя фаговые биопрепараты в различных методиках (реакция нарастания титра фага, реакция адсорбции фагов, фаготетразоловый метод, пробирочный метод, метод стекающей капли), анализировать качественный и количественный состав выделенных бацилл, являющихся причиной не только порчи продуктов питания, но и возбудителями пищевых токсикоинфекций, и разрабатывать контрольные меры для исключения рисков или уменьшения их возможности до приемлемого уровня (дополнительная тепловая обработка, установление гигиенического барьера и т.п.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Азизбеян, Р.Р. Система фаг – клетка *Bacillus subtilis* как объект для изучения генетики микроорганизмов / Р.Р. Азизбеян, А.С. Кривитский // Генетика. – 1966. – № 5. – С. 54.
2. Азизбеян, Р.Р. О структуре фагов *Bacillus subtilis* и лизогении клеток-хозяев / Р.Р. Азизбеян, Н.И. Беляева, А.С. Кривитский // Микробиология. – 1966. – №35. – С. 279.
3. Азизбеян, Р.Р. Бактериофаги *Bacillus subtilis* / Р.Р. Азизбеян // Успехи современной генетики. – 1972. – № 2. – С. 3-46.
4. Азизбеян, Р.Р. Сравнительная характеристика спорообразующих и аспорогенных штаммов *Bacillus thuringiensis* / Р.Р. Азизбеян, Р.А. Белых, Е.М. Нетыкса [и др.] // Генетика. – 1978. – № 14. – С. 510-518.
5. Азизбеян, Р.Р. Энтомопатогенные бактерии *Bacillus thuringiensis* и их фаги: генетическая и физиологическая характеристика: автореф. дис. ...докт. биол. наук. – Москва, 1980. – С. 4.
6. Алешкин, А.В. Бактериофаги как пробиотики и средства деконтаминации пищевых продуктов / А.В. Алешкин, Н.В. Воложанцев, Э.А. Светоч [и др.] // Астраханский мед. журнал. – 2012. – №3 (7), – С.31-39.
7. Антонов, Б.И. Временное наставление по применению сибиреязвенного бактериофага «К» ВИЭВ для определения возбудителя сибирской язвы: Утверждено Главным управлением ветеринарии Минсельхоза СССР 15 июня 1967 г. / Б.И. Антонов, В.В. Борисова, П.М. Волкова // Справочник «Бактериальные инфекции». – М.: Агропромиздат, 1986. – С.17-27.
8. Асколонов, С.П. Пищевые заболевания, вызываемые спорообразующими бактериями *Bacillus subtilis* и *Bacillus mesentericus* / С.П. Асколонов, А.И. Ильченко // Вопросы питания. – Киев: Госмедиздат УССР. – 1962 – С. 226–229.
9. Африкян, Э.К. Энтомопатогенные бактерии и их значение / Э.К. Африкян // Ереван: Изд-во АН АрмССР. – 1973. – С. 418.
10. Ахундова, К.А. Значение *V.cereus* в патологии человека. / К.А. Ахундова // ЖМЭИ. – 1967. – № 10. – С. 129–132.
11. 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.
12. Бурцева, Л.И. Изучение «фагоносительства» спор для системы *Bacillus subtilis* 168 – фаг SPP1 / Л.И. Бурцева, О.И. Рязанкина, С.Н. Щелкунов // сб. тез. докл. конф «Вирусы микроорганизмов». - Пушино: науч. центр биол. исслед. АН СССР, 1981. – С. 111-112.
13. Беляева, Н.Н. Новый фаг *Bacillus subtilis* необычайной морфологии / Н.Н. Беляева, Р.Р. Азизбеян // Микробиология. – 1967. - № 36. – С. 1054.
14. Вайнштейн, Б.К. Строение вирусов / Б.К. Вайнштейн, Н.А. Киселев // Вирусология и иммунология. – М.: Наука, 1964. – С. 11.
15. Васильев, П.Г., Чувствительность штаммов *V. anthracis*, выделенных из разных источников внешней среды, к видоспецифическим сибиреязвенным бактериофагам / П.Г. Васильев, Ю.И. Иванов, Н.С. Садыков [и др.] // мат. юбилейной науч. конф. посвящ. 70-летию НИИ Микробиологии МОРФ «Диагн., лечение и проф. опасных инф. Заболеваний». – Киров, 1998. – С.64.
16. Васильев, П.Г. Типирование штаммов *V. anthracis* и близкородственных бацилл с помощью умеренных бактериофагов / П.Г. Васильев, Ю.И. Иванов, А.В. Сенькин // матер. юбилейн. науч. конфер., посвящ. 50-летию Центра военно-технических проблем биологической защиты НИИ микробиологии МО РФ. – Екатеринбург, 1999. – С. 35–36.
17. Васильев, Д.А. Идентификация бактерий *Bacillus cereus* на основе их фенотипической характеристики / Д.А. Васильев, А.И. Калдыркаев, Н.А. Феоктистова [и др.]. – Ульяновск: НИИЦМиБ УлГСХА им. П.А. Столыпина, 2013. – С. 9-24.
18. Галкина, Т.А. Выделение протеолитических ферментов из *Bacillus mesentericus* и изучение их свойств / Т. А. Галкина, А. А. Бондарчук, М. Пасечник // Mikrobiol Zh. – 1977. – V. 39. – P. 286-289.
19. Динчева, Е.Н. Микробиологическое изучение мясного фарша / Е.Н. Динчева // науч. тр. Высш. ветеринарно-мед. ин-та. – 1970. – Т.22. – С.139-146.
20. Дятлов, И.А. Штамм бактериофага *Bacillus anthracis* R/D, используемый для получения препарата, жидкий препарат для для диагностики сибиреязвенной инфекции и препарат для для диагностики сибиреязвенной ин-

- фекции / И.А. Дятлов, В.М. Попова, А.М. Баранов // Патент РФ (19) RU (11) 235165 (13) С1 (51) МПК С12N7/00 (2006.01) А61К35/76 (2006.01)
21. Еременко, Е.И. Усовершенствование методов идентификации атипичных штаммов возбудителя сибирской язвы и их дифференциация от близкородственных бактерий / Е.И. Еременко, О.И. Цыганкова, А.Г. Рязанова А.Г. [и др.] // Журн. гиг., эпид., микробиол. и иммунолог. – 2009. – № 3. – С. 76–80.
 22. Ефимочкина, Н.Р. Новые бактериальные патогены в пищевых продуктах: экспериментальное обоснование и разработка системы контроля с применением методов микробиологического и молекулярно-генетического анализа: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 14.02.01 / Ефимочкина Наталья Рамозановна. – Москва, 2010. – С. 28
 23. Жиленков, Е.Л. Совершенствование методов конструирования препаратов бактериофагов для лечения лор-патологии / Е.Л. Жиленков, Д.В. Попов, В.М. Попова [и др.] // Биопрепараты. – 2002. – №2(6). – С. 2-6.
 24. Затула, Д.Г. Влияние метаболитов спорных сапрофитных бактерий на организм человека / Д.Г. Затула, С.Р. Резник С.Р. – Киев: «Наукова Думка», 1973. – С. 10-12.
 25. Ипатенко, Н.Г. Испытание сибиреязвенных бактериофагов «К» ВИЭВ и Гамма МВА / Н.Г. Ипатенко, А.А. Маничев // Ветеринария. - 1989. - 2. - С.59-60.
 26. Ипатенко, Н.Г. Испытание сибиреязвенных фагов / Н.Г. Ипатенко // Ветеринария, 2000. – № 6. – С. 22-23.
 27. Ипатенко, Н.Г. Испытание сибиреязвенных бактериофагов / Н.Г. Ипатенко // Ветеринария. – 2000. – № 6. – С. 22-23.
 28. Ипатенко, Н.Г. Дифференциация *Vac. anthracis* от спорообразующих почвенных бактерий / Н.Г. Ипатенко, А.А. Маничев, Б.И. Шморган [и др.] // Ветеринария. – 1995. - № 7. – С. 19-22.
 29. Ипатенко, Н.Г. Сибирская язва сельскохозяйственных животных / И.Г. Ипатенко, В.А. Седов, В.С. Зелепукин [и др.]. – М.: Агропромиздат, 1987. - С.175-177.
 30. Калдыркаев, А.И. Методика выделения фагов бактерий вида *Bacillus cereus* и *Bacillus subtilis*, перспективы их применения / А.И. Калдыркаев, Н.А. Феоктистова, А.Х. Мустафин, Д.А. Васильев // Естественные и технические науки. – 2011. – №2 (52). – С. 83–84.
 31. Каттер, Э. Бактериофаги. Биология и практическое применение / Э. Каттер, А. Сулаквелидзе // М.: Научный мир, 2012. – С. 163-170, 366-368.
 32. Костенко, Ю.Г. Изучение остаточной аэробной мезофильной микрофлоры в пастеризованных консервах «Шейка ветчинная» / Ю.Г. Костенко, П.П. Степаненко, С.Я. Любашенко // Тр. ВНИИ мясо-молоч. пром-сти. – 1978. – № 41. – С.28-29.
 33. Кочкина, З.М. Сравнительное изучение нуклеиновых кислот фагов *Bacillus thuringiensis* sp. *Galleriae* 1-97 / З.М. Кочкина // сб. тез. докл. конф «Вирусы микроорганизмов». – Пушкино: науч. центр биол. исслед. АН СССР, 1981. – С. 110-111.
 34. Краевский, С.В. Атомно-силовая микроскопия аффинных взаимодействий в микробиологии: автореф. дис. ...канд. биол. наук: 03.02.03, 03.01.06 / Краевский Сергей Владимирович. – Оболенск, 2011. – С. 10-13.
 35. Красильников, Н.А. Жизнь растений // Н.А. Красильников, А.А. Уранова – М.: «Просвещение», 1974. – Т. I. - С 186.
 36. Кренева, Р.А. Радиационный мутагенез у *Bacillus subtilis* и фага 105: автореф. дис. ...канд. биол. наук: 03.00.15 /Кренева Римма Александровна. – Ленинград, 1985. – С.17.
 37. Лабораторная диагностика и обнаружение возбудителя сибирской язвы. Методические указания. МУК 4.2.2413-08 // утв. 29 июля 2008 г.
 38. Маринин, Л.И. Опасность заноса (завоза) сибирской язвы из зарубежных стран / Л.И. Маринин, Е.А. Тюрин // Матер. VIII Межгосударств. науч.-практ. конфер. государств-участников СНГ. – Саратов, 2007. - С. 79–81.
 39. Матвеева, К.И. Руководство по микробиологической диагностике инфекционных болезней / К.И. Матвеева, М.И. Соколова. – М., 1964. – 683 с.
 40. Мейнелл, Дж. Экспериментальная микробиология / Дж. Мейнелл, Э. Мейнелл. – М., Мир, 1967. – С. 78-120.
 41. Мерчина, С.В. Обоснование необходимости в разработке технологических параметров, исключающих контаминацию пищевых продуктов *Bacillus cereus*: автореф. дис. ...канд. биол. наук: 03.00.07, 03.00.23 / Мерчина Светлана Васильевна. – Саратов, 2003. – С. 4.
 42. Мирзоева, В.А. Бактерия группы сенной и картофельной палочек. / В.А. Мирзоева. – М.: Изд-во АН СССР, 1959. – С.176.
 43. Мирошников, К.А. Пептидогликанлизирующие ферменты бактериофагов – перспективные противобактериальные агенты / К.А. Мирошников, О.В. Чертков, П.А. Назаров [и др.] // Успехи биологической химии. – 2006. – Т.46. – с. 65-98.
 44. Обносова, Н.В. О патогенных свойствах возбудителя сибирской язвы в разных очагах / Н.В. Обносова, В.П. Шуляк // Достижения и перспективы борьбы с сибирской язвой в СССР: тез. докл. X Пленарного заседания межведомственной научно-методической комиссии по борьбе с сибирской язвой (28-29 сентября 1978 г., г. Баку). – Москва, 1978. – С. 123-124.
 45. Павлова, И.П. Изучение морфологии и биологических свойств фагов *V. anthracis* и *V. cereus* / И.П. Павлова // ЖМЭИ. – 1971. – № 7. – С. 147.
 46. Петрова, Л.Н. Дифференциране на култури от род *Bacillus* изолирани от местних полукопсервов / Л.Н. Петрова // Ветеринарно-медицинские науки. – 1975. – № 8. – С.12.

47. Полховский, В.А. Биохимические типы *Vacillus cereus*, выделенных из различных природных источников / В.А. Полховский // Журн. микробиол. – 1970. – № 2. – С.82-86.
48. Попов, Д.В. Разработка фагового препарата для лечения хронического гнойного среднего отита: дис. канд. мед. наук / Оболенск, 2003. – 113 с. – с.52.
49. Попов, В.Г. Профилактика и терапия сибиреязвенной инфекции / В.Г. Попов, Г.Я. Щербаков, Л.И. Маринин [и др.] // Сборник докладов I Российского симпозиума по биологической безопасности, 23 октября 2003 года. – Москва, 2003. – С. 56-67.
50. Попов, В.Г. Профилактика и терапия сибиреязвенной инфекции / В.Г. Попов, Г.Я. Щербаков, Л.И. Маринин [и др.] // 2003 – <http://bio.su/popr.ht.m>.
51. Попов, В.Г. Биопрепарат для нейтрализации спор и вегетативных клеток *Bacillus anthracis* / В.Г. Попов, С.Ю. Пчелинцев, М.Ю. Озеров [и др.] // Патент РФ, (19) RU (11) 2413539 (13) С1(51) МПК А61L2/18 (2006.01).
52. Попов, В.Г. Роль бактериофагов *B. anthracis* в противодействии терроризму / В.Г. Попов, В.Н. Каркищенко, С.Б. Пчелинцев [и др.] // Биомедицина. – 2006. – № 2. – С. 24-32.
53. Раутенштейн, Я.И. Практическое значение вирусов микроорганизмов для микробиологических производств / Я.И. Раутенштейн // Бактериофаги: сб. науч. тр. – Пушино: науч. центр биол. исслед. АН СССР, 1982. – С. 183-184.
54. Сахарова, В.В. Особенности роста лизогенной культуры *Bacillus megaterium* в периодических и непрерывных условиях культивирования / В.В. Сахарова, Т.П. Блохина, Я.И. Раутенштейн [и др.] // Микробиология, 1978. – т. 47. – С. 641-652.
55. Саяпина, Л.В. Характеристика нового бактериофага диагностического сибиреязвенного Гамма А-26 жидкого / Л.В. Саяпина, А.С. Абдраштова, И.В. Касина / Биопрепараты, 2011. – № 3 (43). – http://www.biopreparaty-magazine.ru/articles/41_07/.
56. Селянинов, Ю.О. Об ошибках при индикации и идентификации *B. anthracis* / Ю. О. Селянинов, И. Ю. Егорова // Ветеринария. – 2008. – N 10. – С. 30-33 .
57. Сергиенко, Ф.Е. Новый метод бактериологично діагностики за допомогою бактеріофага // Мікробіол. журн. АН УССР. – 1936. – №1. – С. 85-112.
58. Сибирская язва: актуальные проблемы разработки и внедрения медицинских средств защиты: руководство для врачей / Под ред. Г.Г. Онищенко, В.В. Кожухова. – М., 2010.
59. Сибирская язва: Актуальные аспекты микробиологии, эпидемиологии, клиники, диагностики, лечения и профилактики // Г.Г. Онищенко, Н.Т. Васильев, Н.В. Литусов и др. – М., 1999.
60. Смирнова, Н.И. Специфические бактериофаги в профилактике и лечении гнильцовых заболеваний пчел / Н.И. Смирнова // «Зооветеринарная наука – производству» – ученые записки Витебского ветеринарного университета. – 1968. – Т.20. – С. 35.
61. Станчева, Н. Состав липолитических микроорганизмов, выделенных из свежего овечьего молока // Животноводческие науки. – 1997. – №1-2. – С.72-75.
62. Ревенко, И.П. Бактериофаги и их использование в ветеринарной практике / И.П. Ревенко. – Киев: Урожай, 1978. – С. 62, 74, 78.
63. Русалеев, В.С. Фагочувствительность аэробных спорообразующих бактерий / В.С. Русалеев // Ветеринария. – 1990. – № 8. – С.29-31.
64. Тихоненко, А.С. О двух формах фага *Bacillus mycoides* / А.С. Тихоненко, И.А. Беспалова // Микробиология. – 1961. – №30. – С. 867.
65. Тихоненко, А.С. Извлеченный морфогенез оболочки головки фага № 1 *Bacillus mycoides* / А.С. Тихоненко // Микробиология. – 1966. – №35. – С. 118.
66. Тихоненко, А.С. Изменение белковой структуры фагов № 1 и Н19 *Bacillus mycoides* в процессе нагревания / А.С. Тихоненко, Н.Н. Беляева // Микробиология. – 1967. – №36. – С. 475.
67. Тихоненко, А.С. Ультраструктура вирусов бактерий / А.С. Тихоненко. – М.: Изд-во «Наука», 1968. – С. 28, 47-71, 75-83, 111-145.
68. Фадеева, Н.П. Варианты лизогенной культуры *Bacillus megaterium* штамм 899, различающиеся по способности к спонтанной индукции / Н.П. Фадеева, Я.И. Раутенштейн, Л.М. Байкова // Микробиология, 1968. – т. 37. – С.109-114.
69. Феоктистова, Н.А. Факторы патогенности бактерий вида *Bacillus cereus* / Н.А. Феоктистова, М.А. Юдина, Д.А. Васильев // материалы II-й Открытой Всероссийской конференции молодых ученых «Молодёжь и наука XXI века». – Ульяновск: УГСХА, 2007. – Ч.1. – С. 188-191.
70. Феоктистова, Н.А. Диагностика картофельной болезни хлеба, вызываемой бактериями видов *Bacillus subtilis* и *Bacillus mesentericus* / Н.А. Феоктистова, М.А. Юдина, А.Х. Мустафин [и др.] // материалы Международной научно-практической конференции «Ветеринарная медицина XXI века: инновации, опыт, проблемы и пути их решения» – Ульяновск: УГСХА, 2011. – С.191-198.
71. Цыганкова, О.И. Фенотипическая и генетическая вариабельность штаммов сибиреязвенного микроба Специальность ВАК РФ: 03.00.07 – Микробиология Дис.докт. мед. наук. – Ростов-на-Дону, 2007. – С.3-5.
72. Юдина, М.А. Разработка фагового препарата *Bacillus mesentericus* и область его практического применения: автореф. дис. ...канд. биол. наук: 03.01.06, 03.02.03 / Юдина Мария Александровна. – Саратов, 2013. – С. 3.

73. Ackermann, H.-W. Viruses of prokaryotes. Natural groups of bacteriophages / H.-W. Ackermann, M.S. Dubow // CRC Press. Boca Raton. – 1987. Vol. II. – P. 242.
74. Ackermann, H.-W. The present state of phage taxonomy / H.-W. Ackermann, A. Eisenstark // Intervirology. – 1974. – V. 3. – P. 201-219.
75. Adeyanju, S.A. Microorganisms associated with mouldiness of dried yam chips and their prevention / S.A. Adeyanju, T. Ikotun // Nahrung. – 1988. – V. 32. – № 8. – P. 777-781.
76. Ahmed, A.H. Incidence of *Bacillus cereus* in milk and some milk products / A.A.H. Ahmed, M.K. Moustafa, E.H. J. Marth // Food Prot. – 1995. – № 46. – P. 126-128.
77. Ashelford, K.E. Elevated abundance of bacteriophage infecting bacteria in soil / K.E. Ashelford, M.J. Day, J.C. Fry // Appl Environ Microbiol. – 2003. – V. 69. – P. 285-289.
78. Barrow, P.A. Sootillil – Bacteriophage Therapy and renewed assessment of the Potential // Trends Microbiol. – 1997. – V. 5 – P. 268-271.
79. Bergey's manual of determinative bacteriology. – Baltimore: Williams and Wilkins Co, – 1993. – 9th ed. – P. 1258.
80. Berkel, H. Lecithinase und Toxinbildung durch Stamme der Gattung *Bacillus* / H. Berkel u. R. Hodlok // Lebensm. Itelhygiene. – 1976. – V. 27. – № 2. – P. 63-65.
81. Bush, L.M. Index case of fatal inhalational anthrax due to bioterrorism in the United States / L.M. Bush, B.H. Abrams, A. Beall, C.C. Johnson // Nl. Engl. J. Med. – 2001. – Vol. 345. – P. 1607–1610.
82. Brussow, H. Comparative phage genomics and the evolution of Siphoviridae: Insights from dairy phages / H. Brussow, F. Desiere // Mol Microbiol. – 2001. – V. 39. – P. 213-222.
83. Chelm, B.K. Interaction of *Bacillus subtilis* RNA polymerase core with two specificity-determining subunits. Cobetween sigma and the SPO1 gene 28 protein / B.K. Chelm, J.J. Duffy, E.P. Geiduschek // J Biol Chem. – 1982. – V. 257. – P. 6501-6508.
84. Chen, F. Genomic sequence and evolution of marine cyanophage P60: A new insight on lytic and lysogenic phages / F. Chen, J. Lu // Appl. Environ Microbiol. – 2002. – V. 68. – P. 2589-2594.
85. Davison, P. The structure of bacteriophage SP8 / P. Davison // Virology. – 1963. – V. 21. – P. 146.
86. Desiere, P. Com-parativegenomics reveals close genetic relationships between phages from dairy bacteria and pathogenic Streptococci: Evolutionary implications for prophage-host interactions / P. Desiere, W. McShan, D. van Sinderen [et al.] // Virology. – 2001. – V. 288. – P. 325-341.
87. Donk, P.J // Journal of Bacteriology. - 1920. – V. 5. – P. 373–374.
88. Eiserling, F. The structure of *Bacillus subtilis* bacteriophage PBS1 / F. Eiserling // J. Ultrastruct. Res. – 1967. – V. 17. – P. 342.
89. Eiserling, F. Capsomeres and structure observed on some bacteriophages / F. Eiserling, E. Boy de la Tour // Pathol. Microbiol. (Suisse). – 1965. – V. 28. – P. 175.
90. Ezzell, J.W. Association of *Bacillus anthracis* capsule with lethal toxin during experimental infection / J.W. Ezzell, T.G. Abshire, R. Panchal, D. Chabot, S. Bavari, E.K. Leffel, B. Purcell, A.M. Friedlander, W.J. Ribot // J. Clin. Microbiol. – 1990. – V. 28. – V. 2. – P. 223-231.
91. Fraenkel-Conrat, H. The role of the nucleic acid in the reconstitution of active tobacco mosaic virus / H. Fraenkel-Conrat // J Amer Chem Soc. – 1956. – V. 78. – P. 882.
92. Frankel, R. Adsorption specificity of bacteriophage PBS1 / R. Frankel, T. Joys // J. bacterial. – 1966. – V. 92. – P. 388.
93. Gaillard, S. Modelling combined effects of temperature and pH on the heat resistance of spores of *Bacillus cereus* / S. Gaillard, I. Lequerinel, P. Mafart // J. Food Sci. – 1998. – V. 63. – P. 887-889.
94. Garry, P. Influence de la rugosité de surfaces en polyurethane sur l'adhésion de *Bacillus subtilis* et de *Bacillus cereus* / P. Garry, L. Venduvre, M. Bellon-Fontaine // J. Dispers. Sci. and Technol. – 1998. – V. 19. – P. 1175-1197.
95. Gordon, R. The genus *Bacillus* / R. Gordon // In Handb. Microbiol. Cleveland (Ohio). – 1973. – V. 1. – P. 71–88.
96. Hammer, B.W. // Iowa Agricultural Experimental Station Research Bulletin. - 1915. – V. 19. – P. 119–131.
97. Hershey, A. Independent function of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage / A. Hershey, M. Chase // J Gen Physiol. – 1952. – V. 36. – P. 39.
98. Hills, G.M. Chemical factors in the germination of spore bearing aerobes. The effects of amino acids on the germination of *Bacillus anthracis*, with some observations on the relation of optical form to biological activity / G.M. Hills // Biochem J. – 1949. – V. 45. – P. 363-370.
99. Ireland, J.A.W. Amino acid- and purine ribonucleoside-induced germination of *Bacillus anthracis* delta spore endospores: gerS mediates responses to aromatic ring structures / J.A.W. Ireland, P.C. Hanna // J Bacterid. – 2002. – V. 184. – P. 1296-1303.
100. Jonescu, C. Identification of *Bacillus subtilis* from milk / C. Jonescu // Microbiologia, Parasitologia, Epidemiologia. – 1966. – V. 11. – N 5. – P. 322-325.
101. Kellenberger, E. Die Struktur des Schwanzes der Phagen T2 and T4 und der Mechanismus der irreversible Adsorption / E. Kellenberger, W. Arber // Z. Naturforsch. – 1965. – V. 10. – P. 698.
102. Klug, C. Combined effect of temperature a(W) and pH on proteases from *Pseudomonas* and *Bacillus* spp / C. Klug, K. Fehlhaber, U. Muller, P. Braim P. // Berlin und munch tierarztl Wochenschr. – 1998. – V. 3. – P. 9–12.
103. Kutter, E. Genomic map of bacteriophage T4 / E. Kutter, T. Stidham, B. Guttman [et al.] // Molecular Biology of Bacteriophage T4. – 1994. – P. 491-519

104. Lazarevic, V. Nu-cleotidesequence of the Bacillus subtilis temperate bacteriophage SPbetac2 / V. Lazarevic, A. Dusterhoft, A., B. Soldo, B. [et al.] // Microbiology. – 1999. – V. 145. – P. 1055-1067.
105. Lee, J-H. Complete Genome Sequence of Bacillus cereus Bacteriophage BCP78 / J-H. Lee, H. Shin, Son et al. // J. Virol. – 2012. – № 86(1). – P. 637–638.
106. Letellier, L. Main features on tailed phage, host recognition and DNA uptake / L. Letellier, P. Boulanger, L. Plancon [et al.] // Front Biosci. –2004. – V. 9. – P. 1228-1339.
107. Lott, G. Taxonomie und Bedeutung psychrotropher Keime / G. Lott // Arch. Lebensmittelhyg. – 1972. – 23. – № 12. – P.265-268.
108. Lwoff, A. Recherches sur un Bacillus megatherium lysogene / A. Lwoff, A. Gutmann, A. // Ann InstPasteur. – 1961. – P. 711-739.
109. Mazas, M. Effects of sporulation media and strain on thermal resistance of Bacillus cereus spores / M. Mazas, J. Gonzalez, R. M. Sarmiento // Int. J. Food Sci and Technol. –1995. –V.30. –№1. – P.71-78.
110. McAllister, W.T. Bacteriophage infection: Which end of the SP82G genome goes in first / W.T. McAllister // J Virol. – 1970. – V. 5. – P. 194-198.
111. Meyer, A. 1901 in Gottheil, O. Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene / Meyer, A. O. Gottheil // Abteilung II. – 1901. – V. 7. – P. 680–691.
112. Molineux, I.J. The T7 Group / I.J. Molineux, R. Calendar [et al.] / The Bacteriophages. - New York, Oxford University Press, 2005.
113. Molska, I. Warunki rozwoju i proby eliminacji Bacillus cereus z mleka pasteryzowanego / I. Molska // Przen. spoz. – 1996. – V.50. – № 12. – P.13-15.
114. Nagy, E. Characterization of phage AP50, an RNA phage containing phospholipids // E. Nagy, B. Pragai, G. Ivanovics // Gen. Virol. – 1976. – V.32. – P. 129-132.
115. Noriyasu, S. Bacillus cereus food poisoning / S. Noriyasu, K. Haruhiko, W. Toshniko, M. Takeshi, M. Tatsujiir // Applied Microbiology. – 1998. – V.21. – N 4. – P.311-314.
116. Rasko, D.A. 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.
117. Pedulla, M.X. Bacteriophage G: Analysis of a bacterium-sized genome / Pedulla, MX., Lewis, J.A., Hendrickson [et al.] // 103rd General ASM Meeting, 18-22 May 2003. - Washington, DC, 2003.
118. Renata, A.C. The occurrence of B.cereus fast foods / A.C. Renata, C. Teresa V. Francesco, M. Gtancarlo // Int. J. Food Sci. and Nutr. – 1998. – V.49. – №4. – P.303-308.
119. Pisu, I. Intossicazione alimentare del Bacillus cereus / I. Pisu, L. Stazzi // Nuovi Ann. – 1952. – № 14. – P.325-329.
120. Schuch, R. A bacteriolytic agent that detects and kills Bacillus anthracis / R. Schuch, D. Nelson, V. Fischetti // Nature. – 2002. – V. 418. – P. 884-889.
121. Sharp, R.J. The isolation and characterization of bacteriophages infecting obligately thermophilic strains of Bacillus / R.J. Sharp, S.I. Ahmad, A. Munster [et al.] // J Gen Microbiol. – 1986. – V. 132 (Pt 6). – P. 1709-1722.
122. Sampath, A. Roles of genes 44, 50, and 51 in regulating gene expression and host takeover during infection of Bacillus subtilis by bacteriophage SPO1 // A. Sampath, C. Stewart // J Bacteriol. – 2004. – V. 186. – P. 1785-1792.
123. Sonenshein, A.L. The course of phage phie infection in sporulating cells of Bacillus subtilis strain 3610 / A.L. Sonenshein, D.H. Roscoe // Virology. –1969. – V. 39. – P. 265-275.
124. Stanley, P.E. A review of bioluminescent ATP techniques in rapid microbiology / P.E. Stanley // J Biolumin Chemilumin. – 1989. –V. 4. P. 375-380.
125. Stewart, C.R. Genes and regulatory sites of the «host-takeover module» in the terminal redundancy of Bacillus subtilis bacteriophage SPO1 / C.R. Stewart, Gaslightwala I., Hinata K. // Virology. –1988. - V. 246. – P. 329-340.
126. Tallent, S.M. Efficient Isolation and Identification of Bacillus cereus / S. M. Tallent, K. M. Kotewicz, E. A. Strain, R. W. Bennett, // Group Journal of AOAC International. – 2012. – Vol. 95. – №. 2. – P. 446-451.
127. Thome C.B. Genetics of Bacillus anthracis // In Leive L. (Ed.). Microbiology. – 1985. – Amer. Soc. Microbiol, Washington D.C. – 1985. – P. 56-62.
128. Titball, R.W. Factors affecting the germination of spores of Bacillus anthracis / R.W. Titball, R.J. Manchee // J Appl Bacteriol. – 1987. – V. 62. – P. 269-273, 1987.
129. Watanabe T. The fine structure and the protein composition of phage of Bacillus anthracis / T. Watanabe, A. Morimoto, T. Shiomi // Can. J. Microbial. – 1975. – V.21. - P. 1889-1892.
130. Wood, H.E. Characterization of PBSX, a defective prophage of Bacillus subtilis / H.E. Wood, M.T. Dawson, K.M. Devine [et al.] // J. Bacteriol. – 1990. – V. 172. – P. 2667-2674.
131. Zhou B. Human antibodies against Bacillus: A model study for detection of and protection against anthrax and the bioterrorist threat / B. Zhou, P. Wirsching, K. Janda // Proc. Nath. Acad. Sci. USA. – 2002. – V. 99. – P. 5241-5246.
132. База знаний по биологии человека - http://humbio.ru/humbio/tarantul_sl/00001642.htm.
133. http://www.worldidlogo.com/ma/enwiki/ru/Bacillus_licheniformis
134. <http://www.diclib.com/cgi-bin/>
135. <http://smikro.ru/>
136. <http://www.splammo.net/bact102/102bacillus.html>
137. <http://ru-patent.info>

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

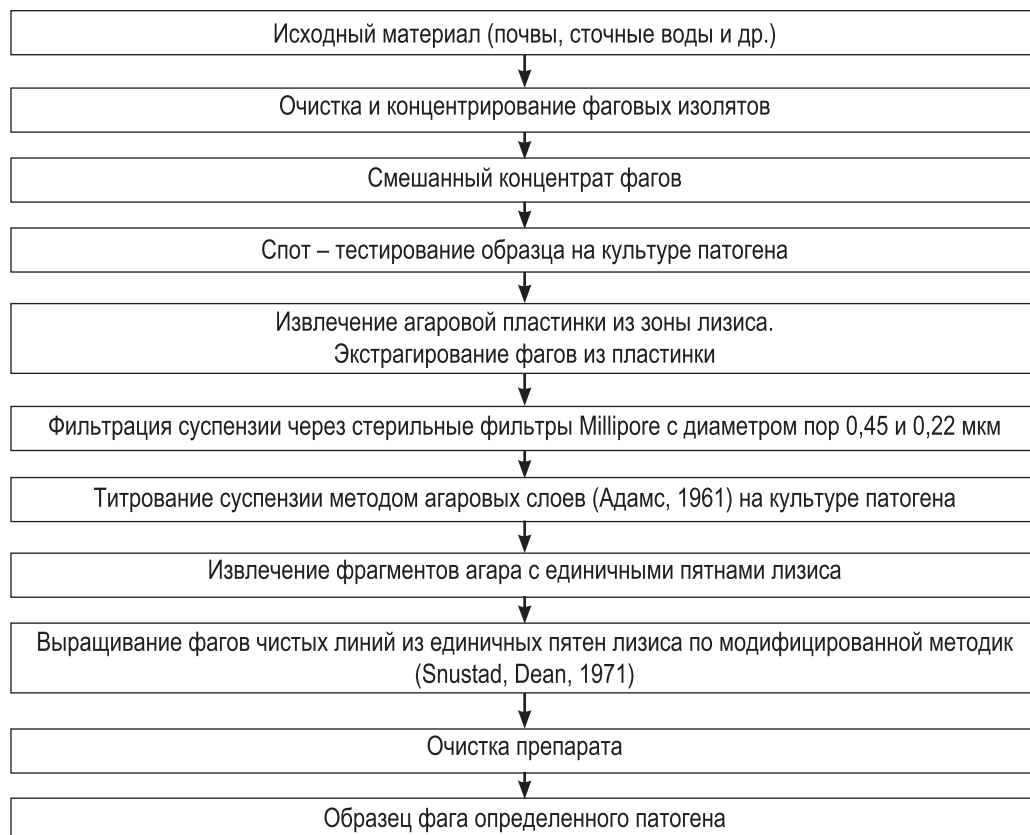


Рис. 1. Схема изолирования чистых линий фагов из природных источников (Попов, 2003)

СОДЕРЖАНИЕ

ПРЕДИСЛОВИЕ	5
ВВЕДЕНИЕ	7
ГЛАВА 1	
ФАГИ БАКТЕРИЙ РОДА BACILLUS	9
1.1. Распространение бактерий рода BACILLUS	9
1.2. Генетика бациллярных фагов	18
1.3. Морфология бациллярных фагов	22
1.4. Взаимодействие фаг-клетка на примере бациллярных фагов	34
1.5. Лизогения на примере бациллярных фагов	38
1.6. Действие химических и физических агентов на бациллярные фаги	40
1.7. Распространение и применение бациллярных фагов	45
ГЛАВА 2	
СИБИРЕЯЗВЕННЫЕ БАКТЕРИОФАГИ	51
2.1. Идентификация возбудителя сибирской язвы	51
2.2. Характеристика сибиреязвенных фагов	55
2.3. Применение применения сибиреязвенных бактериофагов	64
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	68
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	73
ПРИЛОЖЕНИЕ 1	78

**ВАСИЛЬБЕВ Д.А., ФЕОКТИСТОВА Н.А.,
ЗОЛОТУХИН С.Н., АЛЕШКИН А.В.**

БАКТЕРИОФАГИ РОДА BACILLUS

Художественное оформление и компьютерное обеспечение Василькиной М.Н.

Отпечатано в типографии ООО "Колор-Принт"
г.Ульяновск, ул. Ленина, д.75
тел.: (8422)42-28-45, т/ф 41-82-23
www.color73.ru