

УДК 619:578

**ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ВЫДЕЛЕННЫХ ФАГОВ
БАКТЕРИЙ ВИДА *BACILLUS SUBTILIS*
STUDYING OF BIOLOGICAL PROPERTIES OF THE ALLOCATED PHAGES OF
BACTERIA OF TYPE *BACILLUS SUBTILIS***

**Н.А. Феоктистова, А.Х. Мустафин, А.И. Калдыркаев, Д.А. Васильев
N.A. Feoktistova, A.H. Mustafin, A.I. Kakdirkaev, D.A. Vasiliev**

**Научно-исследовательский инновационный центр микробиологии и
биотехнологии Ульяновской ГСХА
The research innovation centre of microbiology and biotechnology
Ulyanovsk state academy of Agriculture**

*In article the characteristic is given to biological properties of phages of bacteria of type *Bacillus subtilis* (morphology of negative colonies, the spectrum of lytic action, lytic activity).*

Изучение биологических свойств фагов проводили по методикам, предложенным М. Адамсом [1], А.С. Тихоненко [9], Т.Г. Чинашвили [10], И.М. Габриловичем [3].

Целью наших исследований было изучение следующих свойств выделенных фагов бактерий вида *Bacillus subtilis*:

- морфология негативных колоний,
- спектр литического действия,
- литическая активность.

Морфологию негативных колоний выделенных бактериофагов изучали при посевах фагов методом агаровых слоев по Грациа. Учет проводили через 24 часа инкубации при температуре 33 °С.

Результаты исследований представлены в таблице 1.

Изучение морфологии негативных колоний выделенных бактериофагов показало, что их можно сгруппировать в два типа негативных колоний [2]:

1 тип: прозрачные негативные колонии округлой формы, 1,0-2,5 мм в диаметре (фаги С-3, С-4, С-5, С-8, С-10, С-15, С-19 С-9, С-12, С-14, С-17, С-18, С-22 серии УГСХА);

2 тип: прозрачные негативные колонии округлой формы, 2,6-4,0 мм в диаметре (фаги С-1, С-2, С-11, С-16, С-13, С-20, С-21 серии УГСХА).

Селекцию бактериофагов и повышение их литической активности проводили методом пассирования фага на индикаторной культуре с периодической отливкой типичных негативных колоний по методике, описанной И.М. Габриловичем [4], С.Н. Золотухиным [7].

Для этого исследуемый бактериофаг засеивали по методу агаровых слоев по Грациа, используя разведения 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , чтобы на питательной среде сформировались отдельные негативные колонии. После 24-часового культивирования в термостате одну негативную колонию, расположенную от других не менее чем в 10 мм, отливали бактериологической петлей на мясопептонный бульон, туда же вносили индикаторную культуру *Bacillus subtilis* в количестве 0,2 мл. Одновременно ставился контроль: мясопептонный бульон, засеянный индикаторной культурой *Bacillus subtilis* в количестве 0,2 мл. Пробирки культивировали в термостате при 33 °С в течение 5 часов. Полученный фаголизат прогревали в водяной бане при 78-80 °С в течение 30 минут и исследовали методом агаровых слоев по Грациа, затем отбирали негативную колонию идентичную исходной, с которой вновь проводили такую же операцию.

Таблица 1

**Морфология негативных колоний выделенных фагов бактерий вида
*Bacillus subtilis***

№	Бактериальная культура <i>Bacillus subtilis</i> / название фага.	Наличие негативных колоний или лизиса
1.	<i>Bacillus subtilis</i> 61/ C-1 УГСХА	Прозрачные негативные колонии, округлой формы с ровными краями, 2,6-3,0 мм в диаметре
2.	<i>Bacillus subtilis</i> 3/ C-2 УГСХА	Прозрачные негативные колонии, округлой формы с ровными краями, 3,0-4,0 мм в диаметре
3.	<i>Bacillus subtilis</i> 3П/ C-3 УГСХА	Прозрачные негативные колонии, округлой формы с ровными краями, 1,0 мм в диаметре
4.	<i>Bacillus subtilis</i> 98/ C-4 УГСХА	Прозрачные негативные колонии, округлой формы с ровными краями, 1,0-1,5 мм в диаметре
5.	<i>Bacillus subtilis</i> 8/ C-5 УГСХА	Прозрачные негативные колонии, округлой формы с ровными краями, 0,5-1,0 мм в диаметре
6.	<i>Bacillus subtilis</i> 21/ C-6 УГСХА	Прозрачные негативные колонии, округлой формы с ровными краями, 1,0-1,3 мм в диаметре
7.	<i>Bacillus subtilis</i> 17/ C-7 УГСХА	Прозрачные негативные колонии, округлой формы с ровными краями, 1,0-1,5 мм в диаметре
8.	<i>Bacillus subtilis</i> 5/ C-8 УГСХА	Прозрачные негативные колонии, округлой формы с ровными краями, 1,0-1,5 мм в диаметре
9.	<i>Bacillus subtilis</i> 16/ C-9 УГСХА	Прозрачные негативные колонии, округлой формы с ровными краями, 1,0 мм в диаметре
10.	<i>Bacillus subtilis</i> 32/ C-10 УГСХА	Прозрачные негативные колонии, округлой формы с ровными краями, 1,0-1,5 мм в диаметре
11.	<i>Bacillus subtilis</i> 10/ C-11 УГСХА	Прозрачные негативные колонии, округлой формы с ровными краями, 2,6-3,0 мм в диаметре
12.	<i>Bacillus subtilis</i> 12/ C-12 УГСХА	Прозрачные негативные колонии, округлой формы с ровными краями, 1,0-1,5 мм в диаметре
13.	<i>Bacillus subtilis</i> 26/ C-13 УГСХА	Прозрачные негативные колонии, округлой формы с ровными краями, с зоной неполного лизиса по периферии, 6,0-8,0 мм в диаметре
14.	<i>Bacillus subtilis</i> 23/ C-14 УГСХА	Прозрачные негативные колонии, округлой формы с ровными краями, 1,0 мм в диаметре
15.	<i>Bacillus subtilis</i> 12/ C-15 УГСХА	Прозрачные негативные колонии, округлой формы с ровными краями, 1,5 мм в диаметре
16.	<i>Bacillus subtilis</i> 4/ C-16 УГСХА	Прозрачные негативные колонии, округлой формы с ровными краями, 2,6-3,0 мм в диаметре
17.	<i>Bacillus subtilis</i> 19/ C-17 УГСХА	Прозрачные негативные колонии, округлой формы с ровными краями, 1,5 мм в диаметре
18.	<i>Bacillus subtilis</i> 4/ C-18 УГСХА	Прозрачные негативные колонии, округлой формы с ровными краями, 1,0-1,5 мм в диаметре
19.	<i>Bacillus subtilis</i> 31/ C-19 УГСХА	Прозрачные негативные колонии, округлой формы с ровными краями, 1,0-1,5 мм в диаметре
20.	<i>Bacillus subtilis</i> 25/ C-20 УГСХА	Прозрачные негативные колонии, округлой формы с ровными краями, с зоной неполного лизиса по периферии, 3,0-3,5 мм в диаметре
21.	<i>Bacillus subtilis</i> 27/ C-21 УГСХА	Прозрачные негативные колонии, округлой формы с ровными краями, с зоной неполного лизиса по периферии, 2,6-3,0 мм в диаметре
22.	<i>Bacillus subtilis</i> 14/ C-22 УГСХА	Прозрачные негативные колонии, округлой формы с ровными краями, 2,0-2,5 мм в диаметре

Спектр литической активности является одной из основных характеристик диагностического препарата фага. Определение спектра литической активности проводили методом нанесения фага на газон бактериальной культуры [1, 5].

Для изучения спектра литической активности селекционированных нами 22 изолятов фагов было использовано 30 полевых и 5 штаммов бактерий *Bacillus subtilis* из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ Ульяновской ГСХА.

На поверхность МПА в чашках Петри пастеровской пипеткой наносили 3-4 капли 18-ти часовой бульонной культуры исследуемых микроорганизмов. Затем равномерно распределяли по поверхности среды стерильным шпателем. Чашки ставили в термостат для подсушивания на 15-20 минут. Чашку делили бактериологическим карандашом на два сектора. На поверхность засеянной среды в первом секторе пастеровской пипеткой легким прикосновением капли наносили исследуемый фаг и наклоняли, чтобы капля стекла, на второй сектор аналогичным образом наносили МПБ (для контроля), затем инкубировали при температуре 33 °С, оценку результатов проводили через 18 часов.

Результаты исследований представлены в таблице 2.

Таблица 2

**Спектр литической активности выделенных фагов
бактерий вида *Bacillus subtilis***

№	Фаги	Кол-во испытанных штаммов	Из них чувствительны к фагу	Процент лизируемых штаммов
1	С-1 УГСХА	35	13	37,1
2	С-2 УГСХА	35	5	14,3
3	С-3 УГСХА	35	5	14,3
4	С-4 УГСХА	35	8	22,9
5	С-5 УГСХА	35	13	37,1
6	С-6 УГСХА	35	12	34,3
7	С-7 УГСХА	35	7	20,0
8	С-8 УГСХА	35	10	28,6
9	С-9 УГСХА	35	8	22,9
10	С-10 УГСХА	35	9	25,7
11	С-11 УГСХА	35	11	31,4
12	С-12 УГСХА	35	12	34,3
13	С-13 УГСХА	35	17	48,6
14	С-14 УГСХА	35	8	22,9
15	С-15 УГСХА	35	10	28,6
16	С-16 УГСХА	35	17	48,6
17	С-17 УГСХА	35	6	17,1
18	С-18 УГСХА	35	9	25,8
19	С-19 УГСХА	35	3	8,6
20	С-20 УГСХА	35	7	20,0
21	С-21 УГСХА	35	8	22,9
22	С-22 УГСХА	35	10	28,6

Анализируя данные таблицы 2, нужно отметить, что бактериофагов, лизирующих только один штамм, обнаружено не было, а максимальное количество штаммов (по 17) лизировали 2 сублисных фага С-13 УГСХА и С-16 УГСХА. Все выделенные фаги обладали перекрестным лизисом. Совокупный процент лизиса 35 сублисных культур бактериофагами С-13 УГСХА и С-16 УГСХА составил 64,4 %.

Литическая активность бактериофага оценивается по его способности вызывать лизис бактериальной культуры в жидких или плотных питательных средах и выражает это тем максимальным разведением, в котором испытуемый

бактериофаг проявил свое литическое действие. Более точным методом оценки литической активности бактериофага является определение количества активных корпускул фага в единице объема. Однако этот показатель относительный, так как активность фага зависит от различных условий, основными из которых являются биологические особенности бактериальной клетки, которые в свою очередь зависят от физических свойств среды, ее химического состава, окружающей температуры и так далее. Поэтому активность фага всегда определяется в конкретных, стандартных условиях.

Культуры бактерий вида *Bacillus subtilis* для определения литической активности бактериофагов выращивали на стандартном мясопептонном бульоне в течение 18 часов.

Литическую активность селекционированных бактериофагов определяли по методу Аппельмана и Грация [8].

Определение литической активности фага по методу Аппельмана: в ряд пробирок из нейтрального стекла одинакового диаметра наливали по 4,5 мл бульона. В первую пробирку вносили 0,5 мл исследуемого протейного фага. Затем делали последовательные разведения, перенося отдельными пипетками из пробирки в пробирку по 0,5 мл бактериофага. Использовали 10 пробирок. Из последней пробирки 0,5 мл выливали в дезинфицирующий раствор, затем во все пробирки вносили по 0,2 мл 18-часовой индикаторной культуры. 11 и 12 пробирки являются контрольными, в первой из них находится МПБ и культура (без фага), во второй - один МПБ (контроль на стерильность). Все 12 пробирок помещали в термостат при 33 °С на 18 часов. Титр фага устанавливали по последней прозрачной пробирке ряда и выражали разведением фага.

Также литическую активность определяли методом агаровых слоев.

Результаты исследований представлены в таблице 3.

Таблица 3

Литическая активность субтилисных бактериофагов по Аппельману и Грация

№/№	Название бактериофага	Титр по Аппельману	Титр по Грация
1	С-1 УГСХА	10 ⁻⁶	3,5x10 ⁷
2	С-2 УГСХА	10 ⁻⁷	1,0x10 ⁸
3	С-3 УГСХА	10 ⁻⁶	2,2x10 ⁷
4	С-4 УГСХА	10 ⁻⁷	2,4x10 ⁸
5	С-5 УГСХА	10 ⁻⁶	2,0x10 ⁷
6	С-6 УГСХА	10 ⁻⁷	6,0x10 ⁸
7	С-7 УГСХА	10 ⁻⁶	4,0x10 ⁷
8	С-8 УГСХА	10 ⁻⁵	1,7x10 ⁶
9	С-9 УГСХА	10 ⁻⁶	2,4x10 ⁷
10	С-10 УГСХА	10 ⁻⁷	3,0x10 ⁸
11	С-11 УГСХА	10 ⁻⁷	1,0x10 ⁸
12	С-12 УГСХА	10 ⁻⁶	4,0x10 ⁷
13	С-13 УГСХА	10 ⁻⁸	2,8x10 ⁹
14	С-14 УГСХА	10 ⁻⁷	2,4x10 ⁸
15	С-15 УГСХА	10 ⁻⁶	4,0x10 ⁷
16	С-16 УГСХА	10 ⁻⁸	3,0x10 ⁹
17	С-17 УГСХА	10 ⁻⁶	1,5x10 ⁷
18	С-18 УГСХА	10 ⁻⁷	5,1x10 ⁸
19	С-19 УГСХА	10 ⁻⁶	3,0x10 ⁷
20	С-20 УГСХА	10 ⁻⁶	1,2x10 ⁷
21	С-21 УГСХА	10 ⁻⁶	2,0x10 ⁷
22	С-22 УГСХА	10 ⁻⁷	3,4x10 ⁸

Согласно данным таблицы 3, нужно отметить, что выделенные субтилисные бактериофаги обладали разной литической активностью в диапазоне от 10^{-5} до 10^{-8} , оценивая ее по Аппельману. Максимальный титр - 10^{-8} - отмечен у бактериофагов С-13 УГСХА и С-16 УГСХА. Изученные фаги характеризовались различным спектром литической активности, оценивая ее методом агаровых слоев по Грациа. Он колебалась от $1,7 \times 10^6$ до $3,0 \times 10^9$. Максимальный титр был зафиксирован у бактериофагов С-13 УГСХА и С-16 УГСХА и составил $2,8 \times 10^9$ и $3,0 \times 10^9$ соответственно.

Анализируя результаты изучения биологических свойств выделенных нами фагов бактерий вида *Bacillus subtilis*, нужно отметить, что наиболее широким спектром литической активности по отношению к изучаемым субтилисным культурам обладали фаги С-13 УГСХА и С-16 УГСХА, лизировавшие по 17 из изучаемых 35 штаммов бактерий вида *Bacillus subtilis*, что равно 64,4 %. Литическая активность, определяемая по методам Аппельмана и Грациа, этих фагов была максимальной из 22 выделенных. Учитывая вышеизложенные результаты, фаги С-13 УГСХА и С-16 УГСХА были выбраны нами для конструирования диагностического препарата, предназначенного для индикации и идентификации бактерий вида *Bacillus subtilis* в объектах санитарного надзора.

Литература

1. Адамс М. Бактериофаги. – М., 1961. – С. 26-121.
2. Бабков В.В. Биологическая характеристика умеренных бактериофагов *E. coli* O124:B17 // Проблемы бактериофагии и биологии кишечных бактерий: Сб. кафедры микробиологии 1 Лен. Мед. ин-та им. акад. И.П. Павлова. – Л., 1973. – С.53.
3. Габрилович И.М. Общая характеристика бактериофагов // Основы бактериофагии. – Минск, 1973. – С.5 – 24.
4. Габрилович И.М. Биологические свойства бактериофагов *Serratia marcescens* //ЖМЭИ. – 1992. – №6. – С.10-12.
5. Ганюшкин В.Я. Бактериофаги сальмонелл и их применение в ветеринарии. – Ульяновск. – 1988. – С.45.
6. Гольдфарб Д.М. Бактериофагия. – М.: Медгиз, 1961. – С. 6-184.
7. Золотухин С.Н. Бактериофаги *M.morganii* и их применение при желудочно-кишечных заболеваниях поросят // Автореф. дис. ... канд. вет. наук. – М, 1994. – 20с.
8. Ревенко И.П. Бактериофаги и их использование в ветеринарной практике. – Киев: Урожай, 1978. – С. 41-88.
9. Тихоненко А.С. Ультраструктура вирусов бактерий. – М.: Наука, 1968. – С. 89.
10. Чинашвили Т.Г. К механизму образования фагоустойчивых форм микроорганизмов // В кн.: Вопросы молекулярной генетики микроорганизмов. – М., 1968. – С.225.