

А.В.Каштанов // Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии: сб. науч. тр. Всероссийского научно-исследовательского института ветеринарной санитарии, гигиены и экологии. Т.115. –М., 2003. –С.242-249.

6. Костюкова, Т.А. Практические аспекты выбора дезинфекционных средств / Т.А. Кострюкова, М.Н. Ляпин, Т.А. Малюкова // Санитарная охрана территорий государств СНГ: проблемы биологической безопасности и противодействия биотерроризму в современных условиях: материалы VI Межгосударственной науч.- практ. конф. государств-участников СНГ. – Волгоград. - 2005. - С. 249-250.

7. Попов, Н.И. Новое дезинфицирующее средство Бианол для дезинфекции объектов ветеринарного надзора / Н.И.Попов, Г.Д.Волковской, С.А.Мичко // Проблемы ве-

теринарной санитарии, гигиены и экологии: сб. науч. трудов Всероссийского научно-исследовательского института ветеринарной санитарии, гигиены и экологии. Т. 115.-М., 2003. – С. 218-229.

8. Саврилов, М.Р. Изыскание средств дезинфекции при сибирской язве / М.Р. Саврилов // Проблемы мониторинга и генодиагностики инфекционных болезней животных: материалы Международной научной конференции молодых ученых, Владимир, 2004.- С.175-177.

9. Шандала, М.Г. Новые дезинфекционные технологии для профилактики инфекционных болезней / М.Г.Шандала // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2006. - №4. - С.15-17.

УДК 619:578

ХАРАКТЕРИСТИКА БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БАКТЕРИОФАГОВ ВИДА *BACILLUS SUBTILIS*

Д.А. Васильев, доктор биологических наук, профессор

С.Н. Золотухин, доктор биологических наук, профессор

И.Н. Хайруллин, доктор ветеринарных наук, профессор

Н.А. Феоктистова, кандидат биологических наук, доцент

А.И. Калдыркаев, ассистент

М.А. Юдина, аспирант

А.Х. Мустафин, аспирант

ФГОУ ВПО «Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия»

тел. 8(422)55-95-47

feokna@yandex.ru

В статье дана характеристика основных биологических свойств бактериофагов вида *Bacillus subtilis* (морфология негативных колоний, литическая активность, спектр литической активности, специфичность действия, температурная устойчивость, устойчивость к хлороформу, изменение литической активности при хранении). На основании изученных свойств были отобраны фаги для конструирования биопрепарата для фагоиндикации и фагоидентификации бактерий вида *Bacillus subtilis* в объектах санитарного надзора.

Ключевые слова: бактериофаги, *Bacillus subtilis*, морфология негативных колоний, литическая активность, спектр литической активности, специфичность действия, температурная устойчивость, устойчивость к хлороформу, изменение литической активности при хранении.

Изучение биологических свойств бактериофагов – это важный этап при создании биопрепаратов для фагоиндикации и фагоидентификации бактерий. Главным признаком воздействия фага на чувствительные бактерии является их лизис, сопровождающийся выходом в среду новых вирионов фага [8]. Нанесение небольшого количества фага на поверхность сплошного слоя бактериального газона на поверхности агара ведет к образованию локальных участков лизиса клеток негативных колоний или «бляшек», каждая из которых может содержать 10^7 - 10^9 вирионов - потомков одной фаговой частицы [9]. 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 [11]. Видовая специфичность фагов используется в практике для дифференциации бактерий. Эта способность фагов определяется, прежде всего, родством их к рецепторам лизируемых бактерий [6]. Степень устойчивости бактериофагов и клеточных хозяев к воздействию высокой температуры имеет практическое значение, поэтому при изучении биологических свойств фагов определение их чувствительности к такому фактору является обязательным [4]. Бактериофаги обычно устойчивее к хлороформу, чем клетки микроорганизмов, поэтому данный химический агент является хорошим средством для освобождения фаголизата от жизнеспособных бактерий [1].

Целью наших исследований было изучение основных биологических свойств бактериофагов вида *Bacillus subtilis* (мор-

фология негативных колоний, литическая активность, спектр литической активности, специфичность действия, температурная устойчивость, устойчивость к хлороформу, изменение литической активности при хранении).

Материалы и методы исследований

Штаммы бактерий. В работе были использованы 40 штаммов бактерии вида *Bacillus subtilis*, из них 5 референс - штаммов из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы Ульяновской ГСХА; 5 референс - штаммов из лаборатории санитарной микробиологии ВНИИВСГиЭ; 30 штаммов выделены из проб пищевых продуктов и объектов санитарного надзора. Использовали также 126 штаммов бактерий следующих родов и видов: *Morganella*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Y. enterocolitica*, *Bacillus cereus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus mesentericus*, *Bacillus polymyxa*, *Bacillus thuringiensis*, полученных из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ ФГОУ ВПО «Ульяновская ГСХА».

Штаммы бактериофагов. Изучались биологические свойства 22 изолятов бактериофагов вида *Bacillus subtilis*, выделенных из объектов санитарного надзора Ульяновской и Самарской областей, Краснодарского края.

Методы. Изучение биологических свойств бактериофагов проводили методами, предложенными М.Адамсом [1], Д.М.Гольдфарбом [6], Л.И.Адельсоном [2], С.Лурия, Д.Дарнелом [8], А.С.Тихоненко [10], Т.Г.Чинашвили [12], И.М.Габриловичем [3], И.П.Ревенко [9], В.Я.Ганюшкиным [5]. Селекцию бактериофагов и повышение их литической активности проводили по методике, описанной и использованной И.М.Габриловичем [4], С.Н.Золотухиным [7].

Результаты собственных исследований

Характеристика выделенных фагов бактерий вида *Bacillus subtilis*

Морфологию негативных колоний изучали при посевах фагов методом агаровых слоев по Грациа [9]. Негативные колонии, образуемые выделенными бактериофагами, были разделены нами на два типа.

Спектр литической активности выделенных фагов бактерий вида *Bacillus subtilis*

№	Фаги	Кол-во испытанных штаммов	Из них чувствительны к фагу	Процент лизируемых штаммов
1	Bs - 1 УГСХА	35	17	48,6
2	Bs - 2 УГСХА	35	15	42,9
3	Bs - 3 УГСХА	35	25	71,4
4	Bs - 4 УГСХА	35	18	51,4
5	Bs - 5 УГСХА	35	13	37,1
6	Bs - 6 УГСХА	35	12	34,2
7	Bs - 7 УГСХА	35	7	20,0
8	Bs - 6 УГСХА	35	10	28,6
9	Bs - 9 УГСХА	35	8	22,9
10	Bs - 10 УГСХА	35	9	25,7
11	Bs - 11 УГСХА	35	11	31,4
12	Bs - 12 УГСХА	35	12	34,3
13	Bs - 13 УГСХА	35	28	80,0
14	Bs - 14 УГСХА	35	8	22,9
15	Bs - 15 УГСХА	35	10	28,6
16	Bs - 16 УГСХА	35	31	88,6
17	Bs - 17 УГСХА	35	6	17,1
18	Bs - 18 УГСХА	35	19	54,3
19	Bs - 19 УГСХА	35	13	37,2
20	Bs - 20 УГСХА	35	7	20,0
21	Bs - 21 УГСХА	35	18	51,4
22	Bs - 22 УГСХА	35	10	28,6
	Процент лизиса			91,5

1 тип: прозрачные негативные колонии округлой формы, 1,0-2,5 мм в диаметре (фаги Bs-3, Bs-4, Bs-5, Bs-8, Bs-10, Bs-15, Bs-13, Bs-9, Bs-12, Bs-14, Bs-17, Bs-18, Bs-22 серии УГСХА);

2 тип: прозрачные негативные колонии округлой формы, 2,6-4,0 мм в диаметре (фаги Bs-1, Bs-2, Bs-11, Bs-16, Bs-19, Bs-20, Bs-21 серии УГСХА).

Для изучения спектра литической активности селекционированных фагов использовали 35 штаммов бактерий вида *Bacillus subtilis*. Проводили его методом нанесения фага на газон бактериальной культуры и изучаемого бактериофага. Наиболее широким спектром литической активности по отношению к изучаемым культурам обладали штаммы фагов Bs-13 УГСХА и Bs-16 УГСХА, которые лизировали 32 штамма *Bacillus subtilis* из 35 изученных штаммов, независимо от вида, что составляло 91,5% (табл. 1).

Литическую активность выделенных бактериофагов определяли методом ага-

ровых слоев по Грациа. Накануне опыта по чашкам разливали 1,5%-ый мясопептонный агар. Перед использованием чашки подсушивали в термостате 15-20 минут. Индикаторные культуры выращивались в условиях термостата в течение 18-20 часов при 37°C на мясопептонном бульоне. Стерильно подготовленный 0,7%-ый мясопептонный агар, разлитый в пробирки по 2,5 мл, расплавляли и остужали до 46-48°C. Исследуемый на наличие бактериофага субстрат в количестве 1,0 мл помещали в 2,5 мл 0,7%-ого мясопептонного агара, туда же вносили 0,2 мл индикаторной культуры. Все быстро и тщательно перемешивали вращением пробирки в ладонях и выливали на поверхность 1,5%-ого МПА. Смесь осторожными движениями распределяли по поверхности мясопептонного агара, чашки оставляли на горизонтальной поверхности с приоткрытыми крышками на 30 минут до полного застывания агара, затем инкубировали в термостате при 37°C в течение 18-20 часов.

Результаты проведенных исследова-

Спектр литического действия бактериофагов Bs-13 и Bs-16 серии УГСХА

Название бактериофага	Количество исследуемых культур	Из них чувствительны к фагу	Процент лизируемых культур
Bs-13 УГСХА	40	31	77,5
Bs-16 УГСХА	40	34	85,0
Процент лизиса			95,0

ний свидетельствуют, что выделенные бактериофаги обладали различной литической активностью, показатели которой колебались от $1,7 \times 10^6$ до $8,0 \times 10^9$. Наиболее высокой литической активностью обладали фаги Bs-13 УГСХА и Bs-16 УГСХА: титр по Грациа $2,8 \times 10^9$ и $8,0 \times 10^9$, соответственно.

Для конструирования биопрепарата было отобрано два фага Bs-13 УГСХА и Bs-16 УГСХА, которые обладали наиболее высокими титрами по Грациа и широким спектром литического действия.

Для изучения спектра литической активности бактериофагов Bs-13 УГСХА и Bs-16 УГСХА использовали дополнительно 5 штаммов бактерий вида *Bacillus subtilis* из музея ВНИИВСГиЭ. Результаты опыта представлены в таблице 1.

Таким образом, совместный процент лизиса бактериофагов Bs-13 УГСХА и Bs-16 УГСХА на 40 штаммах бактерий вида *Bacillus subtilis* составил 95,0% (табл. 2).

Изучение специфичности двух бактериофагов *Bacillus subtilis* (Bs-13 УГСХА, Bs-16 УГСХА) проводили по отношению к представителям других семейств и родов методом «стекающая капля» с использованием штаммов: *spp. Morganella* - 6 штаммов, *spp. Klebsiella* - 6 штаммов, *spp. Salmonella* - 6 штаммов, *spp. Staphylococcus* - 4

штамма, *spp. Streptococcus* - 2 штамма, *spp. Pseudomonas* - 4 штамма, *Y. enterocolitica* - 12 штаммов; и гомологичного рода: *Bacillus cereus* - 25 штаммов, *Bacillus mycoides* - 15 штаммов, *Bacillus megaterium* - 14 штаммов, *Bacillus mesentericus* - 18 штаммов, *Bacillus polymyxa* - 12 штаммов, *Bacillus thuringiensis* - 4 штамма. Полученные результаты позволяют сделать вывод, что фаги неактивны к представителям бактерий гетерологичных видов, родов и семейств. Таким образом, селекционированные нами фаги являются специфичными для бактерий вида *Bacillus subtilis*.

Результаты проведенных исследований по изучению температурной устойчивости фагов бактерий вида *Bacillus subtilis*. Позволяют применять прогревание как метод инактивации микрофлоры при работе с бактериофагами *Bacillus subtilis*, так как воздействие температуры в диапазоне 64-73°C не понижало литическую активность бактериофагов, в то время как вегетативные формы клетки бактерий вида *Bacillus subtilis* в наших исследованиях погибали при температуре 64°C в течение 45 минут.

Определение чувствительности бактериофагов и бактерий к воздействию хлороформа проводили методом обработки фаговой суспензии и бульонных культур хлороформом в соотношении 1:10 при постоянном встряхивании. Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что селекционированные бактериофаги Bs-13 УГСХА и Bs-16 УГСХА проявили выраженную устойчивость к воздействию хлороформа. Обработка вегетативных форм индикаторных штаммов *Bacillus subtilis* 26 для фага Bs-13 УГСХА и *Bacillus*

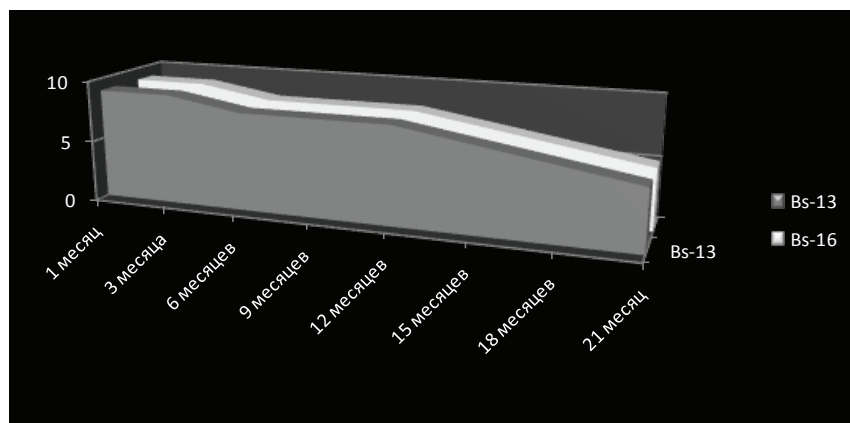


Рис. 1. - Изменение литической активности фагов при хранении

Устойчивость фагов Bs-13 и Bs-16 серии УГСХА к воздействию хлороформа

Фаги	Количество фаговых корпускул в 1 мл			Контроль активности
	Обработка в течение 15 мин.	Обработка в течение 30 мин.	Обработка в течение 45 мин.	
Bs-13 УГСХА	2,5x10 ⁹	2,0x10 ⁹	0,6x10 ⁹	2,8x10 ⁹
Bs-16 УГСХА	8,0x10 ⁹	7,1x10 ⁹	5,1x10 ⁹	8,0x10 ⁹

subtilis 4 для фага Bs-16 УГСХА в течение 15 минут хлороформом приводила к их полной гибели. Это свойство мы использовали для освобождения фаголизата от жизнеспособных бактерий при пастеризации хлороформоустойчивых термостабильных бактериофагов *Bacillus subtilis*.

Для разработки технологических параметров изготовления биопрепарата из фагов Bs-13 УГСХА и Bs-16 УГСХА необходимо было установить изменение литической активности указанных штаммов при хранении в условиях 2-4 °С. В течение 12 месяцев проверялась литическая активность укупоренных бактериофагов методом агаровых слоев. Полученные результаты свидетельствуют о том, что селекционированные бактериофаги *Bacillus subtilis* при хранении в условиях 2-4°С в течение 12 месяцев незначительно снижали литическую активность до 10⁸ фаговых корпускул в 1 см³.

В результате проведенных исследований были изучены основные биологические свойства бактериофагов вида *Bacillus subtilis* (морфология негативных колоний, литическая активность, спектр литической активности, специфичность действия, температурная устойчивость, устойчивость к хлороформу, изменение литической активности при хранении). На основании изученных свойств было отобрано для конструирования биопрепарата два штамма фагов Bs-13 УГСХА и Bs-16 УГСХА, которые имели титр 10⁸ по Аппельману и 2,8x10⁹ - 8,0x10⁹ по Грациа, обладали выраженной специфичностью к штаммам бактерий вида *Bacillus subtilis*, не лизировали представителей родов *Morganella*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, вида *Y. enterocolitica*; и гомологичного рода: *Bacillus cereus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus mesentericus*, *Bacillus polymyxa*, *Bacillus thuringiensis*, сохраняли литическую активность в пределах 10⁸–10⁹

в течение 12 месяцев при хранении в условиях 2-4°С, были термостабильными и хлороформоустойчивыми.

Библиографический список

1. Адамс М. Бактериофаги. – М., 1961. – С. 26-121.
2. Адельсон Л.И. Бактериофаги, активные по отношению к энтеропатогенным кишечным палочкам // Вопросы микробиологической диагностики и бактериофагии. – М., 1962. – С. 184-194.
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. Лурия С., Дарнелл Д. Общая вирусология – М., Мир, 1970. – С.36-47.
9. Ревенко И.П. Бактериофаги и их использование в ветеринарной практике. – Киев: Урожай, 1978. – С. 41-88.
10. Тихоненко А.С. Ультраструктура вирусов бактерий. – М.: Наука, 1968. – С. 89.
11. Тимаков В.Д., Гольдфарб Д.М. Экспериментальное обоснование нового принципа обнаружения дизентерийных и брюшнотифозных бактерий с помощью фага // ЖМЭИ. – 1956. – № 10. – С. 3-7.
12. Чинашвили Т.Г. К механизму образования фагоустойчивых форм микроорганизмов // В кн.: Вопросы молекулярной генетики микроорганизмов. – М., 1968. – С.225.