

**BACTERIA, CIRCULATING IN AGROCENOSSES OF UKRAINE**

*Semchuk L.I., Postoenko E.M., Romashev S.A.*

**Keywords:** *Bacteriophages, ecology, phytopathogenic bacteria, nucleic acids, Recombinant.*

*Studied ecology of phages, to fourteen strains phytopathogenic bacteria Xanthomonas, Erwinia and Pseudomonas. Phages in a separate ecological community, could be detected for all test strains during several consecutive sampling. At the same time, in biological samples taken at the Ukrainian Antarctic station, has been detected phages infections on test bacteria. In analysis samples, washed from the gills fishes Black Sea, was observed only lytic activity, no reproduction.*

*It shown, that resistance, to strains of X. axonopodis pv. beticola IMV 7325, P. syringae pv. atrofaciens IMV 1025, P. syringae pv. tabaci IMV 223, E. carotovora IMV 216 (Pectobacterium carotovorum) phages, formed recombinants, which are capable to lysing new hosts.*

*A comparison genomes of monospecific phage P. atrofaciens IMV 1025, from collection, with laboratory recombinants, showed that the profiles DNA HindIII -fragments all samples are identical. Studying the properties of phages is important to consider at their practical implementation, in particular, the artificial bring in ecosystem.*

УДК 579.262

**ОСОБЕННОСТИ ВОЗРАСТНОЙ ДИНАМИКИ БАКТЕРИОФАГОВ  
E. COLI КИШЕЧНОГО МИКРОБИОЦЕНОЗА СВИНЕЙ**

*Скобликов Н.Э., кандидат медицинских наук  
ГНУ Северо-Кавказский научно-исследовательский институт  
животноводства Россельхозакадемии (СКНИИЖ)  
тел. 8(918)4989891, [skoblikow@yandex.ru](mailto:skoblikow@yandex.ru)*

*Зимин А.А., кандидат биологических наук  
ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им.Г.К.Скрябина  
РАН (ИБФМ РАН)  
8(4967)730479, [zimin@ibpm.pushchino.ru](mailto:zimin@ibpm.pushchino.ru)*

**Ключевые слова:** *бактериофаги, E.coli, свиньи, возрастная динамика*

*Работа посвящена определению титра и разнообразия бактериофагов E.coli в кишечнике поросят первых месяцев жизни. Установлено: пик количества и разнообразия коли-фагов приходится на 27 день; динамика имеет тенденцию к снижению с титра 4,73 – 5,46 lg БОЕ/г до неопределяемых значений к 66 дню; большую часть (89,7%) коли-фагов составляют фаги T4-типа семейства Myoviridae.*

**Введение**

В настоящее время исследованиям микробной экологии растущих животных посвящено уже значительное количество работ [1], однако в абсолютном большинстве они касаются рассмотрения бактериальной составляющей, в то время как рассмотрение бактериофагов, составляющих единую микроэкологическую систему с изучаемыми бактериями-хозяевами,

остаётся практически без внимания исследователей. Такая ситуация особенно парадоксальна в отношении фагов *E.coli* (коли-фагов), которых можно назвать самыми изученными (в т.ч. – и по причине их применения в качестве основы профилактических и терапевтических антибактериальных препаратов). Работы, посвящённые описанию фаговых профилей микробиоценозов животных [2; 3], крайне немногочисленны. Данное исследование позволит восполнить пробел в представлениях о детальной (с интервалом в несколько дней) возрастной динамике порослят первых месяцев жизни.

#### **Материалы и методы исследований**

Для наблюдения было отобраны трое порослят, родившихся в один день потомков одной свиноматки породы СМ-1 и содержащихся в одинаковых условиях на одинаковом рационе. Отъём порослят от свиноматок во всех группах проводился на 35-й день жизни.

У всех животных отбирались образцы содержимого толстой кишки в различном возрасте: на 17-й, 21-й, 24-й, 27-й, 31-й, 35-й, 39-й, 42-й, 46-й, 53-й, 59-й, 66-й день жизни (всего 12 раз, т.е., 36 образцов). Фекалии животных г) отбирались в одно и то же время суток (сразу после утреннего кормления около 8<sup>00</sup> – 9<sup>00</sup>) в стерильные 20 мл контейнеры. Для определения титра коли-фагов образцы фекалий, отобранных в стерильный контейнер, взвешивали, после чего ресуспендировали в 10 мл буферного (50мМ трис; 10мМ ЭДТА) раствора (рН 8,0). После приготовления взвесь центрифугировали при 3000 об/мин в течение 20 мин, отбирали супернатант, переносили в другую пробирку, добавляли 0,3 мл хлороформа и перемешивали. Центрифугировали ещё раз при 3000 об/мин в течение 20 мин, отбирали супернатант, переносили его в третью пробирку и добавляли 0,1 мл хлороформа. Из полученной суспензии делали серию 100-кратных разведений в этом же растворе, из которых производили высеивание на культуры лабораторного штамма *E. coli B* методом агаровых слоёв с использованием твёрдой и мягкой агаризованных сред *LB* [4]. После инкубирования при 37°C в течение 18 ч производили отбор образовавшихся бляшек для дальнейшего исследования, учитывая их морфологические особенности и количество бляшко-образующих единиц (БОЕ) данных бактериофагов. Количественная оценка (титр) содержания бактериофагов *E.coli* в исследуемом биоматериале осуществлялась путём подсчёта бляшек после первичного посева, выражая её в lg БОЕ/г.

Для качественной оценки спектра коли-фагов из чашек с посевом штамма *E. coli B* и образовавшимися на них бляшками производили отбор чётких изолированных бляшек, отличающихся наибольшим морфологическим разнообразием. Вырезанные бляшки вносили в пробирки с культурой соответствующего штамма, культивировали на жидкой среде *LB* при 37°C в течение 6,5 часов, после чего рост бактерий останавливали добавлением 0,1 мл хлороформа. Полученную взвесь фагов и лизированных бактерий освобождали от клеточного детрита центрифугированием при 14500 об/мин в течение 5 мин.

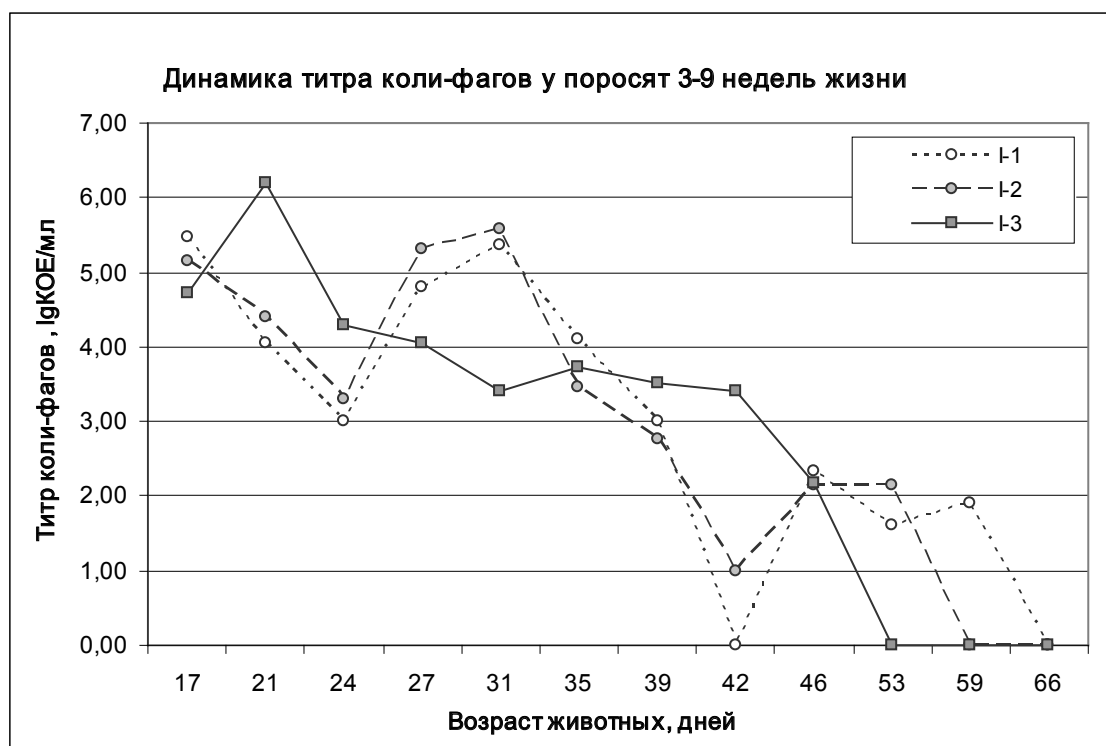
Молекулярно-генетическую характеристику бактериофагов осуществляли с применением метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) со специальными праймерами, позволяющими выявить наличие характеристических для фагов T4-типа семейства *Myoviridae* генетических маркеров. К таким маркерам относятся ген 23, кодирующий основной белок головки фага (праймеры *MZia1* и *Cap8*), ген 32 (праймеры *FR60* и *FR61*) и ген *hoc* (праймеры *hoc1fR* и *hocCrH*), кодирующие иммуноглобулиноподобные белки поверхности фага.

#### **Результаты исследований и их обсуждение**

В результате исследования оставшихся собранных 36 образцов биоматериала, подлежащего качественной и количественной оценке фагов *E.coli*, было установлено, что в 7 образцах отсутствуют фаги, определяемые на культуре *E.coli B*. В остальных 29 образцах было выделено 58 коли-фагов (от 1 до 3 фагов от одного образца), отличающихся друг от друга морфологическими особенностями бляшек. Характерно, что наибольшим разнообразием ти-

пов коли-фагов отличался период 27 дней, демонстрируя с 42 дня тенденцию к снижению разнообразия.

Количество коли-фагов, выделенных от одного животного в течение всех 12 возрастных периодов колебалось от 18 (животное III) до 20 (животные I и II). Что касается суммарного титра коли-фагов в каждом образце, то его динамика имела определённое сходство между животными. У всех животных график динамики титра коли-фагов имел следующие общие элементы: исходный (в 17 день) титр в пределах 4,73 – 5,46 lg БОЕ/г; снижение (в 24 день) до 3,00-4,28 lg БОЕ/г с последующим выравниванием; постепенное снижение (в 59 – 66 дней) до неопределяемых значений (рис. 1).



**Рис.1 - Динамика титра коли-фагов у поросят 3-9 недель жизни**

По результатам ПЦР-анализа на наличие генетических маркеров, характерных для фагов Т4-типа семейства *Myoviridae*, выяснилось, что бактериофаги различались наборами определяемых генов. Было установлено, что большая часть выделенных коли-фагов имела генетические маркеры принадлежности к фагам Т4-типа семейства *Myoviridae*. Так, из всех 58 фагов 44 фага (75,9%) были положительны по обоим генам (ген 23 и ген 32), 8 фагов (13,8%) – по гену 23; отрицательными по обоим генам было 6 фагов (10,3%). Примечательно, что ни один из 58 выделенных фагов не характеризовался генотипом «g23– g32+». Также интересно, что фаги не-Т4-типа, обнаруживаясь до отъёма у всех трёх животных, после отъёма не обнаруживались. Примечательно, что ни один из 58 выделенных фагов не характеризовался генотипом «g23– g32+». Также интересно, что фаги не-Т4-типа, обнаруживаясь до отъёма у всех трёх животных, после отъёма не обнаруживались (таблица 1).

**Таблица 1 -Доля и популяционный состав коли-фагов Т4-типа семейства *Myoviridae* в кишечном микробиоценозе поросят 3-9 недель жизни**

Животное	Доля типа коли-фагов в группе, %				
	Генотипы фагов Т4-типа				Фаги не Т4-типа (g23-/g32-)
	g23+/g32+	g23+/g32-	g23- g32+	всего	
I	75,0	15,0	0,0	90,0	10,0
II	65,0	20,0	0,0	85,0	15,0
III	88,9	5,6	0,0	94,4	5,6
Всего	75,9	13,8	0,0	89,7	10,3

Дополнительное типирование по наличию *hoc*-гена помогло более детально дифференцировать фаги Т4-типа на субпопуляции. Так, всего было выявлено 10 *hoc*-отрицательных фагов из 52 всех фагов Т4-типа (т.е., 19,2 % Т4-фагов). Однако, анализ конкретных фагов в группах животных лишь по трём генам не позволил решить вопрос об идентичности фагов с одинаковыми генотипами, определяемых в одном и том же образце. Также в целом неясным остался вопрос об идентичности фагов с одинаковыми генотипами, выделяющимися у одного и того же животного в разные временные периоды.

Однако, в данном случае, молекулярно-генетическая характеристика коли-фагов по трём различным генам позволила ответить на существенный вопрос динамики содержания бактериофагов *E.coli* у отдельных животных, а именно: вызваны ли описанные выше периодические подъёмы титра коли-фагов одними и теми же или разными фагами? Из анализа данных видно, что подъёмы титра коли-фагов на 17-й, 31-й и 46-й дни могут быть обусловлены одним и тем же фагом у животного I, но у других животных вызваны разными фагами.

#### **Заключение**

Проведённые исследования позволяют сделать следующие выводы:

1. В период с 17 до 31 день жизни в кишечном микробиоценозе поросят выделяется 2-3 коли фага (пик разнообразия приходится на 27 день), с 35 по 53 день – 1-2 фага, в возрасте 66 дней коли-фаги не выделяются в определяемых количествах.
2. Титра коли-фагов кишечного микробиоценоза поросят в возрасте 17-66 дней имеет характерную динамику, в общем имеющую тенденцию к снижению с титра 4,73 – 5,46 lg БОЕ/г до неопределяемых значений.
3. Большую часть (89,7%) выделяемых в кишечном микробиоценозе поросят коли-фагов составляют фаги Т4-типа семейства *Myoviridae*; большинство из них положительны по генам 23, 32 и *hoc*-гену.

#### **Библиографический список**

1. Holzapfel W. H., Naughton P. J. Microbial ecology in growing animals / Elsevier. 2005. 522p.
2. Callaway, T., Edrington, T., Varey, P., Raya, R., Brabban, A., Kutter, E., Jung, Y., Genovese, K., Elder, R., Nisbet, D.J. (2003). Isolation of naturally occurring bacteriophage from sheep that reduce populations of *Escherichia coli* O157:H7 *In Vitro* And *In Vivo*. *5th International Symposium on 'Shiga Toxin (Verocytotoxin) - Producing Escherichia coli Infections'*, O-16.
3. Golomidova, A., Kulikov, E., Isaeva, A., Manykin, A., Letarov, A. (2007) The Diversity of Coliphages and Coliforms in Horse Feces Reveals a Complex Pattern of Ecological Interactions. *Appl. Environ. Microbiol.* 73(19) 5975–5981.
4. Sambrook J., Frith E.F., Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual / Cold Spring Harbor Lab. Press. 1989. 480 p.

## FEATURES OF AGE DYNAMICS OF *E. COLI* PHAGES OF INTESTINAL MICROBIOCENOSIS OF PIGS

*Skoblikov N.E., Zimin A.A.*

**Key words:** bacteriophages, *E.coli*, pigs, age dynamics

The study investigates the titer and biodiversity of *E.coli* phages in intestinal microflora of pigs in first months of life. Established: the quantity and diversity peaks of coli-phages detected at 27<sup>th</sup> day; age dynamics has trend for decreasing from 4,73 – 5,46 lg PFU/g till undetected values at 66<sup>th</sup> day; most part (89,7%) of coli-phages consists of T4-type phages of Myoviridae family.

УДК 602.3:579.8

## ХАРАКТЕРИСТИКА НЕКОТОРЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БАКТЕРИОФАГОВ *VACILLUS MYCOIDES*

*Феоктистова Н. А. \**, кандидат биологических наук, доцент  
тел. 8(8422) 55-95-47, [feokna@yandex.ru](mailto:feokna@yandex.ru)

*Макеев В. А. \**, аспирант

тел. 8(8422) 55-95-47, [usxa@yandex.ru](mailto:usxa@yandex.ru)

*Васильев Д.А. \**, доктор биологических наук, профессор  
8(8422) 55-95-47, [dav\\_ul@mail.ru](mailto:dav_ul@mail.ru)

*Алешкин А.В. \*\**, доктор биологических наук  
8-495-452-18-16, [ava@gabri.ru](mailto:ava@gabri.ru)

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

\*\*Московский НИИЭиМ им. Г.Н. Габричевского»

**Ключевые слова:** Бактериофаги, *Vacillus mycooides*, биопрепарат, литическая активность, спектр литического действия, специфичность действия, изменение литической активности при хранении.

В статье дана характеристика некоторых биологических свойств бактериофагов *Vacillus mycooides* (литическая активность, спектр литического действия, специфичность действия, изменение литической активности при хранении). На основании изученных свойств были выбраны фаги для конструирования биопрепарата для фагоиндикации и фагоидентификации бактерий *Vacillus mycooides* в пищевом сырье и продуктах питания.

**Введение.** Создание биопрепарата для фагоиндикации и фагоидентификации бактерий *Vacillus mycooides* в пищевом сырье на основе бактериофагов подразумевает изучение таких биологических свойств, как литическая активность, спектр литического действия, специфичность в пределах вида и изменение литической активности при хранении [3,5].

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 от-