

### Выделение и комплексная характеристика бактериофагов *Escherichia coli* для контроля колибактериоза поросят

**Е. В. Сульдина**✉, старший преподаватель кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

**Н. И. Молофеева**, кандидат биологических наук, доцент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

**Н. А. Феоктистова**, кандидат биологических наук, доцент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

**И. И. Богданов**, кандидат ветеринарных наук, доцент, заведующий кафедрой «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

**И. С. Раксина**, кандидат ветеринарных наук, старший преподаватель кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ

432000г. Ульяновск, бульвар Новый Венец, 1

✉e.suldina2006@yandex.ru

**Резюме.** Колибактериоз поросят, вызываемый энтеропатогенными сероварами *Escherichia coli*, остаётся одной из наиболее экономически значимых инфекций в промышленном свиноводстве в условиях глобального роста антибиотикорезистентности. Цель работы – выделение и комплексная характеристика бактериофагов *E. coli* из источников, ассоциированных со свиноводческими хозяйствами Ульяновской области, для оценки их потенциала в контроле колибактериоза. Из проб сточных вод и фекалий поросят выделено 10 изолятов *E. coli*, идентифицированных по биохимическому профилю. Методом обогащения с последующей детекцией на плотной среде выделено три штамма бактериофагов. Фаг №8 продемонстрировал максимальный титр  $1,2 \times 10^9$  БОЕ/мл, наиболее широкий спектр литической активности (63,6%) и диаметр бляшек  $2,2 \pm 0,2$  мм. Все изоляты проявили строгую видовую специфичность к *E. coli*, термолабильность и устойчивость к хлороформу, что свидетельствует об отсутствии липидной оболочки и соответствует характеристикам фагов порядка *Caudovirales*. При хранении (2...4 °С) в течение трёх месяцев фаг №8 сохранил 83,3 % исходной активности, что достоверно превосходит показатели фагов №6 и №10 ( $p < 0,001$ ). Выявлена статистически значимая ассоциация между источником выделения *E. coli* и способностью утилизировать сорбит ( $p=0,021$ ), что может служить дополнительным маркером при эпизоотологическом мониторинге. Полученные данные свидетельствуют о высоком терапевтическом потенциале выделенных фагов, особенно штамма №8, и формируют научно-экспериментальную основу для разработки поливалентного биопрепарата для профилактики и терапии колибактериоза поросят, способствующего снижению применения антибиотиков в животноводстве.

**Ключевые слова:** *Escherichia coli*, колибактериоз, бактериофаг, литическая активность, фаговая терапия.

**Для цитирования:** Выделение и комплексная характеристика бактериофагов *Escherichia coli* для контроля колибактериоза поросят / Е. В. Сульдина, Н.И. Молофеева, Н.А. Феоктистова и др. // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. 2026. № 2 (74). С. 116-123. doi:10.18286/1816-4501-2026-2-116-123

### Isolation and comprehensive characterization of *Escherichia coli* bacteriophages for control of colibacillosis in piglets

**E. V. Suldina**✉, **N. I. Molofeeva**, **N. A. Feoktistova**, **I. I. Bogdanov**, **I.S. Raksina**

FSBEI HE Ulyanovsk SAU

432017 Ulyanovsk, Novy Venets Boulevard, 1

✉e.suldina2006@yandex.ru

**Abstract.** Piglet colibacillosis, caused by enteropathogenic serovars of *Escherichia coli*, remains one of the most economically significant infections in industrial swine production amid the global rise of antibiotic resistance. The aim of this study was to isolate and comprehensively characterize *E. coli* bacteriophages from sources associated with swine farms in the Ulyanovsk Region to assess their potential for controlling colibacillosis. Ten *E. coli* isolates, identified by biochemical profiling, were obtained from wastewater and piglet fecal samples. Three bacteriophage strains were isolated using an enrichment method followed by detection on solid medium. Phage 8 demonstrated the highest titer ( $1.2 \times 10^9$  PFU/mL), the broadest spectrum of lytic activity (63.6%), and a plaque diameter of  $2.2 \pm 0.2$  mm. All isolates exhibited strict species specificity to *E. coli*, thermolability, and chloroform resistance, indicating the absence of a lipid envelope and consistent with characteristics of phages belonging to the order *Caudovirales*. When stored at 2–4 °C for three months, phage 8 retained 83.3% of its initial activity, significantly exceeding the stability of phages 6 and 10 ( $p < 0.001$ ). A statistically significant association was identified between the source of *E. coli* isolation and the ability to utilize sorbitol ( $p = 0.021$ ), which may

serve as an additional marker for epizootiological monitoring. The obtained data indicate the high therapeutic potential of the isolated phages, particularly strain 8, and provide a scientific and experimental basis for the development of a polyvalent phage preparation for the prevention and treatment of colibacillosis in piglets, contributing to reduced antibiotic use in livestock production.

**Keywords:** *Escherichia coli*, colibacillosis, bacteriophage, lytic activity, phage therapy

**For citation:** Isolation and comprehensive characterization of *Escherichia coli* bacteriophages for control of colibacillosis in piglets / E. V. Sulдина, N. I. Molofeeva, N. A. Feoktistova, et al. // Vestnik of Ulyanovsk state agricultural academy. 2026.2 (74): 116-123 doi:10.18286/1816-4501-2026-2-116-123

Исследование выполнено при поддержке ООО «Лайф Фаг» (договор № 25-14/2 ДП от 04.04.2025 г.)

### Введение

Колибактериоз, вызываемый энтеропатогенными сероварами *Escherichia coli* (EPEC, ETEC), остаётся одной из наиболее экономически значимых инфекций в промышленном свиноводстве. Массовые диареи у поросят-сосунов и отёмышей приводят к задержке роста, снижению сохранности поголовья и прямым финансовым потерям хозяйств [1, 2]. Десятилетия профилактического и терапевтического применения противомикробных препаратов сформировали популяции *E. coli* с множественной лекарственной устойчивостью, что резко ограничивает эффективность традиционных схем лечения и создаёт риски распространения резистентных детерминант в экосистемах концепции «Одно здоровье» (One Health) [3, 4]. В этих условиях бактериофаги рассматриваются как перспективная альтернатива, обладающая высокой специфичностью к целевым бактериям, способностью к саморепликации в очаге инфекции и минимальным воздействием на комменсальную микробиоту кишечника [5, 6].

Однако успешная интеграция фаговых средств в практику контроля колибактериоза невозможна без предварительного этапа системного выделения и всесторонней характеристики вирулентных изолятов, адаптированных к полевым штаммам, циркулирующим в конкретных хозяйствах. Ключевыми параметрами, определяющими практическую ценность фага, являются широкий спектр литической активности, строгая видовая специфичность, оптимальная кинетика размножения (латентный период, размер выброса), а также устойчивость к агрессивным факторам желудочно-кишечного тракта поросят (низкий pH, желчные кислоты, протеолитические ферменты) и условиям технологического хранения [7, 8]. Несмотря на накопление данных об отдельных эшерихиозных фагах, в литературе остаётся недостаточным количество работ, посвящённых комплексному сопоставлению биологических и физико-химических свойств аутохтонных изолятов с их потенциальной эффективностью в условиях, приближенных к производственным. Отсутствие стандартизированных подходов к оценке стабильности, безопасности и литической активности затрудняет разработку готовых к ветеринарному применению препаратов [9, 10].

В связи с этим выделение новых бактериофагов из экологических ниш, ассоциированных со свиноводческими предприятиями, с последующим глубоким изучением их биологических свойств представляет собой актуальную научно-практическую задачу. Решение

данной проблемы позволит создать доказательную базу для разработки специфичных, безопасных и экономически целесообразных фаговых средств, способных интегрироваться в современные системы профилактики и терапии колибактериоза молодняка свиней.

Цель работы – выделение бактериофагов *Escherichia coli* из источников, ассоциированных со свиноводческими хозяйствами, комплексная характеристика их биологических свойств и оценка потенциала практического применения для контроля колибактериоза у поросят.

### Материалы и методы

Исследования проводили на кафедре микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ в период с 2024 по 2025 гг.

В работе использовали 10 полевых изолятов *Escherichia coli*, выделенных из биоматериала (фекалии, смывы) свиноводческих хозяйств Ульяновской области. Идентификацию культур проводили на основании морфологических, тинкториальных и биохимических свойств с применением набора реагентов «Пластина биохимическая, дифференцирующая энтеробактерии (ПБДЭ)» согласно инструкции производителя.

Для оценки спектра литической активности и специфичности бактериофагов дополнительно использовали референс-штаммы из музейной коллекции кафедры: *Proteus spp.* (n=4), *Citrobacter spp.* (n=1), *Klebsiella spp.* (n=1), *Salmonella spp.* (n=3), *Staphylococcus spp.* (n=6), *Bacillus spp.* (n=1). Все культуры поддерживали на мясо-пептонном агаре (МПА; НПО «Питательные среды», г. Махачкала) при температуре +4 °С не более 14 суток. Для экспериментов использовали 18...20-часовые бульонные культуры, выращенные на мясо-пептонном бульоне (МПБ) при 37 °С.

Объектами для выделения бактериофагов служили пробы сточных вод, навозной жижи и фекалии от поросят с клиническими признаками диареи, отобранные в свиноводческих комплексах Ульяновской области с соблюдением правил асептики. Пробы доставляли в лабораторию в термостатированных контейнерах (+4 °С) и обрабатывали в течение 2 ч после отбора.

Для обогащения фагов 10 г (мл) образца гомогенизировали в 90 мл стерильного МПБ, добавляли по 0,1 мл суточной бульонной культуры каждого из 10 полевых изолятов *E. coli* (индикаторный коктейль) и инкубировали при 37 °С в течение 18...24 ч при постоянном покачивании. После инкубации суспензию центрифугировали (3000 g, 15 мин), надосадочную жидкость

фильтровали через мембранные фильтры с диаметром 0,22 мкм (Millipore, США) для удаления бактериальных клеток. Для инактивации возможной контаминирующей микрофлоры к фильтрату добавляли хлороформ в соотношении 1:10 (по объёму), выдерживали 30 мин при комнатной температуре с периодическим встряхиванием, после чего удаляли органическую фазу центрифугированием.

Первичную детекцию фагов проводили методом двойных агаровых слоёв по Грациа с модификациями. В пробирку с 2,5 мл расплавленного и остуженного до 46...48 °С полужидкого агара (0,7 % МПА) вносили 0,1...0,2 мл 18-часовой индикаторной культуры *E. coli* и 0,1...1,0 мл подготовленного фильтрата. Смесь тщательно перемешивали, равномерно распределяли по поверхности предварительно подсушенного плотного МПА (1,5 %) в чашках Петри и оставляли для застывания на 20...30 мин. Чашки инкубировали при 37 °С в течение 18...20 ч. Наличие прозрачных зон лизиса (бляшек) на бактериальном газоне свидетельствовало о присутствии бактериофага.

Для получения клонированных изолятов проводили серию из 3...5 последовательных пассажей. Для этого изолированную бляшку диаметром 1...2 мм, расположенную на расстоянии  $\geq 10$  мм от соседних, переносили стерильной петлёй в 4,5 мл МПБ, добавляли 0,2 мл индикаторной культуры, инкубировали 6...8 ч при 37 °С, после чего лизат очищали центрифугированием и фильтрацией (0,22 мкм). Полученные моноклональные фаговые суспензии обозначали как *E. coli* фаг № 6, № 8, №10 и использовали для дальнейших исследований.

Титр фагов (количество бляшкообразующих единиц – БОЕ/мл) определяли методом двойных агаровых слоёв по Грациа. Исходную фаговую суспензию последовательно разводили десятикратно в стерильном физиологическом растворе ( $10^{-1}$ – $10^{-10}$ ). Для каждого разведения готовили посеы в двух повторностях. После инкубации (18...20 ч, 37 °С) подсчитывали количество бляшек в чашках, содержащих от 30 до 300 зон лизиса. Титр рассчитывали по формуле:

$$\text{Титр (БОЕ/мл)} = \frac{N \times D}{V}$$

где N – среднее число бляшек,  
D – степень разведения,  
V – объём вносимого фага (мл).

Литическую активность определяли методом серийных разведений в жидкой среде. В ряд из 10 пробирок наливали по 4,5 мл стерильного МПБ. В первую пробирку вносили 0,5 мл исходной фаговой суспензии, после чего готовили последовательные десятикратные разведения (до  $10^{-9}$ ), перенося по 0,5 мл из пробирки в пробирку стерильными пипетками. Во все пробирки добавляли по 0,2 мл 18-часовой бульонной культуры индикаторного штамма *E. coli*. В качестве контроля использовали пробирку с бульонной культурой без фага, а также пробирку только с бульоном

(контроль стерильности). Посевы инкубировали при 37 °С в течение 18 ч. Титр выражали как наибольшее разведение фага, вызывающее полное просветление среды (отсутствие видимого роста бактерий).

Спектр литической активности определяли методом нанесения фага на газон бактериальной культуры. Поверхность МПА в чашках Петри равномерно засеивали 0,2 мл 18-часовой бульонной культуры тестируемого штамма с помощью стерильного шпателя. После подсушивания (15...20 мин, 37 °С) на поверхность агара наносили по 10 мкл фаговой суспензии с титром  $\geq 10^7$  БОЕ/мл. Чашки инкубировали при 37 °С в течение 18...20 ч. Учёт результатов проводили визуально: наличие зоны лизиса в месте нанесения фага расценивали как чувствительность штамма. Каждый опыт выполняли в трёх биологических повторностях.

Специфичность выделенных фагов тестировали на панели референс-штаммов других родов энтеробактерий и грамположительных бактерий (*Proteus*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Bacillus*). Методика соответствовала описанной выше для определения спектра активности. Отсутствие зон лизиса на всех тестируемых культурах, кроме *E. coli*, служило критерием строгой видовой специфичности.

Для оценки термостабильности аликвоты фаговых суспензий (0,5 мл) помещали в стерильные пробирки и прогревали на водяной бане в диапазоне температур 60...90 °С с интервалом 5 °С в течение 30 мин. После охлаждения определяли остаточный титр методом Грациа. Контролем служили образцы, инкубированные при 37 °С.

Устойчивость к хлороформу оценивали путем добавления к 0,9 мл фаговой суспензии 0,1 мл хлороформа (соотношение 9:1), интенсивно встряхивали 1 мин и инкубировали при комнатной температуре. Отбор проб для определения титра проводили через 15, 30 и 45 мин. После центрифугирования (5000 g, 5 мин) водную фазу титровали методом Грациа.

Для определения стабильности при хранении очищенные фаговые лизаты разливали в стерильные стеклянные флаконы, герметично закупоривали и хранили при температуре +2...+4 °С. Титр определяли в момент закладки (исходный контроль) и через 3 месяца хранения.

Все эксперименты проводили в трёх биологических повторностях, каждое определение титра в двух технических повторностях. Результаты представлены как среднее арифметическое  $\pm$  стандартное отклонение ( $M \pm SD$ ). Различия считали достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$ . Анализ данных выполняли в программах Microsoft Excel 2017.

#### Результаты

Из поступивших проб выделено 10 культур, идентифицированных как *E. coli* на основании морфологии колоний на среде Эндо и биохимического профилирования. Все изоляты соответствовали типовым признакам рода *Escherichia* (табл. 1).

Таблица 1. Биохимический профиль полевых изолятов *E. coli* (n = 10)

Биохимический тест	Положительные изоляты, n (%)	95 % ДИ (метод Уилсона)	Интерпретация для рода <i>Escherichia</i>
Углеводное брожение			
Глюкоза	10 (100)	69,2...100	Типично +
Лактоза	9 (90)	55,5...99,7	Типично +
Маннит	10 (100)	69,2...100	Типично +
Сахароза	2 (20)	2,5...55,6	Вариабельно
Инозит	0 (0)	0...30,8	Типично –
Сорбит	5 (50)	18,7...81,3	Вариабельно
Арабиноза	10 (100)	69,2...100	Типично +
Мальтоза	10 (100)	69,2...100	Типично +
Ферментативная активность			
$\beta$ -галактозидаза	10 (100)	69,2...100	Типично +
Лизиндекарбоксилаза	10 (100)	69,2...100	Типично +
Орнитиндекарбоксилаза	6 (60)	26,2...87,8	Вариабельно
Аргининдегидролаза	2 (20)	2,5...55,6	Вариабельно
Фенилаланиндезаминаза	0 (0)	0...30,8	Типично –
Уреаза	0 (0)	0...30,8	Типично –
Метаболиты			
Индол	10 (100)	69,2...100	Типично +
Ацетилметилкарбинол (ВП)	0 (0)	0...30,8	Типично –
Сероводород (H <sub>2</sub> S)	0 (0)	0...30,8	Типично –
Утилизация органических кислот			
Цитрат натрия	0 (0)	0...30,8	Типично –
Малонат натрия	0 (0)	0...30,8	Типично –
Цитрат с глюкозой	10 (100)	69,2...100	Типично +

«Типично +/-» - признак, характерный для >90 % штаммов *E. coli*.

«Вариабельно» - признак, встречающийся у 20...80 % штаммов.

Таблица 2. Источники выделения полевых изолятов *E. coli*

№ изолята	Источник выделения	Категория объекта
1–5	Сточные воды животноводческого комплекса	Объекты внешней среды
6	Фекалии свиноматки	Взрослое клинически здоровое животное
7	Фекалии поросят в период опороса	Новорождённые (группа риска)
8	Фекалии поросят на дорастивании	Отъёмши 30...60 дней (постотъёмный стресс)
9	Фекалии свиноматки	Взрослое клинически здоровое животное
10	Фекалии поросят в период опороса	Новорождённые (группа риска)

Анализируя полученные табличные значения, стоит отметить, что изолят №3 показал вариабельный результат по лактозе, который учтён как отрицательный для консервативной оценки.

Интерпретация данных основана на типовых биохимических признаках рода *Escherichia* согласно Берджи и методическим указаниям по диагностике эшерихиозов.

Выделенные бактериальные культуры в разрезе источников выделения и категории объекта представлены в таблице 2. Так, изоляты №1-5, полученные из сточных вод, отражают смешанную популяцию *E. coli*, контаминирующую объекты внешней среды фекалиями животных различных возрастных групп. Изоляты № 6 и № 9 выделены от клинически здоровых свиноматок и характеризуют комменсальную микрофлору взрослых животных. Изоляты № 7, № 8 и №10 получены от поросят в критические периоды выращивания (опорос и дорастивание), что делает их наиболее релевантными для изучения в контексте разработки средств контроля колибактериоза молодняка.

Выделенные штаммы продемонстрировали базовый биохимический профиль, соответствующий типовым признакам рода *Escherichia*, это утилизация глюкозы, лактозы, маннита, арабинозы и мальтозы, образование индола и  $\beta$ -галактозидазы, отсутствие

утилизации цитрата Симмонса, малоната натрия, инозита, отрицательные реакции на уреазу, фенилаланиндезаминазу и образование сероводорода.

При этом выявлена статистически значимая ассоциация между источником выделения и способностью утилизировать сорбит ( $p=0,021$ , точный критерий Фишера). 100 % изолятов от свиноматок и 60 % изолятов из сточных вод (3/5) утилизировали сорбит, тогда как ни один из изолятов, полученных от поросят (0/3), не проявил данной активности. Вариабельность по другим признакам (утилизация сахарозы, активность аргининдегидролазы и орнитиндекарбоксилазы) не достигала уровня статистической значимости ( $p > 0,05$ ), что, вероятно, связано с малым объёмом выборки.

Изоляты из сточных вод характеризовались наибольшим фенотипическим разнообразием, включая единственный вариант с вариабельной утилизацией лактозы (изолят № 3), что отражает гетерогенный характер данного источника и воздействие факторов внешней среды на популяцию бактерий.

Таким образом, для разработки фаговых препаратов, направленных на контроль колибактериоза поросят, приоритетными источниками выделения бактериофагов являются фекалии молодняка в периоды наибольшей восприимчивости к инфекции (опорос, постотъёмный период). Бактериальные изоляты №7,

#### 4.2.3. Инфекционные болезни и иммунология животных (биологические науки)

№8 и №10, полученные именно от этих возрастных групп, использовались в дальнейших исследованиях в качестве индикаторных культур при фаговом скрининге.

Из проб сточных вод и фекалий выделено три штамма бактериофагов, активных в отношении полевых изолятов *E. coli*: №6, №8 и №10. Морфология бляшек представлена на рисунках 1–3.

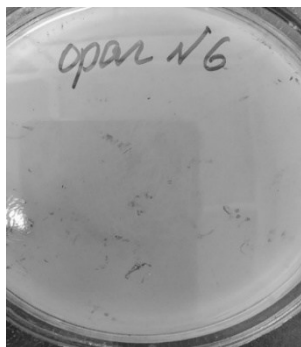


Рис. 1. Морфология фага *E. coli* №6

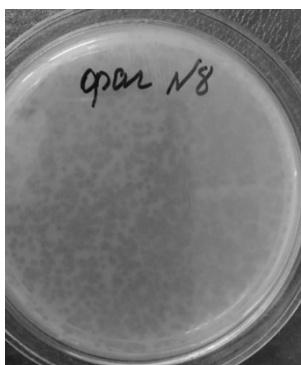


Рис. 2. Морфология фага *E. coli* №8

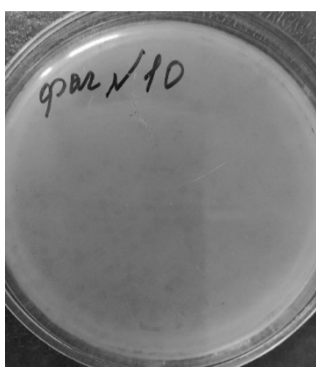


Рис. 3. Морфология фага *E. coli* №10

Таблица 3. Морфологическая характеристика выделенных бактериофагов

Штамм фага	Источник выделения	Морфология бляшек	Диаметр, мм (M ± SD, n=30)
<i>E. coli</i> №6	Сточные воды	Прозрачные, ровные края	1,0 ± 0,1
<i>E. coli</i> №8	Фекалии поросят (доращивание)	Прозрачные, четкие края	2,2 ± 0,2
<i>E. coli</i> №10	Фекалии опоро	Полупрозрачные, центр с вторичным ростом	1,9 ± 0,2

Морфометрический анализ бляшек показал, что выделенные бактериофаги формируют зоны лизиса, достоверно различающиеся по диаметру ( $F(2, 87) = 276,76$ ;  $p < 0,001$ ). Средний диаметр бляшек составил  $1,0 \pm 0,1$  мм для фага *E. coli* №6,  $2,2 \pm 0,3$  мм для фага №8 и  $1,9 \pm 0,2$  мм для фага №10 ( $n = 30$ ).

Пост-хок анализ (Тьюки HSD) выявил высоко достоверные различия между всеми попарными сравнениями ( $p < 0,001$ ). Фаг №8 формировал бляшки наибольшего диаметра, достоверно превышающего показатели фагов №6 (разница 1,18 мм, 95 % ДИ: 1,06...1,31) и №10 (разница 0,26 мм, 95 % ДИ: 0,14...0,39). Различия между фагами №6 и №10 также достигали высокой степени значимости (разница 0,92 мм).

Размеры эффекта (Cohen's d) варьировали от 1,08 до 6,0, что указывает на исключительную практическую значимость наблюдаемых различий. Более крупный размер бляшек фага №8 может отражать повышенную скорость диффузии вирионов в агаровой среде и/или более эффективный литический цикл.

Титр фагов определяли двумя методами: методом Аппельмана (жидкая среда) и методом Грациа (агаровые слои). Результаты представлены в таблице 4.

Таблица 4. Литическая активность выделенных бактериофагов (M ± SD, n = 3)

Штамм фага	Титр по Аппельману (разведение)	Титр по Грациа (БОЕ/мл)	Статистическая значимость различий методов
<i>E. coli</i> №6	$10^{-5}$	$2,0 \pm 0,4 \times 10^8$	$p = 0,032$
<i>E. coli</i> №8	$10^{-8}$	$1,2 \pm 0,2 \times 10^9$	$p = 0,018$
<i>E. coli</i> №10	$10^{-5}$	$2,0 \pm 0,5 \times 10^8$	$p = 0,041$

Метод Грациа продемонстрировал более высокую чувствительность и воспроизводимость (коэффициент вариации 8...15 % против 18...25 % для метода Аппельмана), что согласуется с данными литературы [11].

Спектр активности оценивали на панели из 22 штаммов *E. coli* (10 собственных изолятов и 12 коллекционных штаммов) (табл. 5.).

Таблица 5. Спектр литической активности бактериофагов в отношении *E. coli* (n = 22)

Штамм фага	Чувствительные штаммы, n	% лизированных штаммов (95 % ДИ)	$\chi^2$ Пирсона	p-значение
<i>E. coli</i> №6	8	36,4 (17,2...59,3)	4,82	0,028
<i>E. coli</i> №8	14	63,6 (40,7...82,8)	12,18	< 0,001
<i>E. coli</i> №10	14	63,6 (40,7...82,8)	12,18	< 0,001

Фаги №8 и №10 продемонстрировали статистически значимо более широкий спектр активности, что делает их приоритетными кандидатами для включения в поливалентный препарат.

Специфичность тестировали на панели из 16 штаммов нецелевых бактерий. Ни один из

выделенных фагов не проявил литической активности в отношении *Proteus spp.*, *Citrobacter spp.*, *Klebsiella spp.*, *Salmonella spp.*, *Staphylococcus spp.* или *Bacillus spp.*

Оценка устойчивости бактериофагов к физико-химическим воздействиям является важнейшим этапом их характеристики, так как определяет условия их производства, хранения, транспортировки и потенциального применения. Для выделенных изолятов бактериофагов *E. coli* (№6, №8, №10) была изучена их устойчивость к воздействию температуры и химического агента (трихлорметана) (табл. 6).

**Таблица 6. Комплексная оценка устойчивости выделенных бактериофагов *E. coli* к физико-химическим факторам (M ± SD, n = 3)**

Параметр / Штамм фага	<i>E. coli</i> №6	<i>E. coli</i> №8	<i>E. coli</i> №10
Исходный титр, БОЕ/мл	2,0 ± 0,4×10 <sup>8</sup>	1,2 ± 0,2×10 <sup>9</sup>	2,0 ± 0,5×10 <sup>8</sup>
Термостабильность (остаточный титр, % от контроля)			
37 °С, 30 мин (контроль)	100 ± 5,2	100 ± 4,1	100 ± 6,3
60 °С, 30 мин	94,2 ± 7,1	96,8 ± 5,4	93,5 ± 8,2
65 °С, 30 мин	78,3 ± 9,4	82,1 ± 6,8	76,9 ± 10,1
70 °С, 30 мин	42,6 ± 11,2	51,3 ± 8,9	39,8 ± 12,4
75 °С, 30 мин	3,2 ± 1,8	5,1 ± 2,4	2,8 ± 1,5
≥80 °С, 30 мин	0	0	0
Устойчивость к хлороформу (остаточный титр, % от контроля)			
15 мин экспозиции	98,2 ± 3,1	99,1 ± 2,4	97,8 ± 4,2
30 мин экспозиции	95,4 ± 5,6	97,2 ± 3,8	94,1 ± 6,1
45 мин экспозиции	89,3 ± 7,8	94,6 ± 4,2	88,7 ± 8,3
Стабильность при хранении (+2...+4 °С)			
Титр после 3 мес., БОЕ/мл	5,2±1,1×10 <sup>7</sup>	1,0 ± 0,2×10 <sup>8</sup>	4,8 ± 1,3×10 <sup>7</sup>
Сохранность титра, %	26,0 ± 5,5	83,3 ± 16,7 <sup>b</sup>	24,0 ± 6,5 <sup>a</sup>
Снижение титра, lg	0,58 ± 0,12	0,92 ± 0,18	0,62 ± 0,15

Выделенные эшерихиозные бактериофаги проявили чувствительность к повышенным температурам (табл. 6). Так, все три фага сохраняли исходную литическую активность при стандартных условиях культивирования и хранения (37 °С и +2...+4 °С соответственно). Нагревание до 70 °С в течение 30 минут приводило к статистически значимому снижению титра у всех исследуемых изолятов по сравнению с контролем. Полная инактивация наблюдалась после прогревания при температуре выше 75 °С. Полученный результат полностью согласуется с литературными данными и поведением большинства хвостатых ДНК-содержащих бактериофагов, белков капсида, которых денатурируют в этом температурном диапазоне.

Для оценки наличия липидсодержащих компонентов в структуре вириона проводили тест на устойчивость к трихлорметану (табл. 6). Все фаги сохранили >88 % исходной активности после 45-минутной экспозиции с хлороформом. Различия между изолятами не

достигали уровня значимости ( $p = 0,327$ ), что подтверждает отсутствие липидной оболочки в структуре вирионов [12]. Полученные данные позволяют предположить, что выделенные фаги, вероятно, принадлежат к порядку *Caudovirales* (хвостатые фаги). Это важное технологическое свойство, так как отсутствие липидной оболочки часто коррелирует с повышенной стабильностью фага в различных средах и упрощает методы его очистки.

После 3 месяцев хранения при +2...+4 °С все изоляты сохранили практическую пригодность (снижение титра <1 lg). При этом фаг №8 (табл. 6) продемонстрировал достоверно более высокую сохранность (83,3 ± 16,7 %) по сравнению с фагами №6 (26,0 ± 5,5 %) и №10 (24,0 ± 6,5 %;  $p < 0,001$ ). Данное преимущество, в сочетании с максимальным исходным титром (1,2×10<sup>9</sup> БОЕ/мл), делает фаг №8 наиболее перспективным кандидатом для разработки коммерческого препарата с увеличенным сроком годности.

Эти данные являются основой для разработки условий культивирования, очистки, формуляции и хранения бактериофагов в рамках создания экспериментального биопрепарата.

#### Обсуждение

Провели системное выделение и комплексная характеристика трёх штаммов бактериофагов *Escherichia coli* из аутохтонных источников свиноводческих хозяйств. Полученные данные вносят вклад в решение актуальной задачи разработки альтернативных средств контроля колибактериоза в условиях роста антибиотикорезистентности.

Все 10 выделенных культур *E. coli* продемонстрировали биохимический профиль, соответствующий типовым признакам рода *Escherichia* согласно определителю Берджи [13]. Выявленная ассоциация между источником выделения и способностью утилизировать сорбит ( $p = 0,021$ ) представляет научный интерес, так как отсутствие утилизации сорбита у изолятов от поросят (0/3) в отличие от изолятов свиноматок (2/2) может отражать адаптацию патогенных вариантов *E. coli* к субстратному профилю кишечника новорождённых животных. Данный феномен согласуется с данными о фенотипической гетерогенности популяций *E. coli* в зависимости от возраста хозяина [14] и может служить дополнительным маркером при эпизоотологическом мониторинге.

Статистически значимые различия в диаметре бляшек ( $F(2, 87) = 276,76$ ;  $p < 0,001$ ) свидетельствуют о вариабельности кинетики литического цикла выделенных изолятов. Более крупный размер бляшек фага №8 (2,2±0,2 мм) коррелирует с его максимальным титром (1,2×10<sup>9</sup> БОЕ/мл) и может указывать на повышенную скорость диффузии вирионов в агаровой среде или более короткий латентный период [15]. Эти параметры имеют прямое практическое значение, поскольку влияют на скорость нарастания фаговой популяции в очаге инфекции *in vivo*.

Метод двойных агаровых слоёв по Грациа продемонстрировал более высокую чувствительность и

воспроизводимость по сравнению с методом Аппельмана ( $p < 0,05$ ), что согласуется с литературными данными [16]. Преимущество метода Грация обусловлено возможностью визуализации отдельных бляшек и минимизацией влияния случайных флуктуаций роста бактерий в жидкой среде. Для стандартизации фаговых препаратов мы рекомендуем использовать именно этот метод как референтный.

Полученные показатели титра ( $10^8$ – $10^9$  БОЕ/мл) и спектра активности (36...64 %) сопоставимы с результатами исследований аутохтонных эшерихиозных фагов в других регионах [1, 2, 9]. Преимущество фага №8 по ширине спектра (63,6 %) согласуется с данными о том, что фаги, выделенные из фекалий молодняка в период постотъемного стресса, часто обладают адаптацией к циркулирующим в данной возрастной группе штаммам *E. coli* [17].

Фаги №8 и №10 лизировали 63,6 % тестируемых штаммов *E. coli*, что статистически значимо превосходит показатель фага №6 (36,4 %,  $p < 0,001$ ). Широкий спектр активности является критическим параметром для разработки, например, поливалентных препаратов, поскольку позволяет охватить генетическое разнообразие полевых изолятов [18]. При этом 100 % видовая специфичность всех трёх изолятов минимизирует риск негативного воздействия на комменсальную микробиоту кишечника поросят, что соответствует принципам селективной фаготерапии [6].

Устойчивость к хлороформу подтверждает отсутствие у выделенных бактериофагов липидной оболочки, что характерно для фагов порядка *Caudovirales* [12]. Термолабильность требует соблюдения щадящих режимов при производстве и хранении препаратов, однако не препятствует их ветеринарному применению, так как температура тела животных не достигает критических значений.

Превосходная стабильность фага №8 при хранении (сохранность титра  $83,3 \pm 16,7$  % за 3 месяца) по сравнению с №6 и №10 ( $p < 0,001$ ) является важным технологическим преимуществом. Возможные объяснения включают более высокую исходную концентрацию вирионов, создающую «буферную ёмкость» против деградации, структурные особенности капсида, повышающие устойчивость к протеолизу и отсутствие контаминирующих протеаз в препарате. Данное свойство делает фаг №8 приоритетным кандидатом для разработки коммерческого продукта с увеличенным сроком годности.

#### Заключение

Проведенные исследования позволили получить оригинальную коллекцию патогенных штаммов *E. coli* и активных против них бактериофагов с детально изученными биологическими свойствами. Полученные данные являются научно-экспериментальной основой для последующей разработки, стандартизации и испытаний экспериментальных образцов поливалентного фагового препарата для профилактики и терапии желудочно-кишечных инфекций поросят, что соответствует стратегии снижения применения антибиотиков в животноводстве.

#### Литература

1. Бактериофаги малоизученных энтеробактерий и перспективы их применения в ветеринарии / С. Н. Золотухин, Д. А. Васильев, А. С. Мелехин и др. // Ветеринарная патология. 2006. № 3(18). С. 79-84. EDN OEDQOD.
2. Фагопрофилактика смешанной кишечной инфекции поросят-сосунов, вызываемой патогенными энтеробактериями / А. С. Мелехин, С. Н. Золотухин, Д. А. Васильев и др. // Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения. 2012. Т. 1. С. 262-267. EDN PWMCCCL.
3. Molecular Epidemiology of Extended-spectrum  $\beta$ -Lactamase-producing *Escherichia coli* in South Korea: A Korean Global Antimicrobial Resistance Surveillance System Report / D. Kim, S. Lee, Ju. S. Hong, et al. // Annals of Laboratory Medicine. 2026. Vol. 46. No. 1. P. 72-82. doi: 10.3343/alm.2025.0145. EDN ZHERHP.
4. Global trends in antimicrobial use in food-producing animals: 2020 to 2030 / R. Mulchandani, Yu. Wang, M. Gilbert, et al. // PLOS Global Public Health. 2023. Vol. 3. No. 2. P. e0001305. doi: 10.1371/journal.pgph.0001305. EDN KGZKIX.
5. Genomic insights into bacteriophages: a new frontier in AMR detection and phage therapy / B. Banerjee, S. Halder, Sh. Kumar, et al. // Briefings in Functional Genomics. 2025. Vol. 24. P. elaf011. doi: 10.1093/bfpg/elaf011. EDN KCPVKK.
6. Phage therapy: What have we learned? / A. Górski, R. Międzybrodzki, E. Jończyk-Matysiak, et al. // Viruses. 2018. Vol. 10. No. 6. P. 288. doi:10.3390/v10060288. EDN YHMYDR.
7. Ghazaei C. A Comprehensive Review of Therapeutics Targeting Intracellular Bacteria: Current Insights and Emerging Approaches // International Journal of Basic Science in Medicine. 2024. Vol. 9. No. 3. P. 136-150. doi: 10.34172/ijbsm.46676. –EDN JCUYDC.
8. Synergistic antimicrobial efficacy of phage cocktails and essential oils against *Escherichia coli* / M. Elafify, A. A. Mahmoud, X. Wang, et al. // Microbial Pathogenesis. 2025. Vol. 200. P. 107330. doi: 10.1016/j.micpath.2025.107330. EDN FMMAQB.
9. Effectiveness of a single-dose phage cocktail on the reduction of multidrug-resistant *Escherichia coli* in suckling piglets / V. Chanthavong, N. Vigad, W. Pelyuntha, et al. // Veterinary Microbiology. 2025. Vol. 302. P. 110395. doi: 10.1016/j.vetmic.2025.110395. EDN QNMFXA.
10. Phage applications for biocontrol of enterohemorrhagic *E. coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *Escherichia coli* / K. Holzer, L. Marongiu, K. Detert, et al. // International Journal of Food Microbiology. 2025. Vol. 439. P. 111267. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2025.111267. EDN RQJSYH.
11. Isolation, Characterization, and Genome Analysis of a Novel Bacteriophage, *Escherichia* Phage vB\_EcoM-4HA13, Representing a New Phage Genus in the Novel Phage Family Chaseviridae / Ja. T. Lin, S. Kirst, S. Cucić, et al. // Viruses. 2022. Vol. 14. No. 11. P. 2356. doi: 10.3390/v14112356. EDN XBDBKO.

12. Complete genome sequence of Escherichia coli bacteriophage PGT2 / A. K. Golomidova, E. E. Kulikov, A. V. Letarov, et al. // *Genome Announcements*. 2018. Vol. 6. No. 3. P. e01370-17. doi: 10.1128/genomeA.01370-17. EDN XXIOGL.

13. Bergey's manual of systematic bacteriology. Second edition. Volume three. The Firmicutes - Springer Science Business Media, LLC, 233 Spring Street, New York, NY 10013, USA. - 2009. - 1422 p.

14. Predicting clinical phage therapy outcomes in vitro : results using mixed versus single isolates from an MRSA case study / M. Castledine, Ch. Esom, B. Van Nieuwenhuysse, et al. // *Journal of Applied Microbiology*. 2025. Vol. 136. No. 6. P. lxaf144. DOI 10.1093/jambio/lxaf144. EDN PKUEQA.

15. A comparative analysis of phage classification methods in light of the recent ICTV taxonomic revisions / X. Zhu, L. Tang, Zh. Wang, et al. // *Virology*. 2024. Vol. 594. P. 110016. doi: 10.1016/j.virol.2024.110016. EDN IICTLM.

16. Kurtboke I., Svetoch E. A., Volozhantsev N. V. Bacteriophages Rijeka: InTech, 2012. 256 p. ISBN 978-953-51-0272-4. doi: 10.5772/1065. EDN SMCNEF.

17. KanekoT. , Nakatsuka K., Tsuneda S. Phage Cocktails: State-of-the-Art Technologies and Strategies for Effective Design // *FEMS Microbiology Reviews*. 2025. P. fuaf061. doi: 10.1093/femsre/fuaf061. EDN ZKEOWS.

18. Effectiveness of a single-dose phage cocktail on the reduction of multidrug-resistant Escherichia coli in suckling piglets / V. Chanthavong, N. Vigad, W. Pelyuntha, et al. // *Veterinary Microbiology*. 2025. Vol. 302. P. 110395. doi: 10.1016/j.vetmic.2025.110395. EDN QNMFXA.

#### References

1. Bacteriophages of poorly studied enterobacteria and prospects for their use in veterinary medicine / S. N. Zolotukhin, D. A. Vasiliev, A. S. Melehin, et al. // *Veterinary pathology*. 2006. No. 3 (18). Pp. 79-84. EDN OEDKOD.

2. Phage prophylaxis of mixed intestinal infection of suckling piglets caused by pathogenic enterobacteria / A. S. Melehin, S. N. Zolotukhin, D. A. Vasiliev, et al. // *Agrarian science and education at the present stage of development: experience, problems and ways of their solution*. 2012. Vol. 1. Pp. 262-267. EDN PWMCCCL.

3. Molecular Epidemiology of Extended-spectrum  $\beta$ -Lactamase-producing Escherichia coli in South Korea: A Korean Global Antimicrobial Resistance Surveillance System Report / D. Kim, S. Lee, Ju. S. Hong, et al. // *Annals of Laboratory Medicine*. 2026. Vol. 46. No. 1. P. 72-82. doi: 10.3343/alm.2025.0145. EDN ZHERHP.

4. Global trends in antimicrobial use in food-producing animals: 2020 to 2030 / R. Mulchandani, Yu. Wang, M. Gilbert, et al. // *PLOS Global Public Health*. 2023. Vol. 3. No. 2. P. e0001305. doi: 10.1371/journal.pgph.0001305. EDN KGZKIX.

5. Genomic insights into bacteriophages: a new frontier in AMR detection and phage therapy / B. Banerjee, S. Halder, Sh. Kumar, et al. // *Briefings in Functional Genomics*. 2025. Vol. 24. P. elaf011. doi: 10.1093/bfpg/elaf011. EDN KCPVKK.

6. Phage therapy: What have we learned? / A. Górski, R. Międzybrodzki, E. Jończyk-Matysiak, et al. // *Viruses*.

2018. Vol. 10. No. 6. P. 288. doi:10.3390/v10060288. EDN YHMYDR.

7. Ghazaei C. A Comprehensive Review of Therapeutics Targeting Intracellular Bacteria: Current Insights and Emerging Approaches // *International Journal of Basic Science in Medicine*. 2024. Vol. 9. No. 3. P. 136-150. doi: 10.34172/ijbsm.46676. –EDN JCUYDC.

8. Synergistic antimicrobial efficacy of phage cocktails and essential oils against Escherichia coli / M. Elaffy, A. A. Mahmoud, X. Wang, et al. // *Microbial Pathogenesis*. 2025. Vol. 200. P. 107330. doi: 10.1016/j.micpath.2025.107330. EDN FMMAQB.

9. Effectiveness of a single-dose phage cocktail on the reduction of multidrug-resistant Escherichia coli in suckling piglets / V. Chanthavong, N. Vigad, W. Pelyuntha, et al. // *Veterinary Microbiology*. 2025. Vol. 302. P. 110395. doi: 10.1016/j.vetmic.2025.110395. EDN QNMFXA.

10. Phage applications for biocontrol of enterohemorrhagic E. coli O157:H7 and other Shiga toxin-producing Escherichia coli / K. Holzer, L. Marongiu, K. Detert, et al. // *International Journal of Food Microbiology*. 2025. Vol. 439. P. 111267. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2025.111267. EDN RQJSYH.

11. Isolation, Characterization, and Genome Analysis of a Novel Bacteriophage, Escherichia Phage vB\_EcoM-4HA13, Representing a New Phage Genus in the Novel Phage Family Chaseviridae / Ja. T. Lin, S. Kirst, S. Cucić, et al. // *Viruses*. 2022. Vol. 14. No. 11. P. 2356. doi: 10.3390/v14112356. EDN XBDBKO.

12. Complete genome sequence of Escherichia coli bacteriophage PGT2 / A. K. Golomidova, E. E. Kulikov, A. V. Letarov, et al. // *Genome Announcements*. 2018. Vol. 6. No. 3. P. e01370-17. doi: 10.1128/genomeA.01370-17. EDN XXIOGL.

13. Bergey's manual of systematic bacteriology. Second edition. Volume three. The Firmicutes - Springer Science Business Media, LLC, 233 Spring Street, New York, NY 10013, USA. - 2009. - 1422 p.

14. Predicting clinical phage therapy outcomes in vitro : results using mixed versus single isolates from an MRSA case study / M. Castledine, Ch. Esom, B. Van Nieuwenhuysse, et al. // *Journal of Applied Microbiology*. 2025. Vol. 136. No. 6. P. lxaf144. DOI 10.1093/jambio/lxaf144. EDN PKUEQA.

15. A comparative analysis of phage classification methods in light of the recent ICTV taxonomic revisions / X. Zhu, L. Tang, Zh. Wang, et al. // *Virology*. 2024. Vol. 594. P. 110016. doi: 10.1016/j.virol.2024.110016. EDN IICTLM.

16. Kurtboke I., Svetoch E. A., Volozhantsev N. V. Bacteriophages Rijeka: InTech, 2012. 256 p. ISBN 978-953-51-0272-4. doi: 10.5772/1065. EDN SMCNEF.

17. KanekoT. , Nakatsuka K., Tsuneda S. Phage Cocktails: State-of-the-Art Technologies and Strategies for Effective Design // *FEMS Microbiology Reviews*. 2025. P. fuaf061. doi: 10.1093/femsre/fuaf061. EDN ZKEOWS.

18. Effectiveness of a single-dose phage cocktail on the reduction of multidrug-resistant Escherichia coli in suckling piglets / V. Chanthavong, N. Vigad, W. Pelyuntha, et al. // *Veterinary Microbiology*. 2025. Vol. 302. P. 110395. doi: 10.1016/j.vetmic.2025.110395. EDN QNMFXA