УДК 579.6

ВЫДЕЛЕНИЕ, ИЗУЧЕНИЕ ОСНОВНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БАКТЕРИОФАГА BACILLUS ANTHRACIS И КОНСТРУИРОВАНИЕ НА ЕГО ОСНОВЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО БИОПРЕПАРАТА

Феоктистова Н.А.[1], Васильев Д.А.[1], Золотухин С.Н.[1], Климушкин Е.И.[1], Белова К.В.[1], Калдыркаев А.И.[1], Сульдина Е.В.[1], Маслюкова К.В.[1], Майоров П.С.[1], Юдина Т.Г.[2], Павлова И.Б.[3], Обухов И.Л.[3], Швиденко И.Г.[4]

[1]ФГБОУ ВО Ульяновская ГСХА, Ульяновск, e-mail: feokna@yandex.ru;
[2]ФГБОУ ВО Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, e-mail: yudinatg@mail.ru;
[3]ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной санитарии, гигиены и экологии, Москва, e-mail: oil15@mail.ru;
[4]ГБОУ ВПО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского Минздрава России, Саратов, e-mail: dav_ul@mail.ru

Проведены исследования по определению оптимальной схемы для выделения бактериофагов *Bacillus anthracis.* Установлено, что это – модифицированный метод выделения фагов из окружающей среды с заменой технологического этапа – высев центрифугата агаровыми слоями на методику «стекающая капля»; выделено из проб почвы и селекционировано 8 бактериофагов, специфичных к *Bacillus anthracis.* Изучены основные биологические свойства фага В.а. – 4 УГСХА (литическая активность, спектр литического действия; воздействие температуры в диапазоне 64–78 ^{0}С и трихлорметана в соотношении 1:10 во временном интервале 5–35 минут; изменение литической активности при хранении), на основе которого был сконструирован экспериментальный биопрепарат. Разработаны технологические параметры изготовления фагового биопрепарата *Bacillus anthracis.* Биопрепарат готовится на коммерческом мясо-пептонном бульоне. Установлено, что температурным оптимумом для культивирования биопрепарата на основе В.а. – 4 УГСХА с индикаторной культурой была температура 37 ^{0}С. Определено оптимальное соотношение бактериофага В.а. – 4 УГСХА и штамма *Bacillus anthracis* Шуя-15 – 1:1, т.е. 0,2 мл фага на 0,2 мл индикаторной культуры, время пассажа составляет 5 часов. Разлитый во флаконы фаг контролируется на чистоту и стерильность, обязательно определяется его титр. Биопрепарат на основе фагов представляет собой флакон с прозрачной жидкостью желтоватого цвета (цвет засеянной среды) без посторонних примесей, осадка. Титр не ниже 10^7. Дату изготовления серии исчисляют со дня закупорки флаконов. Срок годности бактериофагов при температуре 2–4 °С 12 месяцев.

Ключевые слова: бактериофаги, схема выделения, *Bacillus anthracis*; литическая активность; спектр литического действия; специфичность, физические факторы, биопрепарат, культура, пассаж.

ALLOCATION, STUDYING OF THE MAIN BIOLOGICAL PROPERTIES OF THE BACTERIOPHAGE OF BACILLUS ANTHRACIS AND DESIGNING ON ITS BASIS OF THE EXPERIMENTAL BIOLOGICAL PRODUCT

Feoktistova N.A.[1], Vasilyev D.A.[1], Zolotukhin S.N.[1], Klimushkin E.I.[1], Belova K.V.[1], Kaldyrkaev A.I.[1], Suldina E.V.[1], Maslyukova K.V.[1], Majorov P.S.[1], Yudina T.G.[2], Pavlova I.B.[3], Obuchov I.L.[3], Shvidenko I.G.[4]

[1]Ulyanovsk State Agricultural Academy named after PA Stolypin, Ulyanovsk, e-mail: feokna@yandex.ru;
[2]Moscow State University of M.V. Lomonosov, Moscow, e-mail: yudinatg@mail.ru;
[3]All-Russian research institute of veterinary sanitation, hygiene and ecology, Moscow, e-mail: oil15@mail.ru;
[4]Saratov State Medical University of V. I. Razumovsky Russian Ministry of Health, Saratov, e-mail: dav_ul@mail.ru

Researches on determination of the optimum scheme for allocation of bacteriophages of Bacillus anthracis are conducted. It is established that it is the modified method of allocation of phages from the environment with replacement of a technological stage – seeding of a tsentrifugat agar layers on a technique "the flowing-down drop"; it is allocated from tests of the soil and 8 bacteriophages specific to Bacillus anthracis are selected. The main biological properties of a phage of VA are studied.-4 UGSHA (lytic activity, range of lytic action; impact of temperature in the range 64–78 ^{0}C and trichloromethane in the ratio 1:10 in a time frame of 5–35 minutes; change of lytic activity in case of storage) on the basis of which the experimental biological product was designed. Technological parameters of production of a fagovy biological product Bacillus anthracis are developed. The biological product prepares on commercial meat-peptonnom broth. It is established that a temperature optimum for cultivation of a biological product on the basis of B.a. – 4 UGSHA with indicator culture was temperature 37

0C. The optimum ratio of a bacteriophage of B.a is determined. – 4 UGSHA and a strain of Bacillus anthracis Shuya-15 – 1:1, i.e. 0,2 ml of a phage on 0,2 ml of indicator culture, time of a passage constitutes 5 hours. The phage poured in bottles is controlled on purity and sterility, its caption is surely determined. The biological product on the basis of phages represents a bottle with transparent liquid of yellowish color (color of the sowed environment) without foreign impurity, a deposit. Caption not lower than 107. Date of production of a series is estimated from the date of obstruction of bottles. An expiration date of bacteriophages at a temperature of 2–4 ^{0}C of 12 months.

Keywords: bacteriophages, scheme of allocation, bacillus anthracis, lytic activity, range of lytic action, specificity, physical factors, biological product, culture, passage.

Современная ситуация по сибирской язве на фоне значительного снижения заболеваемости в Российской Федерации не расценивается в настоящий момент как благополучная. По-прежнему регистрируются эпизоотии среди животных и эпидемические очаги среди населения. На сегодняшний день возникла необходимость разработки критериев и алгоритма действий для оценки эпизоотологической и эпидемиологической опасности сибиреязвенных захоронений, находящихся на территории Российской Федерации, с учетом достижений современной науки. 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 ранее использовали ветеринарные биопрепараты: «Бактериофаг сибиреязвенный «К» ВИЭВ», «Бактериофаг сибиреязвенный «Гамма-МВА», ныне применяют «Бактериофаг ВНИИВВиМ сибиреязвенный диагностический», «Бактериофаг диагностический сибиреязвенный Гамма А-26 жидкий», диагностическая эффективность которых и в настоящий момент не подлежит сомнению [1, 7-8].

Новый сибиреязвенный фаговый биопрепарат позволит выявлять возбудитель сибирской язвы, так как широкое применение в медицине антибиотиков, инактивированных и живых вакцин привело к реверсии и длительной персистенции вакцинных штаммов в макроорганизме, загрязнению окружающей среды живыми микроорганизмами с измененными свойствами, циркуляции атипичных штаммов, которые не поддаются диагностике антраксин-кожным тестом, генотипическими и бактериологическими методами.

Цель исследования

Цель настоящей работы – выделение, изучение основных биологических свойств бактериофага *Bacillus anthracis* и конструирование на его основе экспериментального биопрепарата.

Задачи работы:

1) подобрать оптимальную схему выделения бактериофагов *Bacillus anthracis*, выделить и селекционировать специфичные к *Bacillus anthracis* фаги;

2) изучить основные биологические свойства (литическую активность, спектр литического действия, специфичность, температурную устойчивость, устойчивость к

хлороформу, изменение литической активности при хранении) выделенных бактериофагов, из которых сконструирован экспериментальный биопрепарат;

3) разработать технологические параметры изготовления фагового биопрепарата *Bacillus anthracis*.

Материал и методы исследования

МУК 4.2.2413-08 «МЕТОДИЧЕСКИМ УКАЗАНИЯМ МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ. Лабораторная диагностика и обнаружение возбудителя сибирской язвы» [4]. МУК 4.2.2941-11. 4.2 «Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы. Порядок организации и проведения лабораторной диагностики сибирской язвы для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней. Методические указания» [5].

Вакцинные штаммы *Bacillus anthracis*-СТИ и *Bacillus anthracis* 55-ВНИИВВиМ, авирулентные штаммы *Bacillus anthracis* – Шуя-15 и *Bacillus anthracis* 34 F_2, 12 штаммов бактерии *Bacillus mycoides*, 52 штамма бактерий *Bacillus cereus* и *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus subtilis* – 6 штаммов, *Bacillus mesentericus (pumilus)* – 8 штаммов, *Bacillus coagulans* – 3 штамма, полученные из музея НИИЦМиБ ФГБОУ ВО Ульяновская ГСХА. Сибиреязвенный бактериофаг, выделенный и селекционированный авторами в 2015 году [10].

Литическая активность бактериофага и спектр литического действия определяли методом Аппельмана на питательном бульоне для культивирования микроорганизмов (ФС 42-0049-00) (Адамс, 1961), концентрацию фаговых частиц – методом A. Gratia (Gratia, 1936) на двухслойном МПА (производства ФГУН ГНЦ ПМБ г. Оболенск, Московская область) [2, 6, 11, 12]. Основные биологические свойства бактериофагов изучали по схемам, отработанным Золотухиным С.Н. [3], Юдиной М.А. [13].

Контроль специфической активности препаратов бактериофагов проводили с помощью специально подобранных наборов контрольных штаммов. Концентрацию микробных клеток определяли с помощью оптического стандарта мутности (ОСО 42-28-85 на 10 ед. производства ГИСК им. Л.А. Тарасевича).

Статистическую обработку результатов исследований проводили общепринятыми статистическими методами. Расчет результатов осуществляли с применением пакета прикладных программ Statistica 6.0. (for Windows; «Stat Soft Ins.», США), Microsoft Exsel 2003 (for Windows XP).

Результаты исследования и их обсуждение

Первоочередной задачей наших исследований стало изучение биологических свойств референс-штаммов *Bacillus anthracis* (вакцинные штаммы *Bacillus anthracis*-СТИ и *Bacillus anthracis* 55-ВНИИВВиМ, авирулентные штаммы *Bacillus anthracis* – Шуя-15 и *Bacillus*

anthracis 34 F_2,), которые были использованы в исследованиях в качестве индикаторных культур. В результате исследований было установлено, что все сибиреязвенные штаммы из коллекции кафедры соответствуют паспортам на вышеназванные штаммы.

Следующим этапом наших исследований был поиск фагов бактерий *Bacillus anthracis* из имеющихся у нас штаммов без воздействия на них индуцирующего фактора по методике, предложенной Лурия и Дарнеллом [6]. Во второй серии опытов мы воздействовали на бактерий, исследуемые как «лизогенные», ультрафиолетовыми лучами [9]. Резюмируя полученные нами данные, можно утверждать, что мы не обнаружили явления перехода профага в свободный фаг у имеющихся штаммов бактерий *Bacillus anthracis*.

Третья серия опытов была посвящена выделению бактериофагов *Bacillus anthracis* из объектов внешней среды. Мы в алгоритме данного эксперимента заменили этап агаровых слоев по Грациа на «стекающую каплю». Данная модификация позволяет исследователям получить гораздо большее поле для забора фага и значительно сэкономить питательные среды и снизить трудозатраты. При исследовании 73 проб почвы мы выделили 8 изолятов бактериофагов, активных в отношении бактерий *Bacillus anthracis.*

Четвертым этапом наших исследований было изучение основных биологических свойств выделенных бактериофагов *Bacillus anthracis*. Основным фактором отбора фагов с целью дальнейшего конструирования биопрепарата было изучение спектра литического действия. Минимальный процент лизируемых культур *Bacillus anthracis* составил 25 %, максимальный – 100 %.

Для дальнейших исследований был взят бактериофаг В.а. – 4 УГСХА, обладающий максимально возможным спектром литического действия в условиях эксперимента. Наиболее важной характеристикой выделенного и селекционированного сибиреязвенного фага была его специфичность по отношению к штаммам *Bacillus anthracis* и отсутствие способности лизировать культуры *Bacillus mycoides*, *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis,* которые составляют группу близкородственной ассоциации бацилл, получивших в литературе название «группа «*Bacillus cereus*».

Основная характеристика биологических свойств изучаемого сибиреязвенного бактериофага

№	Название изучаемого биологического свойство бактериофага	Результат изучения характерных биологических свойств сибиреязвенного бактериофага на бактериальной культуре			
		B. anthracis Шуя-15	*B. anthracis* 55-ВНИИВВиМ	*B. anthracis*-СТИ	*B. anthracis* 34 F_2
1	Литическая активность, БОЕ (бляшкообразующих единиц) /мл (по методу агаровых слоев)	$1{,}0x10^8 \pm 0{,}1x10^8$	$1{,}9x10^6 \pm 0{,}1x10^6$	$1{,}4x10^7 \pm 0{,}1x10^7$	$3{,}0x10^8 \pm 0{,}1x10^8$

2	Литическая активность (по методу Аппельмана)	10^{-7}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
3	Спектр литического действия	Лизис культур – *B. anthracis-СТИ, B. anthracis 55-ВНИИВВиМ, B. anthracis–Шуя-15* и *B. anthracis 34* F_2			
4	Специфичность	Не лизирует – *B. mycoides* – 12 штаммов, *B. cereus* – 50 штаммов, *B. thuringiensis* – 2 штамма, *B. subtilis* – 6 штаммов, *B. mesentericus (pumilus)* – 8 штаммов, *B. coagulans* – 3 штамма.			
5	Показатель литической активности при хранении в условиях бытового холодильника 2-4 ^{0}С в течение 3 месяцев	$1{,}0x10^8 \pm 0{,}1x10^8$	$1{,}9x10^6 \pm 0{,}1x10^6$	$1{,}4x10^7 \pm 0{,}1x10^7$	$3{,}0x10^8 \pm 0{,}1x10^8$
	течение 6 месяцев	$0{,}6x10^8 \pm 0{,}1x10^8$	-	-	$1{,}8x10^8 \pm 0{,}3x10^8$
	течение 9 месяцев	$2{,}2x10^7 \pm 0{,}4x10^7$	-	-	$3{,}4x10^7 \pm 0{,}2x10^7$
	течение 12 месяцев	$1{,}6x10^6 \pm 0{,}2x10^6$	-	-	$0{,}7x10^6 \pm 0{,}2x10^6$

Установлено, что бактериофаг не лизирует близкородственные бактерии, включая *Bacillus subtilis*, *Bacillus mesentericus (pumilus)*, *Bacillus coagulans*. Технологической особенностью культивирования фага В.а. – 4 УГСХА было применение этапа центрифугирования с последующей фильтрацией через мембранные фильтры фирмы Millipore (filter type: 0,22 µm GV). Результаты исследований отражены в таблице.

Ранние исследования не позволили нам в качестве очистки фага от бактериальной культуры применять прогревание и обработку трихлорметаном (хлороформом). Но нами установлено, что воздействие температуры в диапазоне 64–78 ^{0}С не понижает литическую активность фага В.а. – 4 УГСХА, как и воздействие хлороформа в соотношении 1:10 во временном интервале 5–35 минут. Опытным путем установлено, что в течение 3 месяцев показатели литической активности исследуемого бактериофага остались без изменений. Нужно отметить, что бактериофаг В.а. – 4 УГСХА при хранении в условиях 2–4 ^{0}С в течение 12 месяцев незначительно снижал литическую активность и поэтому может быть основным компонентом биопрепарата для индикации и идентификации бактерий *Bacillus anthracis*. Экспериментальным путем установлено, что активность бактериофагов повышается после 5-6 пассажей на индикаторной культуре.

Проведенные исследования по изучению основных показателей биологических свойств сибиреязвенного бактериофага позволил установить, что изучаемый бактериофаг при культивировании на различных штаммах *Bacillus anthracis* имеет литическую активность, которая не изменяется при хранении в условиях бытового холодильника (2–4 ^{0}С) без добавления консерванта.

На основании полученных данных установлено, что для достижения поставленной цели в качестве перспективного производственного штамма рекомендовано применять штамм *Bacillus anthracis* Шуя-15, на котором при высеве на МПА образуются негативные колонии с четким краем и прозрачным центром, что чрезвычайно важно при визуальном подсчете колоний в случае постановки реакции нарастания титра фага. Культивирование изучаемого бактериофага на вышеназванном штамме дает литическую активность – $1{,}0x10^8 \pm 0{,}1x10^8$ БОЕ в 1 мл фаголизата. При аналогичных исследованиях показатель на штамме *Bacillus anthracis* 34 F_2 составляет $3{,}0x10^8 \pm 0{,}1x10^8$ БОЕ в 1 мл фаголизата. Однако визуальная характеристика негативных колоний, полученных на индикаторной культуре данного бактериального штамма, возможно, затруднит оценку результатов в реакции нарастания титра фага. Поэтому применение штамма *Bacillus anthracis* 34 F_2 в качестве перспективного и производственного возможно при условии сравнения показателей в случае постановки РНФ на обоих штаммах.

Заключение

Установлено, что оптимальной схемой для выделения бактериофагов *Bacillus anthracis* является модифицированный метод выделения фагов из окружающей среды с заменой технологического этапа – высев цетрифугата агаровыми слоями на методику «стекающая капля»; выделено из проб почвы и селекционировано 8 бактериофагов, специфичных к *Bacillus anthracis*.

Изучены основные биологические свойства фага В.а. -4 УГСХА (литическая активность – $3{,}0x10^8 \pm 1{,}0x10^8$ БОЕ/мл (по Грациа) и 10^{-7} – по Аппельману, спектр литического действия составляет 100 %, бактериофаг не культуры *Bacillus mycoides*, *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis,* которые составляют группу близкородственной ассоциации бацилл, получивших в литературе название «группа «*Bacillus cereus*»» и близкородственные бактерии, включая *Bacillus subtilis*, *Bacillus mesentericus (pumilus)*, *Bacillus coagulans*; воздействие температуры в диапазоне 64–78 ^{0}С не понижает литическую активность фага В.а. – 4 УГСХА, как и воздействие хлороформа в соотношении 1:10 во временном интервале 5–35 минут; определено, что в течение 3 месяцев показатели литической активности исследуемого бактериофага остались без изменений, при хранении в условиях 2–4 ^{0}С в течение 12 месяцев незначительно снижал литическую активность), на основе которого был сконструирован экспериментальный биопрепарат.

Резюмируя вышеизложенное, рекомендовано для изготовления биопрепарата использовать бактериофаг В.а. – 4 УГСХА и культуру *Bacillus anthracis* Шуя-15, которая хранятся на полужидком МПА (pH 7,2–7,4) с содержанием 0,3 % бактериологического агара при температуре 2–4 °С (пересев музея рекомендуется каждые 3–4 месяца).

Биопрепарат готовится на коммерческом мясо-пептонном бульоне. Установлено, что температурным оптимумом для культивирования биопрепарата на основе В.а. – 4 УГСХА с индикаторной культурой была температура 37 °С. Определено оптимальное соотношение бактериофага В.а. – 4 УГСХА и штамма *Bacillus anthracis* Шуя-15 – 1:1, т.е. 0,2 мл фага на 0,2 мл индикаторной культуры, время пассажа составляет 5 часов.

Разлитый во флаконы фаг контролируется на чистоту и стерильность, обязательно определяется его титр. Биопрепарат на основе фагов представляет собой флакон с прозрачной жидкостью желтоватого цвета (цвет засеянной среды) без посторонних примесей, осадка. Титр не ниже 10^7. Дату изготовления серии исчисляют со дня закупорки флаконов. Срок годности бактериофагов при температуре 2–4 °С 12 месяцев.

С целью оптимизации процесса идентификации бацилл, возбудителей сибирской язвы, мы использовали бактериофаг В.а. – 4 УГСХА, применяя методику «стекающая капля». Установлено, что сконструированный фаговый биопрепарат столь же специфичен, как и коммерческие фаги «Бактериофаг ВНИИВВиМ сибиреязвенный диагностический» (ТУ 10-09.39-90) и «Бактериофаг диагностический сибиреязвенный Гамма А-26 жидкий» (ТУ 9386-013-01897080-2009) на спектре культур *Bacillus anthracis* в количестве 10 штаммов.

Список литературы

1. 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. 79-82.
2. Васильев Д.А. Биосенсорная детекция бактерий рода *Bacillus* в молоке и молочных продуктах для предупреждения их порчи / Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин, Н.А. Феоктистова, А.В. Алешкин // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2013. – № 4 (24). – С. 36-43.
3. Золотухин С.Н. Штаммы бактериофагов малоизученных патогенных энтеробактерий и их практическое применение / С.Н. Золотухин, Д.А. Васильев, Н.А. Феоктистова [и др.] // Научные разработки и научно-консультационные услуги Ульяновской ГСХА: Информационно-справочный указатель. – Ульяновск, 2006. – С.45-49.
4. МУК 4.2.2413-08. Лабораторная диагностика и обнаружение возбудителя сибирской язвы». – URL: http://docs.cntd.ru/document/1200075231.
5. МУК 4.2.2941-11. Порядок организации и проведения лабораторной диагностики сибирской язвы для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней. – URL: http://docs.cntd.ru/document/1200094086.

6. Каттер Э. Бактериофаги. Биология и практическое применение / Э. Каттер, А. Сулаквелидзе. – М.: Научный мир, 2012.

7. Климушкин Е.И. Биологические свойства сибиреязвенного бактериофага / Е.И. Климушкин, Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев, К.В. Белова // Вестник ветеринарии. – 2015. – № 3 (74). – С. 46-49.

8. Климушкин Е.И. Выделение бактериофагов, специфичных к *Bacillus anthracis* / Е.И. Климушкин, Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев [и др.] // БиоКиров-2015: сборник материалов III Международного форума. [Электронный ресурс]. – 2015. – С. 10-12.

9. Феоктистова Н.А. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов бактерий *Bacillus subtilis* / Н.А. Феоктистова // Бактериофаги микроорганизмов значимых для животных, растений и человека. – Ульяновск, 2013. – С. 186-197.

10. Феоктистова Н.А. Подбор перспективного производственного штамма *Bacillus anthracis* для конструирования фагового биопрепарата // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2015. – № 3 (31). – С. 69-75.

11. Феоктистова Н.А. Результаты сравнительного анализа бактериологических методов исследований какао-порошка на наличие бацилл, вызывающих порчу продуктов питания (БВППП) / Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2015. – № 1 (29). – С. 69-76.

12. Феоктистова Н.А. Получение производственно-перспективных штаммов фагов *Bacillus megaterium* / Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев, М.А. Лыдина [и др.] // Биотика. – 2015. – Т.2. – № 1. – С. 3-7.

13. Юдина М.А. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов бактерий вида *Bacillus mesentericus* / М.А. Юдина, Н.А. Феоктистова // Бактериофаги микроорганизмов значимых для животных, растений и человека. – Ульяновск, 2013. – С. 197-211.