

---

## НОВОЕ В ПРИМЕНЕНИИ БАКТЕРИОФАГОВ

И.Г. Серегин<sup>1</sup>, А.Д. Флерова<sup>1</sup>, С.В. Линева<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГУ Московский государственный университет прикладной биотехнологии  
*ул. Талалихина, 33, Москва, Россия, 109316*

<sup>2</sup>Всероссийской государственной научный контрольный институт  
*Звенигородское ш., 5, Москва, Россия, 123022*

В статье рассматривается процесс изучения возможности применения бактериофагов для предупреждения кантаминирования сальмонеллами фарша и готовых колбасных изделий.

Бактериофагами называют живые мельчайшие вирусоподобные частицы, способные изменять биологические свойства бактерий, в т.ч. такие, как наследственность и изменчивость. Честь открытия этого природного феномена принадлежит английскому бактериологу F.W. Twort, описавшему в 1915 году острую инфекционную болезнь стафилококков и возможность пассирования проходившего через бактериальные фильтры инфекционного агента.

Выделенные фаги могут быть охарактеризованы по морфологии вирионов и негативных колоний, антигенным свойствам, спектру литического действия, чувствительности к воздействию химических веществ и физических факторов, а также по характеристикам взаимодействия в системе «фаг — бактериальная клетка».

Первичная фаза взаимодействия бактериофага с бактерией — адсорбция — состоит из диффузии фаговых частиц в среде, их случайном столкновении с бактериями и специфическом прикреплении к поверхности бактериальной клетки.

На ход этого процесса влияют количественные соотношения между фагом и клеткой, физические и химические факторы среды, фагоустойчивость бактерий. Феномен бактериофаги протекает в нейтральной или слабощелочной среде (рН 7,4—7,6). Многие исследователи отмечают, что бактериофаги не адсорбируются на чувствительных бакклетках при рН ниже 5 или выше 12.

Фаг фиксируется и прикрепляется к бактериальной клетке в зависимости от своей природы, физиологического состояния и антигенной структуры самой клетки, их фаз роста и размножения. Для взаимодействия с рецепторами клеточной поверхности необходимо изменение конформации фибрилл.

Адсорбция фага состоит из обратимой и необратимой фаз. При необратимой ферментативной фазе закрепления фага наблюдается, что фаг не отделяется от клетки, не нейтрализуется антифаговой сывороткой. При этом его эффективность зависит от температуры, вязкости среды и других факторов.

Установлено также, что и микробы, и бактериофаги размножаются по времени логарифмически. Причем скорость накопления бактериофага значительно опережает скорость размножения микроба. Темп накопления остается постоянным для данного бактериофага. Скорость размножения фагов остается неизменной, их

концентрация будет увеличиваться с одинаковым постоянством при любых исходных его показателях. Конечная популяция фага в несколько раз выше максимальной численности популяции микробов. При инфицировании фагом в соотношении около 200 фагов на бактериальную клетку последняя лизируется и размножения фага не происходит. В таких случаях бактерии набухают, приобретают специфическую форму и постепенно исчезают под действием лизоцима фаговых отростков клеточной стенки бактерии. Так происходит другой тип литической реакции бактериофагами клетки-мишени (лизис извне). Бактериальная взвесь не всегда растворяется при очень высоких соотношениях между фагом и бактерией. Наиболее выраженную литическую активность отмечали при равных и меньших соотношениях бактериофага и бактериальной клетки-мишени. Литические ферменты фагов разнообразны — от одобных лизоциму до подобных гиалуронидазе. Литические ферменты фага обуславливают растворение клеточной стенки, что обеспечивает гибель бактериальной клетки. Такая способность фагов определяет их большое практическое значение в борьбе с возбудителями различных болезней.

Установлено, что наиболее выраженная активность фага по отношению к бактериальной клетке отмечается при температуре 22—37 °С. При такой температуре за 60 минут количество живых бактерий кишечной палочки уменьшается на 91%, а через 90 минут все погибают. Лизис бактериальных клеток под действием фагов прекращается при температуре 70 °С и выше. Низкие температуры только снижают лизирующую активность фагов, но не прекращают их деятельность полностью.

Учитывая высокую лизирующую активность бактериофагов, многие исследователи применяли их для типирования возбудителя болезни в очагах сложной эпидемической и эпизоотической обстановки, для лечения и профилактики инфекционных болезней, для возбудителя которых были получены эти фаги.

В медицинской и ветеринарной практике применяют фаги, выделенные от переболевших сальмонеллезом животных и птиц, а также из сточных вод хозяйств, не благополучных в отношении этой болезни.

Бактериофаги для лечения животных и птиц а также для идентификации микроорганизмов, должны иметь титр не менее  $10^7$ — $10^8$ , и лизировать бактериальные культуры следует в течение 6—10 часов. Для производства бактериофагов обычно используют по несколько родов микроорганизмов соответствующих типов.

Фаги широко распространены в природе: в естественных условиях они находятся в тех природных субстратах, в которых обитают гомологичные бактерии. Особую социальную значимость в ветеринарной практике имеют патогенные сальмонеллы (*Salmonella typhimurium*, *S. enteritidis* и другие), с которыми связано возникновение более 80% случаев пищевых токсикоинфекций человека. Для борьбы с ними широко применяются сальманеллезные бактериофаги, выделить которые можно из сточных вод животноводческих ферм и боенских предприятий. Для выделения фагов мы использовали метод обогащения.

Исследуемый материал засеивали в МПБ совместно со штаммами *S. typhimurium* и *S. enteritidis*, находящимися в логарифмической фазе роста, инкубировали 18—24 часа при температуре 37 °С. Пробы фильтровали через фильтры с пористостью 0,22 мк, затем определяли наличие фагов в безмикробных фильтрах, высевали их на жидкие и плотные питательные среды, предварительно засеянные индикаторными штаммами *S. typhimurium* и *S. enteritidis*.

Поиск бактериофагов мы проводили в сточных водах различных мясоперерабатывающих предприятий. В результате анализа образцов 32 проб сточных вод выделено 11 бактериофагов сальмонелл. Состав изолятов фагов был гетерогенным и представлен несколькими типами негативных колоний. Для получения фагов в чистых линиях проведено их клонирование по типу негативных колоний до получения однородной популяции. Из клонированных бактериофагов было отобрано 6 наиболее активных в отношении *S. typhimurium* и *S. enteritidis* (по 3 фага каждого серовара). После пяти пассажей на гомологичных штаммах сальмонелл селекционированные фаги имели высокую активность. В их фаголизатах в течение 4—6 часов культивирования в МПБ, при температуре 37 °С, в стационарных условиях накапливалась от  $5,2 \times 10^8$  и до  $2,8 \times 10^{10}$  жизнеспособных фаговых частиц.

Результаты определения активности сальмонеллезных фагов представлены в таблице.

Таблица

Результаты определения активности сальмонеллезных фагов

Фаг	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$	$10^{-8}$	$10^{-9}$	$10^{-10}$	$10^{-11}$
<i>S. enteritidis</i>	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	+	+	—
<i>S. typhimurium</i>	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++	++	+	—	—
<i>S. choleraesuis</i>	++	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—

Полученные данные свидетельствуют о том, что производственные фаги обладают по отношению к гомологичным культурам хорошо выраженной активностью, но не в одинаковой степени.

Для определения сектора специфичности выделенных фагов использовали штаммы, принадлежащие к различным родам энтеробактерий: *Yersinia*, *Citrobacter*, *Morganella*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Escherichia*, а также гетерологичным сероваром сальмонелл.

В результате установлено, что спектр специфичности выделенных фагов ограничен пределами подвида *Salmonella enterica* subsp. *enterica*. По отношению к гетерологичным сероварам сальмонелл установлена способность изучаемых фагов лизировать штаммы сальмонелл серогруппы В, серогрупп Д, С и Е.

Таким образом, из сточных вод мясоперерабатывающих предприятий выделены и селекционированы бактериофаги *S. typhimurium* и *S. enteritidis*, обладающие высокой активностью и широким спектром литического действия.

На их основе, по нашему мнению, могут быть созданы эффективные препараты для санации оборудования против сальмонелл, сырья и продуктов животного происхождения.

Мы изучили возможность применения бактериофагов с целью предупреждения кантаминирования сальмонеллами фарша и готовых колбасных изделий. Для этого применяли бактериофаги к *S. typhimurium* и *S. enteritidis* активностью  $1 \times 10^{-7}$ — $1 \times 10^{-8}$ . Фаги добавляли в фарш вместе с водой. При этом не допускали каких-либо изменений технологического процесса изготовления колбас; в экспериментальные образцы фарша вносили определенное количество сальмонеллезных клеток, гомологичных вносимым сальмонеллезным фагам. За период кутерования фарша, шприцевания и осаждения батонов, а также период варки и после охлаждения проводили микробиологические исследования опытных образцов фарша с целью выявления сальмонелл. Оказалось, что период подготовки колбасных батонов к термической обработке количество сальмонелл не увеличивается, снижение происходит на 27—69% от исходных. В случаях нарушения температурных режимов кутерования фарша и осаждения батонов количество сальмонелл снижается на 59—87%. В готовых вареных колбасных изделиях сальмонеллы не обнаружены.

Эти данные свидетельствуют, что с целью предупреждения кантаминирования фарша сальмонеллами в производственных условиях можно использовать бактериофаги активностью не ниже  $1 \times 10^{-7}$ .

## **NEW IN BACTERIOPHAGE'S USAGE**

**I.G. Seregin<sup>1</sup>, A.D. Flerova<sup>1</sup>, S.V. Linev<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>FSI Moscow state university of engineering biotechnology  
*Talalikhina str., 33, Moscow, Russia, 109316*

<sup>2</sup>Russian national state scientific monitoring institute  
*hwy Zvenigorodskoe, 5, Moscow, Russia, 117198*

There were held studies on possibility of bacteriophage's usage for prevention of salmonella contamination of farce and fabricated sausage goods. Bacteriophage *Salmonella typhimurium* and *S. enteritidis* with  $1 \times 10^{-7}$ — $1 \times 10^{-8}$  activity were used. They were added in farce through water.