ივანე ჯავახიშვილის სახელობის თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტი

ქეთევან წულაია

ახალი სტაფილოკოკური ბაქტერიოფაგის დახასიათება და მისი დეკონტამინაციის უნარის შესწავლა სურსათის უვნებლობის კუთხით

გამოყენებითი ბიომეცნიერებების სამაგისტრო პროგრამა

ნაშრომი შესრულებულია გამოყენებითი ბიომეცნიერებების მაგისტრის აკადემიური ხარისხის მოსაპოვებლად

სამეცნიერო ხელმძღვანელი:

ბიოლოგიის მეცნიერებათა დოქტორი **ეკატერინე ჯაიანი**

ნაშრომის შესრულების ადგილი: გ.ელიავას სახელობის ბაქტერიოფაგიის, მიკრობიოლოგიისა და ვირუსოლოგიის კვლევითი ინსტიტუტი

თბილისი

2017 წ

ანოტაცია

სურსათისმიერი დაავადებები მნიშვნელოვან გამოწვევას წარმოადგენს მსოფლიოსთვის. ჯანდაცვის მსოფლიო ორგანიზაციის (WHO) მონაცემებით, ყოველწლიურად, მსოფლიოში ყოველი ათი ადამიანიდან ერთი ავადდება დაბინძურებული სურსათის მიღებით და 420 000 შემთხვევა სრულდება ფატალურად. ამ შემთხვევების 72% ბაქტერიული წარმოშობის სურსათისმიერ დაავადებებზე მოდის.

როგორც ცნობილია, სურსათის ბაქტერიებით, მათ შორის ოქროსფერი სტაფილოკოკით, დაბინძურების წყარო, შესაძლებელია იყოს ნედლეული, შესაფუთი მასალები, სურსათთან შეხებაში მყოფი ზედაპირები, პერსონალი და სხვ. საწარმოებში სათანადო ჰიგიენური გარემოს უზრუნველყოფისთვის მასიურად გამოიყენება ქიმიური სარეცხი/სადეზინფექციო საშუალებები, რაც შესაძლოა თავად აღმოჩნდეს სურსათის ქიმიური დაბინძურების წყარო. შესაბამისად, მნიშვნელოვანია ეფექტური და ამავდროულად, უსაფრთხო ბიოლოგიური აგენტების გამოყენება, როგორც სანიტარიული დამუშავების კუთხით, აგრეთვე, ბიომაკონტროლებელ აგენტებად. ამგვარ აგენტებს მიეკუთვნება ბაქტერიოფაგები.

ჩვენი კვლევის მიზანს წარმოადგენდა ახალი, შეუსწავლელი სტაფილოკოკური ბაქტერიოფაგის დეკონტამინაციის უნარის შესწავლა, როგორც ზედაპირებისთვის, ასევე სურსათისთვის.

ჩვენი მიზნის მისაღწევად დავისახეთ შემდეგი ამოცანები: ბაქტერიოფაგის მოქმედების სპექტრის შესწავლა, ერთჯერადი გამრავლების ციკლის აღწერა, ფაგის მდგრადობის შესწავლა სხვადასხვა ტემპერატურასა და pH-ზე და სურსათის, კერძოდ რძის და ზედაპირების (მინის), დეკონტამინაციის პოტენციალის შესწავლა.

მიღებულ შედეგებზე დაყრდნობით ჩვენ შეგვიძლია დავასკვნათ, რომ ახალი სტაფილოკოკური ბაქტერიოფაგი - 92N აკმაყოფილებს დეკონტამინაციისთვის გამოყენებული ფაგების მიმართ წაყენებულ მოთხოვნებს, კერძოდ, ავლენს ვირულენტური ფაგის თვისებებს, აგრეთვე გამოირჩევა გარემო პირობების მიმართ მდგრადობით და სურსათის, კერძოდ რძის და ზედაპირების აშკარა დეკონტამინაციის უნარით.

Annotation

Foodborne diseases are one of the important healthcare issues in the world. According to the World Health Organization (WHO) one in every ten person becomes ill and approximately 420 000 people die due to contaminated food each year, worldwide. Among these diseases 72% is caused by pathogenic bacteria.

It is already well established that food can be contaminated by bacteria, including *Staphylococcus aureus*, through contaminated raw and packaging materials, food contact surfaces, personnel and etc. Food manufacturers are widely using cleaning/sanitizing chemicals to achieve proper hygiene standards. On the other hand these agents may represent chemical hazard and contaminate food. Thus using effective as well as safe sanitation and biocontrol agents is extremely important for food industries. Bacteriophages can be considered as valuable tools for decontamination at different stages of food production.

The goal of our research was to investigate the potential of the novel staphylococcal bacteriophage in decontamination of food and surfaces.

To achieve our goal we have set several aims such as: investigation of the staphylococcal bacteriophage host range, single step growth cycle, stability at different temperature and pH and it's decontamination ability of diary product, such as milk and also surfaces (glass).

Based on our results we can conclude that the novel staphylococcal bacteriophage – 92N complies with the requirements for the phages used in decontamination procedures, in particular it shows properties of virulent phages, is stable under various environmental conditions and has the obvious decontamination potential for food, such as milk and also surfaces.

სარჩევი

ანოტაცია 2

Annotation 3

შესავალი 6

I. ლიტერატურის მიმოხილვა 8

1. ოქროსფერი სტაფილოკოკის დახასიათება და სტაფილოკოკური სურსათისმიერი დაავადება 8

2. ბაქტერიოფაგი 10

2.1 ბაქტერიოფაგის დახასიათება 10

2.2 აღმოჩენის ისტორია 11

2.3 ბაქტერიოფაგების კლასიფიკაცია 13

2.4 კუდის მქონე ფაგები 13

2.5 ბაქტერიოფაგის ლითიური ციკლი 15

2.6 ბაქტერიოფაგების, როგორც სურსათის ბიოკონტროლის აგენტების, სასურველი მახასიათებლები 17

2.7 ბაქტერიოფაგების გამოყენება სასურსათო ჯაჭვის სხვადასხვა ეტაპზე 21

II ექსპერიმენტალური ნაწილი 23

1.კვლევის ობიექტი 23

2. კვლევის მეთოდები 24

3. მეთოდის მსვლელობა 24

3.1 სტაფილოკოკური ბაქტერიოფაგის (92 N) სხვადასხვა ტემპერატურის მიმართ მდგრადობის შესწავლა 25

3.2 სტაფილოკოკური ბაქტერიოფაგის (92N) მდგრადობის შემოწმება სხვადასხვა pH-ის მიმართ 26

3.3 სტაფილოკოკური ბაქტერიოფაგის (92N) მიერ ზედაპირების დეკონტამინაციის უნარის შესწავლა 27

3.4 ერთჯერადი გამრავლების ციკლი 28

3.5 სტაფილოკოკური ბაქტერიოფაგის (92N) მიერ რძის დეკონტამინაციის უნარის შესწავლა 29

3.6 92N ბაქტერიოფაგის მოქმედების სპექტრის შესწავლა 30

3.7 ბაქტერიოფაგის ტიტრის განსაზღვრა გრაციას მეთოდით 30

III კვლევის შედეგები და მათი განხილვა 31

დასკვნა 41

გამოყენებული ლიტერატურა 42

შესავალი

თემის აქტუალობა

სურსათის უვნებლობა გლობალური მნიშვნელობის საკითხს წარმოადგენს. სურსათისმიერი დაავადებები სერიოზულ პრობლემას ქმნის მთელს მსოფლიოში. ჯანდაცვის მსოფლიო ორგანიზაციის (WHO) მონაცემებით, ყოველწლიურად, მსოფლიოში ყოველი ათი ადამიანიდან ერთი ავადდება დაბინძურებული სურსათის მიღებით და 420 000 შემთხვევა სრულდება ფატალურად. ამ შემთხვევებიდან უმეტესი ნაწილი, 72%, ბაქტერიული წარმოშობის დაავადებებზე მოდის, რომლებიც სხვადასხვა მიზეზით არის განპირობებული. სურსათის გადამამუშავებელი საწარმოებისთვის ჰიგიენის სათანადო მდგომარეობის შენარჩუნება უმნიშვნელოვანესია საბოლოო პროდუქტის უვნებლობის მისაღწევად. განსაკუთრებით საყურადღებოა, სურსათთან შეხებაში მყოფი ზედაპირებისა და პერსონალის ჰიგიენა, ვინაიდან ხშირია ამ მიზეზებით განპირობებული სურსათის დაბინძურება. სათანადო ჰიგიენური გარემოს უზრუნველყოფისთვის მასიურად გამოიყენება ქიმიური სარეცხი/სადეზინფექციო საშუალებები, რაც შესაძლოა თავად გახდეს სურსათის ქიმიური დაბინძურების წყარო. ამავდროულად, ბიომაკონტროლებელ აგენტებად ანტიბიოტიკების უკონტროლო გამოყენებამ სერიოზული პრობლემები წარმოქმნა, რაც უკავშირდება რეზისტენტობას, ალერგიულ რეაქციებს და სხვ.

სწორედ ამიტომ, მნიშვნელოვანია ეფექტური და ამავდროულად, უსაფრთხო ბიოლოგიური აგენტების გამოყენება, როგორც სანიტარიული დამუშავების კუთხით, აგრეთვე, ბიომაკონტროლებელ აგენტებად. ამგვარ აგენტებს მიეკუთვნება ბაქტერიოფაგები.

2006 წ. 18 აგვისტოს FDA-ს მიერ პირველი ფაგური პრეპარატის (ListShield) დამტკიცების შემდეგ სულ უფრო და უფრო იზრდება ინტერესი სურსათის უვნებლობის უზრუნველსაყოფად ახალი ბაქტერიოფაგური პრეპარატების მიმართ. შესაბამისად, აქტიურად მიმდინარეობს კვლევები ფაგების სხვადასხვა დანიშნულებით გამოყენებასთან დაკავშირებით, კერძოდ, ფაგი როგორც თერაპიული, ბიომაკონტროლებელი, სანიტარიული საშუალება და როგორც კონსერვანტი.

კვლევის მიზანი

ჩვენი კვლევის მიზანს წარმოადგენდა ახალი, შეუსწავლელი სტაფილოკოკური ბაქტერიოფაგის დეკონტამინაციის უნარის შესწავლა, როგორც ზედაპირებისთვის, ასევე სურსათისთვის.

კვლევის ამოცანები

მისაღწევად დავისახეთ შემდეგი ამოცანები:

- ახალი სტაფილოკოკური ბაქტერიოფაგების მოქმედების სპექტრის შესწავლა
- ფაგის მდგრადობის შესწავლა სხვადასხვა ტემპერატურასა და pH-ზე
- ფაგის ადსორბციის, ლატენტური პერიოდის და საშუალო გამოსავლის დადგენა
- მინის ზედაპირების და სურსათის, კერძოდ, რძის დეკონტამინაციის უნარის შესწავლა

I. ლიტერატურის მიმოხილვა

1. ოქროსფერი სტაფილოკოკის დახასიათება და სტაფილოკოკური სურსათისმიერი დაავადება

სტაფილოკოკები ფართოდ არიან გავრცელებული გარემოში. ისინი გვხვდება ჰაერში, წყალში, მტვერში, კანალიზაციაში, სურსათში, სურსათთან შეხებაში მყოფ ზედაპირებზე, ადამიანებსა და ცხოველებში. ისინი აღმოჩენილია 50%-ზე მეტ ჯანმრთელი ადამიანების ცხვირ-ხახაში, ყელში, თმასა და კანზე. სურსათი, შესაძლებელია დაბინძურდეს აღნიშნული მიკროორგანიზმით მისი წარმოების სხვადასხვა ეტაპზე, კერძოდ, პირველადი წარმოებისას დაინფიცირებული ცხოველებიდან, გადამუშავების დროს დაინფიცირებული პერსონალისგან (ხელებიდან, დახველებით, დაცემინებით და ა.შ), აგრეთვე, სურსათთან შეხებაში მყოფი დაბინძურებული ზედაპირებიდან. [1,2]

Staphylococcus სახეობები წარმოადგენენ გრამ დადებით, კატალაზა დადებით, პატარა, უმოძრაო, სფერულ ბაქტერიებს (კოკები), რომლებიც მიკროსკოპში გამოკვლევისას ჩანს წყვილებად, მოკლე ჯაჭვებად ან ყურძნის ფორმის დატოტვილ სტრუქტურებად. სტაფილოკოკები ყველგან გავრცელებული მიკროორგანიზმებია და მათი გარემოდან აღმოფხვრა შეუძლებელია. 32 სახეობიდან და ქვესახეობებიდან მრავალი სტაფილოკოკი არის აღმოჩენილი სურსათში, რაც შესაძლოა განპირობებული იყოს სხვადასხვა დაბინძურების წყაროს მიერ, კერძოდ, დასნებოვნებული ცხოველები, ადამიანები და გარემო. [1]

ზოგიერთი სახეობას, მათ შორის, როგორც კოაგულაზა დადებით, ისე კოაგულაზა უარყოფით შტამებს, აქვს უნარი წარმოქმნან თერმოგამძლე ენტეროტოქსინები, რომლებიც ზიანს აყენებს ადამიანების ჯანმრთელობის მდგომარეობას. ოქროსფერი სტაფილოკოკი წარმოადგენს სტაფილოკოკური სურსათისმიერი დაავადებების გამომწვევთაგან ყველაზე გავრცელებულ და საშიშ მიკროორგანიზმს. ოქროსფერი სტაფილოკოკი ერთ-ერთი ყველაზე რეზისტენტული პათოგენია, რომელიც კარგად უძლებს გამოშრობას და არ წარმოქმნის სპორებს. მისი განვითარებისთვის საჭირო ტემპერატურა მერყეობს 7-47,8^0 C დიაპაზონში (ზრდის ოპტიმალური ტემპერატურაა 35^0 C) ხოლო, საჭირო pH არის 4,5-9,3 ფარგლებში

(ოპტიმალური pH 7,0-7,5). მათ შეუძლია განაგრძონ ზრდა-განვითარება წყლის დაბალი აქტივობის პირობებშიც (a_w 0,83). ზოგიერთი შტამი ტოლერანტულია მარილებისა და შაქრების მიმართ. [1,2,3]

სტაფილოკოკური ენტეროტოქსინები 26 000-29 000 მოლეკულური მასის მქონე ცილებია. ისინი პროტეოლიზური ფერმენტების მიმართ მდგრადია. განარჩევენ ენტეროტოქსინების 5 სეროტიპს: SEA, SEB, SEC1,2,3, SED და SEE, აგრეთვე ახალი აღწერილია SEG, SEH და SEI.

სტაფილოკოკური ენტეროტოქსინის ინტოქსიკაციური დოზა წარმოადგენს 1 მკგ-ზე ნაკლებს. ტოქსინის აღნიშნული დოზა მიიღწევა, როდესაც ოქროსფერი სტაფილოკოკის რაოდენობა სურსათში აღემატება 100 000 უჯრედს/გ. მოწყვლად ჯგუფებში ენტეროტოქსინის ინფექციური დოზა, შესაძლებელია, იყოს 100-200 ნგ.

ინტოქსიკაციის საწყისი სიმპტომები სწრაფად ვლინდება (1-7 სთ) და ხშირ შემთხვევაში ძალიან მძაფრად. ის დამოკიდებულია ინდივიდუალურ მგრძნობელობაზე, მიღებული ტოქსინის რაოდენობაზე და ინდივიდის ჯანმრთელობის მდგომარეობაზე. მისი სიმპტომებია: ღებინება, სპაზმური ტკივილი მუცლის ღრუში, ფაღარათი. მძიმე შემთხვევებში ამას ემატება დეჰიდრატაცია, თავის ტკივილი, კუნთების ტკივილი, სისხლის წნევის და პულსის სიხშირის ცვლილებები.

ძირითადად, დაავადება გრძელდება რამდენიმე საათიდან ერთ დღემდე, თუმცა გარკვეულ შემთხვევებში ის საჭიროებს ჰოსპიტალიზაციას. როგორც წესი, დაავადება ფატალურად არ სრულდება, თუმცა ლეტალური შემთხვევებს ადგილი ჰქონია მოხუცებში, ჩვილებში და დასუსტებული იმუნური სისტემის მქონე ადამიანებში. [1,2]

დაავადებათა კონტროლისა და პრევენციის ცენტრის მონაცემებით, ამერიკის შეერთებულ შტატებში, ყოველწლიურად, 200 000-ზე მეტი სტაფილოკოკური სურსათისმიერი დაავადების შემთხვევა ფიქსირდება, რომელთაგან 1064 შემთხვევა საჭიროებს ჰოსპიტალიზაციას და 6 სრულდება ფატალურად. [1]

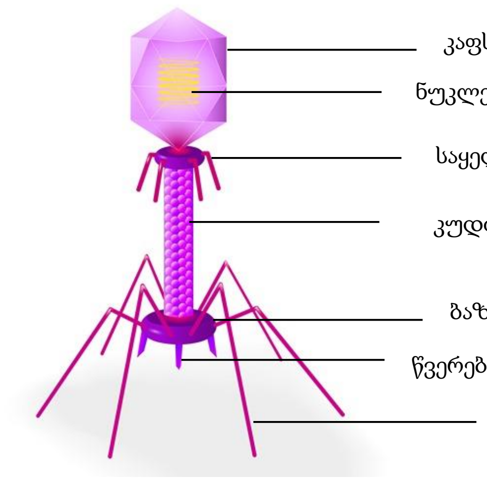
2. ბაქტერიოფაგი

2.1 ბაქტერიოფაგის დახასიათება

ბაქტერიოფაგები აინფიცირებს ეუბაქტერიასა (Eubacteria) და არქეებს (Archaea), სწორედ ამიტომ ისინი განისაზღვრება, როგორც ,,პროკარიოტების ვირუსი“. ფაგები აინფიცირებენ 140-ზე მეტ გვარს, მათ შორის როგორც აერობულ ისე ანაერობულ ფორმებს, ეგზო და ენდოსპორის წარმომქმნელებს, ექსტრემალურ ჰალოფილებს, მეთანოგენებს, ჰიპერთერმოფილურ არქეებს. [4]

ბაქტერიოფაგები, სხვა ვირუსების მსგავსად, არიან ობლიგატური პარაზიტები. ისინი ყველგან არის გავრცელებული ბუნებაში ჰაერში, ნიადაგში, წყლში, განსაკუთრებით საკანალიზაციო წყლებში, სხეულის ზედაპირებზე, კუჭ-ნაწლავში და სხვ. სუფთა წყლის 1 მლ შეიცავს $2X10^8$ ფაგურ ნაწილაკს. ისინი წარმოადგენენ რაოდენობრივად ყველაზე უხვ ბიოლოგიურ ობიექტებს დედამიწაზე, დაახლოებით 10^{30} - 10^{32} ფაგური ნაწილაკი. სწორედ ამის გამო ისინი დამსახურებულად იწოდებიან, როგორც მიკრობული ბალანსის მთავარი მარეგულირებლები ეკოსისტემებში.

მორფოლოგიურად ფაგები შესაძლოა იყოს კუდის მქონე, კუბური, ფილამენტური ან პლეომორფული. ბაქტერიოფაგების უმეტესობა შედგება თავისგან - კაფსიდისგან და კუდისგან. მათ შეიძლება გააჩნდეთ, აგრეთვე, დამატებითი სტრუქტურებიც, როგორებიცაა საყელო, ბაზალური ფირფიტა, ფიბრილები. დღესდღეობით ყველაზე უკეთ არის შესწავლილი T4 ბაქტერიოფაგი, რომლის მორფოლოგიური აღწერა მოცემულია სურათზე 1. [4]



სურათი 1: T4 ბაქტერიოფაგის სტრუქტურა

ბაქტერიოფაგები, მათი სასიცოცხლო ციკლიდან გამომდინარე, იყოფა ორ ძირითად კლასად: ლითიური ან ზომიერი ფაგები. ვირულენტურ (ლითიურ) ფაგებს გამრავლება შეუძლია მხოლოდ ლითიური ციკლის მეშვეობით, რაც იწვევს მასპინძელი ბაქტერიული უჯრედის ლიზისს და ახალი ფაგური ნაწილაკების გამოთავისუფლებას. მეორის მხრივ, ზომიერი ფაგების ინფექცია შესაძლებელია განხორციელდეს ორგვარი გზით: ლითიური გზით ან ლიზოგენური გზით, როდესაც ფაგის გენომი თანაარსებობს მასპინძელი უჯრედის გენომთან ერთად ქრომოსომაში ინტეგრირებული სახით, როგორც პროფაგი ან იზოლირებულად, პლაზმიდის მსგავსად და არის პასიურ მდგომარეობაში. პროფაგები რეპლიცირდება და გადაეცემა შვილეულ უჯრედებს გაყოფის შედეგად. მასპინძელი უჯრედებს, რომლებიც პროფაგების თაფშესაფარს წარმოადგენს, შესწევთ უნარი გამოიყვანონ პროფაგები პასიური მდგომარეობიდან და გადართონ ლითიურ ციკლზე. [4,5]

2.2 აღმოჩენის ისტორია

ლიტერატურულ წყაროებში არსებობს ცნობები, სადაც გადაკვრით არის აღნიშნული ბაქტერიოფაგების (მოგვიანებით ეწოდა ეს სახელი) არსებობა. ჰანკინი (1896 წ) წერს, რომ ინდოეთში არსებულ მდინარეებს ჯუმნასა და განგს გააჩნია ანტისეპტიკური მოქმედება მრავალი ბაქტერიის მიმართ და განსაკუთრებით, კი *Vibrio cholerae* -ს წინააღმდეგ. ეს აქტივობა დუღილით ნადგურდებოდა. მან დაასკვნა, რომ ანტისეპტიკური უნარი გააჩნდა

აქროლად ქიმიურ ნივთიერებას. ემერიხი და ლოუ იუწყებოდნენ, რომ გარკვეულ ნივთიერებას გააჩნია უნარი გამოიწვიოს სხვადასხვა კულტურების ლიზისი. ამასთან, არსებობს გამალიევას, მალფიტანოს, კრუსესა და პანსინის მიერ მომზადებული ფაქტობრივი მასალა ბაქტერიების ავტოლიზთან დაკავშირებით, რაც გადაიხედა ოტოსა და მუნტერის მიერ 1923 წელს. ზემოთ აღნიშნული ყველა ექსპერიმენტი მიმდინარეობდა თხევად კულტურებზე. პირველი მნიშვნელოვანი ექსპერიმენტი ფაგებთან დაკავშირებით განხორციელდა მყარ საკვებ არეებზე და დაფუძნებული იყო ლიზისური ზონის დაკვირვებაზე. [4,6]

პირველი თანამედროვე კვლევები ბაქტერიოფაგებთან დაკავშირებით უკავშირდება ფრედერიკ ტვორტის ექსპერიმენტებს. იგი იყო ცნობილი ბაქტერიოლოგის უილიამ ბულოხის სტუდენტი. მისი ექსპერიმენტის ფარგლებში, სადაც ის ცდილობდა მყარ აგარზე გაეზარდა ვაქცინია ვირუსის, ტვორტმა შენიშნა გაზრდილი *micrococci*-ის კოლონიები და ჩათვალა, რომ საკვლევი მასალა დაუბინძურდა. მისი დაინტერესების ობიექტი გახდა ის ფაქტი, რომ აღნიშნული კოლონიებიდან ზოგი იყო ლორწოვანი, ზოგი - უფერული და ზოგიც - სარკესავით პრიალა ზედაპირის მქონე. აღნიშნული პრიალა ზედაპირის მქონე კოლონიების მიკროსკოპის ქვეშ გამოკვლევისას მან დაინახა, რომ ბაქტერია იყო დაშლილი პატარ-პატარა ,,გრანულებად''. [4]

ამ ექსპერიმენტებისგან დამოუკიდებლად, ფელიქს დერელმა აღმოაჩინა მიკრობი, რომელსაც გააჩნდა ანტაგონისტური მოქმედების უნარი ბაქტერიების მიმართ და რაც იწვევდა თხევად არეში კულტურების ლიზისს და აგარიან საკვებ არეებზე დისკრეტული ლაქებით მჟღავნდებოდა. დერელმა ამ უხილავ მიკრობებს ,,ულტრავირუსებს'', რომლებიც იჭრებოდა ბაქტერიულ უჯრედებში და მათ ხარჯზე მრავლდებოდა, უწოდა ბაქტერიოფაგები (ბერძნულად φαγεῖν (*phagein*) ნიშნავს შთანთქმას). [4,6]

ბაქტერიოფაგების კვლევაში დიდი წვლილი შეიტანა ქართველმა მეცნიერმა გიორგი ელიავამ, რომელმაც 1915 წელს შენიშნა *Vibrio cholerae*-ს თვითლიზისის მოვლენა და შეისწავლა ბაქტერიოფაგის ფენომენი.

2.3 ბაქტერიოფაგების კლასიფიკაცია

ფაგები თავიანთი სტრუქტურული, ფიზიკო-ქიმიური და ბიოლოგიური მახასიათებლების მიხედვით, არიან ჰეტეროგენულები, რაც იმაზე მეტყველებს, რომ ისინი პოლიფილეტიკური წარმოშობის არიან. უმეტესობა მათგანი შეიცავს ორჯაჭვიან დნმ-ს, თუმცა გვხვდება ისეთებიც, რომელთაც გააჩნია ერთჯაჭვიანი დნმ ან რნმ და ორჯაჭვიანი რნმ მოლეკულები. ყველა დნმ შემცველი ფაგი შეიცავს დნმ-ის მხოლოდ ერთ მოლეკულას. ზოგიერთ ფაგს გააჩნია ლიპიდების შემცველი კაპსულა ან შიდა ვეზიკულები. 5000 ბაქტერიოფაგზე მეტია შესწავლილი ელექტრონული მიკროსკოპით. ბაქტერიოფაგები კლასიფიცირდება ერთ კლასად, 13 ოჯახად და 31 გვარად. ოჯახები უმთავრესად განისაზღვრება ნუკლეინის მჟავის ბუნებისა და ვირიონის მორფოლოგიის მიხედვით. მიუხედავად იმისა, რომ დაახლოებით 40 კრიტერიუმი გამოიყენება კლასიფიკაციისთვის, ჯერჯერობით უნივერსალური კრიტერიუმი გვარებისა და სახეობების კლასიფიცირებისთვის არ არის. [4,7]

2.4 კუდის მქონე ფაგები

ბაქტერიული ვირუსების ძირითად და ყველაზე გავრცელებულ ნაწილს წარმოადგენს კუდის მქონე ბაქტერიოფაგები (Caudovirales - ლათინურად cauda, კუდი), რომელთაგან მინიმუმ 4950 არის შესწავლილი ელექტრონული მიკროსკოპის საშუალებით. შესაძლოა ისინი უძველეს ვირუსებსაც კი წარმოადგენენ, თარიღდებიან რა 3,5 მილიარდი წლით, რაც დაახლოებით უძველესი მიკრობული წიაღისეულის ასაკია. ტიპიური კუდიანი ფაგები აინფიცირებენ, როგორც ეუბაქტერიას ისე არქეებს, რაც მიგვანიშნებს რომ მათი გამოჩენა წინ უძღვოდა ამ ორი ბაქტერიული სამეფოს დაყოფას. ვირიონები შეიცავს ცილოვან გარსსა და ხაზოვან ორჯაჭვიან დნმ მოლეკულას. ფაგური ნაწილაკები არ არის კაფსულირებული და მათ გააჩნია ბინარული სიმეტრია, ვინაიდან მათი თავი კუბური და კუდი სპირალური სიმეტრიის მქონეა. მათი კაპსიდი იკოსაედრული, როგორც თანაბარი, ისე წაგრძელებულია. კაპსიდი აგებულია კაპსომერებისგან (5-6 ცილოვანი ერთეული). ფაგის კუდი სპირალურია ან შედგება ერთმანეთზე დაწყობილი დისკებისგან და როგორც წესი, ის შეიცავს ტერმინალურ ადსორბციის სტრუქტურებს, როგორებიცაა ბაზალური ფირფიტა, წვერები ან ფიბრილები. კუდის მსგავსი სტრუქტურები განსაკუთრებით აღმოჩენილია ტექტივირუსებში და ზოგიერთი წყალმცენარის ვირუსში, თუმცა ეს სტრუქტურები არც მუდმივია და აგრეთვე, მკვეთრად განსხვავდება რეალური კუდის სტრუქტურისგან. [4]

კუდის მქონე ბაქტერიოფაგების დნმ-ის სტრუქტურა ემსგავსება მათი მასპინძელი ბაქტერიის ნუკლეინის მჟავას. რიგ შემთხვევებში დნმ-ის მოლეკულა შეიცავს უჩვეულო ფუძეს - 5-ჰიდროქსიმეთილციტოზინს. ფაგის გენომი არის დიდი, კომპლექსური და როგორც წესი, ორგანიზებულია ურთიერთცვალებად სამშენებლო ბლოკებში ან მოდულებში. ყველაზე დიდი ბაქტერიოფაგის (*Bacillus*-ის ფაგი G) გენომი შედგება 498 kbp-სგან და 684 გენისგან, შესაბამისად მისი გენომი უფრო დიდი ზომისაა ვიდრე ზოგიერთი მიკოპლაზმის. ჩვეულებრივ, მონათესავე ფუნქციების განმაპირობებელი გენები კლასტერებად თავსდება. რეპლიკაციისას დნმ-ის მოლეკულა წარმოქმნის დატოტვილ სტრუქტურას ან კონკატემერებს, რომლებიც ცალკეულ გენომზე გაცილებით გრძელია. ამის შემდეგ დნმ იჭრება ერთეული სიგრძის მონაკვეთებად და თავსდება წინასწარ ფორმირებულ კაპსიდებში, იწყობა ვირიონები, რასაც მოყვება ფაგური ნაწილაკების გამოთავისუფლება მასპინძელი უჯრედის ლიზისის მეშვეობით. [4,6]

კუდის მქონე ფაგები, შესაძლოა, იყოს ვირულენტური (ლითიური) ან ზომიერი. ვირულენტური ფაგები მრავლდებიან ხშირად და ანადგურებენ მასპინძელ უჯრედებს, რაც შვილეული ბაქტერიოფაგების გამოთავისუფლებას უწყობს ხელს. ზომიერი ფაგები ლატენტურ ან პროფაგურ მდგომარეობაში გადასვლით აყალიბებენ მდგომარეობას, რასაც ლიზოგენია ეწოდება და თავიანთი მასპინძელი უჯრედის მსგავსად რეპროდუცირებენ. მხოლოდ გარკვეულ შემთხვევებში არის შესაძლებელი, რომ მათ წარმოქმნან ინფექციური ფაგური შთამომავლობა. ზომიერ ფაგებს აქვთ უნარი დაინფიცირებულ ბაქტერიებს მიანიჭონ ახალი, დამატებითი თვისებები და ამ ფენომენს ეწოდება ლიზოგენური კონვერსია. ლატენტური ფაგის გენომი ან პროფაგი რჩება მასპინძელი უჯრედის გენომში ინტეგრირებული ან პლაზმიდის სახით. [4,6]

მრავალფეროვანია კუდიანი ფაგების თვისებები, მაგალითად, მათი ზომები, სტრუქტურა, დნმ მოლეკულის შემადგენლობა, ძირითადი ცილების ბუნება, სეროლოგია, ლიზისური სპექტრი და ფიზიოლოგია. მაშასადამე, კუდის მქონე ფაგები წარმოადგენენ ვირუსების ყველაზე მრავალფეროვან, ფართოდ გავრცელებულ და მრავალრიცხოვან ჯგუფს. კუდის სტრუქტურის მიხედვით, რომელიც ელექტრონული მიკროსკოპიისას ადვილად დეტექციის მნიშვნელოვან კრიტერიუმს წარმოადგენს და აგრეთვე, აწყობის მექანიზმის მიხედვით კუდის მქონე ფაგები იყოფა 3 ოჯახად:

- **Myoviridae** -კუმშვადი კუდის მქონე, რომელიც შეიცავს გარსსა და ცენტრალურ მილს კუდიანი ფაგების 25%).
- **Syphoviridae** - გრძელი, არაკუმშვადი კუდის მქონე (61%).
- **Podoviridae** - მოკლე, არაკუმშვადი კუდის მქონე (14%).

აღნიშნული სამი ოჯახის ფიზიკო-ქიმიური მახასიათებლები მნიშვნელოვნად ემთხვევა ერთმანეთს, რის გამოც, მათი დიფერენცირება ამ კუთხით ვერ ხერხდება.

Syphoviridae და Podoviridae ოჯახის წარმომადგენელ ბაქტერიოფაგებს უფრო მეტი მსგავსება აქვთ ერთმანეთთან და მათ შორის ძირითად განსხვავებას წარმოადგენს კუდის სიგრძე, რაც თავის მხრივ განპირობებულია კუდის სიგრძის განმსაზღვრელი მოლეკულის არსებობით ან არარსებობით.

კუდის მქონე ფაგებში არჩევენ 15 გვარს და ეს დაყოფა ეფუძნება გენომის სტრუქტურის და რეპლიკაციურ თავისებურებებს. კუდიანი ფაგების დაყოფა გვარებად ჯერ არ დასრულებულა და მომავალში მოსალოდნელია ახალი გვარების დადგენა. [4]

2.5 ბაქტერიოფაგის ლითიური ციკლი

2.5.1 ადსორბცია

ლითიური ციკლის პირველ ეტაპს წარმოადგენს ბაქტერიოფაგსა და ბაქტერიის უჯრედის ზედაპირზე არსებულ სპეციფიკურ დასაკავშირებელ უბანს, რეცეპტორს შორის ურთიერთკავშირი. დასაკავშირებელი სტრუქტურების არსებობა ან არარსებობა წარმოადგენს ფაგის ლიზისური სპექტრის დეტერმინანტს. გრამ-უარყოფითი ბაქტერიების ფაგები შესაძლოა ურთიერთქმედებდნენ ლიპოპოლისაქარიდულ კომპონენტებთან (LPS, ენდოტოქსინი), გარეთა მემბრანის ცილებთან (OMP) ან შესაძლებელია გააჩნდეთ ადჰეზინების კომპლექსი, რომელსაც მრავალ რეცეპტორის ამოცნობის უნარი აქვს. გრამ-დადებითი ბაქტერიების ფაგები ამოიცნობენ ერთ ან რამდენიმე მოლეკულას, მაგალითად, თეიხოის მჟავას, რომელიც პეპტიდოგლიკანის შრეშია განლაგებული. [4,6]

რეცეპტორის კონცენტრაცია და სივრცითი ორიენტაცია წარმოადგენს კრიტიკულ ფაქტორებს ბაქტერიოფაგის გამოცნობისას და ადსორბციისას. ადსორბციის პროცესში მნიშვნელოვან როლს ასრულებს, აგრეთვე, სხვა გარე ფაქტორები, როგორიცაა მოთხოვნა სპეციფიკური კოფაქტორების, მაგალითად, ორვალენტიანი კათიონების არსებობაზე და მასპინძელი ბაქტერიული უჯრედის ფიზიოლოგიურ მდგომარეობაზე. გარკვეული ზედაპირული მოლეკულების დანაკლისმა, რომლებიც ფაგის მიერ გამოიყენება, როგორც რეცეპტორები, შესაძლოა გამოიწვიოს ბაქტერიის მნიშვნელოვანი ფუნქციების დარღვევა ან მათი კონკურენტუნარიანობის შემცირება. ეს განსაკუთრებით იმ შემთხვევაში ხდება, თუ აღნიშნული ზედაპირული მოლეკულები მონაწილეობას იღებს გარკვეული გარემო პირობების არსებობისას ბაქტერიების ზრდა-გამრავლების პროცესში. [6]

მიუხედავად იმისა, რომ ბაქტერიებს შეუძლია რეზისტენტობის ჩამოყალიბება, რეცეპტორების შეცვლის ან მათი მოკლების გზით, საკუთრივ, ბაქტერიოფაგებსაც შეუძლია მაკომპენსირებელი ადაპტაციის უნარი შეიძინონ, მუტაციების გზით, რაც საშუალებას მისცემს მათ ამოიცნონ შეცვლილი ზედაპირული მოლეკულური სტრუქტურა ან დაუკავშირდნენ ახალ რეცეპტორს.

2.5.2 შეღწევა

ყოველ ბატერიოფაგს გააჩნია მასპინძელ უჯრედში საკუთარი გენომის გადაცემის უნიკალური მექანიზმი, თუმცა, ზოგად სქემაში ჩართულია ფაგის კუდის წვერი, რომელსაც გააჩნია შესაბამისი ფერმენტი პეპტიდოგლიკანურ შრეში შეღწევისთვის, რათა ჩაუშვას დნმ მოლეკულა ბაქტერიულ უჯრედში. ზოგიერთი ფაგის შემთხვევაში, დნმ-ის ჩაშვება უჯრედში დამოკიდებულია მასპინძელი უჯრედის ბიოქიმიაზე.

2.5.3 ფაგური გენომის რეპლიკაცია

ბაქტერიოფაგებს შეუძლია ეგზონუკლეაზებისა და რესტრიქციული ფერმენტების მიმართ მგრძნობელობის დაძლევა საკუთარი წრიული ფორმის გენომით, ბაქტერიული ნუკლეაზების ინჰიბირებით ან დნმ მოლეკულაში მოდიფიცირებული ნუკლეოტიდების ჩართვით.

ფაგური პრომოტორების ამოცნობა ბაქტერიული რნმ პოლიმერაზას საშუალებით იწვევს ადრეული გენების ტრანსკრიპციას, რომელთა პროდუქტებიც მონაწილეობას ღებულობს ფაგური გენომის დაცვაში და მასპინძელი უჯრედის გარემოს შეცვლას ბაქტერიოფაგის საჭიროების მიხედვით. გარკვეულ შემთხვევებში, ფაგურ გენომთან ერთად ფაგის ცილების შეყვანაც ხდება ბაქტერიულ უჯრედში. ფაგური გენომის რეპლიკაციას ადგილი აქვს მასპინძელ უჯრედში ოპტიმალური გარემო პირობების ჩამოყალიბების შემდეგ. ლითიური ფაგები რეპლიკაციურ მექანიზმს თავად აკოდირებენ, განსხვავებით, ზომიერი და მცირედ ლითიური ფაგებისგან, რომლებიც დამოკიდებული არიან მასპინძელ უჯრედზე საკუთარი გენომის რეპლიკაციისთვის. [6]

2.5.4 მორფოგენეზი და უჯრედის ლიზისი

მორფოგენეზი მოიცავს ფაგური გენომის შეფუთვას და ახალი ფაგების აწყობას. მასპინძელი ბაქტერიული უჯრედის ლიზისის ქრონომეტრაჟი გაკონტროლებულია უმეტესობა კუდიანი ბაქტერიოფაგების ლიზინ-ჰოლინის ორკომპონენტიანი სისტემის საშუალებით. ლიზინი არის ფერმენტი, რომელიც პეპტიდოგლიკანის ძირითად კავშირებს შლის, ხოლო ჰოლინი არის ცილა, რომელიც შიგნითა მემბრანაში წარმოქმნის ფორებს, იმისათვის რომ პეპტიდოგლიკანის შრე დროულად იყოს ლიზინისთვის ხელმისაწვდომი. ლითიური ციკლის საბოლოო საფეხურს წარმოადგენს მასპინძელი უჯრედის ლიზისი და შთამომავალი ბაქტერიოფაგების გამოთავისუფლება. [4,6]

2.6 ბაქტერიოფაგების, როგორც სურსათის ბიოკონტროლის აგენტების, სასურველი მახასიათებლები

ბაქტერიოფაგების გამოყენება შესაძლებელია ,,ფერმიდან ჩანგლამდე“ მასშტაბში სხვადასხვა დანიშნულებით:

- ფაგი, როგორც თერაპიული საშუალება - ცოცხალ შინაურ ცხოველებში დაავადებების პრევენციისა და შემცირებისთვის;

- ფაგი, როგორც ბიოსანიტარიული საშუალება - ტანხორცის, ნედლი ხილ-ბოსტნეულის და სხვა სურსათის დეკონტამინაციისთვის და სურსათთან შეხებაში მყოფი ზედაპირების, მოწყობილობის დეზინფიცირებისთვის;
- ფაგი, როგორც ბიოკონსერვანტი, იმისათვის რომ გაზარდოს წარმოებული მალფუჭებადი სურსათის შენახვის ვადა.

თავიანთ მიმოხილვაში ჰაგენსმა და ლოზნერმა ჩამოთვალეს ბაქტერიოფაგის რამდენიმე სასურველი მახასიათებელი, რომლებიც იძლევა ფაგების, როგორც ბიოკონტროლის აგენტებად გამოყენების საშუალებას. [6,7]

2.6.1 ბაქტერიოფაგი უნდა იყოს მკაცრად ლითიური

სურსათში ბიოკონტროლის აგენტად გამოყენებული ბაქტერიოფაგი უნდა იყოს აუცილებლად ვირულენტური. ზომიერი ფაგების გამოყენება არ არის სასურველი, რადგან შესაძლოა მათი გენომი შეიცავდეს ისეთ გენებს, რომლებიც მასპინძელი ბაქტერიის ფენოტიპს ცვლიან (ლიზოგენური ტრანსფორმაციის გენები). შედეგად შესაძლოა მივიღოთ არაპათოგენური ბაქტერიული შტამის გარდაქმნა ვირულენტურ შტამად. სწორედ ლიზოგენური ტრანსფორმაციის წყალობით ითამაშეს დიდი როლი ბაქტერიოფაგებმა ახალი სურსათისმიერი დაავადებების გამომწვევი პათოგენების ევოლუციაში. ზოგიერთი სურსათისმიერი დაავადების გამომწვევ მიკროორგანიზმებში არსებული ვირულენტობის მაკოდირებელი გენები, ჩვეულებრივ, ნაპოვნია ბაქტერიოფაგებში და ბაქტერიოფაგურ ნარჩენებში. ამის მაგალითებს წარმოადგენს: H-19B და VT2-sakai ბაქტერიოფაგებიდან - შიგა ტოქსინი 1 - მასპინძელი ბაქტერია *Escherichia coli*; CTXф ბაქტერიოფაგიდან - ქოლერა ტოქსინი - მასპინძელი ბაქტერია *Vibrio cholerae*. [6]

ვირულენტური ბაქტერიოფაგის შერჩევისას, როგორც ბიოკონტროლის აგენტი, ამორჩეული უნდა იყოს ნათელი ლიზისური ზონის წარმომქნელი ფაგი (clear plaque forming). ამასთან ერთად, იმის დასადასტურებლად, რომ კონკრეტული ბაქტერიოფაგი არის მკაცრად ლითიური, საჭიროა, მისი დნმ-ის სექვენირება და გულმოდგინედ შემოწმება არის თუ არა

მასში წარმოდგენილი ინტეგრაზას მაკოდირებელი და ლიზოგენიასთან დაკავშირებული გენები.

2.6.2 ბაქტერიოფაგს უნდა გააჩნდეს ფართო ლიზისური სპექტრი

მასპინძელ სპეციფიკურობა ნაპოვნია ბაქტერიის შტამის, სახეობის ან უფრო იშვიათად გვარისა და კლასის დონეზე. სპეციფიკურობა საშუალებას იძლევა მიზანმიმართულად ვიმოქმედოთ ფაგებით კონკრეტული პათოგენური ბაქტერიის მიმართ. მაღალი სპეციფიკურობა ბაქტერიოფაგებს იდეალური ბიოკონტროლის აგენტებად აქცევს, ვინაიდან ზიანს არ აყენებს სასარგებო მიკროფლორას, როგორც სხვა ანტიმიკრობული საშუალებების გამოყენების დროს ხდება. სწორედ მაღალი სპეციფიკურობის და ფართო ლიზისური სპექტრის მქონე ბაქტერიოფაგი წარმოადგენს სასურველ ობიექტს ბიოკონტროლის აგენტად გამოსაყენებლად სხვადასხვა სურსათში. ასეთი ფაგის ერთ-ერთი მაგალითია კომერციულად ხელმისაწვდომი ლისტერიის საწინააღმდეგო პრეპარატი LISTEX^{TM}P 100 (წარმოებული MICREOS Food Safety-ის მიერ, ჰოლანდია), რომელიც აინფიცირებს და კლავს *Listeria monocytogenes* შტამების უმრავლესობას და გამოიყენება, როგორც ანტიმიკრობული საშუალება საკვებად მზა პროდუქტებში, ახალ თევზში. კიდევ ერთი ასეთი მაგალითია, Felix O1 და ϕS1, რომლებიც, შესაბამისად, აქტიურია სალმონელას თითქმის ყველა სეროტიპის და ფლუორესცენტული ფსევდომონადების მიმართ. [6,7,8]

ხშირად გამოიყენება სხვადასხვა ლიზისური სპექტრის მქონე ბაქტერიოფაგის კოქტეილები, იმისათვის რომ მიღწული იყოს უფრო ფართო ლიზისური სპექტრისთვის და აგრეთვე, იმიტომ რომ დაიძლიოს მასპინძელი ბაქტერიის რეზისტენტობა, რაც მაგალითად შესაძლოა გამოწვეული იყოს რეცეპტორის შეცვლით. ზოგიერთ შემთხვევაში, ბაქტერიას უწევს სიცოცხლისუნარიანობის მთლიანად დაკარგვა, იმისათვის რომ შეიძინოს რეზისტენტობა კოქტეილში შემავალი ფაგების მიმართ. ამგვარი კოქტეილების კომერციულ ერთ-ერთ მაგალითს წარმოადგენს ListShield^{TM} (წარმოებული Intralytix მიერ, ბალტიმორში, აშშ), რომელიც 6 ფაგის ნარევია და ახორციელებს სხვადახვა სეროტიპის *Lysteria monocytogenes*-ის უამრავი შტამის ლიზისს. [9]

2.6.3 ფაგის ორალურად მიღების შესახებ კვლევებმა უარყოფითი ეფექტი არ უნდა აჩვენოს

კვლევებმა უნდა დაადასტუროს, რომ ფაგური პრეპარატის მიღება სრულიად უვნებელია ადამიანებისთვის, რაც არ უნდა დიდი დოზით იყოს იგი მოხმარებული. ლისტერიული ფაგის, ,,P 100'', შესახებ კვლევებმა აჩვენა, რომ თაგვებში აღნიშნული პრეპარატის დიდი დოზით გამოყენება არ იძლევა უარყოფით ეფექტს კონტროლთან შედარებით. მსგავსი შედეგი იყო მიღებული *E. coli*-ის ფაგების შესახებ კვლევებშიც, სადაც თაგვებსა და მოხალისე ადამიანებში არ ჰქონია ადგილი საზიანო გავლენას.[6]

2.6.4 ფაგური პრეპარატი უნდა იყოს მდგრადი მათი შენახვისა თუ გამოყენებისას

სურსათის ფიზიკო-ქიმიურმა მდგომარეობამ (მაგ., pH, a_w და სხვ.), შესაძლოა, იქონიოს გავლენა ბაქტერიოფაგის მდგრადობაზე. მნიშვნელოვანია, იმ სურსათის ფიზიკო-ქიმიური მახასიათებლების გათვალისწინება, რომლის ბიომაკონტროლებელ აგენტადაც უნდა იყოს გამოყენებული კონკრეტული ფაგი. ფაგების უმეტესობა მდგრადია pH 4-10 დიაპაზონში. *Lysteria monocytogenes*-ის კონტროლის კვლევამ ხილში აჩვენა, რომ ფაგის ტიტრი დიდი ხნის განმავლობაში ინარჩუნებდა მდგრადობას ნესვის ნაჭრებზე, თუმცა ვაშლის შემთხვევაში მკვეთრად ეცემოდა, რაც ვაშლის დაბალი pH-ით იყო განპირობებული. [6,8]

2.6.5 ფაგი უნდა იძლეოდეს მასშტაბური კომერციული წარმოების საშუალებას

იმისათვის, რომ ფაგური პრეპარატი მასშტაბურად იწარმოოს სხვადასხვა ფაქტორების სისრულეში მოყვანაა საჭირო, კერძოდ, ბიორეაქტორში არსებული ტემპერატურის, ხსნარის შემადგენლობის, დროის განსაზღვრის, რათა ფაგი გამრავლდეს და მისი კონცენტრაცია გაიზარდოს. მასპინძელ უჯრედზე ფაგის ადსორბციის ხარისხსა და შედეგიანობაზე კრიტიკულ გავლენას ახდენს სასურველი ტემპერატურა, წნევა, ბაქტერია:ფაგის კონცენტრაცია. ის ბაქტერიოფაგები, რომლებიც არასათანადო ადსორბციის უნარით ხასიათდებიან, არ იწარმოება საწარმოო მასშტაბით. [6,8,10]

2.7 ბაქტერიოფაგების გამოყენება სასურსათო ჯაჭვის სხვადასხვა ეტაპზე

მრავალი კვლევა არის ჩატარებული, სურსათის უვნებლობის მისაღწევად, საკვები პროდუქტების წარმოების სხვადასხვა ეტაპზე ბაქტერიოფაგების გამოყენებასთან დაკავშირებით. აღნიშნულმა კვლევებმა, განსაკუთრებით, ხშირი ხასიათი მიიღო მას შემდეგ, რაც FDA-მა გზა გაუხსნა ფაგური პრეპარატების გამოყენებას კვების მრეწველობაში. ბაქტერიოფაგები გამოიყენება, როგორც ბიოკონტროლის საშუალებები ისეთი პროდუქტებისთვის, როგორებიცაა საქონლის და ქათმის ხორცი, თევზის პროდუქტები, ხილ-ბოსტნეული.

დღეისათვის მრავალი ფაგური პრეპარატის გამოცდა მიმდინარეობს ცოცხალ პირუტყვში თერაპიული ეფექტის შესასწავლად, აგრეთვე სურსათთან შეხებაში მყოფი ზედაპირების დეკონტამინაციის პოტენციალის დასადგენად.

2005 წელს აშშ-ის გარემოს დაცვის სააგენტოს მიერ დამტკიცდა Agriphage™, რომელიც გამოიყენებოდა მარცვლეულში ბაქტერიული წარმოშობის ლაქების წინააღმდეგ. 2006 წელს, როგორც ზემოთ აღვნიშნეთ, FDA-მ დაამტკიცა პირველი ფაგური პრეპარატი ლისტერიის წინააღმდეგ. 2007 წელს FDA-მ დაამტკიცა ფაგური პრეპარატი ცოცხალ შინაურ ცხოველებში *E. coli*-სა და *Salmonella*-ს საწინააღმდეგოდ. დღესდღეობით, რამდენიმე პრეპარატია კომერციულად ხელმისაწვდომი, მათ შორის Finalyse სპრეი *E. coli* O157:H7-ის წინააღმდეგ ცოცხალ პირუტყვში და Armament ფრინველებში Salmonella-ს წინააღმდეგ. [7,10,11,12]

სურსათთან შეხებაში მყოფი ზედაპირებიდან ბაქტერიული დაბინძურების აღმოფხვრა მნიშვნელოვან პრობლემებს ქმნის, რაც განპირობებულია ბიოფილმების არსებობით. ეს უკანასკნელი პათოგენური მიკროორგანიზმების ე.წ რეზერვუარს წარმოადგენს. ამგვარი ბიოფილმების წინააღმდეგ წარმატებით გამოიცადა სტაფილოკოკური ფაგი K და უფრო ფართო სპექტრის მქონე სხვა ფაგების ნაზავი DRA88, რომლებიც შედეგიანად ახდენდნენ ოქროსფერი სტაფილოკოკის მოცილებას პოლისტირენის ზედაპირებიდან 48 სთ-იანი დამუშავების შემდეგ. განსაკუთრებით დიდი იყო ეფექტი, როდესაც მსგავსი კვლევები ჩაატარეს ფაგების ნაცვლად ფაგური ენდოლიზინების გამოყენებით. კერძოდ, phi 11 ფაგის ენდოლიზინით პოლისტირენის ზედაპირების 2 სთ-იანი დამუშავებით 37^0 C-ზე სრულად განადგურდა ოქროსფერი სტაფილოკოკის ბიომასა. *Campylobacter jejuni*-ის წინააღმდეგ

გამოყენებულმა ფაგურმა პრეპარატებმა (CP8 და CP30) 1000-ჯერ (ერთეული/სმ²) შეამცირა მიკრობთა რაოდენობა მინის კუპონებიდან. [9,11]

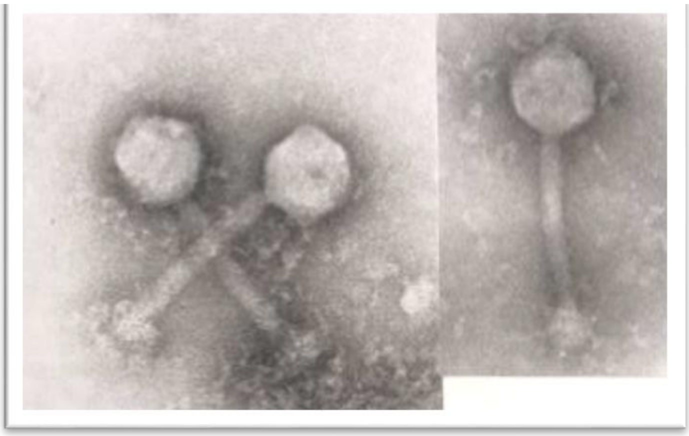
არაერთი კვლევა განხორციელებულა რძისა და რძის პროდუქტების წარმოებაში ბაქტერიოფაგების გამოყენებასთან დაკავშირებით. არსებობს ცნობები ჩედარის ყველის წარმოებისას *Salmonella enteriditis*-ის წინააღმდეგ ფაგების წარმატებით გამოყენების შესახებ. ხაჭოსა და რძის წარმოებაში ოქროსფერი სტაფილოკოკის წინააღმდეგ წარმატებით გამოიცადა ფაგური პრეპარატები philPLA35 და philPLA88. ამ უკანასკნელმა ფაგებმა წარმატებით გაუძლეს მაღალ ჰიდროსტატიკურ წნევას და უფრო მეტიც, მასთან კომბინაციაში მნიშვნელოვნად შეამცირეს რძეში ოქროსფერი სტაფილოკოკის რაოდენობა 4 სთ-ში. [13]

II ექსპერიმენტალური ნაწილი

1.კვლევის ობიექტი

კვლევის ობიექტს წარმოადგენს ახალი სტაფილოკოკური ბაქტერიოფაგი - **92N**, რომელიც 2016 წელს იქნა გამოყოფილი მდინარე ჭოროხის შესართავიდან და ამჟამად ინახება გ. ელიავას სახელობის ბაქტერიოფაგის, მიკრობიოლოგიისა და ვირუსოლოგიის ინსტიტუტში.

ის მიეკუთვნება *Myoviridae* ჯგუფის ბაქტერიოფაგებს, იკოსაედრული კაფსიდით, კუმშვადი კუდით. ბაქტერიოფაგის თავი არის 100 ნმ, კუდის სიგრძე - 230 ნმ, ხოლო კუდის სიგანე 22 ნმ. აღნიშნულიდან გამომდინარე, შეიძლება ითქვას, რომ ფაგი მიეკუთვნება დიდი ზომის ფაგებს. ელექტრონული მიკროსკოპის სურათზე დაკვირვებით, ჩანს რომ მას გააჩნია ბაზალური ფირფიტა, საყელო, კუდის ფიბრილები და წვერები (იხ. სურათი 2).



სურსათი 2: ფაგი 92N - ტრანსმისიული ელექტრონული მიკროსკოპია

2. კვლევის მეთოდები

ჩვენი კვლევის ფარგლებში განხორციელებული ცდები იყო მიკრობიოლოგიური ხასიათის და შესრულდა გ. ელიავას სახელობის ბაქტერიოფაგის, მიკრობიოლოგიისა და ვირუსოლოგიის ინსტიტუტში.

ახალი სტაფიოკოკური ბაქტერიოფაგის დასახასიათებლად და მისი დეკონტამინაციის პოტენციალის შესასწავლად გამოვიყენეთ შემდეგი მეთოდები:

- მოქმედების სპექტრის შესასწავლად - **,,Spot test"**
- სხვადასხვა ტემპერატურისა და pH-ის მიმართ მდგრადობის შესასწავლად - **გრაციას მეთოდით ფაგის გატიტვრა**
- ფაგის ადსორბციის, ლატენტური პერიოდისა და საშუალო გამოსავლის დადგენა - **ელისისა და დელბრუკის მეთოდით ერთჯერადი გამრავლების ციკლი**
- ზედაპირების და სურსათის დეკონტამინაციის უნარის შესწავლა - **ბაქტერიების რაოდენობის განსაზღვრის სტანდარტული მეთოდი & გრაციას მეთოდით ფაგის გატიტვრა**

3. მეთოდის მსვლელობა

3.1 სტაფილოკოკური ბაქტერიოფაგის (92 N) სხვადასხვა ტემპერატურის მიმართ მდგრადობის შესწავლა

სტაფილოკოკური ბაქტერიოფაგის თერმო-მდგრადობის შესამოწმებლად ავირჩიეთ 50^0 C, 60^0 C ტემპერატურები და ოთახის ტემპერატურა, როგორც კონტროლი, ხოლო დაყოვნების პერიოდად ავირჩიეთ 15 წთ და 30 წთ.

ცდისთვის, საწყისი ბაქტერიოფაგის ლიზატი 92N (2,7 X 10^9) განვაზავეთ 1000-ჯერ (2,7 X 10^6) და გადავიტანეთ 1-1 მლ ცდისთვის განკუთვნილ და კონტროლისთვის განკუთვნილ 1,5-იან ეპენდორფის სინჯარებში. საექსპერიმენტო სინჯარა განვათავსეთ გამაცხელებელ ბლოკში (როგორც 50^0 C, ისე, 60^0 C ტემერატურის პირობებში) 15 წთ-ის განმავლობაში, ხოლო, კონტროლი დავაყოვნეთ ოთახის ტემპერატურაზე. 15 წთ-ის შემდეგ ბაქტერიოფაგის ტიტრის განსაზღვრა როგორც კონტროლის, ასევეცდის სინჯარაში განხორციელდა გრაციას ორშრიანი აგარის მეთოდით (Gratia). კერძოდ, გავაკეთეთ ბაქტერიოფაგის 100 ჯერადი განზავებები 0,1 მლ ბაქტერიოფაგის ლიზატის გადატანით წინასწარ გამზადებულ 9,9 მლ ფიზიოლოგიური ხსნარის შემცველ სინჯარებში აგრეთვე, ცდის ეპენდორფიდან 0,2 მლ ბაქტერიოფაგი გადავიტანეთ ცალკე სინჯარაში განზავების გარეშე. საექსპერიმენტო სინჯარა დავაბრუნეთ გამაცხელებელ ბლოკში, ხოლო კონტროლი, კვლავ ოთახის ტემპერატურაზე დამატებით 15 წთ-ის განმავლობაში. მიღებული განზავებებიდან, გარდა კონტროლის 10^{-2} სინჯარისა, ცალკე სინჯარებში გამოვიტანეთ 0,1-0,1 მლ ბაქტერიოფაგი, რომელთაც დავუმატეთ ბაქტერიული სუსპენზია (*S.aureus* # 57 შტამი) 0, 1 მლ და 5მლ გამლღვალი 0,7%-იანი LB აგარი 5. იგივე დაემატა, აგრეთვე, ეპენდორფიდან აღებული ბაქტერიოფაგის განუზავებელ სინჯარასაც. მიღებული ნარევი სარეველას გამოყენებით კარგად შევურიეთ და დავასხით წინასწარ გამზადებულ 1,8% LB აგარის შემცველ პეტრის ფინჯნებზე. მსგავსი პროცედურა გავიმეორეთ 30 წთ დაყოვნების შემდეგაც. მეორე დღეს ნეგატიური კოლონიები დავითვალეთ და გავაანალიზეთ შედეგები. [14, 15]

3.2 სტაფილოკოკური ბაქტერიოფაგის (92N) მდგრადობის შემოწმება სხვადასხვა pH-ის მიმართ

სტაფილოკოკური ბაქტერიოფაგის pH-მდგრადობის შესამოწმებლად ავირჩიეთ წინასწარ გაფილტრული (0,2 მკრ ფილტრი) სხვადასხვა მჟავიანობის მქონე ხსნარი, კერძოდ, pH2, pH4, pH8 და კონტროლი pH7, ხოლო დაყოვნების დრო 15 წთ და 30 წთ.

თითოეული ხსნარიდან (pH2, pH4, pH8, pH7) 4-4 მლ გადავიტანეთ სტერილურ სინჯარებში და ყოველ მათგანს დავუმატეთ ბაქტერიოფაგის 92N (2,7 X 10^9) სუსპენზიის 1-1 მლ. სინჯარები დავაყოვნეთ 15 წთ-ის განმავლობაში და შემდეგ გავაკეთეთ 10^{-2} და 10^{-4} განზავებები - წინასწარ გამზადებულ 9,9 მლ ფიზიოლოგიური ხსნარის შემცველ სინჯარებში 0,1 მლ ფაგის გადატანით შესაბამისი სინჯარებიდან. ამის შემდეგ, ახალ, სტერილურ სინჯარებში გადავიტანეთ თითოეულ pH-ზე დაყოვნებული ფაგი 10^{-2} და 10^{-4} განზავებებიდან შესაბამისად 0,2 მლ და 1 მლ, განსხვავებით pH 7-ზე დაყოვნებული ფაგისა, რომელიც გამოვიტანეთ მხოლოდ 10^{-4} განზავებიდან 0,2 მლ. აღნიშნულ სინჯარებს დავუმატეთ წინა დღეს მომზადებული ბაქტერიული კულტურის შემცველი ბულიონიდან 0,1-0,1 მლ და ბოლოს 0,7%-იანი LB აგარი 5 მლ. მიღებული ნარევი სარეველას გამოყენებით კარგად შევურიეთ და დავასხით წინასწარ გამზადებულ 1,8% LB აგარის შემცველ პეტრის ფინჯნებზე. მსგავსი პროცედურა გავიმეორეთ 30 წთ დაყოვნების შემდეგაც. [14, 15]

3.3 სტაფილოკოკური ბაქტერიოფაგის (92N) მიერ ზედაპირების დეკონტამინაციის უნარის შესწავლა

ცდის განხორციელებამდე წინასწარ გავფილტრეთ 3-4 მლ ბაქტერიოფაგი 92N (2,7 X 10^9) 0,4 მკრ ფილტრის გამოყენებით. წინა დღეს მოვამზადეთ სტაფილოკოკის (St. 57 შტამი) კულტურა დაცერებულ 1,8%-იან LB აგარზე. ზედაპირების მოდელად გამოვიყენეთ სასაგნე მინები. ცდის დაწყებამდე ისინი 5-10 წთ დავაყოვნეთ რძეში, რადგან საწარმოო პირობების მოდელირება მოგვეხდინა. ამის შემდეგ, სასაგნე მინები დავყავით შემდეგ საექსპერიმენტო ჯგუფებად:

1. 0 წთ -	0,1 მლ ბაქტერია + 0,1 მლ ფაგი	0,1 მლ ბაქტერია + 0,1 მლ ბულიონი	0,1 მლ ფაგი
2. 30 წთ -	0,1 მლ ბაქტერია + 0,1 მლ ფაგი	0,1 მლ ბაქტერია + 0,1 მლ ბულიონი	0,1 მლ ფაგი
3. 1 სთ -	0,1 მლ ბაქტერია + 0,1 მლ ფაგი	0,1 მლ ბაქტერია + 0,1 მლ ბულიონი	0,1 მლ ფაგი
4. 2 სთ -	0,1 მლ ბაქტერია + 0,1 მლ ფაგი	0,1 მლ ბაქტერია + 0,1 მლ ბულიონი	0,1 მლ ფაგი
5. 24 სთ -	0,1 მლ ბაქტერია + 0,1 მლ ფაგი	0,1 მლ ბაქტერია + 0,1 მლ ბულიონი	0,1 მლ ფაგი

აღნიშნული დროების მიხედვით თითოეული სასაგნე მინა მოვათავსეთ 10 მლ ფიზიოლოგიური ხსნარის შემცველ ცენტრიფუგის სინჯარებში და სარეველას გამოყენებით ჩამოვრეცხეთ 1-2 წთ-ის განმავლობაში. ამის შემდეგ ბაქტერია+ფაგი და ბაქტერია+ბულიონის სინჯარებიდან ამოვიღეთ 0,1 და 1 მლ, დავასხით წინასწარ გამზადებულ პეტრის ფინჯნებზე და გადავანაწილეთ შპადელით. ფაგის შემცველი სინჯარიდან გავაკეთეთ 10^{-2}, 10^{-4} და 10^{-6} განზავებები, რის შემდეგაც, გრაციას ორშრიანი აგარის მეთოდით მოვახდინეთფაგის გატიტვრა, კერძოდ, 10^{-6} სინჯარიდან გამოვიტანეთ ცალკე სტერილურ სინჯარებში 0,1 მლ და 1 მლ, დავუმატეთ 0,1 მლ ბაქტერიის ბულიონიანი კულტურა, 0,7% LB აგარი და დავასხით პეტრის ფინჯნებზე. [14,15]

3.4 ერთჯერადი გამრავლების ციკლი

ბაქტერიოფაგების გამრავლების ერთჯერადი ციკლი შესწავლილ იქნა ელისისა და დელბრუკის მეთოდით. ამ მეთოდის საშუალებით შეისწავლება მნიშვნელოვანი მახასიათებლები, კერძოდ, ფაგის უჯრედშიდა გამრავლების სტადიები, ლატენტური პერიოდი და ფაგის საშუალო გამოსავალი.

ბაქტერიოფაგების გამრავლების ერთჯერადი ციკლის შესწავლისათვის ჩატარდა 3 ცდა. კვლევის პროცესში საკვებ ნიადაგად გამოყენებულ იქნა LB 1,8%-იანი, 0,7%-იანი LB აგარი და LB ბულიონი. [14,15,16,17]

3.4.1 ფაგის ადსორბცია, ლატენტური პერიოდი და გამოსავლიანობა

ფაგის ლიზატი (N92) $1*10^7$ pfu/ml (ნ.კ/მლ) და ბაქტერიული სუსპენზია (St.57) $1*10^8$ კწე/მლ შეფარდებით 1:10, მოვათავსეთ 37^0C-ზე თერმოსტატში და სინჯები ავიღეთ დროის გარკვეულ ინტერვალში (0', 5', 10', 15', 20', 25', 30', 35', 40', 60', 90', 120',140', 160' წთ): 0,1მლ სინჯი შევიტანეთ 9,9მლ ფიზიოლოგიურ ხსნარში (10^{-2}), დავუმატეთ 0,4მლ ქლოროფორმი და 10 წუთის განმავლობაში დავაყოვნეთ ყინულში. შემდეგ გავაკეთეთ განზავებები (10^{-4}, 10^{-6}), საიდანაც, შესაბამისად, 0,1 მლ და 1 მლ გადავიტანეთ ფინჯანზე გრაციას ორშრიანი აგარის მეთოდით. მეორე დღეს დავითვალეთ და გავაანალიზეთ მიღებული შედეგები. [14,15,16,17]

3.5 სტაფილოკოკური ბაქტერიოფაგის (92N) მიერ რძის დეკონტამინაციის უნარის შესწავლა

ცდის განხორციელებამდე წინასწარ გავფილტრეთ 3-4 მლ ბაქტერიოფაგი 92N (2,7 X 10^9) 0,4 მკმ ფოროვნების ფილტრის გამოყენებით. წინა დღეს მოვამზადეთ სტაფილოკოკის (St. 57 შტამი) კულტურა დაცერებულ 1,8%-იან LB აგარზე, რომელიც 4,5 მლ LB ბულიონში განვაზავეთ ათჯერადად (10^{-2}). ცდისთვის ავიღეთ სამი სუფთა ცენტრიფუგის სინჯარა, რომელთაგან ორში მოვათავსეთ 4-4 მლ რძე (0%-იანი), ხოლო, ბაქტერია/ბულიონი 0,5/0,5 მლ და ბაქტერია/ფაგი 0,5/0,5 მლ შესაბამისად სხვადასხვა სინჯარებში განვათავსეთ. მესამე სინჯარაში, კი მოვათავსეთ 4,5 მლ რძე და 0,5 მლ ფაგი. ცდისთვის გამოვიყენეთ სხვადასხვა დაყოვნების პერიოდი, კერძოდ, 0 წთ, 30 წთ, 60 წთ, 120 წთ და 24 სთ, რის შემდეგაც გავაკეთეთ (10^{-2}), (10^{-4}), (10^{-6}) განზავებები -9,9 მლ ფიზიოლოგიური ხსნარის შემცველ სინჯარებში 0,1 მლ საკვლევი ობიექტის გადატანით.

ამის შემდეგ, ბაქტერიის შემცველი რძიანი სინჯარიდან პეტრის ფინჯანზე შპადელით გადავანაწილეთ შემდეგი განზავებები:

- 0, 30, 60 წთ-ზე - (10^{-4}) განზავებიდან 0,1 და 1 მლ;
- 120 წთ-ზე – (10^{-4}) განზავებიდან 0,1 მლ და (10^{-6}) განზავებიდან 1 მლ;
- 24 სთ-ზე – (10^{-4}) განზავებიდან 0,1 მლ, (10^{-6}) განზავებიდან 1 მლ და (10^{-8}) განზავებიდან 1 მლ;

ბაქტერია+ფაგის შემცველი რძიანი სინჯარიდან პეტრის ფინჯანზე შპადელით გადავანაწილეთ შემდეგი განზავებები:

- 0, 30 წთ-ზე - (10^{-2}) განზავებიდან 0,1 მლ და (10^{-4}) განზავებიდან 1 მლ;
- 60 წთ-ზე - საწყისი სინჯარიდან 0,1 მლ და (10^{-2}) განზავებიდან 1 მლ;
- 120 წთ-ზე - საწყისი სინჯარიდან 0,2 მლ და (10^{-2}) განზავებიდან 1 მლ;
- 24 სთ-ზე - საწყისი სინჯარიდან 1 მლ და (10^{-2}) განზავებიდან 1 მლ;

იმავე, ბაქტერია+ფაგის შემცველი რძის სინჯარიდან, დროის ყოველ ინტერვალში, გამოვტიტრეთ ფაგი, გრაციას ორშრიანი აგარის მეთოდით - 10^{-6} განზავებიდან 0,1 და 1 მლ-ის გადატანით სუფთა სინჯარაში, რომელსაც ვუმატებდით 0,1 მლ ბაქტერიის სუსპენზიას და

0,7%-იან LB აგარს, რის შემდეგაც ვანაწილებდით 1,8%-იან აგარის შემცველ პეტრის ფინჯნებზე.

მხოლოდ ბაქტერიოფაგის შემცველი რძიანი სინჯარიდან განვახორციელეთ ფაგის გამოტიტვრა გრაციას ორშრიანი აგარის მეთოდით - 10^{-6} განზავებიდან 0,1 და 1 მლ-ის გადატანით სუფთა სინჯარაში, რომელსაც ვუმატებდით 0,1 მლ ბაქტერიის სუსპენზია და 0,7%-იან აგარს, რის შემდეგაც ვანაწილებდით 1,8%-იან LB აგარის შემცველ პეტრის ფინჯნებზე. [14,15]

3.6 92N ბაქტერიოფაგის მოქმედების სპექტრის შესწავლა

ფაგის მოქმედების/არსებობის შესასწავლად ვიყენებდით ე.წ ,,Spot Test“-ს, რომლის დროსაც, მიკრობული შტამის 18 სთ-იანი ბულიონიანი კულტურა ნახევრად თხიერ აგართან ერთად გადაგვქონდა 1,8%-იან LB აგარიან პეტრის ფინჯანზე და ვაწვეთებდით საკვლევ ფილტრატებს 5-10 მკლ ოდენობით. შემდეგ ფინჯანს ვათავსებდით თერმოსტატში. 24 საათის შემდეგ, ფაგის არსებობის შემთხვევაში, პეტრის ფინჯანზე შეინიშნებოდა ლიზისური უბნები, რომლის რადიუსის მიხედვითაც შეიძლებოდა ფაგის აქტივობის ხარისხის განსაზღვრა. [17,18]

3.7 ბაქტერიოფაგის ტიტრის განსაზღვრა გრაციას მეთოდით

ფაგის ტიტრის დასადგენად ვიყენებდით გრაციას მეთოდს, რომლის საშუალებითაც განისაზღვრება ფაგური ნაწილაკების რაოდენობა 1 მლ-ში. თავდაპირველად ვახდენდით საკვლევი ფაგის ლიზატის 10-ჯერად განზავებებს, რის შემდეგაც სათანადო ნაზავიდან 1 მლ გადაგვქონდა სტერილურ სინჯარაში, ვამატებდით 0,1 მლ მილიარდიან კულტურას (წინა დღის კულტურას) და 5 მლ ნახევრად თხიერ LB აგარს (0,7%). სინჯარის სწრაფი შენჯღრევის შემდეგ, ნარევი გადაგვქონდა 1,8% LB აგარიან პეტრის ფინჯანზე. 30წთ-ის შემდეგ ფინჯნები თავსდებოდა თერმოსტატში. შედეგების დათვლას ვახორციელებდით მეორე დღეს. ფაგის ტიტრი განისაზღვრება ფაგის ნეგატიური კოლონიების რაოდენობით. [14,15]

III კვლევის შედეგები და მათი განხილვა

მოქმედების სპექტრის შესწავლა

როგორც ზემოთ აღვნიშნეთ, დეკონტამინაციისთვის გამოსაყენებელი ბაქტერიოფაგისთვის ფართო მოქმედების სპექტრის ქონა წარმოადგენს ერთ-ერთ გადამწყვეტ პირობას. სწორედ ამიტომ, გამოვიკვლიეთ ახალი სტაფილოკოკური ფაგის მოქმედების სპექტრი გ. ელიავას სახელობის ბაქტერიოფაგის, მიკრობიოლოგიისა და ვირუსოლოგიისა ინსტიტუტში არსებულ როგორც გარემოდან გამოყოფილ, აგრეთვე, კლინიკურ 37 სტაფილოკოკის შტამზე. ჩვენს მიერ ,,Spot test''-ის შედეგების გაანალიზებით დადგინდა, რომ ახალი სტაფილოკოკური ბაქტერიოფაგი 92N ლაბორატორიაში არსებულ ყველა სტაფილოკოკურ შტამზე მოქმედებს, თუმცა სხვადასხვა ხარისხით.

მისი მოქმედების შედეგად გამოვლინდა:

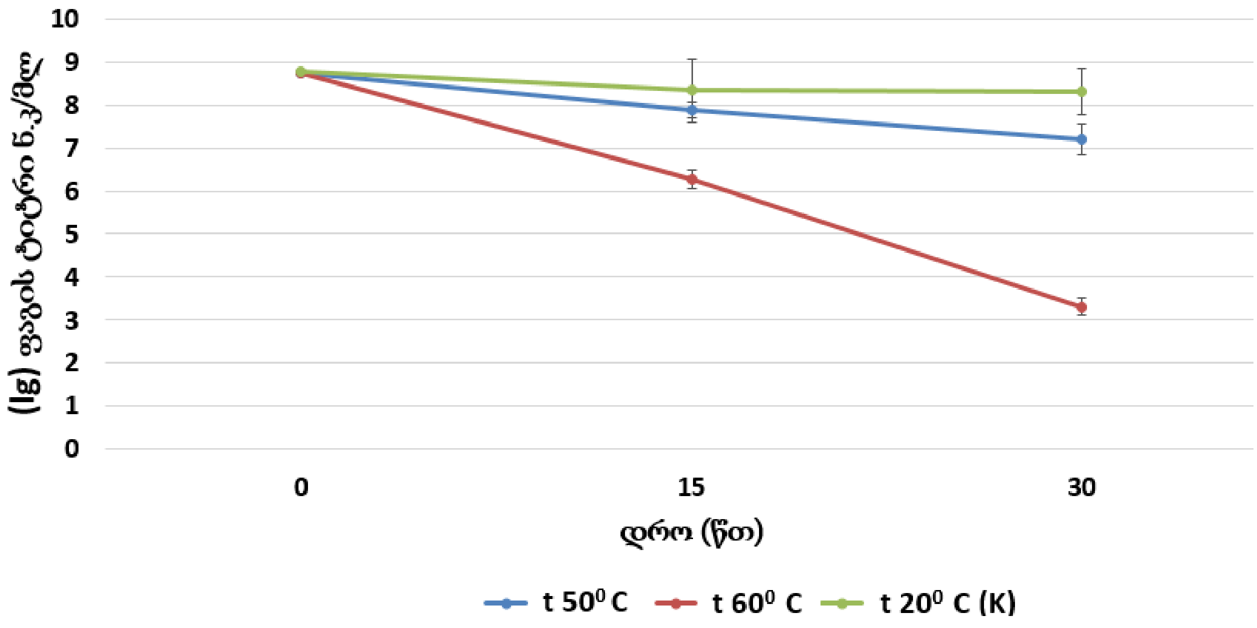
- სრული ლიზისი (Cl) - 26 შტამის
- არასრული ლიზისი (Scl) – 4 შტამის
- სუსტი ლიზისი (+) – 3 შტამის
- გადაფარვა (Ol) - 4 შტამის

აღნიშნული შედეგები ნათლად მიუთითებს ფაგის ვირულენტურობას, რაც ასევე მნიშვნელოვან მოთხოვნას წარმოადგენს სურსათისა თუ ზედაპირების დეკონტამინაციისთვის გამოსაყენებელი ბაქტერიოფაგების მიმართ.

სხვადასხვა ტემპერატურაზე ფაგის მდგრადობის შესწავლა

აღნიშნულ ექსპერიმენტში შევისწავლეთ ფაგის მდგრადობა სხვადასხვა ტემპერატურის მიმართ, ვინაიდან მაღალ ტემპერატურაზე მდგრადობა ფაგის მნიშვნელოვან მახასიათებელს წარმოადგენს.

ჩვენს მიერ მიღებულმა შედეგებმა აჩვენა, რომ ფაგი გამოირჩევა მაღალი ტემპერატურის, კერძოდ, 50⁰C-ის მიმართ მდგრადობით, რაც მიუთითებს აღნიშნულ ტემპერატურაზე ფაგის გამოყენების შესაძლებლობაზეც.



გრაფიკი1: ფაგის ტემპერატურაზე მდგრადობის შესწავლა

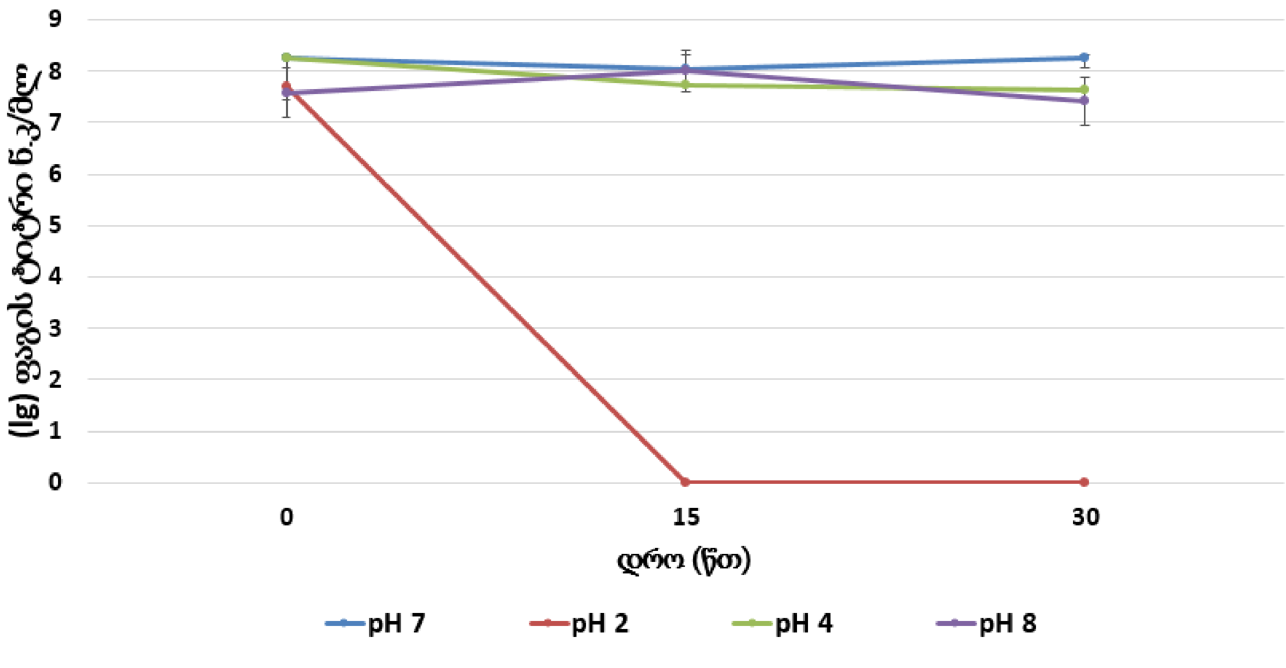
გრაფიკის მიხედვით ჩანს (გრაფიკი 1), რომ 0 წთ-ზე სამივე ტემპერატურის შემთხვევაში ფაგების ტიტრი მსგავსია. 15 წთ-ზე აშკარა კლებას განიცდის 60⁰ C-ზე არსებული ფაგი და მისი ტიტრი 1000-ჯერ მცირდება. რაც შეეხება დანარჩენ ორ ტემპერატურაზე დაყოვნებულ ფაგებს, მათი ტიტრი იმავე ხარისხში დარჩა და თითქმის ერთნაირია, მხოლოდ

უმნიშვნელოდ შეიმჩნევა 50⁰ C-ზე არსებული ფაგის რაოდენობის კლება კონტროლთან შედარებით. 30 წთ-ზე მკვეთრი კლება კვლავ განაგრძო 60⁰ C-ზე განთავსებულმა ფაგმა და კვლავ 1000-ჯერ შემცირდა მისი ტიტრი. 50⁰ C-ზე არსებული ბაქტერიოფაგი მცირედით ჩამორჩა კონტროლს და საერთო ჯამში მისი საწყისი რაოდენობა დაახლოებით 10-ჯერ შემცირდა.

შედეგებმა აჩვენა, რომ საკვლევი სტაფილოკოკური ბაქტერიოფაგი მგრძნობიარე აღმოჩნდა 60⁰ C ის მიმართ..

სხვადასხვა pH-ზე ფაგის მდგრადობის შესწავლა

სასურსათო პროდუქტებს გააჩნია სხვადასხვა pH, რომელიც შესაძლოა აღმოჩნდეს ბაქტერიოფაგის მოქმედების დამთრგუნველი. სწორედ ამიტომ, აუცილებელი იყო შეგვესწავლა ახალი სტაფილოკოკური ფაგის მდგრადობა სხვადასხვა pH-ის მიმართ. ვინაიდან, სურსათი ძირითადად 4-8 pH-ის ფარგლებშია, ჩვენი ექსპერიმენტის ფარგლებშიც აღნიშნულ pH-ზე შევისწავლეთ ფაგის მდგრადობა და დამატებით შევარჩიეთ pH 2, რათა თერაპიული დანიშნულებით ფაგის გამოყენების შესაძლებლობაც დაგვედგინა.



გრაფიკი 2: სხვადასხვა pH-ზე ფაგის მდგრადობის შესწავლა

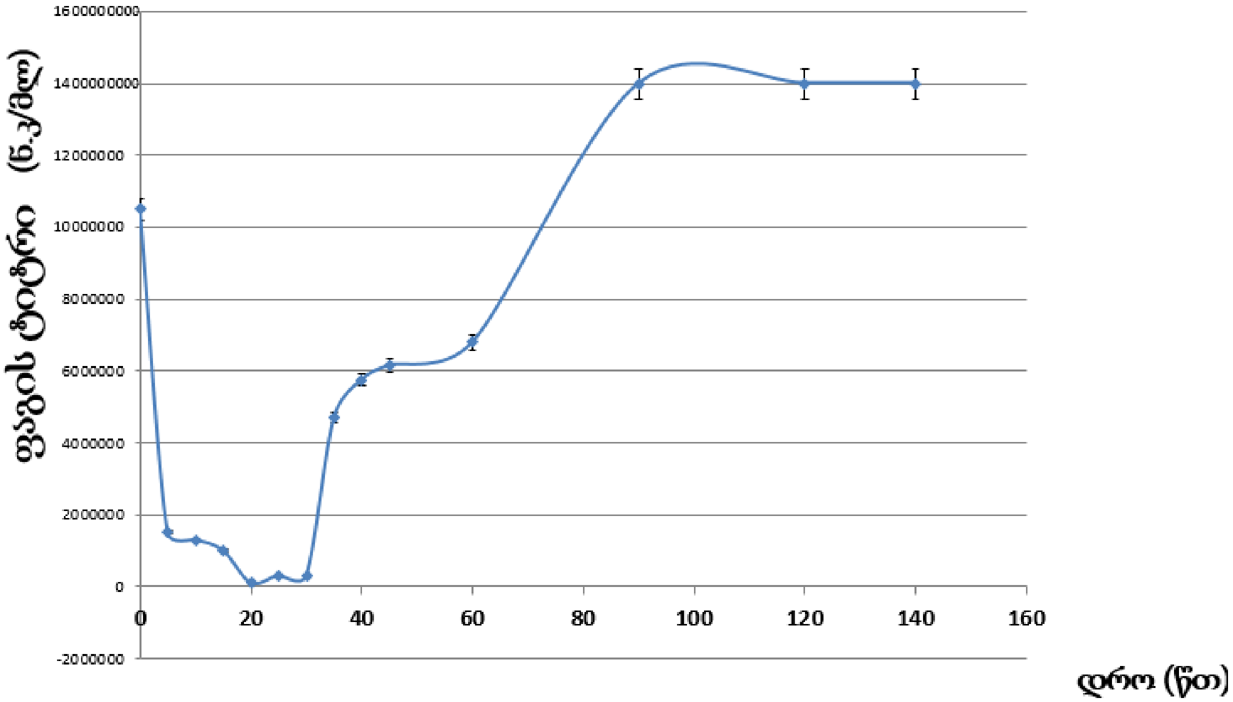
გრაფიკის მიხედვით (გრაფიკი 2), რომ ვიმსჯელოთ, pH 7-ზე, pH 8-ზე და pH 4-ზე დაყოვნებული ფაგის ტიტრი საწყის რაოდენობასთან შედარებით, ფაქტობრივად, არ შეცვლილა და ერთმანეთის მსგავსია.

რაც შეეხება, pH 2-ზე დაყოვნებულ ბაქტერიოფაგს, მისი ტიტრი მკვეთრად დაეცა და მიუხედავად იმისა, რომ ფაგის გატიტვრა განვახორციელეთ საწყისი, განუზავებელი ეპენდორფის სინჯარიდან, პეტრის ჯამზე ნეგატიური კოლონია ვერ იქნა გამოვლენილი.

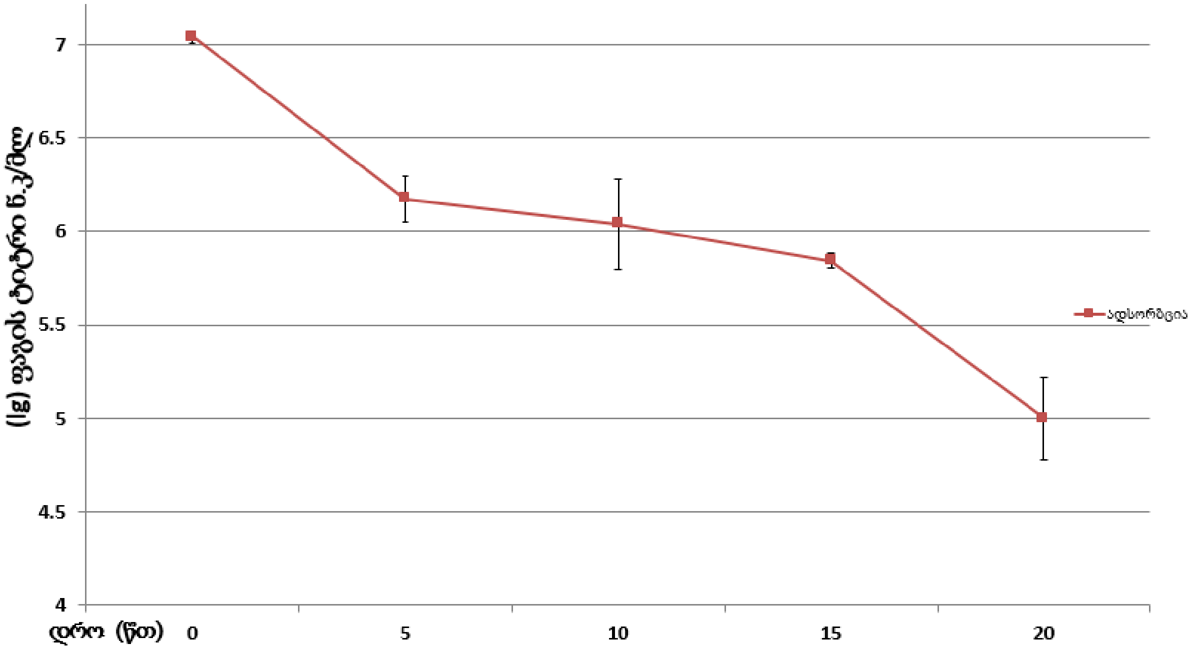
მიღებული შედეგები მიუთითებს იმაზე, რომ ახალი სტაფილოკოკური ბაქტერიოფაგისთვის კრიტიკული აღმოჩნდა pH 2.

ფაგის ადსორბციის, ლატენტური პერიოდისა და საშუალო გამოსავლის დადგენა

ბაქტერიოფაგების ლითიური ბუნების შესახებ ინფორმაციას იძლევა მათი ერთჯერადი გამრავლების ციკლის შესწავლა, რაც განვახორციელეთ ელისისა და დელბრუკის მეთოდით. ცდის მიხედვით დავადგინეთ ფაგის უჯრედშიდა გამრავლების ციკლის მახასიათებლები- განვსაზღვრეთ ფაგის მაქსიმალური ადსორბცია, ლატენტური პერიოდი, ანუ დრო ფაგის ადსორბციიდან მის გამოთავისუფლებამდე, აგრეთვე, გამოვთვალეთ ფაგის საშუალო გამოსავალი, რაც წარმოადგენს ერთი დაინფიცირებული მასპინძელი უჯრედიდან გამოთავისუფლებული ფაგების რაოდენობას და ითვლება შემდეგი ფორმული მიხედვით: ფაგის მაქსიმალური რაოდენობის საშუალო/ადსორბირებული ფაგის საშუალო რაოდენობაზე.



გრაფიკი 3: ერთჯერადი გამრავლების ციკლი



გრაფიკი 4: ადსორბციის ფაზა

ერთჯერადი გამრავლების ციკლის შესწავლით (იხ. *გრაფიკები 3, 4*) დადგინდა, რომ ახალი სტაფილოკოკური ბაქტერიოფაგი მაქსიმალურ ადსორბციას ავლენს 20 წთ-ზე და ადსორბირდება ფაგების 99%. უჯრედშიდა გამრავლების პერიოდი გრძელდება დაახლოებით 15 წუთი და ახალფორმირებული ფაგების გამოთავისუფლებას ადგილი აქვს 35 წთ-დან. გარკვეული პერიოდის შემდეგ ფაგის ტიტრი გადის პლატოზე, რაც გამრავლების პირველი ციკლის დასასრულზე მიგვანიშნებს. ფაგის საშუალო გამოსავალი ერთი დაინფიცირებული მასპინძელი უჯრედიდან წარმოადგენს 93 ფაგურ ნაწილაკს.

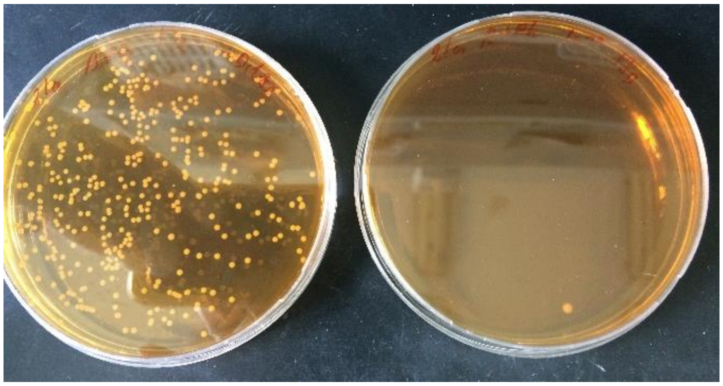
შეიძლება ითქვას, რომ ზემოთაღნიშნული მახასიათებლები კერძოდ, ფაგის მაღალი ადსორბციის ხარისხი, მოკლე ლატენტური პერიოდი და მაღალი გამოსავალი, მიუთითებს ახალი სტაფილოკოკური ბაქტერიოფაგის ლითიურ ბუნებაზე..

სურსათის დეკონტამინაციის უნარის შესწავლა

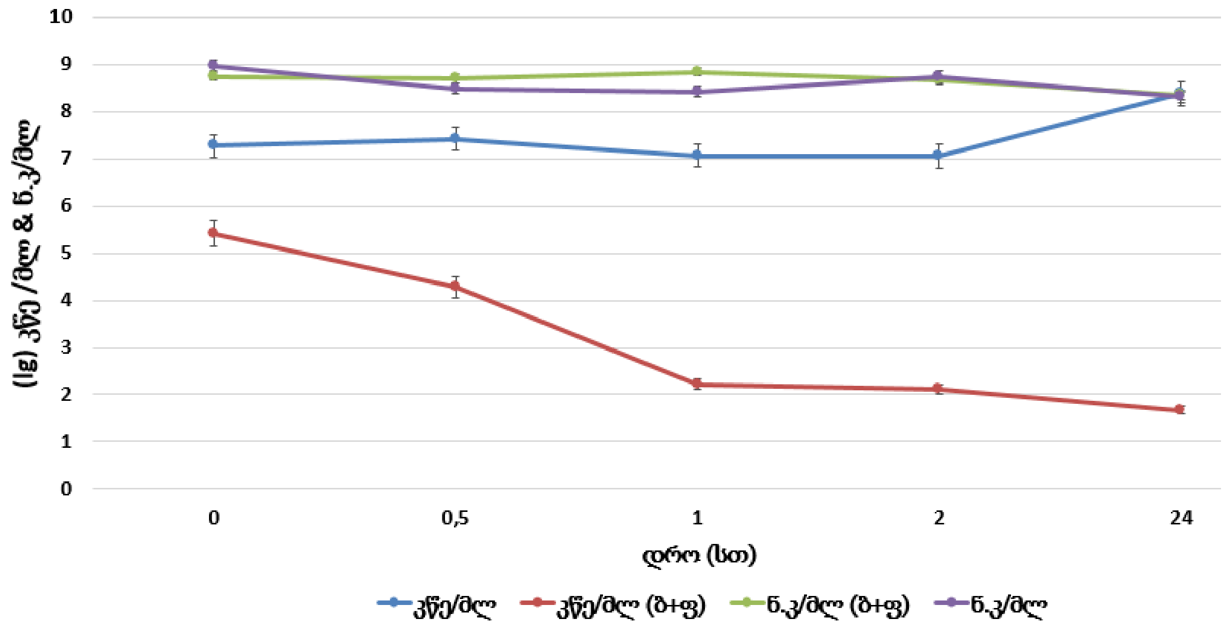
სურსათის დეკონტამინაციის ექსპერიმენტებისთვის რძის შერჩევა მოხდა იმ მიზეზებიდან გამომდინარე, რომ იგი მალფუჭებად პროდუქტს წარმოადგენს (ე.ი. ხელსაყრელი გარემოა მიკროორგანიზმების გამრავლებისთვის) და მისი დაბინძურება ოქროსფერი სტაფილოკოკით სურსათის გადამუშავების სხვადახვა ეტაპზე შეიძლება მოხდეს.

ექსპერიმენეტბის საწყის ეტაპზე განხორციელდა რძის შემოწმება დამაბინძურებელი ბაქტერიების შემცველობაზე, მისი მყარ საკვებ არეზე გათესვით. ცდის შედეგად დაბინძურება არ გამოვლენილა. რძის დეკონტამინაციის ექსპერიმენტში ბაქტერია:ფაგის შეფარდება შეადგენდა 1:100. როგორც ლიტერატურულ მიმოხილვაში აღვნიშნეთ, ოქროსფერი სტაფილოკოკის ინფექციური დოზა წარმოადგენს 100 000 უჯრედს 1 მლ-ში. ჩვენი ცდისთვის გამოვიყენეთ ინფექციურ დოზაზე 100-ჯერ მეტი რაოდენობის ოქროსფერი სტაფილოკოკი, რათა დაგვედგინა ფაგის მიერ, მაღალი რაოდენობით სტაფილოკოკური დაბინძურების შემთხვევაში, პროდუქტის გაუვნებელყოფის შესაძლებლობა.

აღნიშნულ ექსპერიმენტში შესაძლებლობა გვქონდა, აგრეთვე, შეგვესწავლა ფაგის ტიტრზე რძის ფიზიკო-ქიმიური მახასიათებლების გავლენა, ასევე აღნიშნულ პროდუქტში სტაფილოკოკის რაოდენობის დინამიკა ფაგის დამატების გარეშე.



სურათი 3: რძეში ბაქტერიების რაოდენობის კლება ფაგის 2 სთ-იანი მოქმედების შემდეგ



გრაფიკი 5: ფაგის დეკონტამინაციის უნარის შესწავლა რძეში

ზემოთ მოცემული გრაფიკის (იხ. გრაფიკი 5) მიხედვით ადვილად შესამჩნევია, რომ ფაგის ტიტრი რძეში 24-სთ-ის განმავლობაში არ იკლებს. რაც შეეხება სტაფილოკოკის რაოდენობას რძეში, მისი რიცხოვნობა 2 სთ-ის განმავლობაში უცვლელია, ხოლო 24 სთ-ის შემდეგ იმატებს დაახლოებით 10-ჯერ, რაც აღნიშნულ პროდუქტში სტაფილოკოკის გამრავლებისთვის ხელსაყრელი პირობების არსებობაზე მიუთითებს. ბაქტერია+ფაგი სინჯარაში ბაქტერიების რაოდენობა მკვეთრად იკლებს, და უკვე 0 წთ-ზე 100-ჯერ, ხოლო 30 წთ-ზე 1000-ჯერ მცირდება; უფრო მნიშვნელოვანია ბაქტერიების რიცხვის შემცირება 2 სთ-ის და 24 სთ-ის შემდეგ და შესაბამისად 100 000-ჯერ და დაახლოებით მილიონჯერ მცირდება.

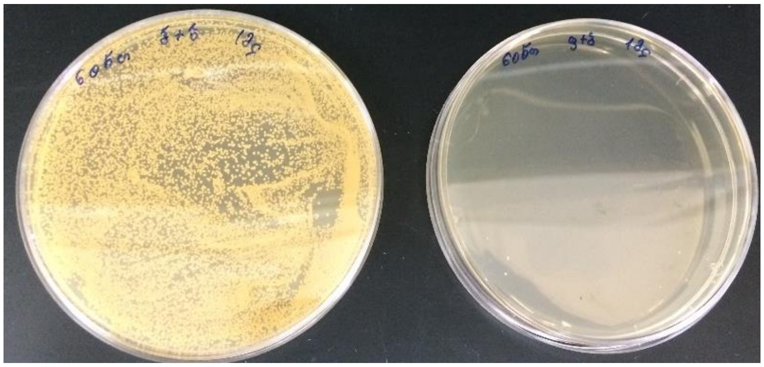
ცდიდან მიღებული შედეგები, რომ შევაჯამოთ, ახალი სტაფილოკოკური ბაქტერიოფაგი არ კარგავს აქტივობას რძეში 24სთ-ის განმავლობაში. ამასთან, ის ავლენს აშკარა დეკონტამინაციის უნარს. კერძოდ, ფაგის მოქმედების შედეგად ოქროსფერი სტაფილოკოკის რაოდენობამ დაიკლო ინფექციურ დოზასთან შედარებით 1000-ჯერ, რაც მისი წარმატებით გამოყენების იმედს იძლევა ერთდროულად, როგორც კონსერვანტად ისე ბიომაკონტროლებელ აგენტად.

ზედაპირების დეკონტამინაციის უნარის შესწავლა

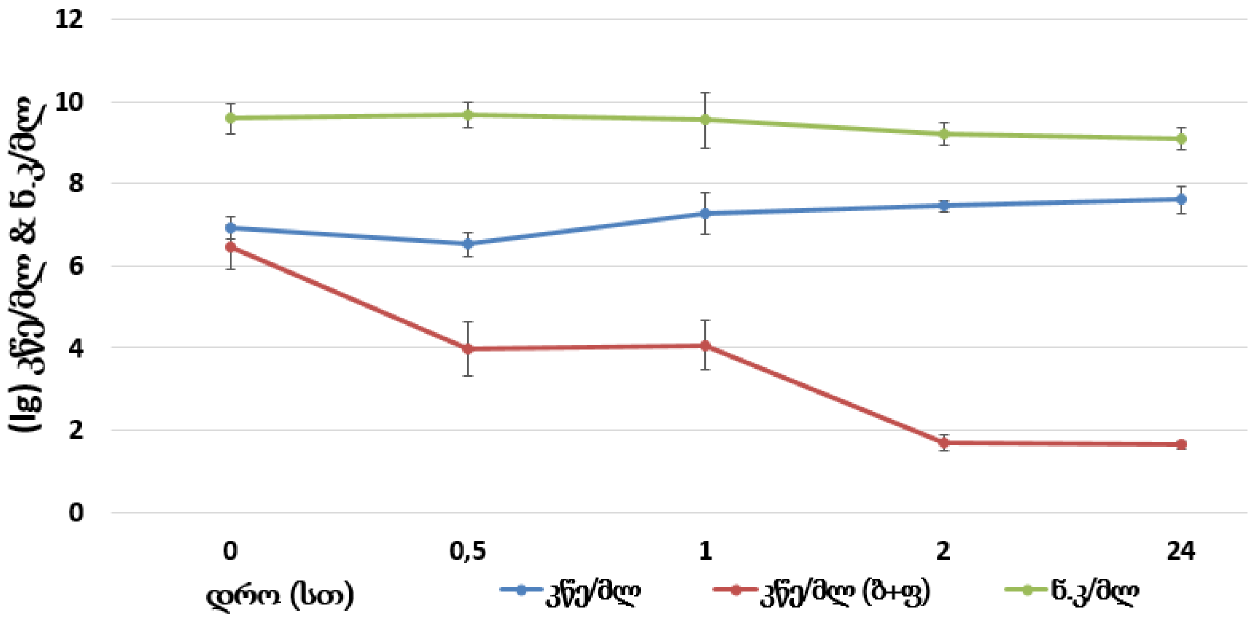
ხშირია შემთხვევები, როდესაც სურსათი პათოგენური მიკროორგანიზმებით, მათ შორის ოქროსფერი სტაფილოკოკით, ბინძურდება სურსათთან შეხებაში მყოფი ზედაპირებიდან. ამასთან, სარეცხი-სადეზინფექციო საშუალებები, რომლებიც სათანადო ჰიგიენური გარემოს მისაღწევად გამოიყენება საწარმოებში, შესაძლებელია თვითონ აღმოჩნდეს ქიმიური საფრთხის წყარო. სწორედ ამის გამო, მნიშვნელოვანი იყო შეგვესწავლა ახალი სტაფილოკოკური ბაქტერიოფაგის მიერ ზედაპირების, ჩვენს შემთხვევაში მინის ზედაპირების, დეკონტამინაციის უნარი.

აღნიშნულ ექსპერიმენტში ბაქტერია:ფაგის შეფარდება შეადგენდა 1:1000, ვინაიდან გავითვალისწინეთ მშრალი ზედაპირების მიერ გამოწვეული შესაძლო შეფერხება ფაგების მოქმედების მიმართ. ამ შემთხვევაში ოქროსფერი სტაფილოკოკი მინის ზედაპირზე

დავიტანეთ 10^6 კწე/მლ რაოდენობით, ხოლო ფაგის ლიზატი დავამატეთ 10^9-ნკწე/მლ კონცენტრაციით.



სურსათი 5: ფაგის 1 სთ-იანი მოქმედების შედეგად მინის კუპონებზე არსებული სტაფილოკოკების რაოდენობის შემცირება



გრაფიკი 6: ფაგის მიერ ზედაპირების დეკონტამინაციის უნარის შესწავლა

მსგავსად წინა გრაფიკისა, აღნიშნულ შემთხვევაშიც ფაგი ინარჩუნებს ტიტრს მშრალ ზედაპირებზე 24 სთ-ის განმავლობაში. ამ შემთხვევაშიც ოქროსფერი სტაფილოკოკის რაოდენობის მატება შეიმჩნევა დაახლოებით 100-ჯერ, რაც შესაძლებელია გამოეწვია ჩვენს

მიერ დამატებულ ბულიონს. რაც შეეხება ბაქტერია+ფაგი მინის კუპონიდან ბაქტერიების რაოდენობას, აქაც უდავოა ფაგის მოქმედებით გამოწვეული კლება, კერძოდ, 30 წთ-ის და 1 სთ-ის შემდეგ ბაქტერიის რაოდენობამ დაიკლო 100-ჯერ; 2 სთ-ში - 10 000-ჯერ, ხოლო 24 სთ-ში ბაქტერიების რაოდენობის დამატებით კლებას ადგილი არ ჰქონია, რაც შესაძლოა გამოწვეული ყოფილიყო გამოშრობით და ფაგის მოქმედების უნარის დაკარგვით.

როგორც ვხედავთ, ახალმა ბაქტერიოფაგმა ზედაპირების შემთხვევაშიც წარმატებით იმოქმედა, გაუძლო გამოშრობას და ინფექციური დოზა შეამცირა დაახლოებით 1000-ჯერ.

ექსპერიმენტებიდან მიღებული შედეგები, რომ შევაჯამოთ:

- ✓ N92 ფაგი მდგრადობას ინარჩუნებს 50^0 C-ზე
- ✓ 60^0 C-ზე მნიშვნელოვნად ითრგუნება ფაგის მოქმედება
- ✓ pH 4 და 8-ზე ფაგი მდგრადია
- ✓ pH 2 აღმოჩნდა ფაგის მოქმედებისთვის კრიტიკული ზღვარი
- ✓ ფაგს გააჩნია ფართო მოქმედების სპექტრი
- ✓ ე.გ.ც.-დან გამომდინარე ფაგი ლითიური ბუნებისაა,
- ✓ ფაგი უძლებს გამოშრობას და ინარჩუნებს მდგრადობას მყარ ზედაპირებზე, თუმცა, რძეში უკეთ
- ✓ ფაგის მოქმედების შედეგად 24 სთ-ში რძეში ბაქტერიის რაოდენობა შემცირდა 100 000-ჯერ, ხოლო მინის ზედაპირზე 10 000-ჯერ.

დასკვნა

ჩვენს მიერ მიღებულ შედეგებზე დაყრდნობით შეგვიძლია დავასკვნათ, რომ ახალი სტაფილოკოკური ბაქტერიოფაგი 92N აკმაყოფილებს დეკონტამინაციისთვის გამოყენებული ფაგების მიმართ წაყენებულ მოთხოვნებს, კერძოდ, მას გააჩნია ლითიური ბუნება, ფართო მოქმედების სპექტრი, სხვადასხვა გარემო პირობების მიმართ მდგრადობა და აშკარა დეკონტამინაციის უნარი, როგორც მინის ზედაპირების შემთხვევაში, ისე სურსათში, კერძოდ რძეში.

გამოყენებული ლიტერატურა

1. *Bad Bug Book - Handbook of Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins.* **Mark Walderhaug.** The Bad Bug Book is published by the Center for Food Safety and Applied Nutrition (CFSAN) of the Food and Drug Administration (FDA), U.S. Department of Health and Human Services. pp. 87-92
2. *Staphylococcus aureus and Staphylococcal Food-Borne Disease:An Ongoing Challenge in Public Health.* **Jhalka Kadariya, Tara C. Smith, and Dipendra Thapaliya.** Department of Biostatistics, Environmental Health Sciences and Epidemiology, Kent State University, College of Public Health, 750 Hilltop Drive, Kent, OH 44242, USA. 2014
3. *Staphylococcus aureus Contamination during Food Preparation, Processing and Handling.* **Al-Bahry S. N., Mahmoud I. Y., Al-Musharafi S. K., and Sivakumar N.** 2014
4. *Bacteriophages : biology and applications.* **Elizabeth Kutter, Alexander Sulakvelidze.***p. cm.* Boca Raton London New York Washington, D.C. pp. 19-40, 42-75, 80-94, 350-372.
5. *Phage approved in food, why not as a therapeutic?* **Wessam A Sarhan, Azzazy HM.** *2014*
6. *Bacteriophages in food safety.* ***A. Chibeu.*** Guelph Food Research Centre-Agriculture and Agri-Food Canada, 93 Stone Road West, Guelph Ontario, N1G 5C9, Canada. Department of Food Science, University of Guelph, 43 McGilvray Street, Guelph, Ontario, Canada, N1G W1. 2013
7. *Bacteriophages and Their Role in Food Safety.* **Sanna M. Sillankorva, Hugo Oliveira, and Joana Azeredo.** Institute for Biotechnology and Bioengineering (IBB), Centre for Biological Engineering, University of Minho, Campus de Gualtar, 4710-057 Braga, Portugal. 2012
8. *Pros and cons of phage therapy.* **Catherine Loc-Carrillo and Stephen T. Abedon**. Department of Orthopaedics; The University of Utah; 2Department of Veterans Affairs; Health Care System; Salt Lake City, UT USA; Department of Microbiology; The Ohio State University; Mansfield, OH USA. 2011
9. *Bacteriophages as Weapons Against Bacterial Biofilms in the Food Industry*. **Diana Gutiérrez, Lorena Rodríguez-Rubio, Beatriz Martínez, Ana Rodríguez, and Pilar García.** 2016

10. *USE OF BACTERIOPHAGES AS NOVEL FOOD ADDITIVES.* **Kathy Walker.** Michigan State University. 2006
11. *Bacteriophage for Biocontrol of Foodborne Pathogens: Calculations and Considerations.* **Steven Hagens and Martin J. Loessner.** EBI Food Safety, Nieuwe Kanaal 7P, 6709 PA Wageningen, The Netherlands; Institute of Food Nutrition and Health, ETH Zurich, Schmelzbergstrasse 7, CH-8092 Zurich, Switzerland. 2010
12. *Bacteriophage performance against Staphylococcus aureus in milk is improved by high hydrostatic pressure treatments.* **Tabla R1, Martínez B, Rebollo JE, González J, Ramírez MR, Roa I, Rodríguez A, García P.** 2012
13. *The use and mode of action of bacteriophages in food production - Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards.* SCIENTIFIC OPINION – EFSA Journal. 2009
14. *Isolation and Characterisation of Lytic Bacteriophages of Klebsiella pneumoniae and Klebsiella oxytoca Curr. Microbiol.* **Karumidze N, Kusradze I, Rigvava S, Goderdzishvili M, Rajakumar K, Alavidze Z.** 2012.
15. *Characterization of lytic Pseudomonas aeruginosa bacteriophages via biological properties and genomic sequences Appl. Microbiol. Biotechnol. 94:1609-17.* **Karumidze N, Thomas JA, Kvatadze N, Goderdzishvili M, Hakala KW et al.** 2012.
16. *Isolation and characterisation of KP34--a novel phiKMV-like bacteriophage for Klebsiella pneumoniae Appl. Microbiol. Biotechnol.* 90:1333-45. **Drulis-Kawa Z, Mackiewicz P, Kesik-Szeloch A, Maciaszczyk-Dziubinska E, Weber-Dabrowska B et al.** 2011.
17. *Characterization of JG024, a pseudomonas aeruginosa PB1-like broad host range phage under simulated infection conditions BMC. Microbiol.* 10:301. **Garbe J, Wesche A, Bunk B, Kazmierczak M, Selezska K et al.** 2010
18. *Phage host range and efficiency of plating Methods Mol. Biol. 501:141-9.* **Kutter E.** 2009.