

УДК 57: 579.2

СЕЛЕКЦИЯ ВЫДЕЛЕННЫХ КЛОНОВ БАКТЕРИОФАГОВ, АКТИВНЫХ К *KLEBSIELLA OXYTOCA*

Г.Р. Садртдинова, аспирант кафедры МВЭиВСЭ
тел. 8(953) 98-14-799, sadrtdinova-guzlik@yandex.ru
ФГБОУ ВО Ульяновская ГСХА

Ключевые слова: селекция, бактериофаги, литическая активность, индикаторная культура, фаголизат.

В статье представлены результаты исследований, связанные с повышением литической активности (титра) фагов Ф 4 хл- УГСХА и Ф 14 хл- УГСХА, активных в отношении *Klebsiella oxytoca* №1, для их дальнейшего изучения по биологическим свойствам и применения при разработке фагового клебсиеллезного биопрепарата.

Введение. Частота возникновения заболеваний бактериальной природы у животных и человека в последние годы возросла. Одним из таких микроорганизмов является представитель семейства *Enterobacteriaceae* относящийся к роду *Klebsiella* вид *Klebsiella oxytoca*. Бактерии вида *Klebsiella oxytoca* известны как условно- патогенные представители нормальной микрофлоры желудочно-кишечного тракта и ротоглотки человека и животных, а также возбудителем заболеваний с тяжелым течением (метриты, заболевания мочеполовой системы, инфекционные поражения желчных путей, брюшной полости, среднего уха, сосцевидного отростка, параназальных синусов, мягких мозговых оболочек, сепсис, абсцессы легких, вагиниты половых органов) [7].

В апреле 2014 года специалистами ВОЗ было озвучено, что в странах ЕС от инфекций, вызванных бактериями, имеющими множественную лекарственную устойчивость, умирает более 25000 пациентов в год. На мероприятии было объявлено о кризисе антибиотикотерапии, и прозвучал призыв к ученым всего мира сконцентрировать усилия на разработках новых препаратов и методов, которые позволили бы бороться с инфекциями, возбудители которых резистентны к действию антибиотиков. Такими препаратами выступили бактериофаги [2, 3].

Цель исследования заключалась в освоении метода селекции бактериофагов, активных в отношении бактерии *Klebsiella oxytoca* для их

дальнейшего использования при разработке биопрепарата.

Материалы и методы. В исследованиях использовали бактериофаги, выделенные из объекта внешней среды и активные в отношении штамма *Klebsiella oxytoca* № 1. Селекцию и повышение литической активности выделенных бактериофагов осуществляли с помощью пассирования фага на индикаторной культуре с периодической отбивкой негативных колоний по методике предложенной Габриловичем И.М., Золотухиным С.Н., Ляшенко Е.А [4, 5].

Для работы в мясопептонном бульоне рН (7,2) готовили разведение фагов (10^{-6} - 10^{-9}). Полученные разведения высевали методом агаровых слоев, так, чтобы на питательном агаре сформировались отдельные негативные колонии. После 20-ти часового культивирования в термостате, бактериологической петлей отбивали одну негативную колонию, расположенную изолированно от других не менее чем на 5-10 мм, и помещали в пробирку с мясопептонным бульоном, туда же вносили 0,2 мл 20-ти часовой индикаторной культуры *Klebsiella oxytoca* №1. Контролем выступал посев индикаторной культуры в мясопептонный бульон без фага [6, 7].

Результаты исследований и их обсуждение. Опытные и контрольные пробирки культивировали в термостате при 37°C в течение 4 часов (с просмотром каждый час). Через 3-4 часа фиксировали просветление пробирок, где помимо индикаторной культуры присутствовал бактериофаг (таблица 1).

Таблица 1- Пассирование бактериофагов активных в отношении *Klebsiella oxytoca* №1

Бактериофаг	Время пассирования			
	1 час	2 часа	3 часа	4 часа
Ф 4 хл-УГСХА	слабое помутнение	слабое помутнение	слабое просветление	просветление
К (культуры)	слабое помутнение	слабое помутнение	просветление помутнение	помутнение
Ф 14 хл-УГСХА	слабое помутнение	слабое помутнение	слабое просветление	просветление
К (культуры)	слабое помутнение	слабое помутнение	помутнение	помутнение

Полученный фаголизат (пробирки с Ф 4 хл-УГСХА, Ф 14 хл-УГСХА) обрабатывали хлороформом (1:10) в течение 30 минут и снова исследовали методом агаровых слоев. Использование хлороформа в качестве метода очистки фаголизатов от оставшейся бактериальной культуры связано с устойчивостью фагов к этому химическому агенту. На чашках с агаром отбирали идентичную исходной негативную колонию и вновь пассировали. Проводили до четырех пассирований, после чего селекцию бактериофагов считали законченной, поскольку возможности увеличения титра фага не безграничны (обычно после 3-4 пассажей титр фага повышается по сравнению с исходным, при дальнейшем пассировании он уже не увеличивается).

Заключение. Повышение активности выделенных штаммов фага Ф 4 хл-УГСХА и Ф 14 хл-УГСХА достигли проведением пассажей на индикаторной культуре *Klebsiella oxytoca* №1 с последующим высевом на агар и отбором соответствующих колоний. Подтверждение увеличения титра фагов, а, следовательно, и их активности планируется в следующих работах, с использованием методов изучения активности фага по Аппельману и Грациа.

Библиографический список

1. Золотухин С.Н. Малоизученные энтеробактерии и их роль в патологии животных // Ульяновск. – 2004. – С. 64 – 75.
2. Маслова К.П. Бактериофаги в жизнедеятельности человека// Материалы VIII-й Международной студенческой научной конференции «Актуальные проблемы инфекционной патологии и биотехнологии».- Ульяновск: Ульяновская ГСХА им.П.А.Столыпина, 2015-Т.2-С. 344-346
3. Садртдинова Г.Р. Бактериофаги клебсиелл: их роль и значение// Материалы IV Международной научно-практической конференции молодых ученых «Молодежь и наука XXI века». - Ульяновск: Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина, 2014,Т.1 - С. 115-121.
4. Ляшенко Е.А. Селекция выделенных клонов бактериофагов, активных к *Klebsiella pneumonia* /Г.Р. Садртдинова, Д.А.Васильев// Инфекция и иммунитет.2014.-№5.-С.95.
5. Васильев Д.А. Индикация бактерий рода *Klebsiella* с помощью специфических бактериофагов, в объектах ветеринарного надзора/ Е.А. Ляшенко, С.Н. Золотухин// В сборнике: Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности Материалы Международной научно-практической конференции.-2013.-С.36-40.

6. Ляшенко Е.А. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов бактерии рода *Klebsiella*//В книге: Бактериофаги микроорганизмов значимых для животных, растений и человека, Ульяновск, 2013. -С. -61-74.
7. Барт Н.Г. Выделение, селекция и изучение некоторых биологических свойств бактериофагов *Providencia* / Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин, // Проблемы профилактики и борьбы с особо опасными, экзотическими и малоизученными инфекционными болезнями животных: Материалы Международной научно-практической конференции посвященной 50-летию ВНИИВВиМ. – Покров, 2008. – С. 91-93.

SELECTION ISOLATED CLONES BACTERIOPHAGE ACTIVE *KLEBSIELLA* *OXYTOCA*

Sadrtdinova G.R.

Key words: selection, bacteriophages, lytic activit, indicator culture, fagolizat.

The article presents results studies related to increase in political activity (titer) phages F 4 hl- UGSHA and F 14 hl- UGSHA active against *Klebsiella oxytoca* №1, for further study on biological characteristics and application in development phage klebsiella biological product.