

УДК 57: 579.2

ОЦЕНКА САНИТАРНОГО СОСТОЯНИЯ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ МЕТОДОМ ВЫДЕЛЕНИЯ ИЗ НЕЕ БАКТЕРИОФАГОВ

Г.Р. Садртдинова, ассистент,
тел. 8(953) 98-14-799, sadrtdinova-guzlik@yandex.ru,
Л.П. Пульчеровская, кандидат биологических наук, доцент,
тел. 8(8422)55-95-47, pulcherovskaya.lidia@yandex.ru,
Д.А. Васильев, доктор биологических наук, профессор,
тел. 8(8422)55-95-47, dav_ul@mail.ru,
С.Н. Золотухин, доктор биологических наук, профессор,
тел. 8(8422)55-95-47, fvm.zol@yandex.ru
ФГБОУ ВО Ульяновская ГСХА

Ключевые слова: триба, бактерии, бактериофаги, ареал распространения, фекальное загрязнение.

В статье представлены результаты исследования вирулентных фагов, активных в отношении бактерий, входящих в трибу *Klebsielleae*, для целей санитарной оценки определенных территорий. Получение фагов методом выделения из окружающей среды изучаемого ареала распространения позволило выделить четыре фага, активных в отношении представителей трибы: *K.oxytoca* ATCC 8724, *K.oxytoca* 26, *S.marcescens* ATCC 13800, *S. liquefaciens* 16, *E.cloaceae* 397, *E.aerogenes* 654.

Введение. Микроорганизмы семейства *Enterobacteriaceae* являются представителями естественной микрофлоры кишечника человека и животных, и попадают в окружающую среду вместе с продуктами их жизнедеятельности. Бактерии данного семейства обладают высокой адаптационной устойчивостью, являясь частыми контаминантами воды открытых водоемов, почвы, продуктов питания. Их обнаружение во внешней среде используют как индикатор фекального загрязнения (санитарно-показательные микроорганизмы) [1].

Представители таксономической группы *Klebsielleae* (*Klebsiella*, *Hafnia*, *Serratia*, *Enterobacter*) часто имеют один и тот же ареал распространения, и, следовательно, выделяются совместно. Необходимо учитывать, что они являются возбудителями смешанных инфекций, поэтому быстрый санитарный контроль таких мест крайне необходим. Выделение специфических фагов и разработка на их основе диагностического препарата - является одним из путей решения задачи по

предотвращению вспышек кишечных инфекций, вызванных микроорганизмами данной группы [2, 3, 4].

Цель исследования заключалась в освоении метода выделения и селекции бактериофагов, активных в отношении бактерий, входящих в группу *Klebsiellae* и являющихся возбудителями заболеваний кишечной этиологии.

Материалы и методы. Объектом исследования служили пробы песка, отобранные из различных мест активного пребывания человека (песочницы на детских площадках- 7 проб, песок с действующих пляжей- 3 пробы). Штаммы, использованные в исследованиях, были получены из музея кафедры МВЭиВСЭ Ульяновской ГСХА- *K.oxytoca* ATCC 8724, *K.oxytoca* 26, *S.marcescens* ATCC 13800, *S. liquefaciens* 16, *E.cloaceae* 397, *E.aerogenes* 654. При проведении работ применяли методы выделения бактериофагов- методы выделения фагов из объектов внешней среды, разработанные: Золотухин С.Н., Пульчеровская Л.П., Пожарникова Е.Н., Катмакова Н.П., Ляшенко Е.А., Садртдинова Г.Р.

Результаты исследований и их обсуждение. В условиях лаборатории пробу навеской в 10 г суспензировали стерильным физиологическим раствором. В колбу, содержащую стерильный мясопептонный бульон в количестве 50 мл, вносили 10 мл исследуемого материала и по 0,5 мл всех изучаемых штаммов-*K.oxytoca* ATCC 8724, *K.oxytoca* 26, *S.marcescens* ATCC 13800, *S. liquefaciens* 16, *E.cloaceae* 397, *E.aerogenes* 654. Таким образом, каждая проба испытывалась на наличие фагов ко всем имеющимся культурам бактерий: *K.oxytoca* ATCC 8724, *K.oxytoca* 26, *S.marcescens* ATCC 13800, *S. liquefaciens* 16, *E.cloaceae* 397, *E.aerogenes* 654. Данную колбу помещали в термостат и инкубировали в течение 5 суток при 37 °С [5, 6, 7].

После этого содержимое колбы разливали в стерильные пробирки, центрифугировали при 3000 об/мин (2-3 минуты). Полученные пробы исследовали методом агаровых слоев по Грациа. Чашки ставили в термостат на 18-20 часов при 37 °С. По истечению времени инкубации чашки просматривали на наличие видимых зон лизиса (рис.1).

В таблице 1 указаны пробы, исследование которых выявило наличие фагов.

Наличие негативных колоний или зон лизиса на газоне роста индикаторной культуры свидетельствовало о присутствии в исследуемом материале бактериофага. В результате проведенных исследований, было выделено 7 бактериофагов (название фагов дано по номеру пробы, ТВ-бактериофаг, активный в отношении трибы V): TV-1-2-УГСХА., TV-1-3-УГСХА, TV-1-4-УГСХА, TV-1-5-УГСХА, TV -2-3-УГСХА, TV -2-6-УГСХА, TV-

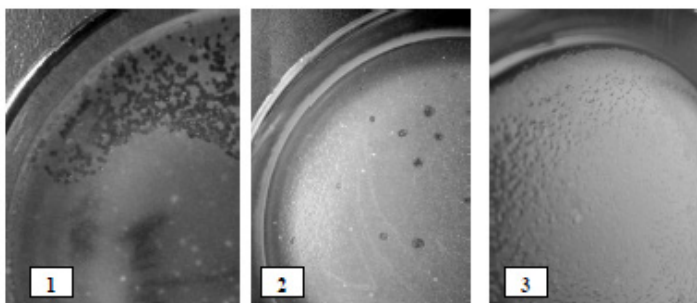


Рисунок 1 - Образование негативных колоний (проба №3):

K. oxytoca ATCC 8724, 2) *S. marcescens* ATCC 13800, 3) *E. cloacae* 397

Таблица 1- Выделение бактериофагов трибы *Klebsiellae* из объектов внешней среды

№ п/п	Исследуемый штамм	Исследуемая проба									
		№1	№2	№3	№4	№5	№6	№7	№8	№9	№10
1	<i>K. oxytoca</i> ATCC 8724	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
2	<i>K. oxytoca</i> 26	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+
3	<i>S. marcescens</i> ATCC 13800	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+
4	<i>S. liquefaciens</i> 16	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+
5	<i>E. cloacae</i> 397	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+
6	<i>E. aerogenes</i> 654	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-

Примечание:
 + наличие негативных колоний
 - отсутствие негативных колоний

3-1-УГСХА, TV-3-2-УГСХА, TV-3-3-УГСХА, TV-3-4-УГСХА, TV-3-5УГСХА, Т-3-6УГСХА, TV -5-УГСХА, TV-7-3-УГСХА, TV-7-4-УГСХА, TV-7-6-УГСХА, TV-8-2-УГСХА, TV-8-4-УГСХА, TV-8-5-УГСХА, TV -10-2-УГСХА, TV -10-3-УГСХА, TV -10-4-УГСХА, TV -10-5-УГСХА.

Таким образом, из одной и той же пробы (№1, №2, №3, №5, №7, №8, №10) были выделены фаги, активные в отношении различных видов бактерий. Определение видовой специфичности бактериофагов проводили нанесением капли на газон культуры. Для этого на поверх-

ность МПА в чашках Петри наносили 0,4 мл 18-ти часовой исследуемой культуры: *K. oxytoca* ATCC 8724, *K. oxytoca* 26, *S. marcescens* ATCC 13800, *S. liquefaciens* 16, *E. cloacae* 397, *E. aerogenes* 654. Бактериальную культуру растирали равномерно шпателем по поверхности среды для получения газона. На дне чашек отмечали сектора. После подсушивания газона культуры в термостате на поверхность среды наносили капли изучаемых бактериофагов (по каждой пробе) и наклоняли чашки, чтобы капли стекли. Каждый сектор используется для одного фага. В качестве контроля наносили каплю стерильного МПБ (Пульчеровская, 2004). Было выявлено 4 фага- TV-1-УГСХА, TV-3-УГСХА, TV-8-УГСХА, TV-10-УГСХА. Отобранные фаги проявили активность в отношении всех видов бактерий, входящих в трибу: *K. oxytoca* ATCC 8724, *K. oxytoca* 26, *S. marcescens* ATCC 13800, *S. liquefaciens* 16, *E. cloacae* 397, *E. aerogenes* 654.

Дальнейшее изучение способности лизиса бактерий под действием фагов, уже с учетом устойчивости к тому или другому фактору, было связано с 4-мя фагами (TV-1-УГСХА, TV-3-УГСХА, TV-8-УГСХА, TV-10-УГСХА). Для этого изучаемые штаммы сплошным газоном высевали на 1,5%-ый мясопептонный агар. Каждая из чашек была разделена на два сектора, на которых, соответственно, проверялась устойчивость фага к хлороформу или температуре. На каждый из секторов с края чашки капнули фагом и дали стечь капли, тем самым образуя своего рода дорожку, которая в случае лизогении культуры образует прозрачную область по всей длине стекания. Результаты исследования представлены в таблице 2.

Дальнейшие исследования были связаны с селекцией бактериофагов и повышением их литической активности. Для этого проводили 4-кратное пассирование изолятов фагов с индикаторной культурой, засеянных методом агаровых слоев, с периодическим пересевом типичных для данного изолята негативных колоний до получения популяции вирусов, имеющих однородные негативные колонии и стабильно высокий титр [8].

Готовили разведение выделенного фага в МПБ от 10^{-6} - 10^{-9} . После 20-ти часового инкубирования, отвивали бактериологической петлей одну негативную колонию, расположенную изолированно от других и помещали в пробирку с МПБ, туда же вносили 20-ти часовую бульонную культуру индикаторных штаммов в количестве 0,2 мл [9,10, 11]. Одновременно ставили МПБ с индикаторной культурой без фага (контроль). Пробирки культивировали при 37°C в течение 4 часов (с наблюдением за изменениями каждый час). В случае появления изменений (просветление опытной пробирки по сравнению с контрольной), полу-

Таблица 2 - Результаты определения лизиса у штаммов бактерий трибы *Klebsiellae* под действием хлороформа и температуры

Исследуемый штамм	Исследуемый бактериофаг							
	TV-1-УГСХА		TV-3-УГСХА		TV-8-УГСХА		TV-10-УГСХА	
	t (60°C)	хл (10%)	t (60°C)	хл (10%)	t (60°C)	хл (10%)	t (60°C)	хл (10%)
<i>K. oxytoca</i> ATCC 8724	+	-	+	-	+	-	+	-
<i>K. oxytoca</i> 26	+	-	+	-	+	-	+	-
<i>S. marcescens</i> ATCC 13800	-	+	-	+	-	+	-	+
<i>S. liquefaciens</i> 16	-	+	-	+	-	+	-	+
<i>E. cloacae</i> 397	+	-	+	-	+	-	+	-
<i>E. aerogenes</i> 654	+	-	+	-	+	-	+	-
Примечание: + наличие зон лизиса - отсутствие зон лизиса								

ченный фаголизат обрабатывали хлороформом (фаги активные в отношении штаммов *S. marcescens* ATCC 13800, *S. liquefaciens* 16) и температурой (фаги активные в отношении *K. oxytoca* ATCC 8724, *K. oxytoca* 26, *E. cloacae* 397, *E. aerogenes* 654) в течение 30 минут и исследовали методом агаровых слоев [12, 13].

В ходе исследования, в каждом случае отбирали идентичную исходной негативную колонию и пассировали. Проводили до четырех пассирований, после чего селекцию считали законченной.

Заключение. Предполагаем, что в результате проведенных исследований из изученных объектов окружающей среды (пробы песка) нами была выделена ассоциация вирулентных штаммов фагов TV-1-УГСХА, TV-3-УГСХА, TV-8-УГСХА, TV-10-УГСХА, активные в отношении различных видов, входящих в трибу *Klebsiellae*: *K. oxytoca*, *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *E. cloacae*, *E. aerogenes*. Результаты исследования позволяют подтвердить первоначальное предположение о частом совместном распространении бактерий родов *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* в однотипных природных ареалах. Данные исследования указывают на возможность использования предполагаемого метода работы с родственными бактериофагами для целей быстрой санитарной оценки изучаемых объектов по искомым бактериям одной трибы.

1. Евтеева Н.И. Энтеробактерии в ближайшем окружении человека / Евтеева Н.И., Речкин А.И. // Популяции в пространстве и во времени. Сборник материалов VIII Всероссий. популяцион. семинара. Н. Новгород, 2005. С.89-91.
2. Золотухин С.Н. Малоизученные энтеробактерии и их роль в патологии животных // Ульяновск. – 2004. – С. 64 – 75.
3. Штаммы бактериофагов малоизученных патогенных энтеробактерий и их практическое применение / Золотухин С.Н., Васильев Д.А., Каврук Л.С., Пульчеровская Л.П., Молофеева Н.И., Коритняк Б.М., Кузнецов А.Ю., Булькинова Е.А., Пожарникова Е.Н., Феоктистова Н.А., Мелехин А.С., Ленев С.В. // В сборнике: Научные разработки и научно-консультационные услуги Ульяновской ГСХА Информационно-справочный указатель. Ульяновск, 2006. С. 45-49.
4. 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.
5. Ляшенко Е.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. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов бактерий *Bacillus subtilis* / Феоктистова Н.А. // В книге: Бактериофаги микроорганизмов значимых для животных, растений и человека. - Ульяновск, 2013. С. 186-197.
8. Садртдинова Г.Р. Сравнительная эффективность методов выделения бактериофагов *Klebsiella oxytoca*/ С.Н. Золотухин, Д.А. Васильев, Г.Р. Садртдинова// Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2015. - № 4 (32).-С.68-72.
9. Ляшенко Е.А. Особенности селекции фагов активных к *Klebsiella oxytoca*/ Г.Р.Садртдинова, Е.А.Ляшенко, Д.А.Васильев, С.Н.Золотухин// Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности: материалы 3-й научно-практической конференции с международным участием: к 100-летию открытия бактери-

- офагов, Москва, 13–15 октября / Федер. служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека [и др.]. – Москва: Медицинское маркетинговое агентство, 2016.-С.82.
10. Садртдинова Г.Р. Селекция выделенных клонов бактериофагов, активных к *Klebsiella oxytoca*// Материалы VII Международной научно-практической конференции «Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения» / - Ульяновск: УГСХА, 2016. Т. III. – С.266-269.
 11. Ляшенко Е.А. Селекция выделенных клонов бактериофагов, активных к *Klebsiella pneumonia* /Е.А.Ляшенко, Г.Р. Садртдинова, Д.А.Васильев// Инфекция и иммунитет.2014.-№5.-С.95.
 12. Ляшенко Е.А. Сравнительный анализ биологических свойств бактериофагов бактерий *Klebsiella pneumonia* /Е.А.Ляшенко, Г.Р. Садртдинова, Д.А.Васильев// Инфекция и иммунитет.2014.-№5.-С.94-95.
 13. Sadrtidinova G.R. Sanitary assessment of environmental objects by isolation of virulent phages// G.R.Sadrtidinova, L.P.Pulcherovskaya, D.A.Vasiliev, S.N.Zolotuhin//Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences.2016.Т.58.№10.С.165-170.

ASSESS THE SANITARY CONDITION ENVIRONMENT BY ISOLATION FROM HER BACTERIOPHAGES

Sadrtidinova G.R., Pulsherovskaya L.P., Vasiliev D.A., Zolotukhin S.N.

Key words: *tribe, bacteria, bacteriophages, area of distribution, fecal contamination.*

The article presents the results of a study of virulent phages active against bacteria belonging to the tribe Klebsielleae, for the purposes of health assessment of certain areas. Preparation of phage method of isolation from the environment of the studied area of distribution has allowed to identify four phage active against members of the tribe: K.oxytoca ATCC 8724, K.oxytoca 26 S.marcessens ATCC 13800, S. liquefaciens 16, E.cloaceae 397, E. The aerogenes 654.