

**СРАВНИТЕЛЬНАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ МЕТОДОВ ВЫДЕЛЕНИЯ  
БАКТЕРИОФАГОВ *KLEBSIELLA OXYTOSA***

**Васильев Дмитрий Аркадьевич**, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

**Золотухин Сергей Николаевич**, доктор биологических наук, профессор кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

**Садрtdинова Гузелия Рафиковна**, аспирант кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

ФГБОУ ВО Ульяновская ГСХА

432017, г. Ульяновск, бульвар Новый Венец, 1; тел.: (8422)55-95-47; e-mail: sadrtdinova-guzlik@yandex.ru

**Ключевые слова:** бактерии, бактериофаги, выделение, ультрафиолетовое облучение, методы.

В статье представлены результаты исследования по выделению фагов бактерий вида *Klebsiella oxytoca*. Использование в научной практике любого из трех основных методов выделения вирусов бактерий не является универсальным. В процессе исследований была показана сравнительная эффективность методов выделения бактериофагов и отмечены биологические особенности негативных колоний выделенных бактериофагов.

**Введение**

Представители рода *Klebsiella* достаточно широко распространены в природе. Так, в 90-ые годы XX века насчитывалось около 5-6 изученных видов бактерий данного рода, а сегодня их более 10 (*Kl. pneumoniae*, *Kl. ozaenae*, *Kl. rhinoscleromatis*, *Kl. ornithinolytica*, *Kl. oxytoca*, *Kl. planticola*, *Kl. terrigena*, *Kl. mobilis*, *Kl. singaporensis*, *Kl. granulomatis*, *Kl. variicola*, *Kl. aerogenes*, *Kl. milletis*, *Kl. sinegalensis*) [1]. Большинство видов еще малоизучены, о степени патогенности, области распространения сложно что-либо сказать точно из-за отсутствия статисти-

ческих данных о частоте выделения этих микроорганизмов.

Бактерии вида *Kl. oxytoca* занимают второе место (по числу вызываемых заболеваний) после *Kl. pneumoniae*. В норме данный микроорганизм встречается в кишечнике людей и животных [2, 3]. В то же время этот микроорганизм является причиной острых воспалительных заболеваний слизистой полости рта, таких как стоматит или гингивит, спонтанного ктериального перитонита.

Выделением и изучением бактериофагов *Klebsiella* занимались разные научные школы как в нашей стране, так и за рубежом. Активная работа в этой области проводилась

отечественными, польскими и венгерскими учеными (Przondo-Hessek, 1966; Slopek et al., 1967; 1978; Габрилович с соавт., 1970; 1973; 1981; 1983; Gastonet. al., 1987; Pieroniet. al., 1994; Джапаридзе с соавт., 2005) [4].

Одним из эффективных средств для диагностики, лечения и профилактики заболеваний, вызываемых патогенными микроорганизмами, являются биопрепараты на основе специфических бактериофагов. Изучение биологических свойств бактериофагов, выполненное с момента их получения, позволило широко использовать вирусы бактерий для решения многих задач в микробиологии, вирусологии, генетике, молекулярной биологии, иммунологии, радиобиологии, биотехнологии и других областях биологии. Поэтому процесс изучения вирусов прокариот, характеризующийся вначале как узкая область медицинской микробиологии, в настоящее время приобрел общебиологическое значение [5]. Находящийся в розничной аптечной сети бактериофаг клебсиеллезный поливалентный оказывает специфическое антибактериальное действие в отношении штаммов трех видов: *Kl. pneumoniae*, *Kl. rinoscleromatis* и *Kl. ozaenae*. Недостатком этого препарата является не всегда широкий спектр литического действия в отношении клинических штаммов клебсиелл.

Следовательно, получение специфических фагов, активных в отношении бактерий данного вида, является актуальным.

Цель исследования заключалась в выделении бактериофагов, активных в отношении представителей вида *Kl. oxytoca* различными методами.

#### **Объекты и методы исследований**

Было изучено 6 выделенных нами штаммов бактерий *Kl. oxytoca* на наличие в них профага. Изучение биологических свойств выделенных бактериофагов проводили с использованием методик, апробированных сотрудниками кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы ФГБОУ ВО Ульяновская ГСХА.

#### **Результаты исследований**

При проведении исследований использовали наиболее часто применяемые в научной практике методики, с нашими дополнениями для изучаемого микроорганизма:

1. Метод выделения бактериофагов без воздействия на них индуцирующего фактора (С. Лурия, Д. Дарнеллу, 1970). В колбу с мясопептонным бульоном добавляли по 1,0 мл суточной бульонной культуры всех имеющихся у нас штаммов бактерий *Kl. oxytoca* и инкубировали при 37°C 24 часа. Затем смесь бактерий центрифугировали при 3000 об/мин в течение 30 минут. Полученный центрифугат прогревали в водяной бане при 60°C 30 минут. Надосадочную жидкость исследовали на присутствие фага методом агаровых слоев по Грациа (1936). Через 20 часов учитывали результат [6, 7]. В результате проведенных исследований было установлено, что изучаемые штаммы бактерий (*Kl. oxytoca 1*, *Kl. oxytoca 2*, *Kl. oxytoca 3*, *Kl. oxytoca 10*, *Kl. oxytoca 24*, *Kl. oxytoca 25*) не проявили лизогенных свойств.

2. Выделение фагов из культур с использованием индуцирующего фактора (Шестаков, 2011). Во второй серии опытов на исследуемые культуры воздействовали ультрафиолетовым облучением, являющимся индуцирующим фактором [8]. Для чего на подсушенный газон суточной культуры воздействовали ультрафиолетовыми лучами в течение 1, 3, 5, 10 минут.

Источник облучения лампа фирмы «Philips» с длинной волны 250 нм. Расстояние до объектов облучения 0,35 м. Затем с облученных чашек делали смыв культуры стерильным физиологическим раствором, полученную суспензию фильтровали и полученный фильтрат исследовали на наличие бактериофага на культуре методом агаровых слоев по Грациа. Учет результатов проводили спустя 20 часов инкубирования в термостате при температуре 37°C.

На чашках с агаром отмечали сплошной газон культуры с зонами лизиса и без них (табл. 1).

В наших опытах в результате индукции не все штаммы *Kl. oxytoca* проявили лизогенные свойства. С чашек, на газоне которых были зоны лизиса исследуемой культуры клебсиелл, отвивали бактериологической петлей кусочек агара с лизируемой культурой и использовали этот материал для пассирования фага в жидкой среде с индикаторной культурой. Пассирование проводили пятикратно.

**Таблица 1**  
**Выделение бактериофагов *Kl. oxytoca***  
**под воздействием УФ-лучей**

Исследуемый штамм	Результат воздействия индуцирующего фактора			
	Время, мин			
	1	3	5	10
<i>Kl. oxytoca 1</i>	+	+	-	-
<i>Kl. oxytoca 2</i>	-	-	+	-
<i>Kl. oxytoca 3</i>	-	-	+	-
<i>Kl. oxytoca 10</i>	-	-	-	-
<i>Kl. oxytoca 24</i>	-	-	-	-
<i>Kl. oxytoca 25</i>	-	-	+	-

**Примечание:** + наличие зон лизиса; - отсутствие зон лизиса

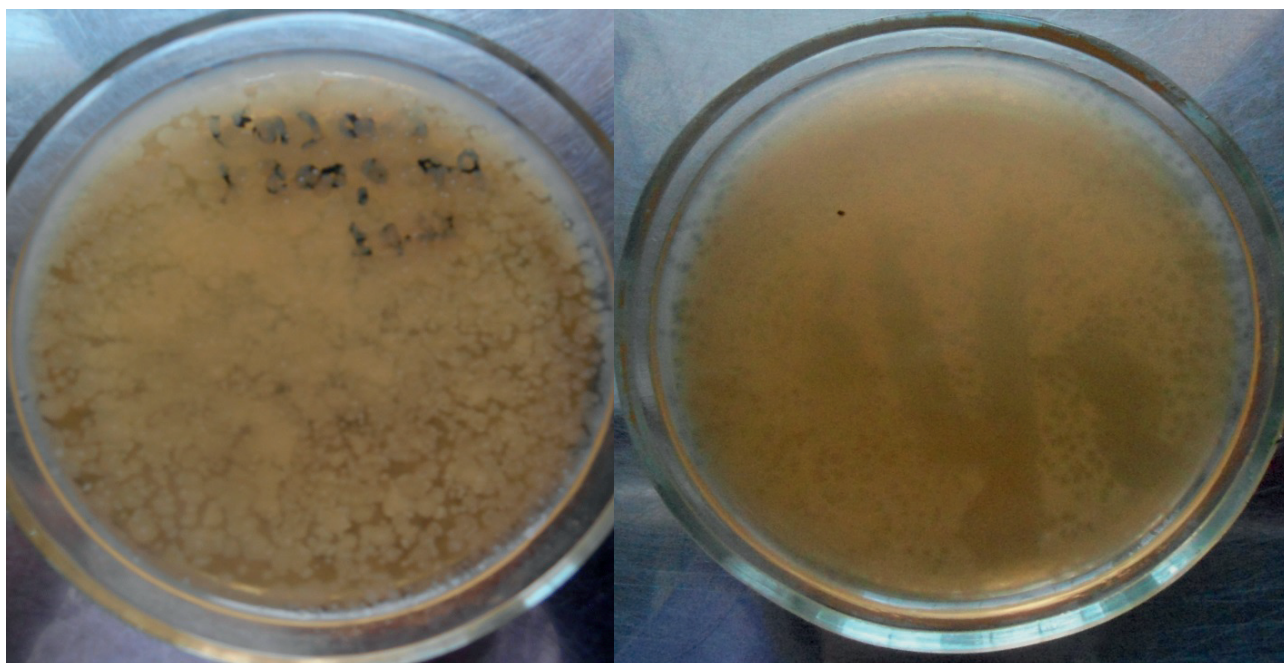
В результате проведенных исследований было выделено 2 штамма бактериофагов, лизирующих бактерии *Kl. oxytoca*, (*Kl. oxytoca 1* УГСХА и *Kl. oxytoca 3* УГСХА). Остальные 3 штамма предполагаемых фагов в ходе пассирования теряли свою активность в отношении индикаторной культуры.

Далее нами были проведены опыты по выделению фагов из объектов внешней среды (Л.И. Адельсон, 1962).

Материалом для исследований были пробы почвы, отходы молочного производства, моча больных людей, фекалии крупного и мелкого рогатого скота, пробы воды, раневой экссудат и гнойные выделения (всего 20 проб).

В колбу, содержащую стерильный мясопептонный бульон в количестве 50 мл, вносили 10 мл исследуемого материала и по 0,5 мл всех изучаемых штаммов бактерий *Kl. oxytoca*.

Далее колбу помещали в термостат и инкубировали в течение 24 часов при 37°C [9]. После этого содержимое колбы разливали в стерильные пробирки, центрифугировали, надосадок исследовали на присутствие фага. Для чего одну из пробирок с супернатантом обрабатывали хлороформом (в разведении 1 : 10), а вторую прогревали в водяной бане при 60°C в течение 30 минут. Такая обработка смеси позволяет не только инактивировать возможных бактериальных контаминантов, но и одновременно селекционировать термоустойчивые фаги и фаги, устойчивые к воздействию хлороформа. Обработанные пробы надосадочной жидкости исследовали методом агаровых слоев по Грациа. Для чего



**Рис.1 - Формирование негативных колоний бактериофагов *Kl. oxytoca*:**

А) под действием УФ-облучения (бактериофаг активный в отношении *Kl. oxytoca 3*); Б) выделение профага из объектов внешней среды (проба №4: 4 т/хл УГСХА-бактериофаг, активный в отношении штаммов *Kl. oxytoca 1*, *Kl. oxytoca 2*, *Kl. oxytoca 3*, *Kl. oxytoca 10*)

Таблица 2

Выделение бактериофагов *Kl.oxytoca* из объектов внешней среды

№ исследуемой пробы	Исследуемая проба	Исследуемый штамм	Наличие зон лизиса
2	Проба куриного помета №1	<i>Kl.oxytoca 1</i>	+t
		<i>Kl.oxytoca 2</i>	-
		<i>Kl.oxytoca 3</i>	-
		<i>Kl.oxytoca 10</i>	+t
		<i>Kl.oxytoca 24</i>	+хл
		<i>Kl.oxytoca 25</i>	-
4	Проба земли №2 (птицефабрика)	<i>Kl.oxytoca 1</i>	+t
		<i>Kl.oxytoca 2</i>	+t
		<i>Kl.oxytoca 3</i>	+хл
		<i>Kl.oxytoca 10</i>	+t
		<i>Kl.oxytoca 24</i>	-
		<i>Klebsiellaoxytoca 25</i>	-
12	Проба куриного помета №2	<i>Kl.oxytoca 1</i>	-
		<i>Kl.oxytoca 2</i>	+хл
		<i>Kl.oxytoca 3</i>	+хл
		<i>Kl.oxytoca 10</i>	-
		<i>Kl.oxytoca 24</i>	-
		<i>Kl.oxytoca 25</i>	-
13	Проба куриного помета №3	<i>Kl.oxytoca 1</i>	+хл
		<i>Kl.oxytoca 2</i>	+хл
		<i>Kl.oxytoca 3</i>	-
		<i>Kl.oxytoca 10</i>	-
		<i>Kl.oxytoca 24</i>	-
		<i>Kl.oxytoca 25</i>	+t
14	Проба воды №1 (птицефабрика)	<i>Kl.oxytoca 1</i>	+хл
		<i>Kl.oxytoca 2</i>	-
		<i>Kl.oxytoca 3</i>	-
		<i>Kl.oxytoca 10</i>	+хл
		<i>Kl.oxytoca 24</i>	+хл
		<i>Kl.oxytoca 25</i>	+хл
20	Проба кормов (для домашней птицы)	<i>Kl.oxytoca 1</i>	-
		<i>Kl.oxytoca 2</i>	-
		<i>Kl.oxytoca 3</i>	+t
		<i>Kl.oxytoca 10</i>	-
		<i>Kl.oxytoca 24</i>	-
		<i>Kl.oxytoca 25</i>	-

**Примечание:** + наличие зон лизиса  
 - отсутствие зон лизиса  
 t температуроустойчивый фаг  
 хл хлороформоустойчивый фаг

чашки помещали в термостат и инкубировали в течение 18 часов при температуре 37°C. Наличие зон лизиса культуры клебсиелл или негативных колоний на газоне роста микроор-

ганизмов свидетельствовало о присутствии в исследуемом материале бактериофагов.

Результаты исследований отражены в табл. 2.

В результате проведенных исследований, при использовании методики Адельсона Л.И., было выделено 6 бактериофагов *Kl. oxytoca*:

2t/хл УГСХА – изолят фага, активный в отношении штаммов *Kl. oxytoca 1*, *Kl. oxytoca 10*, *Kl. oxytoca 24*;

4t/хл УГСХА – изолят фага, активный в отношении штаммов *Kl. oxytoca 1*, *Kl. oxytoca 2*, *Kl. oxytoca 3*, *Kl. oxytoca 10*;

12хл УГСХА – изолят фага, активный в отношении штаммов *Kl. oxytoca 2*, *Kl. oxytoca 3*

13t/хл УГСХА – изолят фага, активный в отношении штаммов *Kl. oxytoca 1*, *Kl. oxytoca 2*, *Kl. oxytoca 25*

14хл-УГСХА – бактериофаг, активный в отношении штаммов *Kl. oxytoca 1*, *Kl. oxytoca 10*, *Kl. oxytoca 24*, *Kl. oxytoca 25*.

20t УГСХА – бактериофаг, активный в отношении штамма *Kl.oxytoca 3*

Выделенные изоляты фагов пассировали на чувствительных культурах клебсиелл 4-5 раз.

На рис. 1 представлены негативные колонии выделенных фагов.

Размер и форма негативных колоний являются одной из характеристик фага [10, 11]. Так, бактериофаг, выделенный методом воздействия индуцирующим фактором (УФ-облучение), по этим показателям отличается от фага, выделенного из объектов внешней среды. В первом случае бактериофаг образует мутные мелкие негативные колонии (0,5-1,0±0,5 мм). Во втором – прозрачные колонии округлой формы средней величины (1,5-2,0±0,5 мм).

### Выводы

В результате проведенных исследований было установлено, что все три метода,

которые на сегодняшний день наиболее часто используются в практике, не имеют стопроцентной эффективности и ни один из них не является универсальным. Выделение бактериофага *Kl. oxytoca* из культуры бактерий без воздействия на них индуцирующего фактора не приводило к выявлению свободного фага. Выделение бактериофага с использованием индуцирующего фактора позволило выделить 2 фага, активных в отношении изучаемого микроорганизма. Выделение бактериофагов из объектов внешней среды позволило нам выделить 4 изолята фагов, активных в отношении бактерий *Klebsiella oxytoca*. Изучение негативных колоний позволило отметить морфологические отличия у выделенных фагов. Колонии фагов, полученные под воздействием УФ-лучей, отличаются меньшим размером и большей мутностью. Мутные бляшки обычно образуют умеренные бактериофаги, поскольку большинство бактериальных клеток внутри бляшки остаются лизогенными.

#### Библиографический список

1. Катер Э. Бактериофаги: биология и практическое применение / Э. Катер, А. Сулаквелидзе. - М.: Научный мир, 2012. - 640 с.
2. Садртдинова, Г.Р. Бактериофаги клебсиелл: их роль и значение / Г.Р. Садртдинова // Молодежь и наука XXI века. Материалы IV Международной научно-практической конференции молодых ученых. 16-20 сентября 2014 года. - Ульяновск: УГСХА им. П.А. Столыпина, 2014. - Т.1. - С. 115-121.
3. Зурабов А.Ю. Создание отечественной коллекции бактериофагов и принципы разработки лечебно-профилактических фаговых препаратов / А.Ю. Зурабов, Н.Н. Каркищенко, Д.В. Попов, Е.Л. Жиленков, В.М. Попова // Биомедицина. - 2012. - № 1. - С. 134-138.
4. Ляшенко, Е.А. Индикация бактерий рода *Klebsiella* с помощью специфических бактериофагов, в объектах ветеринарного надзора / Е.А. Ляшенко, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин // Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности. Материалы Международной научно-практической конференции. 23-25 апреля 2013 года. - Ульяновск, 2013. - С.36-40.
5. Jarzab A, Górska-Frączek S, Rybka J, Witkowska D. Enterobacteriaceae infection - diagnosis, antibiotic resistance and prevention // Postepy Hig Med Dosw (Online). 2011 Feb 16;65:55-72.
6. Сравнительная эффективность методов выделения фагов бактерий *Bacillus megaterium* / Н.А. Феоктистова, Н.А. Романова, С.Н. Золотухин, Д.А. Васильев, А.В. Алешкин // Вестник ветеринарии. - 2013. - № 1 (64). - С. 26-27.
7. Журавская, Н.П. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов бактерий вида *Yersinia pseudotuberculosis* / Н.П. Журавская // Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности. Материалы Международной научно-практической конференции. 23-25 апреля 2013 года. - Ульяновск, 2013. - С. 89-100.
8. Карамышева Наталья Николаевна. Выделение бактериофага *Desulfovibriodesulfuricans* и создание на его основе биопрепарата по профилактике коррозии металлов в нефтяной промышленности: автореф. дис. ... канд. биологических наук: 17.01.2013 / Н.Н. Карамышева. - Саратов, 2013. - 18 с.
9. Ляшенко Е.А. Селекция выделенных клонов бактериофагов, активных к *Klebsiella pneumoniae* / Е.А. Ляшенко, С.Г. Садртдинова, Д.А. Васильев // Инфекция и иммунитет. - 2014. - №5. - С.95.
10. Юдина, М.А. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов бактерий вида *Bacillus mesentericus* / М.А. Юдина, Н.А. Феоктистова // Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности. Материалы Международной научно-практической конференции. 23-25 апреля 2013 года. - Ульяновск, 2013. - С. 197-211.
11. Характеристика биологических свойств бактериофагов вида *Bacillus subtilis* / Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин, И.Н. Хайруллин, Н.А. Феоктистова, А.И. Калдыркаев, М.А. Юдина, А.Х. Мустафин // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2011. - № 1. - С. 79-83.