

## ВЫДЕЛЕНИЕ БАКТЕРИОФАГОВ РОДА *PROTEUS* И ПОДБОР ПАРАМЕТРОВ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

**Феоктистова Наталья Александровна**, кандидат биологических наук, доцент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

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

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

ФГБОУ ВО Ульяновская ГСХА

432017, г. Ульяновск, бульвар Новый Венец, 1; 8(8422)55-95-47

e-mail: feokna@yandex.ru

**Ключевые слова:** бактериофаг, *Proteus*, метод, параметры, культивирование, способ

В статье описаны результаты исследований по выделению бактериофагов, специфичных бактериям рода *Proteus*, и подбору оптимальных параметров культивирования. Были проведены исследования по выделению бактериофагов, специфичных к бактериям *Proteus vulgaris* и *Proteus mirabilis* методом индукции из выделенных нами ранее 16 протейных культур. Были получены отрицательные результаты. Из 94 проб объектов санитарного надзора животноводческих и птицеводческих помещений из хозяйств, неблагополучных по желудочно-кишечным заболеваниям (сточные воды, фекалии, смывы с клеток, почва с территории ферм) было выделено 8 бактериофагов, специфичных к бактериям рода *Proteus*. Было модифицирована методика выделения бактериофагов: при выделении фага из объектов ветеринарно-санитарного надзора по классической методике Гольдфарба Д.М. (1961) этап высева центрифугата методом агаровых слоев по Gracia (1936) был заменен в протоколе исследований на этап высева методом Отто «стекающая капля». Селекцию протейных бактериофагов проводили девятикратным пассированием изолированных негативных колоний на МПА с перевиванием на МПБ. Оптимальное соотношение - 1:1, т.е. 0,2 мл фага на 0,2 мл индикаторной культуры. Время пассажа – 3,5 часа инкубирования при температуре  $36\pm 2$  °С. Для очистки фагов от бактериальных клеток применяли три метода: обработка хлороформом (трихлорметаном), прогревание и фильтрация с применением мембранных фильтров фирмы «Millipore Millex-GP». Установлено, что наиболее эффективным способом является метод многоступенчатой фильтрации: осветляющая микрофильтрация через мембраны Владипор марки МФАС-ОС-3 с размером пор 0,8 мкм, затем МФАС-ОС-2 с размером пор 0,45 мкм, далее стерилизующая фильтрация «Millipore Millex-GP» с диаметром пор 0,22 мкм.

### Введение

Известно, что бактерии рода *Proteus* входят в трибу самых старейших представителей семейства *Enterobacteriaceae*. Первых представителей рода обнаружил в гниющем мясе немецкий бактериолог Густав Хаузер в 1885 году [1-2]. Вышеназванные бактерии широко распространены во внешней среде и обладают высокой устойчивостью к факторам внешней среды, в незначительном количестве обитают в кишечнике здоровых животных, человека и птиц, часто становятся причиной болезни молодняка сельскохозяйственных животных и птицы, находящиеся в иммунодепрессивном состоянии и наиболее подверженных стрессам. Известно, что вспышки протейной инфекции регистрируются преимущественно спорадически, в случаях эпизоотии в стаде, бактерии рода *Proteus* играют сопряженную роль секундарной инфекции при смешанном (ассоциативном) инфекционном поражении [3-5]. Бактерии рода *Proteus* – прямые, подвижные грамотрицательные палочки 0,4-0,8x1-3 мкм, большинство штаммов обладают способностью к роению, образуя на скошенной поверхности агара вуалеобразный голубоватый налет с характерным

гнилостным запахом, они отличаются от других энтеробактерий наличием фенилаланиндезаминазы [6].

Для диагностики, лечения и профилактики дисбиозов, возбудителем которых являются протей в смешанной или монокультурах, в медицинской практике применяются фаговые биопрепараты. В ветеринарии данные методики не нашли широкого распространения, что связано с ограниченным количеством специфических бактериофагов на фармацевтическом рынке.

Цель работы – выделение фагов, специфичных для бактерий рода *Proteus*, из патологического материала и объектов санитарного надзора животноводческих и птицеводческих помещений из хозяйств, неблагополучных по желудочно-кишечным заболеваниям, которые могут быть использованы с целью конструирования фагового биопрепарата для диагностики, профилактики и лечения дисбиозов, возбудителем которых являются протей в смешанной или монокультурах, и их селекция.

Для выполнения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- провести эксперименты по выделению бактериофагов методом индукции на штаммах *Proteus*;

- провести эксперименты по выделению бактериофагов *Proteus* из объектов окружающей среды;

- подобрать оптимальные параметры культивирования выделенных бактериофагов и способы очистки бактериофагов от индикаторной культуры.

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

Штаммы бактерий рода *Proteus* были выделены коллективом авторов из патологического материала и фекалии от телят, поросят и птицы (куры и утки) с клиническими признаками дисбактериоза, фекалии и смывы животноводческих и птицеводческих хозяйств, неблагополучных по желудочно-кишечным заболеваниям Ульяновской и Самарской областей. Для исследований было взято 94 пробы патологического материала (трупы телят, поросят и кур, объекты санитарного надзора животноводческих и птицеводческих помещений из хозяйств, неблагополучных по желудочно-кишечным заболеваниям (сточные воды, фекалии, смывы с клеток, почва с территории животноводческих ферм) Ульяновской, Самарской и Пензенской областей).

Выделение бактериофагов и подбор оптимальных параметров их культивирования проводили с использованием методик, опробованных сотрудниками кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ ФГБОУ ВО Ульяновская ГСХА [7-10]. В исследованиях применяли питательный бульон ТУ 10-02-02-789-176-94 (ООО «БиоКомпас-С», РФ), питательный агар для культивирования микроорганизмов сухой (ГРМ-агар) ТУ 9398-020-78095326-2006 (ФБУН ГНЦ ПМБ, РФ), генцианвиолет 548-62-9 (ЗАО «Вектон», РФ), трихлорметан стабилизированный 0,6-1 % этанола (хлороформ) ч.д.а. ТУ 2631-066-44493179-01. Контроль специфической активности бактериофагов проводили с помощью специально подобранных наборов контрольных штаммов. Концентрацию микробных клеток определяли с помощью оптического стандарта мутности (ОСО 42-28-85 на 10 ед. производства ГИСК им. Л.А. Тарасевича).

#### **Результаты исследований**

В первой серии экспериментов на 16 культур бактерий рода *Proteus*, которые мы исследовали как «лизогенные», воздействовали индуцирующим фактором (применяли воздействие на бактерии ультрафиолетовых лучей).

Анализ литературных данных свидетельствует о том, что при действии на лизогенные культуры индуцирующим фактором продукция фага в значительной степени возрастает, поэтому применяя данную методику удается выявить бактериофаг в значительно большем проценте случаев, чем при изучении только спонтанной его продукции [11-12].

В качестве источника ультрафиолетовых лучей применялась бактерицидная лампа, 80 % энергии которой приходится на длину волны 2537 Å. Исследуемые культуры в период эксперимента (16 культур бактерий, идентифицированных как *Proteus*) находились в экспоненциальной фазе роста. Суточная культура бактерий разводилась в соотношении 1:100 в фосфатном буфере с pH 7,6. Разведение бактерий в объеме 2 мл помещали в чашку Петри и облучали в течение 20 (25, 30, 35, 40) секунд на расстоянии 40 (45, 50, 55, 60) см. Затем облученные культуры рода *Proteus* засеивались на мясо-пептонный бульон (МПБ) комнатной температуры (20-22 °C) в соотношении 1:100. Эксперимент проводился в полутемном помещении с целью предохранения облученных бактерий рода *Proteus* от фотореактивации. Посевы инкубировали при 36±1 °C в течение 6,5-7,0 часов, после чего делали высев методом агаровых слоев по Gracia (1936).

Известно, что лизогения широко распространена среди всех систематических групп микроорганизмов, но нам не удалось выявить профаг у выделенных культур рода *Proteus*.

Второй этап исследований был посвящен выделению бактериофагов из объектов ветеринарно-санитарного надзора. Для исследований был произведен отбор 94 проб патологического материала (трупы телят, поросят и кур, объекты ветеринарно-санитарного надзора животноводческих и птицеводческих помещений из хозяйств, неблагополучных по желудочно-кишечным заболеваниям (сточные воды, фекалии, смывы с клеток, почва с территории животноводческих ферм)).

Первоначально готовили разведения из объектов исследований в МПБ в соотношении 1:10, добавляли в концентрации 10<sup>4</sup> КОЕ /мл по 1,0 мл каждого из 16 штаммов бактерий рода *Proteus*. Колбы с пробами ставили в термостат на 24 часа при температуре 36±1 °C. Затем пробы фильтровали через ватно-марлевый фильтр для освобождения от механических примесей. После этого содержимое колбы разливали в стерильные пробирки, центрифугировали при 3000 об./мин в течение 30 минут, далее прогревали в водяной бане при 62±2 °C в течение 30 минут с целью подавления роста грамотрицательных бактерий.

Каждый исследуемый фильтрат исследовался нами на наличие фага методом Отто «стекающая капля».

Протокол исследования.

1. Накануне опыта по чашкам Петри разливали 1,5 % мясопептонный агар (МПА) в ламинарном боксе. Для подавления роста микрофлоры, которая может попасть из воздуха, к расплавленному МПА перед разливом добавляют 0,04% спиртовой

раствор генцианвиолета из расчета 0,1 мл на каждые 100 мл МПА. Чашки с МПА ставили в термостат для проверки на стерильность на 6-16 часов.

2. На чашку Петри с 1,5% МПА наносили газон 16-18 часовой исследуемой культуры.

3. Бактериальный газон подсушивали в условиях термостата в течение 20-30 минут при  $36\pm 1$  °C.

4. Чашку Петри с подготовленным газоном делили на два сектора: «опытная» дорожка и контроль на механическое повреждение газона. На «опытную» дорожку наносили по 1-2 капли исследуемого фильтрата, на «контрольную» дорожку – стерильный МПБ в том же количестве, что и фильтрат.

5. Посевы помещали в термостат на  $16\pm 2$  часов при  $36\pm 1$  °C.

Результаты оценивали следующим образом: - отсутствие лизиса;

+ лизис по ходу стекания капли;

++ лизис по ходу стекания капли и наличие стерильных пятен;

+++ наличие стерильного пятна и зон лизиса.

Установлено, что на газоне культур 16 культур бактерий рода *Proteus* выявлены зоны лизиса, оцененные в +, ++ и +++ (один, два и три креста) из проб сточных вод 1 (на индикаторной культуре *Proteus vulgaris* 1 - зона лизиса ++), из пробы почвы 2 (на культуре *Proteus vulgaris* 3 – зона лизиса - +++), из фекалий КРС (на культуре *Proteus vulgaris* 13 – зона лизиса - +); смыв с клетки (на индикаторной культуре *Proteus vulgaris* 16 - зона лизиса была оценена на +++); сточные воды 12 (на культуре *Proteus vulgaris* 33 – зона лизиса - +); сточные воды 5 (на культуре *Proteus vulgaris* 28 – зона лизиса - ++); из пробы почвы 4 (на культуре *Proteus vulgaris* 38 – зона лизиса - ++); фекалии свиней (на культуре *Proteus mirabilis* 12 – зона лизиса - +).

При выделении фага из объектов ветеринарно-санитарного надзора по классической методике Гольдфарба Д.М. (1961) [12] этап высева центрифугата методом агаровых слоев по Gracia (1936) был заменен в протоколе исследований на этап высева методом Отто «стекающая капля». Это было сделано с целью экономии расходных материалов и снижения трудозатрат. Также нами было установлено, что при первичном выявлении бактериофага метод Отто позволяет четко видеть его наличие или отсутствие, в то время как метод агаровых слоев по Gracia (1936) затрудняет этап «визуального выявления бактериофага на газоне культуры». Для подтверждения мы провели эксперименты, заключающиеся в том, что каждый из 8 фильтратов был исследован на наличие фага методом агаровых слоев по Gracia (1936).

Протокол исследования

1. Накануне опыта по чашкам Петри разли-

вали 1,5% МПА в ламинарном боксе. Для подавления роста микрофлоры, которая может попасть из воздуха, к расплавленному МПА перед разливом добавляют 0,04% спиртовой раствор генцианвиолета из расчета 0,1 мл на каждые 100 мл МПА. Чашки с МПА ставили в термостат для проверки на стерильность на 6-16 часов.

2. Индикаторную культуру выращивали в условиях термостата в течение 16-18 часов при  $36\pm 1$  °C на МПБ.

3. Стерильный 0,7% МПА, разлитый в пробирку по 2,5 мл, расплавляли на водяной бане и остужали до 46-48 °C.

4. Опыт. В пробирку с 2,5 мл 0,7% МПА вносили 0,2 мл индикаторной культуры и 0,2 мл фильтрата, исследуемого на наличие фага, круговыми движениями перемешивали в ладонях содержимое и выливали на слой 1,5 % МПА. Осторожными круговыми движениями распределяли исследуемый материал по поверхности МПА, чашки Петри оставляли на горизонтальной поверхности до полного застывания верхнего слоя МПА.

5. Контроль культуры. В пробирку с 2,5 мл 0,7% МПА вносили 0,2 мл индикаторной культуры и 0,2 мл стерильного МПБ, круговыми движениями перемешивали в ладонях содержимое и выливали на слой 1,5 % МПА. Осторожными круговыми движениями распределяли исследуемый материал по поверхности МПА, чашки Петри оставляли на горизонтальной поверхности до полного застывания верхнего слоя МПА.

6. Контроль исследуемого субстрата. В пробирку с 2,5 мл 0,7% МПА вносили 0,2 мл фильтрата, исследуемого на наличие фага, и 0,2 мл стерильного МПБ, круговыми движениями перемешивали в ладонях содержимое и выливали на слой 1,5 % МПА. Осторожными круговыми движениями распределяли исследуемый материал по поверхности МПА, чашки Петри оставляли на горизонтальной поверхности до полного застывания верхнего слоя МПА.

7. Инкубировали посевы в условиях термостата при  $36\pm 1$  °C в течение  $16\pm 2$  часов.

Установлено, что на газоне культур *Proteus vulgaris* 1, *Proteus vulgaris* 3, *Proteus vulgaris* 13, *Proteus vulgaris* 16, *Proteus vulgaris* 33, *Proteus vulgaris* 28, *Proteus vulgaris* 38, *Proteus mirabilis* 12 выявлены зоны лизиса. Результаты исследований бактериофага Pr - 2 УГСХА на культуре *Proteus vulgaris* 3 методом агаровых слоев и «стекающей каплей» по Отто (культивирование при температуре  $36\pm 1$  °C в течение 18 часов) представлены на рисунке 1. Затраты на постановку эксперимента в несколько раз больше и при аналогичном результате, что и при применении метода Отто.

Нами из 94 проб объектов ветеринарно-са-



А

Б

**Рис. 1 – Зоны лизиса бактериофага Pr - 2 УГСХА на культуре *Proteus vulgaris* 3: А) способ посева - метод агаровых слоев, Б) способ посева «стекающая капля» по Отто (культивирование при температуре  $36\pm 1$  °С в течение 18 часов)**

нитарного надзора было выделено 8 бактериофагов, специфичных для штаммов *Proteus vulgaris* и *Proteus mirabilis*.

Селекция бактериофагов проводилась следующим образом. С зоны лизиса осторожно бактериологической петлей брали материал и вносили его в пробирку с 4,5 мл стерильного МПБ, туда же вносили 0,2 мл 16-18 часовой индикаторной культуры (та культура *Proteus*, на газоне которой был выявлен лизис). Далее ставился контроль: в пробирку со стерильным МПБ вносили 0,2 мл индикаторной культуры. Обе пробирки ставили в термостат при  $36\pm 1$  °С. Время культивирования подбирали визуально в диапазоне от 3 до 7 часов с интервалом 30 минут. Ориентиром завершения пассажа было наличие роста бактерий в контрольной пробирке – активное помутнение МПБ.

Эмпирическим методом нами установлено, что 3,5 часовое культивирование посевов достаточно для пассирования выделенных фагов на протейных культурах, используемых нами в качестве индикаторных: *Proteus vulgaris* 1, *Proteus vulgaris* 3, *Proteus vulgaris* 13, *Proteus vulgaris* 16, *Proteus vulgaris* 33, *Proteus vulgaris* 28, *Proteus vulgaris* 38, *Proteus mirabilis* 12.

Дальнейшая наша работа проводилась с целью подбора оптимальных параметров культивирования бактериофагов и подбора способа очистки от индикаторных культур на этапе пассирования. Известно, для инактивации бактериальной культуры при селекции фагов применяют следующие способы: обработку пассажа фага трихлорме-

таном, прогреванием или мембранной фильтрацией [9-12].

Изучение устойчивости селекционированных протейных фагов к воздействию трихлорметана проводили следующим образом: соотношение фага и трихлорметана составляли в пропорции 10:1, время воздействия 5-35 минут с 5-минутным интервалом при постоянном встряхивании пробирок и отстаивании в течение 1/5 временного интервала воздействия. Далее при помощи пипетки проводили отбор надсадочной жидкости и высевали обработанный трихлорметаном бактериофаг на МПА методом Отто «стекающая капля» на ранее приготовленный бактериальный газон соответствующей индикаторной культуры. Культивировали посева в условиях термостата в течение  $16\pm 2$  часов при температуре  $36\pm 1$  °С. Наличие зоны лизиса свидетельствовало об устойчивости фагов к воздействию трихлорметана. Результаты исследований представлены в табл. 1.

В экспериментах также определено, что вегетативные формы индикаторных культур бактерий рода *Proteus* не выдерживали воздействие трихлорметана при временной экспозиции 5-35 минут. Установлено, что у фагов, специфичных к бактериям *Proteus*, зафиксированы различные показатели устойчивости к трихлорметану. Соответственно, этот метод не может применяться для очистки протейных бактериофагов, так как не является универсальным.

Вторым способом очистки протейных фагов индикаторной культуры было прогревание

Таблица 1

Устойчивость селекционированных фагов и индикаторных культур *Proteus* к воздействию трихлорметана

Название исследуемого агента	Временной интервал воздействия трихлорметана на бактериофаг, минут						
	5	10	15	20	25	30	35
Бактериальная культура							
<i>Proteus vulgaris</i> 1	-	-	-	-	-	-	-
<i>Proteus vulgaris</i> 3	-	-	-	-	-	-	-
<i>Proteus vulgaris</i> 13	-	-	-	-	-	-	-
<i>Proteus vulgaris</i> 16	-	-	-	-	-	-	-
<i>Proteus vulgaris</i> 33	-	-	-	-	-	-	-
<i>Proteus vulgaris</i> 28	-	-	-	-	-	-	-
<i>Proteus vulgaris</i> 38	-	-	-	-	-	-	-
<i>Proteus mirabilis</i> 12	-	-	-	-	-	-	-
Бактериофаг							
Pr - 1 УГСХА / <i>Proteus vulgaris</i> 1	+	+	-	-	-	-	-
Pr - 2 УГСХА / <i>Proteus vulgaris</i> 3	+	+	-	-	-	-	-
Pr - 3 УГСХА / <i>Proteus vulgaris</i> 13	+	+	-	-	-	-	-
Pr - 4 УГСХА / <i>Proteus vulgaris</i> 16	+	+	+	-	-	-	-
Pr - 5 УГСХА / <i>Proteus vulgaris</i> 33	+	+	-	-	-	-	-
Pr - 6 УГСХА / <i>Proteus vulgaris</i> 28	+	+	+	-	-	-	-
Pr - 7 УГСХА / <i>Proteus vulgaris</i> 38	+	+	-	-	-	-	-
Pr - 8 УГСХА / <i>Proteus mirabilis</i> 12	+	+	+	-	-	-	-

при температуре при  $62 \pm 2$  °C в течение 30 минут. Данные параметры были нами установлены методом подбора из диапазона температур 58-70 °C с интервалом в 2 °C при временном интервале 30 минут. Определено, что в течение 30 минут при  $62 \pm 2$  °C инактивируется индикаторная культура, а бактериофаг остается жизнеспособным. Изучение температурной устойчивости фагов осуществляли также методом Отто «стекающая капля». Температурная обработка при вышеназванных параметрах – это эффективный по качеству, но длительный по временным затратам метод. С целью подбора максимально эффективного метода, не требующего трудо- и время затрат, мы продолжили исследования бактериофагов, применяя метод фильтрации. Очистку протейных бактериофагов от бактериальных клеток, эндотоксина и балластных веществ мы осуществляли методом многоступенчатой фильтрации: осветляющей микрофильтрации через мембраны Владипор марки МФАС-ОС-3 с размером пор 0,8 мкм, затем МФАС-ОС-2 с размером пор 0,45 мкм, которые представляют собой мелкопористый пленочный материал, изготовленный на основе смеси ацетатов целлюлозы. Затем фаголизаты подвергали стерилизующей фильтрации с помощью фильтрующей насадки фирмы «Millipore Millex-GP» с полиэфирсульфоновым наполнителем и диаметром пор 0,22 мкм.

Девятикратное пассирование протейных бактериофагов с применением следующих параметров: соотношение культуры и фага 1:1 (0,2 мл:

0,2 мл) в 4,5 мл стерильного МПБ, культивирование в течение 3,5 часов при  $36 \pm 1$  °C, позволило нам получить достаточное количество фаголизатов для дальнейших исследований по изучению биологических и молекулярно-генетических свойств выделенных фагов. Очищенные бактериофаги хранились в условиях бытового холодильника при температуре 2-4 °C.

#### Выводы

Были проведены исследования по выявлению бактериофагов, специфических к бактериям *Proteus vulgaris* и *Proteus mirabilis* методом индукции из выделенных нами ранее протейных культур. Были получены отрицательные результаты, которые не расходятся с данными исследователей, занимавшихся выделением бактериофагов семейства *Enterobacteriaceae*, утверждающих, что наиболее перспективным является методика выделения бактериофагов из объектов окружающей среды [6, 12-14].

Из 94 проб объектов ветеринарно-санитарного надзора животноводческих и птицеводческих помещений из хозяйств, неблагополучных по желудочно-кишечным заболеваниям, было выделено 8 бактериофагов, специфичных к бактериям рода *Proteus*. Установлено, что объектами для выделения вирулентных бактериофагов рода *Proteus* являются сточные воды, фекалии, смывы с клеток, почва с территории животноводческих ферм.

Селекцию протейных бактериофагов проводили девятикратным пассированием изолирован-

ных негативных колоний на МПА с перевиванием на МПБ. Оптимальное соотношение - 1:1, т.е. 0,2 мл фага на 0,2 мл индикаторной культуры. Время пассажа – 3,5 часа инкубирования при температуре  $36 \pm 2$  °С. Для очистки фагов от бактериальных клеток применяли три метода: обработка хлороформом (трихлорметаном), прогревание и фильтрация с применением мембранных фильтров фирмы «Millipore Millex-GP». Установлено, что наиболее эффективным способом является многоступенчатая фильтрация. Из выделенных нами бактериофагов *Proteus*, в перспективе могут быть сконструированы безопасные фаговые биопрепараты для диагностики, лечения и профилактики заболеваний, вызываемых протеем или протекающих с их участием, если при проведении молекулярно-генетических исследований будет выявлено отсутствие локусов, кодирующих факторы патогенности.

**Исследования проводятся при поддержке государства в лице ФГБУ «Российский фонд фундаментальных исследований» по научному проекту «Геномика и биология кандидатных бактериофагов для терапии энтеробактериальных инфекций в ветеринарной медицине» №16-44-732038/16 от 03.11.2016 г.**

#### Библиографический список

1. Войтенко, Л.Г. Влияние микробного фактора на возникновение скрытого эндометрита у коров / Л.Г. Войтенко, Т.И. Лапина, И.А. Головань, Д.И. Шилин // Известия Самарской государственной сельскохозяйственной академии. - 2015. - № 1. - С. 23-25.
2. Золотухин, С.Н. Малоизученные энтеробактерии и их роль в патологии животных / С.Н. Золотухин. – Ульяновск: Копиринг, 2004. – С.29–37 (130с).
3. Сбойчаков, В.Б. Эпидемиология, клиника и лабораторная диагностика бактериальных и вирусных диарей / В.Б. Сбойчаков, С.М. Захаренко, Ю.П. Финогеев, В.Ф. Крумгольц // Лечение и профилактика. - 2012. - № 3. - С. 77-81.
4. Кураззева, А.В. Состояние кишечного микробиоценоза телят при острых кишечных расстройствах / А.В. Куразеева, В.А. Коноплёв, Л.А. Лаврушина, И.С. Шульга // Вестник Красноярского государственного аграрного университета. - 2015. - № 12. - С. 173-177.
5. Куриленко, А.Н. Бактериальные и вирусные болезни молодняка сельскохозяйственных животных / А.Н. Куриленко, В.Л. Крупальник, Н.В. Пименов. - М.: Колосс, 2005. – С. 35-36 (296 с).
6. Феоктистова, Н.А. Выделение и изучение биологических свойств бактериофагов рода *Proteus*, конструирование на их основе биопрепарата и разработка параметров практического применения: автореф. дис. ...канд. биол. наук: 03.00.07, 03.00.23 / Феоктистова Наталья Александровна. – Саратов, 2006. – С.8–10 (21с).
7. Феоктистова, Н.А. Методы выделения бактериофагов рода *Bacillus* / Н.А. Феоктистова, В.А. Макеев, М.А. Юдина, А.И. Калдыркаев // Вестник ветеринарии. - 2011.- № 4 (59). - С. 88-89.
8. Феоктистова, Н.А. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов бактерий *Bacillus subtilis* / Н.А. Феоктистова / В книге: «Бактериофаги микроорганизмов значимых для животных, растений и человека». - Ульяновск, НИИЦМиБ, 2013. - 315 с.
9. Юдина, М.А. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов бактерий вида *Bacillus mesentericus* / М.А. Юдина, Н.А. Феоктистова // В книге: «Бактериофаги микроорганизмов значимых для животных, растений и человека». - Ульяновск, 2013. - 315 с.
10. Романова, Н.А. Сравнительная эффективность методов выделения фагов *Bacillus megaterium* / Н.А. Романова, Н.А. Феоктистова, С.Н. Золотухин, Д.А. Васильев // Вестник ветеринарии. – 2013. - № 1 (64). – С. 26-27.
11. Климушкин, Е.И. Выделение бактериофагов, специфичных к *Bacillus anthracis* / Е.И. Климушкин, Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев [и др.] // БиоКиров-2015: сборник материалов III Международного форума. [Электронный ресурс]. - 2015. - С. 10-12.
12. Золотухин Сергей Николаевич. Создание и разработка схем применения диагностических биопрепаратов на основе выделенных и изученных бактериофагов энтеробактерий : автореф. дисс. ... доктора биологических наук : 03.00.23 03.00.07 / С.Н. Золотухин. - Ульяновск, 2007. – 39 с.
13. Пульчеровская, Л.П. Бактериофаги *Citrobacter* в окружающей среде / Л.П. Пульчеровская, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин, Е.О. Ефрейтова // Агробизнес и экология. - 2015. - Т. 2. - № 2. - С. 183-185.
14. Пульчеровская, Л.П. Выделение и селекция бактериофагов рода *Citrobacter* / Л.П. Пульчеровская, С.Н. Золотухин, Д.А. Васильев // Вестник ветеринарии. - 2002. - № 5. - С. 85.

## ISOLATION OF BACTERIOPHAGES OF THE PROTEUS GENUS AND SELECTION OF GROWTH PARAMETERS

**Feoktistova N.A., Vasiliev D.A., Zolotukhin S.N.**  
**FSBEI VO Ulyanovsk SAA**  
**432017, Ulyanovsk, Novyi Venets Boulevard, 1;**  
**8 (8422) 55-95-47 E-mail: feokna@yandex.ru**

**Keywords:** bacteriophage, Proteus, method, parameters, growth, means.

The article describes the research results of isolation of bacteriophages specific for bacteria of the Proteus genus, and selection of suitable cultivation parameters. Studies have been carried out to detect bacteriophages specific for Proteus vulgaris and Proteus mirabilis bacteria by means of induction method out of 16 Proteus samples we isolated before. Negative results were obtained. Eight bacteriophages specific for bacteria of the Proteus genus were isolated out of 94 samples of sanitary inspection of farms that have high risks of gastrointestinal diseases (waste water, excrements, cell washings, soil from the farm territory). The method of bacteriophage isolation was modified: when phage was isolated from objects of veterinary and sanitary supervision according to the classical method of Goldfarb, D.M. (1961), the centrifugate seeding stage by the agar-layer technique according to Gracia (1936) was replaced in the study record by the Otto seeding stage named "dripping droplet". Selection of Proteus bacteriophages was carried out by means of ninefold passaging of isolated negative colonies on meat infusion agar with subinoculation on meat infusion broth. The most suitable correlation is 1: 1, i.e. 0,2 ml of phage per 0,2 ml of indicator culture. The passage time is 3,5 hours of incubation at a temperature of  $36 \pm 2$  °C. Three methods were used to purify phages from bacterial cells: treatment with chloroform (trichloromethane), heating and filtration with application of membrane filters made by Millipore Millex-GP. It is stated that the most effective is the multi-filtration method: brightening microfiltration through membranes of Vladipor MAFAS-OS-3 brand with a pore size of 0,8 µm, then MAFAS-OS-2 with a pore size of 0,45 µm, then sterilizing filtration by "Millipore Millex -GP" with a pore diameter of 0,22 µm.

### Bibliography

1. Voitenko, L.G. Influence of microbial factor on occurrence of latent endometritis of cows / L.G. Voitenko, T.I. Lapina, I.A. Golovan, D.I. Shilin // Izvestiya of Samara State Agricultural Academy. - 2015. - № 1. - P. 23-25.
2. Zolotukhin, S.N. Little-studied enterobacteria and their role in animal pathology: monograph / S.N. Zolotukhin. - Ulyanovsk: Copiring, 2004. - 130 p.
3. Sboichakov, V.B. Epidemiology, clinical picture and laboratory diagnostics of bacterial and viral diarrhea / V.B. Sboichakov, S.M. Zakharenko, Y.P. Finogeev, V.F. Krumholtz // Treatment and prevention. - 2012. - № 3. - P. 77-81.
4. Kurazzeva, A.V. The state of intestinal microbiocenosis of calves in case of acute intestinal disorders / A.V. Kurazzeva, V.A. Konoplyov, L.A. Lavrushina, I.S. Shulga // Vestnik of Krasnoyarsk State Agrarian University. - 2015. - № 12. - P. 173-177.
5. Kurilenko, A.N. Bacterial and virus diseases of young animals of agricultural animals / A.N. Kurilenko, V.L. Krupalnik, N.V. Pimenov. - Moscow: Koloss, 2005. - 296 p.
6. Feoktistova, Natalia Alexandrovna. Isolation and study of biological properties of bacteriophages of Proteus genus, design of a bio compound on their basis and parameter development of practical application: the author's abstract of dissertation of Candidate of Biology: 03.00.07, 03.00.23 / N.A. Feoktistova. - Saratov, 2006. - P.8-10 (21p).
7. Feoktistova, N.A. Methods of isolating bacteriophages of Bacillus genus / N.A. Feoktistova, V.A. Makeev, M.A. Yudina, A.I. Kaldyrkaev // Vestnik of veterinary medicine. - 2011. - № 4 (59). - P. 88-89.
8. Feoktistova, N.A. Isolation and study of the basic biological properties of bacteriophages of Bacillus subtilis bacteria. / N.A. Feoktistova // In the book: "Bacteriophages of microorganisms significant for animals, plants and humans." - Ulyanovsk, SRICMB, 2013. - 315 p.
9. Yudina, M.A. Isolation and study of the basic biological properties of bacteriophages of bacteria of Bacillus mesentericus genus/ M.A. Yudina, N.A. Feoktistova // In the book: "Bacteriophages of microorganisms significant for animals, plants and humans." - Ulyanovsk, 2013. - 315 with.
10. Romanova, N.A. Comparative effectiveness of methods for isolation of Bacillus megaterium phages / N.A. Romanova, N.A. Feoktistova, S.N. Zolotukhin, D.A. Vasiliev // Vestnik of veterinary medicine. - 2013. - № 1 (64). - P. 26-27.
11. Klimushkin, E.I. Isolation of bacteriophages specific for Bacillus anthracis / E.I. Klimushkin, N.A. Feoktistova, D.A. Vasiliev [et al] // BioKirov-2015: a digest of materials of the III International Forum. [Electronic resource]. - 2015. - P. 10-12.
12. Zolotukhin Sergey Nikolaevich. Development of schemes for application of diagnostic biocompounds based on isolated and studied enterobacteria bacteriophages: author's abstract of dissertation of Doctor of Biology: 03.00.23 03.00.07 / S.N. Zolotukhin. - Ulyanovsk, 2007. - 39 p.
13. Pulcherovskaya, L.P. Citrobacter bacteriophages in the environment / L.P. Pulcherovskaya, D.A. Vasiliev, S.N. Zolotukhin, E.O. Efreitorova // Agrobusiness and ecology. - 2015. - V. 2. - № 2. - P. 183-185.
14. Pulcherovskaya, L.P. Isolation and selection of bacteriophages of the Citrobacter genus / L.P. Pulcherovskaya, S.N. Zolotukhin, D.A. Vasiliev // Vestnik of veterinary medicine. - 2002. - № 5. - P. 85.