

логические исследования амфибий в Вологодской области / Радченко Н.М., Шабунин А.А. // Паразитология XXI века – проблемы, методы, решения: Материалы IV Всероссийского Съезда Паразитологического общества при Российской академии наук, состоявшегося 20-25 октября 2008 г. в Зоологическом институте Российской академии наук в Санкт-Петербурге. – Т.3. – С.-Петербург, 2008. – С.72-75.

5. Ручин А.Б. Трофическая роль озерной лягушки *Rana ridibunda* (Anura, Ranidae) в околородных экосистемах / Ручин А.Б., Рыжов М.К. // Биоразнообразие и роль зооценоза в естественных и антропогенных эко-

системах: Мат-лы II международной научной конференции. – Днепропетровск, 2003. – С.247-248.

6. Рыжиков К. М., Шарпило В. П., Шевченко Н.Н. Гельминты амфибий фауны СССР. – М.: Наука, 1980. – 279 с.

7. Rapport, D.J., Howard, J., Lannigan, R., McMurtry, R., Jones, D.L., Anjema, C.M., Bend, J. R. Introducing ecosystem health into undergraduate medical education. / Conservation medicine. Ecological health in practice (ed. A.A. Aguirre, R.S. Ostfeld, G.M. Tabor, C. House, M.C. Pearl). Oxford, Oxford University Press, 2002. – P. 345–360.

УДК 619:578

ИЗУЧЕНИЕ БАКТЕРИЦИДНОГО И БАКТЕРИОСТАТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ТЕОТРОПИНА НА МИКРООРГАНИЗМЫ РАЗЛИЧНОЙ МОРФОЛОГИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ

Д.А. Васильев, доктор биологических наук, профессор

И.Н. Хайруллин, доктор ветеринарных наук, профессор

С.Н. Золотухин, доктор биологических наук, профессор

Н.А. Феоктистова, кандидат биологических наук, доцент

Н.Х. Курьянова, аспирант

ФГОУ ВПО «Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия»

тел. 8(422)55-95-47

feokna@yandex.ru

В статье дана характеристика препарата теотропина. Описано бактериостатическое и бактерицидное действие теотропина на бактерии видов *Listeria monocytogenes*, *Ornithobacterium rhinotracheale*, *Staphylococcus aureus*. Эмпирическим путем подобраны дозы препарата, временные экспозиции для полной инактивации вышеназванных микроорганизмов.

Ключевые слова: теотропин, бактериостатическое и бактерицидное действие, *Listeria monocytogenes*, *Ornithobacterium rhinotracheale*, *Staphylococcus aureus*.

Введение

Изучение антибактериальных и антивирусных свойств соединений различных классов, с целью разработки новых нетоксичных, высокоэффективных, экологически безопасных консервантов и инактиваторов для изготовления биопрепаратов представляет собой весьма актуальную задачу современной биотехнологии [2,4,6].

Инактивирование с целью получения антигена для вакцин из убитых штаммов микроорганизмов в то же время должно со-

хранить иммуногенные структуры возбудителя в возможно более неизменном виде. Поэтому прикладные исследования в разработке инактивированных вакцин направлены прежде всего на постоянный поиск «идеального» способа инактивации.

Для решения этой проблемы необходимо изыскание оптимальных средств и методов, которые бы необратимо повреждали имеющиеся в нуклеиновых кислотах возбудителя структуры и информации, ответственные за размножение, но оставляли

контактными антигенные структуры белково-полисахаридных молекул, ответственных за иммуногенность [1,3,7].

Применяемые для этой цели химические соединения типа формальдегида обладают остаточным действием, которое приходится устранять дополнительными реактивами, что усложняет технологию изготовления вакцинных биопрепаратов.

Теотропин – стабильное при хранении и нагревании вещество (плавится без разложения при температуре 194-196°C, стабилен при хранении в сухом виде и температуре не выше 40°C в течение не менее 10 лет – срок наблюдения). Он представляет собой порошок желтоватого цвета со слабым специфическим запахом или без запаха в зависимости от степени очистки. Хорошо растворим в воде (насыщенный раствор имеет концентрацию свыше 50%), спирте, ацетоне, рН 10 %-ого водного раствора в пределах 9,3-9,5. Теотропин не раздражает кожи и слизистых оболочек глаз, дыхательных путей, мочеполовой системы. Для приготовления концентрированных растворов и работы с ними следует использовать резиновые перчатки, для работы с разбавленными растворами специальных мер предосторожности не требуется, кроме предотвращения приема внутрь больших количеств раствора. При попадании в глаза их следует промыть водой и раствором борной кислоты, поскольку растворы теотропина обладают слабощелочным рН [5,8,9].

Отсутствие раздражающего и токсического действия теотропина на организм теплокровных животных делает его перспективным препаратом как возможного средства для инактивации вакцинных штаммов микроорганизмов.

Целью наших исследований являлось изучение бактерицидного и бактериостатического действия теотропина на микроорганизмы различной морфологической структуры при его применении как возможного инактивирующего препарата на производственные штаммы бактерий в технологии изготовления инактивированных вакцин.

Материалы и методы

Оборудование: холодильный бытовой, термостат ТС-80М-2; микроскопы МБИ-3; центрифуги лабораторные ОПн-8УХЛ4,2 и ЦЛС-3, весы чашечные с разновесами, су-

шильный шкаф, машина для изготовления ватных пробок; водяная баня, колбы мерные емкостью 50, 100, 250, 500, 1000 см³; пипетки пастеровские, пипетки мерные на 1,0; 2,0; 5,0; 10 см³; флаконы емкостью 50, 100, 200 см³; стекла покровные, стекла предметные, чашки Петри, пробирки, стандарты мутности на 0,5 и 1,0 млрд. микробных клеток, термометры ртутные, фарфоровая ступка с пестиком.

Для бактериологического исследования использовали следующие питательные среды и реактивы: мясопептонный бульон (НПО «Питательные среды», г.Махачкала), мясо-пептонный агар (ГНЦ прикладной микробиологии, г. Оболенск), желточно-солевой агар, глюкоза, теотропин.

Бактериостатическую и бактерицидную концентрации теотропина определяли методом их серийных разведений согласно «Методическим указаниям по отбору, испытаниям и оценке антивирусных и антибактериальных химиопрепаратов среди соединений различных химических классов» (Москва, 2004), а также «Методическим указаниям по определению чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. МУК 4.2.1890-04».

Концентрацию препарата теотропина в бактериальных суспензиях доводили до следующих величин: 5 мг/мл; 7,5 мг/мл; 10,0 мг/мл. Концентрацию бактерий в 1 мл физиологического раствора доводили до величины 10¹⁰ микробных тел по результатам титрования. Данная концентрация бактериальной суспензии не превышает одну дозу инактивированной бактериальной вакцины, что позволяло, при наличии положительных результатов, указать на возможность использования теотропина в качестве инактиватора.

В эксперименте были использованы следующие виды бактерий, имеющие разную морфологию, строение и химический состав клеточной стенки: грамотрицательная палочка - *Ornithobacterium rhinotracheale*, грамположительная палочка *Listeria monocytogenes*, кокковая культура *Staphylococcus aureus*.

Бактериальную массу нарабатывали на оптимальных для микроорганизмов питательных средах, трёхкратно центрифугировали при 3000 об./мин в течение 30 минут,

освобождая от питательной среды, и доводили до указанной концентрации. В полученную бактериальную суспензию добавляли раствор препарата теотропина с учётом вышеуказанных его конечных концентраций. Посевы микроорганизмов и учет результатов исследований проводили в соответствии с рекомендациями, указанными в вышеупомянутых методических указаниях.

Результаты исследований

Бактериостатическое действие теотропина проверяли методом контрольного высева бактериальных культур, взаимодействующих с изучаемым препаратом в различные промежутки времени от 1 до 18 часов, с интервалом 1 час, без освобождения их от буферного раствора, содержащего препарат.

Бактерицидную активность теотропина определяли методом контрольного высева бактериальной суспензии после освобождения её от буферного раствора, содержащего препарат, используя те же временные параметры.

Методом центрифугирования при 3000 об./мин осаждали бактериальные клетки, надосадок с теотропином удаляли, осадок ресуспендировали в свободном от препарата физиологическом растворе и центрифугировали при вышеуказанных параметрах. Данную процедуру повторяли двукратно. После последнего ресуспендирования и часовой экспозиции раствора с бактериями высевали на плотные питательные среды. Отсутствие бактериального роста в течение трёх суток наблюдения (при положительном контроле с интактными штаммами) означает, что данная доза препарата при используемой экспозиции обладает бактерицидным действием.

Результаты исследований свидетельствуют, что изучаемый препарат в концентрации 5,0 и 7,5 мг/мл обладал бактериостатическим, но не бактерицидным действием за время экспозиции 18 часов на все штаммы изученных микроорганизмов (табл. 1-3).

Бактериостатический эффект на штамм *Ornithobacterium rhinotracheale* начинал проявляться при концентрации теотропина 5,0 мг/мл через 4 часа, на штаммы *Listeria monocytogenes* и *Staphylococcus aureus* – через 5 часов.

При концентрации теотропина 7,5 мг/

мл бактериостатическое действие на штамм *Ornithobacterium rhinotracheale* проявилось через 2 часа, на штаммы *Listeria monocytogenes* и *Staphylococcus aureus* – через 3 часа.

Теотропин в концентрации 10,0 мг/мл оказывал бактериостатическое действие на штамм *Ornithobacterium rhinotracheale* и *Listeria monocytogenes* уже через 2 часа, на штаммы и *Staphylococcus aureus* – через 3 часа.

Бактерицидные свойства теотропина в концентрации раствора 10 мг/г проявились для микроорганизмов вида *Ornithobacterium rhinotracheale* через 16, а для видов *Listeria monocytogenes* и *Staphylococcus aureus* через 18 часов.

Полученные результаты согласуются с литературными данными разных авторов о более высокой толерантности к физико-химическим воздействиям грамположительных микроорганизмов по сравнению с грамотрицательными.

Таким образом, в результате проведенных исследований нами установлено, что препарат теотропин в дозе 5,0 мг/мл при концентрации бактерий в 10^{10} /мл после 5-часовой экспозиции обладает бактериостатическим действием по отношению к бактериальным культурам как грамотрицательных, так и грамположительных микроорганизмов.

Концентрация препарата 7,5 мг/мл является бактериостатической для всех штаммов при 3-х часовой экспозиции.

Препарат в концентрации 10,0 мг/мл после 18-ти часовой экспозиции с бактериальными культурами проявил бактерицидность для всех изучаемых микроорганизмов.

Заключение

Полученные данные позволяют утверждать, что изучаемый препарат теотропин в концентрации 10,0 мг/мл и экспозиции 18 часов можно использовать в качестве ингибитора при производстве инактивированных вакцин из штаммов как грамотрицательных, так и грамположительных вегетативных форм микроорганизмов. При условии, что у убитых бактерий будут сохраняться иммуногенные свойства и отсутствовать отрицательное влияние на организм теплокровных животных: иммунодепрессия, токсичность, аллергия и другие свойства, которые учитывают при контроле качества изготовленных

Таблица 1

Бактериостатическое и бактерицидное действие теотропина на штамм *Ornithobacterium rhinotracheale*, в зависимости от концентрации раствора и экспозиции.

Концентрация тиопентала	Экспозиции (час)																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
5,0 мг/мл	-	-	-	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
7,5 мг/мл	-	-	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
10,0 мг/мл	-	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	+	+	+

«-» - отсутствие бактериостатического и бактерицидного действия

«+» - бактерицидное действие

«±» - бактериостатическое действие

Таблица 2

Бактериостатическое и бактерицидное действие теотропина на штамм *Listeria monocytogenes*, в зависимости от концентрации раствора и экспозиции.

Концентрация тиопентала	Экспозиция (час)																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
5,0 мг/мл	-	-	-	-	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
7,5 мг/мл	-	-	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
10,0 мг/мл	-	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	+	+

«-» - отсутствие бактериостатического и бактерицидного действия

«+» - бактерицидное действие

«±» - бактериостатическое действие

Таблица 3

Бактериостатическое и бактерицидное действие теотропина на штамм *Staphylococcus aureus*, в зависимости от концентрации раствора и экспозиции.

Концентрация тиопентала	Экспозиция (час)																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
5,0 мг/мл	-	-	-	-	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
7,5 мг/мл	-	-	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
10,0 мг/мл	-	-	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	+

«-» - отсутствие бактериостатического и бактерицидного действия

«+» - бактерицидное действие

«±» - бактериостатическое действие

биопрепаратов.

Библиографический список

1. Аржаков, В.Н. Дезинфекция и ее место в системе противозооотических мероприятий / В.Н.Аржаков, Н.В. Аржаков // БИО - 2003. - №7. - С. 9-21.

2. Власов Н.А., Васильев Д.А., Козин А.И. Антибиотики и химиопрепараты для борьбы с инфекционными болезнями животных (Новые методы в профилактике и лечении инфекционных болезней) - Ульяновск, 1997. - С.22.

3. Высоцкий, А.Э. Бактерицидная

активность и токсикологическая характеристика дезинфицирующего препарата КД/ А.Э.Высоцкий // Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии: сб. науч. тр. ВНИИВСГЭ.Т.117. - М., 2005. - С.183-195.

4. Высоцкий, А.Э. Сравнительная биоцидная активность дезинфектанта «Сандим-Д» / А.Э.Высоцкий // Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии: сб. науч. тр. ВНИИВСГЭ. Т.117. - М., 2006. -С.176-182.

5. Каштанов, А.В. Исследование бактерицидной и дезинфицирующей активности препарата однохлористый йод /

А.В.Каштанов // Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии: сб. науч. тр. Всероссийского научно-исследовательского института ветеринарной санитарии, гигиены и экологии. Т.115. –М., 2003. –С.242-249.

6. Костюкова, Т.А. Практические аспекты выбора дезинфекционных средств / Т.А.Кострюкова, М.Н. Ляпин, Т.А. Малюкова // Санитарная охрана территорий государств СНГ: проблемы биологической безопасности и противодействия биотерроризму в современных условиях: материалы VI Межгосударственной науч.- практ. конф. государств-участников СНГ. – Волгоград. - 2005. - С. 249-250.

7. Попов, Н.И. Новое дезинфицирующее средство Бианол для дезинфекции объектов ветеринарного надзора / Н.И.Попов, Г.Д.Волковской, С.А.Мичко // Проблемы ве-

теринарной санитарии, гигиены и экологии: сб. науч. трудов Всероссийского научно-исследовательского института ветеринарной санитарии, гигиены и экологии. Т. 115.-М., 2003. – С. 218-229.

8. Саврилов, М.Р. Изыскание средств дезинфекции при сибирской язве / М.Р. Саврилов // Проблемы мониторинга и генодиагностики инфекционных болезней животных: материалы Международной научной конференции молодых ученых, Владимир, 2004.- С.175-177.

9. Шандала, М.Г. Новые дезинфекционные технологии для профилактики инфекционных болезней / М.Г.Шандала // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2006. - №4. - С.15-17.

УДК 619:578

ХАРАКТЕРИСТИКА БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БАКТЕРИОФАГОВ ВИДА *BACILLUS SUBTILIS*

Д.А. Васильев, доктор биологических наук, профессор

С.Н. Золотухин, доктор биологических наук, профессор

И.Н. Хайруллин, доктор ветеринарных наук, профессор

Н.А. Феоктистова, кандидат биологических наук, доцент

А.И. Калдыркаев, ассистент

М.А. Юдина, аспирант

А.Х. Мустафин, аспирант

ФГОУ ВПО «Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия»

тел. 8(422)55-95-47

feokna@yandex.ru

В статье дана характеристика основных биологических свойств бактериофагов вида *Bacillus subtilis* (морфология негативных колоний, литическая активность, спектр литической активности, специфичность действия, температурная устойчивость, устойчивость к хлороформу, изменение литической активности при хранении). На основании изученных свойств были отобраны фаги для конструирования биопрепарата для фагоиндикации и фагоидентификации бактерий вида *Bacillus subtilis* в объектах санитарного надзора.

Ключевые слова: бактериофаги, *Bacillus subtilis*, морфология негативных колоний, литическая активность, спектр литической активности, специфичность действия, температурная устойчивость, устойчивость к хлороформу, изменение литической активности при хранении.