

УДК 619:579

**ИЗУЧЕНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ БАКТЕРИОФАГОВ
БАКТЕРИЙ AEROMONAS HYDROPHILA
К ТЕМПЕРАТУРНОМУ ВОЗДЕЙСТВИЮ
И ОБРАБОТКЕ ХЛОРОФОРМОМ**

Насибуллин И.Р., соискатель,
Викторов Д.А., кандидат биологических наук, старший
научный сотрудник,*
Швиденко И.Г., доктор медицинских наук, профессор,**
Нафеев А.А., доктор медицинских наук, профессор,*
Горшков И.Г., соискатель,*
Куклина Н.Г., соискатель,*
Васильев Д.А., доктор биологических наук, профессор*
*ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина»
**ГБОУ ВПО «Саратовский ГМУ имени В.И. Разумовского*

Ключевые слова: *Aeromonas hydrophila, активность, бактериофаги, инактивация, способы обработки, температура, устойчивость, хлороформ.*

*В данной статье представлены результаты изучения устойчивости выделенных бактериофагов бактерий *Aeromonas hydrophila* к температурному воздействию и обработке хлороформом.*

Введение. Бактерии рода *Aeromonas* широко распространены в окружающей среде и известны как возбудители аэромоноза – инфекционного заболевания многих видов рыб и других гидробионтов. Аэромоноз встречается повсеместно и наносит значительный экономический ущерб рыбоводческим хозяйствам. Контаминированная аэромонадами рыбная продукция представляет собой источник серьезных заболеваний человека и животных [6].

Ранняя и надежная идентификация микроорганизмов является важным фактором в лечении и профилактике заболеваний. Существующие методики лабораторной идентификации аэромонадной инфекции требуют больших затрат времени, средств и высокой квалификации работников.

Метод фагодиагностики является быстрым, менее трудоемким и доступным для лабораторий любого уровня. Строгая специфичность бактериофагов позволяет дифференцировать не только отдельные виды, но и серологически неотличимые штаммы в пределах одного вида [2,3,4].

Для работы с бактериофагами при их выделении, изучении биологических свойств и применении с диагностической целью важным этапом исследования является подбор метода инактивации жизнеспособных бактерий в фаголизате. Применяемый для этих целей метод не должен снижать литическую активность бактериофагов [1,2,3,4,5]

Цель и задачи исследования. Целью наших исследований явилось изучение устойчивости выделенных бактериофагов бактерий *Aeromonas hydrophila* к температурному воздействию и обработке хлороформом.

Материалы и методы. В работе использовали 5 бактериофагов бактерий *Aeromonas hydrophila*, выделенных из окружающей среды, 1 референс-штамм *Aeromonas hydrophila* Ahd, полученный из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы Ульяновской ГСХА.

Определение температурной устойчивости бактериофагов проводили по следующей методике: 11 пробирок с фагом в разведении от 10^{-1} до 10^{-10} БОЕ/мл прогревали на водяной бане в течение 30 минут при температуре от 58 °С до 66 °С с интервалом 2 °С. Контрольные пробирки с фагами не прогревали.

После прогревания активность бактериофагов определяли по методу Грациа. Учет результатов проводили после 12-18 часового термостатирования чашек при температуре 28 °С. [1,3,4,5].

Для определения чувствительности бактериофагов к воздействию хлороформа 11 пробирок в разведении от 10^{-1} до 10^{-10} БОЕ/мл с каждым фагом в МПБ обрабатывали хлороформом в соотношении 1:10 при постоянном встряхивании в течение 15, 30 и 40 минут. Контролем служили пробирки с фагами, необработанные хлороформом. После воздействия хлороформа активность бактериофагов определяли по методу Грациа [1,3,4,5,7].

Результаты исследований. В результате исследований было установлено, что прогревание пробирок с бактериофагом при температуре 60-62 °С значительно снижало активность фагов. Дальнейшее повышение температуры приводило к резкому снижению активности фагов. Воздействие температуры выше 64 °С полностью инактивировало все изучаемые бактериофаги (таб. 1, рис. 1).

Таким образом, температурное воздействие не представляется возможным с целью очищения фаголизатов от жизнеспособных бактерий.

Таблица 1 – Температурная устойчивость бактериофагов *A. hydrophila*

| Температурный режим, °С | Активность штаммов, подвергнутых температурной обработке, БОЕ/мл | | | | | |
|--------------------------|--|---|---|---|---|---|
| | ИШ | Фаг-43 | Фаг -1п | Фаг-43г | Фаг-13 | Фаг-ahd |
| 58-60 | 2,0x10 ⁸ ±0,2x10 ⁸ | 2,0x10 ⁸ ±0,4x10 ⁸ | 3,0x10 ⁶ ±0,6x10 ⁶ | 2,0x10 ⁷ ±0,5x10 ⁷ | 4,0x10 ⁵ ±0,3x10 ⁵ | 3,0x10 ⁷ ±0,4x10 ⁷ |
| 60-62 | 1,0x10 ⁸ ±0,3x10 ⁸ | 1,0x10 ⁸ ±0,5x10 ⁸ | 1,0x10 ⁵ ±0,7x10 ⁵ | 1,0x10 ⁶ ±0,2x10 ⁶ | 1,0x10 ⁴ ±0,4x10 ⁴ | 1,0x10 ⁶ ±0,5x10 ⁶ |
| 62-64 | - | 3,0x10 ⁷ ±0,4x10 ⁷ | - | 2,0x10 ⁵ ±0,6x10 ⁵ | - | 2,0x10 ⁵ ±0,3x10 ⁵ |
| 64-66 | - | - | - | - | - | - |
| Контроль (без обработки) | 4,0x10 ⁸ ±0,2x10 ⁸ | 2,0x10 ⁸ ±0,5x10 ⁸ | 4,0x10 ⁶ ±0,4x10 ⁶ | 3,0x10 ⁷ ±0,3x10 ⁷ | 5,0x10 ⁵ ±0,6x10 ⁵ | 1,0x10 ⁸ ±0,2x10 ⁸ |

Примечание: «иш»-индикаторный бактериальный штамм *Aeromonas hydrophila*

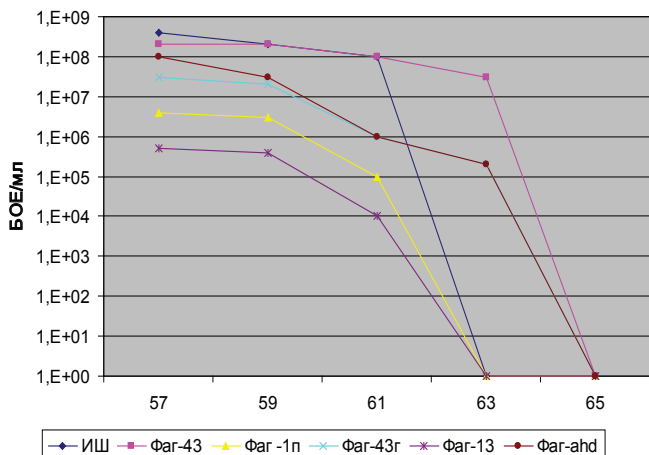


Рисунок 1 - Температурная устойчивость бактериофагов *Aeromonas hydrophila*

Результаты исследований устойчивости фагов к воздействию хлороформа показали, что наблюдаются существенные изменения количества БОЕ в 1 мл при обработке хлороформом. Данные опытов позволяют сделать вывод о чувствительности изучаемых бактериофагов к обработке хлороформом. Воздействие хлороформом на культуру индикаторного

штамма *Aeromonas hydrophila* Ahd в течении 15 минут приводила к их полной инактивации (таб. 2, рис. 2).

Таблица 2 – Устойчивость бактериофагов *A. hydrophila* к воздействию хлороформа

| Время воздействия хлороформа, мин | Активность штаммов подвергнутых обработке хлороформом, БОЕ/мл | | | | | |
|-----------------------------------|---|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| | ИШ | Фаг-43 | Фаг-1п | Фаг-43г | Фаг-13 | Фаг-ahd |
| 15 | - | $4,0 \times 10^5 \pm 0,2 \times 10^5$ | $5,0 \times 10^2 \pm 0,4 \times 10^2$ | $5,0 \times 10^3 \pm 0,3 \times 10^3$ | $7,0 \times 10^2 \pm 0,2 \times 10^2$ | $3,0 \times 10^4 \pm 0,5 \times 10^4$ |
| 30 | - | - | - | $4,0 \times 10^2 \pm 0,3 \times 10^2$ | - | $3,0 \times 10^2 \pm 0,5 \times 10^2$ |
| 45 | - | - | - | - | - | - |
| Контроль | $4,0 \times 10^8 \pm 0,3 \times 10^8$ | $2,0 \times 10^8 \pm 0,4 \times 10^8$ | $4,0 \times 10^6 \pm 0,5 \times 10^6$ | $3,0 \times 10^7 \pm 0,3 \times 10^7$ | $5 \times 10^5 \pm 0,2 \times 10^5$ | $1,0 \times 10^8 \pm 0,4 \times 10^8$ |

Примечание: «иш»-индикаторный бактериальный штамм *Aeromonas hydrophila*

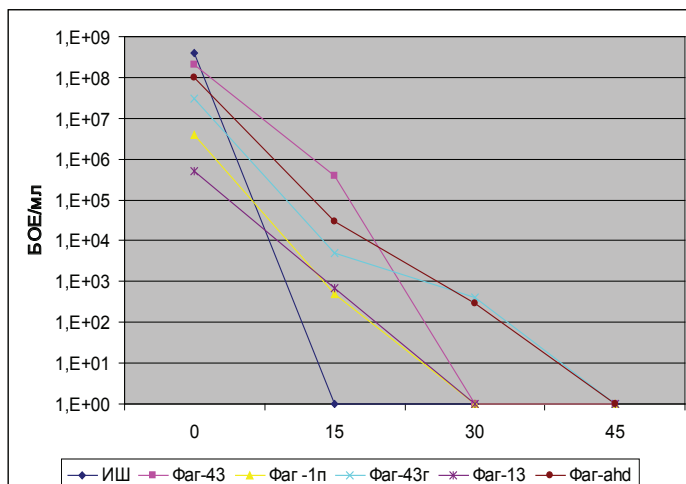


Рисунок 2 - Устойчивость бактериофагов *A. hydrophila* к воздействию хлороформа

В связи с тем, что изучаемые бактериофаги не устойчивы к обработке хлороформом, его применение для освобождения фаголизатов от жизнеспособных бактерий неэффективно.

Выводы. В ходе работы была изучена устойчивость выделенных бактериофагов бактерий *Aeromonas hydrophila* к температурному воз-

действию и обработке хлороформом. Проведенные опыты показали, что изучаемые бактериофаги чувствительны к обработке хлороформом, а также резистентны к воздействию температуры до 61 °С.

Библиографический список:

1. Адамс М. Бактериофаги (перевод с английского) // - М., - 1961 . - 521 с.
2. Викторов Д.А. Усовершенствование методов выделения, идентификации и индикации бактерий *Pseudomonas putida* // Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Саратов. – 2011. – 22 с.
3. Викторов, Д.А. Выделение и изучение биологических свойств бактериофагов *Pseudomonas fluorescens* / Д.А. Викторов, А.М. Артамонов, Д.А. Васильев // Ветеринария и кормление. – Москва: «ВЕТКОРМ», 2012. – №5. – С. 8-9.
4. Ганюшкин В.Я. Бактериофаги сальмонелл и их применение в ветеринарии // Учебное пособие - Ульяновск.- 1988.- с. 45.
5. Гольдфарб Д.М. Бактериофагия. // - М., Медгиз. – 1961.- с 297.
6. Ревенко И.П. Бактериофаги и их использование в ветеринарной практике. - Киев: «Урожай» . – 1978. – с. 20-21.
7. Michael Janda and Sharon L. Abbot The Genus *Aeromonas*: Taxonomy, Pathogenicity, and Infection / Michael Janda, L. Abbott // *Clinical Microbiology Reviews*, Jan.-2010.-P.35-73

STUDYING THE STABILITY OF AEROMONAS HYDROPHILA BACTERIA BACTERIOPHAGES TO TEMPERATURE AND TREATED WITH CHLOROFORM

Nasibullin I.R., Viktorov D.A., Shvidenko I.G., Nafeev A.A., Gorshkov I.G., Kuklina N.G., Vasilev D.A.,

Keywords: *Aeromonas hydrophila*, activity, bacteriophage, inactivation, treatments, temperature, resistance, chloroform.

*This article presents the results of studies on the stability of bacteriophages isolated the bacterium *Aeromonas hydrophila* temperature and chloroform.*