

УДК 619:616.98

СЕЛЕКЦИЯ ВЫДЕЛЕННЫХ БАКТЕРИОФАГОВ *PROTEUS VULGARIS* И *PROTEUS MIRABILIS* И ИЗУЧЕНИЕ ИХ ЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

Шкаликова М.В., 4 курс, факультет ветеринарной медицины

Научный руководитель: к.б.н., доцент Феокистова Н.А.

ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина»

Ключевые слова: бактериофаги, литическая активность, селекция, метод Аппельмана и Грация, индикаторная культура.

Создание экологически чистого препарата точечного действия для лечения и профилактики протейной инфекции – это чрезвычайно актуальная проблема современной фармации. Бактерии рода *Proteus* являются возбудителями внутрибольничных инфекций, энтеритов у детей и взрослых людей, способны вызывать воспалительные процессы мочевыводящих путей, быть причиной послеоперационных и ожоговых осложнений, сепсиса, дисбактериоза, токсикоинфекций и других заболеваний.

Целью наших исследований является селекция выделенных бактериофагов *Proteus vulgaris* и *Proteus mirabilis* и изучение их литической активности.

Материалы и методы: штаммы фагов бактерий рода *Proteus*, выделенные из фекалий молодняка сельскохозяйственных животных и сточных вод животноводческих хозяйств Ульяновской и Самарской областей.

Питательные среды и реактивы: МПА, МПБ, 0,04% спиртовой раствор генцианвиолета.

Оборудование: холодильники бытовые, ультратермостаты УТ-15У4,2; термостаты ТС-80М-2, центрифуги лабораторные ОПн-8УХЛ4,2 и ЦЛС-3, весы чашечные с разновесами, автоклав, шуттель-аппарат, сушильный шкаф, водяная баня, пипетки мерные на 1,0; 2,0; 5,0; 10 см³; флаконы емкостью 50, 100, 200 см³; стекла предметные, чашки Петри, пробирки.

Селекцию бактериофагов и повышение их литической активности проводили методом пассирования фага на индикаторной культуре с периодической отливкой типичных негативных колоний по методике, описанной И.М. Габриловичем (1992), С.Н. Золотухиным (1994).

Для этого, исследуемый бактериофаг засеивали по методу агаровых слоев по Грация, используя разведения 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , чтобы на питательной среде сформировались отдельные негативные колонии. После 16-часового культивирования в термостате одну негативную колонию, расположенную от других не менее чем в 10 мм, отливали бактериологической петлей на мясопептонный бульон, туда же вносили индикаторную культуру *Proteus* в количестве 0,2 мл. Одновременно ставился контроль: мясопептонный бульон, засеянный индикаторной культурой *Proteus* в количестве 0,2 мл. Пробирки культивировали в термостате при 37 °С в течение 4 часов. Полученный

фаголизат прогревали в водяной бане при 58-60 °С в течение 30 минут и исследовали методом агаровых слоев по Грациа, затем отбирали негативную колонию идентичную исходной, с которой вновь проводили такую же операцию.

Литическая активность выделенных протейных бактериофагов

Литическая активность бактериофага оценивается по его способности вызывать лизис бактериальной культуры в жидких или плотных питательных средах и выражает это тем максимальным разведением, в котором испытуемый бактериофаг проявил свое литическое действие. Более точным методом оценки литической активности бактериофага является определение количества активных корпускул фага в единице объема. Однако этот показатель относительный, так как активность фага зависит от различных условий, основными из которых являются биологические особенности бактериальной клетки, которые в свою очередь зависят от физических свойств среды, ее химического состава, окружающей температуры и так далее. Поэтому активность фага всегда определяется в конкретных, стандартных условиях.

Культуры бактерий *Proteus* для определения литической активности бактериофагов, выращивали на стандартном мясопептонном бульоне в течение 16-18 часов.

Литическую активность селекционированных бактериофагов определяли по методу Аппельмана и Грациа (Ревенко, 1978).

Определение литической активности фага по методу Аппельмана: в ряд пробирок из нейтрального стекла одинакового диаметра наливали по 4,5 мл бульона. В первую пробирку вносили 0,5 мл исследуемого протейного фага. Затем делали последовательные разведения, перенося отдельными пипетками из пробирки в пробирку по 0,5 мл бактериофага. Использовали 10 пробирок. Из последней пробирки 0,5 мл выливали в дезинфицирующий раствор, затем во все пробирки вносили по 0,2 мл 18-часовой индикаторной культуры. 11 и 12 пробирки являются контрольными, в первой из них находится МПБ и культура (без фага), во второй - один МПБ (контроль на стерильность). Все 12 пробирок помещали в термостат при 37 °С на 18 часов. Титр фага устанавливали по последней, прозрачной пробирке ряда и выражали разведением фага.

Также литическую активность определяли методом агаровых слоев по Грациа. Результаты исследований представлены в таблице 1.

Заключение: согласно данных таблицы 1, можно сделать вывод о том, что выделенные протейные бактериофаги обладали разной литической активностью в диапазоне от 10^{-5} до 10^{-8} , оценивая ее по Аппельману и от $2,1 \times 10^6$ до $2,0 \times 10^9$ (по Грациа). Максимальные показатели литической активности, определяемые по методу Аппельмана, составили 10^{-8} у фагов П-16 УГСХА и П-261 УГСХА, методом агаровых слоев (по Грациа) максимальные показатели были также у фагов П-16 УГСХА и П-261 УГСХА - она составила у фага П-16 УГСХА $2,0 \times 10^9$ и у фага П-261 УГСХА $1,8 \times 10^9$. Учитывая вышеизложенные результаты, фаги П-16 УГСХА и П-261 УГСХА могут быть выбраны для конструирования диагностического препарата.

Таблица 1 – Литическая активность протейных бактериофагов по Аппельману и Грациа

№ п/п	Название бактериофага	Титр по Аппельману	Титр по Грациа
1	П-1 УГСХА	10^{-6}	$3,0 \times 10^7$
2	П-2 УГСХА	10^{-7}	$2,0 \times 10^8$
3	П-3 УГСХА	10^{-6}	$3,6 \times 10^7$
4	П-4 УГСХА	10^{-7}	$2,4 \times 10^8$
5	П-5 УГСХА	10^{-6}	$4,0 \times 10^7$
6	П-6 УГСХА	10^{-7}	$1,0 \times 10^8$
7	П-7 УГСХА	10^{-6}	$6,0 \times 10^7$
8	П-8 УГСХА	10^{-5}	$2,1 \times 10^6$
9	П-9 УГСХА	10^{-6}	$1,8 \times 10^7$
10	П-10 УГСХА	10^{-7}	$5,0 \times 10^8$
11	П-11 УГСХА	10^{-7}	$6,0 \times 10^8$
12	П-12 УГСХА	10^{-6}	$5,0 \times 10^7$
13	П-261 УГСХА	10^{-8}	$1,8 \times 10^9$
14	П-14 УГСХА	10^{-7}	$1,4 \times 10^8$
15	П-15 УГСХА	10^{-6}	$2,0 \times 10^7$
16	П-16 УГСХА	10^{-8}	$2,0 \times 10^9$
17	П-17 УГСХА	10^{-6}	$2,4 \times 10^7$
18	П-18 УГСХА	10^{-7}	$1,4 \times 10^8$
19	П-19 УГСХА	10^{-6}	$2,0 \times 10^7$
20	П-20 УГСХА	10^{-6}	$3,2 \times 10^7$
21	П-21 УГСХА	10^{-6}	$5,0 \times 10^7$
22	П-22 УГСХА	10^{-7}	$2,7 \times 10^8$

Библиографический список.

1. Барт, Н.Г. Бактериофаги *Providencia* / Н.Г. Барт, С.Н. Золотухин, Д.А. Васильев / Материалы Международной научно-практической конференции «Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения», Ульяновск, 2009. – с.140-146.
2. Барт, Н.Г. Биологические свойства бактериофагов *Providencia* / Н.Г. Барт, С.Н. Золотухин, Д.А. Васильев / Материалы Международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы аграрной науки и образования», Ульяновск, 2009. – С.6-8.
3. Барт, Н.Г. Спектр литической активности бактериофагов *Providencia* / Н.Г. Барт, С.Н. Золотухин, Д.А. Васильев / Материалы V Международной научно-практической конференции «Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения». – Ульяновск: УГСХА им. П.А. Столыпина, 2013. – Т. II. – С.12-16.
4. 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.
5. Викторов, Д.А. Усовершенствование методов диагностики псевдомонозов рыб / Д.А. Викторов, Т.А. Гринева, Д.А. Васильев, А.М. Артамонов, С.Н. Золотухин // Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности: Материалы международной научно-практической конференции, Ульяновск, ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина», 23-25 апреля 2013. – Т. 1. – Ульяновск, 2013. – С. 162-164.

6. Викторов, Д.А. Усовершенствование методов выделения, идентификации и индикации бактерий *Pseudomonas putida* // Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Саратов. – 2011. – 22 с.
7. Васильев, Д.А. Выделение и идентификация *Bordetella bronchiseptica* от животных / Д.А. Васильев, А.В. Мاستиленко, Д.Г. Сверкалова, Ю.Б. Васильева // Естественные и технические науки. – 2010. - № 5. – С. 233-235.
8. Васильев, Д.А. Изучение основных биологических свойств бактериофагов *Bordetella bronchiseptica*, выделенных методом индукции / Д.А. Васильев, Е.Н. Семанина, С.Н. Золотухин, И.Н. Хайруллин, Ю.Б. Васильева, А.Г. Шестаков // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2011. - №1 (13). - С. 59–62.
9. Выделение бактериофагов *Listeria monocytogenes* методом индукции/ Е.Н. Ковалева, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин, Е.В. Сульдина, М.А. Имамов, И.Г. Швиденко // Вестник УГСХА. – 2013. - №1(21) – С. 45-49
10. Выделение и характеристика бактериофагов *Listeria monocytogenes* / Е.Н. Ковалева, Д.А. Васильев, Е.В. Сульдина, М.А. Имамов// Материалы международной научно-практической конференции "Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности". - Ульяновск: Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина, 2013, т.2 - С. 130-133
11. Изучение биологических свойств бактериофагов *Listeria* / Е.Н. Ковалева, Е.В. Сульдина, Д.А. Васильев, М.А. Имамов // Биотехнология: реальность и перспективы в сельском хозяйстве: Материалы Международной научно-практической конференции. – Саратов, 2013. – С. 125 – 127.
12. Перспективы применения бактериофагов *Listeria monocytogenes* / Е.Н. Ковалева, Е.В. Сульдина, М.А. Имамов [и др.] // Животноводство России в условиях ВТО: от фундаментальных исследований до высокопродуктивного производства: Материалы Международной научно-практической конференции молодых ученых, 9-11 апреля 2013. – Орел: Изд-во Орел ГАУ, 2013. – С. 181 – 184.
13. Фагоиндикация бактерий рода *Listeria* с целью мониторинга почвенных экосистем / Е.Н. Ковалева, Е.В. Сульдина, Д.А. Васильев [и др.] // Биодиагностика в экологической оценке почв и сопредельных сред: Тезисы докладов Международной конференции, Москва 4-6 февраля 2013 г. - М.: Бином, 2013. – С. 97.
14. Васильева, Ю.Б. Конструирование биопрепаратов для лабораторной диагностики бордетеллезной инфекции // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2013. - №2 (22). – С. 25-29.
15. Васильева, Ю.Б. Разработка методов фагодиагностики бордетеллеза // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2013. - №2 (22). – С.51-56.
16. Васильева, Ю.Б. Сравнительная характеристика методов лабораторной диагностики бордетеллеза // Современные проблемы науки и образования. – 2013. – № 4; URL: <http://www.science-education.ru/110-9751>.
17. Васильева, Ю.Б. Особенности биологии бактерий вида *Bordetella bronchiseptica* // Современные проблемы науки и образования. – 2013. – № 4; URL: <http://www.science-education.ru/110-9927>.
18. Васильева, Ю.Б. Новая тест-система идентификации возбудителя бордетеллеза – *Bordetella bronchiseptica* // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 10. – Ч.1.
19. Васильева, Ю.Б. Разработка методов детекции бактерий *Bordetella bronchiseptica* // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2013. - № 3 (23). - С. 46-51.
20. Васильева, Ю.Б. Фаги бактерий *Bordetella bronchiseptica*: свойства и перспективы применения // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2013. - №3 (23).- С. 44-49.

21. Бактериофаги микроорганизмов значимых для животных, растений и человека / Васильев Д.А., Золотухин С.Н., Алёшкин А.В., Барт Н.Г., Богданов И.И., Васильева Ю.Б., Викторов Д.А., Золотухин Д.С., Журавская Н.П., Калдыркаев А.И., Карамышева Н.Н., Ковалева Е.Н., Коритняк Б.М., Ляшенко Е.А., Молофеева Н.И., Пожарникова Е.Н., Пульчеровская Л.П., Семанина Е.Н., Феоктистова Н.А., Шестаков А.Г. и др. - Ульяновск, 2013.
22. Васильев Д.А. Бактериофаги рода *Vacillus* / Васильев Д.А., Феоктистова Н.А., Золотухин С.Н., Алёшкин А.В. / Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия; НИИЦМиБ. Ульяновск, 2013.
23. Васильев Д.А. Разработка методов фагоидентификации и фагодетекции бактерий *Pseudomonas fluorescens* / Д.А. Васильев, Д.А. Викторов, А.М. Артамонов, Т.А. Гринева, Е.А. Ляшенко / Фундаментальные исследования. 2014. № 5-1. С. 55-58.
24. Шестаков А.Г. Соотношение бактериофагов в биопрепарате полифага / А.Г. Шестаков, Н.И. Молофеева, Л.П. Пульчеровская, С.Н. Золотухин, Д.А. Васильев, Е.Н. Семанина, Е.Г. Семанин / Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения. Материалы V Международной научно-практической конференции. Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия. - 2013. - С. 205-210.

SELECTION OF THE ALLOCATED BACTERIOPHAGES OF PROTEUS VULGARIS AND PROTEUS MIRABILIS AND STUDYING OF THEIR LYTIC ACTIVITY

Shkalikova M. V., Feoktistova N. A.

Keywords: bacteriophages, lytic activity, selection, method Appelmana and Grazia, indicator culture.

Creation of an environmentally friendly preparation of dot action for treatment and prevention of a proteyny infection is an extremely actual problem of modern pharmacy. Bacteria of the sort *Proteus* are causative agents of intrahospital infections, энтеритов at children and adults, are capable to cause inflammatory processes of urinary ways, to be the cause of postoperative and burn complications, sepsis, dysbacteriosis, toksikoinfektion and other diseases.

УДК 619: 579.63

ИССЛЕДОВАНИЕ ВНУТРИБОЛЬНИЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ НА ПРИМЕРЕ ХИРУРГИЧЕСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ

Бурова Н.С. 3 курс факультет ветеринарной медицины
Научные руководители: к.б.н., Е.Н. Ковалева,
д.б.н., профессор Д.А. Васильев
ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина»

Ключевые слова: внутрибольничные инфекции, госпитальный штамм, смывы, питательные среды.

Работа посвящена обнаружению штаммов, вызывающих внутрибольничные инфекции на примере хирургического отделения.