

развития: опыт, проблемы и пути их решения. Материалы V Международной научно-практической конференции. Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия. - 2013. - С. 205-210.

16. Васильев Д.А. Биоиндикация бактерий *Bacillus mycoides* в объектах санитарного надзора / Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин, Н.А. Феоктистова, М.А. Лыдина, А.И. Калдыркаев, В.А. Макеев, И.Г. Швиденко / Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. 2013. № 3 (23). С. 52-56.

## THE SENSITIVITY OF THE BACTERIA SPECIES *ESCHERICHIA COLI* TO INTEGRATED PHAGE THE BIOLOGICAL PRODUCT

Surkov E.I., Semanin A.G., Skoryk A.S.,  
Feoktistova N.A., Vasilyeva Yu.B., Zolotukhin S.N.

**Keywords:** bacteriophage, *Enterobacteriaceae*, *Escherichia coli*, biosensors, biological preparation.

The article provides the investigation results of the sensitivity of the bacteria species, *Escherichia coli* to experimental biological preparation based on phages. Further use of the biological product as a disinfectant for developed technology, will allow quickly and qualitatively to inactivate non-specific microflora of industrial premises, equipment and equipment at all stages of the technological cycle.

УДК УДК 619:616.98

## ПРОВЕДЕНИЕ ИСПЫТАНИЯ БИОПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ ВЫДЕЛЕННЫХ ФАГОВ *PROTEUS*

Шкаликова М.В., 4 курс, факультет ветеринарной медицины  
Научный руководитель: к.б.н., доцент Феоктистова Н.А.  
ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина»

**Ключевые слова:** биопрепарат, реакция нарастания титра фага, ферментативные свойства, энтеробактерии.

Применение созданного нами фагового препарата позволит избежать осложнений, которые наблюдаются после антибиотикотерапии. Низкая себестоимость, простота изготовления, срок годности в течение 1 года и высокая эффективность биопрепарата делают его коммерчески выгодным.

**Целью** наших исследований является проведение испытания биопрепарата на основе выделенных фагов *Proteus*.

**Материалы и методы.** В работе были использованы 2 штамма бактерии рода *Proteus*, выделенные из объектов ветеринарного надзора и патологического материала: *P. vulgaris* 26, *P. vulgaris* 13.

**Питательные среды и реактивы:** мясопептонный бульон, мясопептонный агар, 0,04% спиртовой раствор генцианвиолета, среды Эндо, Плоскирева, висмут-сульфит-агар, биохимические тесты института Пастера для изучения ферментативных свойств выделенных протеев.

**Объекты исследований.** Пробы фекалий от больных диареей поросят из ЗАО «СВ – Поволжское» Ставропольского района Самарской области, беспородные белые мыши.

Для оценки эффективности реакции нарастания титра фага в условиях производства нами были проведены исследования по фагодиагностике кишечной инфекции поросят, протекающей с участием бактерий рода *Proteus*.

#### Методика бактериологического исследования

Посев материала производили на среды Эндо, Плоскирева и висмут-сульфит агар, инкубировали при температуре 36-37 °С 18-20 часов.

Выросшие в чашках на среде Эндо: бесцветные или сероватые колонии с розовым оттенком, с характерным для протей ползущим ростом; на агаре Плоскирева – полупрозрачные колонии с перламутровым оттенком, в зоне роста колоний среда подщелачивалась и приобретала желтизну; на висмут-сульфит агаре (через 48 часов инкубации) – темно-коричневые колонии, пересевали в МПБ (по 4-6 колоний с чашки). Культуры микроорганизмов инкубировали при 37 °С в течение 18 часов (до появления выраженного помутнения среды).

Видовую принадлежность культур устанавливали на основе определения морфологических и культурально-биохимических свойств. Ферментативные свойства изучали у агаровых культур бактерий, выделенных из одного патологического материала, на наборе полужидких сред с углеводами и индикатором ВР. Посевы инкубировали при температуре 37-38 °С в течение 24-48 часов. Результаты исследований представлены в таблице 1.

Таблица 1 - Ферментативные свойства выделенных культур

| № п/п | Выделенная культура | Название теста |         |          |              |         |          |             |          |                 |           |             |
|-------|---------------------|----------------|---------|----------|--------------|---------|----------|-------------|----------|-----------------|-----------|-------------|
|       |                     | Глюкоза        | Лактоза | Сахароза | Агар Симонса | Желатин | Мочевина | Фенилаланин | Мальтоза | Фогес-Проскауэр | Метил-рот | Подвижность |
| 1     | Культура №1         | +              | -       | +        | -            | +       | +        | +           | +        | -               | +         | +           |
| 2     | Культура №2         | +              | -       | +        | -            | +       | +        | +           | +        | -               | +         | +           |
| 3     | Культура №3         | +              | -       | +        | -            | +       | +        | +           | +        | -               | +         | +           |
| 4     | Культура №4         | +              | -       | +        | -            | +       | +        | +           | +        | -               | +         | +           |

Примечания: «+» - ферментация сахара с образованием кислоты и газа, рост на среде Симонса, образование индола, расщепление мочевины и т.д.; «-» - отрицательный результат.

Таким образом, в результате проведенных исследований нами было выделено из 16 проб фекалий 4 культуры бактерий, которые мы классифицировали по ферментативным свойствам.

Патогенные свойства выделенных культур бактерий рода *Proteus* определяли в биопробе на белых мышах методом внутрибрюшинного введения 0,5 млрд. микробных клеток. Культуру признавали патогенной в случае гибели

двух или более мышей в течение трех суток после заражения и относили ее к возбудителям болезни. Результаты исследований представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Патогенность выделенных бактерий рода *Proteus*

| № п/п | Название культуры    | Биопроба №1 | Биопроба №2 | Биопроба №3 |
|-------|----------------------|-------------|-------------|-------------|
| 1     | <i>P. vulgaris</i> 2 | +           | -           | +           |
| 2     | <i>P. vulgaris</i> 5 | +           | -           | -           |
| 3     | <i>P. vulgaris</i> 6 | -           | +           | -           |
| 4     | <i>P. vulgaris</i> 7 | -           | +           | +           |

Примечания: «+» - доза введенной культуры была летальной, «-» - отрицательный результат.

Анализируя, данные таблицы 2, можно утверждать, что выделенные нами культуры бактерий рода *Proteus* обладают патогенными свойствами.

**При фагоиндикации** результат реакции учитывали путем подсчета негативных колоний фага в опытных и контрольных чашках. Оценку реакции проводили в соответствии с показателями таблицы 3 (по Ганюшкину, 1988). Положительная реакция характеризовалась увеличением количества корпускул хотя бы одного штамма фага по сравнению с контролем в 5 и более раз.

Таблица 3 – Оценка реакции нарастания титра фага (РНФ)

| Увеличение количества корпускул индикаторного фага в опытной пробе (пробирка №1) в отношении к количеству корпускул в контроле (пробирка №3) | Оценка              |
|--|---------------------|
| Увеличение в 2,5 раза  | Сомнительная        |
| Увеличение от 3 до 5 раз   | Слабо положительная |
| Увеличение свыше 5 раз   | Положительная       |
| Увеличение более 10 раз  | Резко положительная |

При исследовании материала в РНФ с использованием диагностического набора протейных бактериофагов, включающего фаги П-6 и П-2 серии УГСХА, положительная реакция была в 10 пробах фекалий. Результаты проведенных исследований представлены в таблицах 4-5.

Из таблицы 4 видно, что при исследовании 16 проб фекалий от больных диареей поросят, бактериологическим методом выделено бактерий рода *Proteus* 36 % проб, а в РНФ - 55 % проб.

Таблица 4 - Результаты исследования проб фекалий от больных диареей поросят

| Всего проб | Результаты исследований  |    |                 |      |
|------------|--------------------------|----|-----------------|------|
|            | Бактериологический метод |    | РНФ             |      |
| От поросят | Количество проб          | %  | Количество проб | %    |
| 16         | 4                        | 25 | 10              | 62,5 |

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о более высокой чувствительности РНФ (18 часов) при обнаружении бактерий рода *Proteus* в испражнениях больных диареей поросят в сравнении с бактериологическим

методом исследования при меньшей затрате времени (96 часов), реактивов и посуды.

Таблица 5 - Результаты использования РНФ для индикации протеев в фекалиях от больных диареей поросят

| № исследуемой пробы | № фага | Количество негативных колоний в контроле | Количество негативных колоний в опыте | Увеличение негативных колоний (раз) | Результат РНФ | Результат бактериологических исследований |
|---------------------|--------|--|---------------------------------------|-------------------------------------|---------------|---|
| 1                   | П-6    | 56±4,1                                   | 71±3,1                                | -                                   | Отрицательный | Отрицательный                             |
|                     | П-2    | 44±3,3                                   | 89±4,9                                | 2                                   | Отрицательный |   |
| 2                   | П-6    | 56±4,1                                   | 60±4,1                                | -                                   | Отрицательный | Отрицательный                             |
|                     | П-2    | 44±3,3                                   | 266±30,2                              | 6                                   | Положительный |   |
| 3                   | П-6    | 56±4,1                                   | 281±36,3                              | 5                                   | Положительный | Отрицательный                             |
|                     | П-2    | 44±3,3                                   | 59±4,5                                | -                                   | Отрицательный |   |
| 4                   | П-6    | 56±4,1                                   | 304±34,7                              | 5                                   | Положительный | Отрицательный                             |
|                     | П-2    | 44±3,3                                   | 105±9,6                               | 2                                   | Отрицательный |   |
| 5                   | П-6    | 56±4,1                                   | 56±1,8                                | -                                   | Отрицательный | Отрицательный                             |
|                     | П-2    | 44±3,3                                   | 69±3,5                                | -                                   | Отрицательный |   |
| 6                   | П-6    | 56±4,1                                   | 64±4,9                                | -                                   | Отрицательный | Отрицательный                             |
|                     | П-2    | 44±3,3                                   | 89±7,1                                | 2                                   | Отрицательный |   |
| 7                   | П-6    | 56±4,1                                   | 117±8,6                               | 2                                   | Отрицательный | Отрицательный                             |
|                     | П-2    | 44±3,3                                   | 269±17,3                              | 6                                   | Положительный |   |
| 8                   | П-6    | 56±4,1                                   | 54±5,2                                | -                                   | Отрицательный | Отрицательный                             |
|                     | П-2    | 44±3,3                                   | 131±9,3                               | 2                                   | Отрицательный |   |
| 9                   | П-6    | 56±4,1                                   | 342±29,8                              | 6                                   | Положительный | Положительный                             |
|                     | П-2    | 44±3,3                                   | 309±40,3                              | 7                                   | Положительный |   |
| 10                  | П-6    | 56±4,1                                   | 89±7,7                                | -                                   | Отрицательный | Отрицательный                             |
|                     | П-2    | 44±3,3                                   | 126±10,5                              | 2                                   | Отрицательный |   |
| 11                  | П-6    | 56±4,1                                   | 62±5,2                                | -                                   | Отрицательный | Отрицательный                             |
|                     | П-2    | 44±3,3                                   | 148±11,4                              | 3                                   | Отрицательный |   |
| 12                  | П-6    | 56±4,1                                   | 280±16,1                              | 5                                   | Положительный | Положительный                             |
|                     | П-2    | 44±3,3                                   | 308±14,6                              | 7                                   | Положительный |   |
| 13                  | П-6    | 56±4,1                                   | 336±10,2                              | 6                                   | Положительный | Отрицательный                             |
|                     | П-2    | 44±3,3                                   | 264±14,1                              | 6                                   | Положительный |   |
| 14                  | П-6    | 56±4,1                                   | 560±25,7                              | 10                                  | Положительный | Положительный                             |
|                     | П-2    | 44±3,3                                   | 220±11,1                              | 5                                   | Положительный |   |
| 15                  | П-6    | 56±4,1                                   | 392±35,3                              | 7                                   | Положительный | Положительный                             |
|                     | П-2    | 44±3,3                                   | 484±43,2                              | 11                                  | Положительный |   |
| 16                  | П-6    | 56±4,1                                   | 560±13,5                              | 10                                  | Положительный | Отрицательный                             |
|                     | П-2    | 44±3,3                                   | 396±24,6                              | 9                                   | Положительный |   |

Свободный фаг в контроле не был обнаружен.

**Заключение.** Важное место среди условно-патогенных микроорганизмов, вызывающих различные заболевания у животных и человека, занимают энтеробактерии рода *Proteus*. Борьба с любыми инфекционными заболеваниями зависит от своевременной диагностики, поэтому усовершенствование методов лабораторной диагностики заболеваний, вызываемых этими

микроорганизмами, уделяется большое внимание. Современные методы диагностики, которые могут быть использованы для индикации и идентификации микроорганизмов дорогостоящи и недоступны большинству районных бактериологических лабораторий. Поэтому изысканию простых и доступных методов для лабораторий любого уровня является актуальной проблемой. На основании экспериментов, проведенных нами, доказана возможность применения РНФ с целью обнаружения бактерий рода *Proteus* в объектах ветеринарного надзора, позволяющая сократить время исследования, уменьшить расход питательных сред и лабораторной посуды, увеличить эффективность обнаружения бактерий рода *Proteus*.

#### 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.П. – 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. Васильева, Ю.Б. Конструирование биопрепаратов для лабораторной диагностики бордетеллезной инфекции // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2013. - №2 (22). – С. 25-29.
  12. Васильева, Ю.Б. Разработка методов фагодиагностики бордетеллеза // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2013. - №2 (22). – С.51-56.
  13. Васильева, Ю.Б. Сравнительная характеристика методов лабораторной диагностики бордетеллеза // Современные проблемы науки и образования. – 2013. – № 4; URL: <http://www.science-education.ru/110-9751>.
  14. Васильева, Ю.Б. Особенности биологии бактерий вида *Bordetella bronchiseptica* // Современные проблемы науки и образования. – 2013. – № 4; URL: <http://www.science-education.ru/110-9927>.
  15. Васильева, Ю.Б. Новая тест-система идентификации возбудителя бордетеллеза – *Bordetella bronchiseptica* // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 10. – Ч.1.
  16. Васильева, Ю.Б. Разработка методов детекции бактерий *Bordetella bronchiseptica* // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2013. - № 3 (23). - С. 46-51.
  17. Васильева, Ю.Б. Фаги бактерий *Bordetella bronchiseptica*: свойства и перспективы применения // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2013. - №3 (23).- С. 44-49.
  18. 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.
  19. 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.
  20. 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.
  21. Шестаков А.Г. Соотношение бактериофагов в биопреparate 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.

## CARRYING OUT TEST OF THE BIOLOGICAL PRODUCT ON THE BASIS OF THE ALLOCATED PHAGES OF PROTEUS

Shkalikova M. V., Feoktistova N. A.

**Keywords:** biological product, reaction of increase of a caption of a phage, fermentativny properties, enterobakteriya.

Application of the fagovy preparation created by us will allow to avoid complications which are observed after an antibiotikoterapiya. Low prime cost, simplicity of production, expiration date during 1 year and high efficiency of a biological product do it commercially favorable.