

БАКТЕРИОФАГИ МИКРООРГАНИЗМОВ ЗНАЧИМЫХ ДЛЯ ЖИВОТНЫХ, РАСТЕНИЙ И ЧЕЛОВЕКА

Результаты научных исследований сотрудников кафедры микробиологии,
вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы
Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии им. П.А. Столыпина,
Научно-исследовательский инновационный центр
микробиологии и биотехнологии.

Под редакцией Васильева Д.А., Золотухина С.Н.

Издаются к «Международная научно-практическая конференция Бактериофаги:
Теоретические и практические аспекты применения в медицине,
ветеринарии и пищевой промышленности
Ульяновск 23-25 апреля 2013 г.»

УДК 579.01:578
ББК 28.4

Под редакцией: д.б.н., профессора Васильева Д.А., д.б.н., профессора Золотухина С.Н.

Коллектив авторов: Алёшкин А.В., Барт Н.А., 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., Юдина М.А.

Научное издание.

ISBN 978-8-905970-13-9

БАКТЕРИОФАГИ МИКРООРГАНИЗМОВ ЗНАЧИМЫХ, ДЛЯ ЖИВОТНЫХ, РАСТЕНИЙ И ЧЕЛОВЕКА.

Результаты научных исследований сотрудников кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии им. П.А. Столыпина

В монографии представлены результаты научных исследований сотрудников кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии им. П.А. Столыпина, по бактериофагам, проведенные за последние 15 лет. Освещены вопросы по выделению, селекции и изучению биологических свойств бактериофагов микроорганизмов, представляющих определенный интерес как для практических ветеринарных и медицинских работников, микробиологов и биотехнологов, так и для научных сотрудников, аспирантов и студентов этих направлений. Также описаны схемы и параметры практического применения выделенных и селекционированных штаммов бактериофагов, разработанные авторами.

Научные исследования проводятся при финансовой поддержке государства в лице Минобрнауки России в рамках реализации федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009 - 2013 годы (соглашение № 8267 от 10.08.2012).

Рецензент: Щербаков Анатолий Анисимович, д.б.н., профессор кафедры микробиологии, вирусологии и биотехнологии ФГБОУ ВПО «Саратовский государственный аграрный университет им. Н.В. Вавилова».

BACTERIOPHAGES OF THE MICROORGANISMS IMPORTANT FOR HUMAN BEINGS AND ANIMALS

The results of the research performed by the personnel of the Department of Microbiology, Virology,
Epizootology and Veterinary-Sanitary Evaluation of Ulyanovsk State Agricultural Academy
Named After P.A. Stolypin, Research-and-Development Innovative Center of Microbiology and
Biotechnology

Edited by Vasylyev D.A., Zolotukhin S.N.

Issued for
«International Theoretical and Practical Conference Bacteriophages:
Theoretical and Practical Aspects of Phage Application in Medicine,
Veterinary and Food Industry
Ulyanovsk, April, 23-25th, 2013»

BACTERIOPHAGES OF THE MICROORGANISMS IMPORTANT FOR HUMAN BEINGS AND ANIMALS

The monograph presents the results of the research of the phages performed by the personnel of the Department of Microbiology, Virology, Epizootology and Veterinary-Sanitary Evaluation of Ulyanovsk State Agricultural Academy Named After P.A. Stolypin during the last 15 years.

The issues on isolation, selection and study of biological properties of certain phages are reported. The microorganisms whose phages have been studied present a certain interest for veterinary and medical practitioners, microbiologists and biotechnologists as well as for scientists, postgraduates and students performing research in this field. The schemes and parameters for practical employment of the isolated and selected phage strains worked out by the authors are also presented.

The research is performed with the financial support of the government represented by the Ministry of Education and Science within the federal target program "Scientific and Scientific-Educational Personnel of Innovative Russia" for 2009-2013 (agreement № 8267 from 10.08.2012)

Светлой памяти Виктора Яковлевича Ганюшкина
и Леонида Сергеевича Каврука,
посвящается

ВМЕСТО ВВЕДЕНИЯ

Всесторонние исследования бактериофагов, выполненные почти за столетний период их изучения, позволили решить многие задачи в микробиологии, вирусологии, биотехнологии, генетики, молекулярной биологии, генетической инженерии, иммунологии, радиобиологии и других областях прикладных и фундаментальных исследований.

Фаги являются одним из наиболее удобным объектов для глубокого изучения ряда вирусологических проблем и, в частности, взаимоотношения вируса с клеткой-хозяином. При их использовании возможно моделировать как явно выраженную продуктивную инфекцию, так и потенциальное вирусоносительство в форме лизогении. Успешно разрабатывается проблема лизогении, имеющая общебиологическое значение для понимания молекулярных механизмов вирусного канцерогенеза и латентных вирусных инфекций.

С 1940 годов бактериофаги стали одним из наиболее популярных объектов молекулярной биологии. Исследования с использованием фагов позволили раскрыть механизмы таких фундаментальных биологических процессов, как репликация ДНК, рекомбинация, транскрипция и генная регуляция. Благодаря изучению фагов открылись также возможности разработки многих важных методов и направлений генной инженерии (Й. Лейгнер и др., 2005).

Одним из центральных разделов современной биологии бактерий является проблема устойчивости или «надежности» наследственной информации. В настоящее время установлено, что после внедрения в клетку фаг вызывает хромосомные перестройки, что приводит к общей нестабильности наследственного матери-

ала. Именно с бактериофагами связано изучение наследственной изменчивости бактерий - трансдукция, фаговая конверсия (В.Я. Ганюшкин, 1988).

С помощью фагов проводятся широкие радиобиологические исследования, а также первичный отбор химиотерапевтических средств и некоторых антибиотиков против вирусных болезней и злокачественных опухолей.

С выходом человека на космические орбиты фаги стали использовать для важнейших биологических исследований космического пространства.

Таким образом, учение о фагах, развивающееся вначале как узкая область гуманитарной и ветеринарной медицинской микробиологии, в настоящее время приобрело фундаментальное общебиологическое значение.

В тоже время остаются актуальными научные разработки, направленные на прикладное применение бактериофагов. В гуманитарной и ветеринарной медицине практическое значение бактериофагов связано с индикацией патогенных бактерий и диагностикой инфекционных заболеваний, а также фаготерапией и фагопрофилактикой.

В последние годы бактериофаги стали использовать в пищевой промышленности для санации пищевых продуктов и пищевого сырья с целью предотвращения их порчи и профилактики пищевых токсикозов и токсикоинфекций бактериальной этиологии.

Имеются публикации о успешном опыте применения бактериофагов для борьбы с фитопатогенными микроорганизмами – возбудителями болезни культурных растений, а также сульфатредуцирующими бактериями, вызывающими коррозию оборудования в нефтедобывающей промышленности и др.

В течение трех – четырёх последних десятилетий преобладало мнение, что прикладное изучение фагов уже не может дать ничего принципиально нового. При возникновении и развитии новых методов лечения, диагностики бактериальных инфекций произошла утрата интереса к изучению фагов, и лишь единичные научные лаборатории в настоящее время продолжают заниматься исследованиями в области бактериофагии.

Несмотря на накопленный большой научный материал по изучению биологических свойств бактериофагов, многие вопросы

требуют дополнительных исследований. Так, например, у большинства, как считалось ранее, глубоко изученных модельных эшерихиозных фагов Т-серии, так и не удалось выяснить функцию двух третей синтезируемых ими продуктов. Кроме того, нет единой схемы таксономии и классификации этих микроорганизмов, отсутствуют стандартные наборы фагов многих прокариот, вызывающих определенный интерес у человека, а также схемы и регламенты их практического применения.

Интерес к фагам у отечественных исследователей возродился сравнительно недавно по ряду причин и, прежде всего, прежде всего с возникновением множественно-устойчивых к антибиотикам возбудителей разных болезней. Кроме того, в настоящее время в результате молекулярно-генетических исследований была выявлена связь генома патогенности бактерий с профагом и отмечена возможность генетического обмена не только между бактериями и фагами, но и между фагами и эукариотами (В.Н. Крылов, 2003).

Кафедра микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина» определила одно из приоритетных научных направлений – выделение и изучение бактериофагов значимых в практике микроорганизмов, а также разработка схем и методов их применения.

Начало исследований по бактериофагам, на кафедре связано с именем В.Я. Ганюшкина, который под научным руководством доцента А.П. Васильева с 1967 года проводил исследования по выделению и изучению биологических свойств бактериофагов *S.cholerae-suis* и защитил диссертацию на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук. Далее его исследования по материалам докторской диссертации координировал Д.М. Гольдфарб – ученый-фаголог, имеющий мировую известность.

Работу по выделению и изучению бактериофагов патогенных энтеробактерий продолжил С.Н. Золотухин. Большую научно-методическую помощь при работе с бактериофагами оказал заведующий лабораторией санитарной микробиологии ВНИИВ-СГиЭ, д.в.н., профессор Л.С. Каврук.

В настоящее время на базе кафедры создан Научно-исследовательский инновационный центр микробиологии и био-

технологии с одной из лабораторий прикладной микробиологии и биотехнологии бактериофагов. Научное руководство исследований по изучению бактериофагов возглавляют доктора биологических наук, профессора Д.А. Васильев и С.Н. Золотухин.

Выбор данного направления связан с тем, что в последние годы, благодаря работам многих отечественных и зарубежных исследователей, расширилось представление об этиологической роли ранее неизвестных бактерий в патологии животных и человека, которые широко распространены в природе. Большая часть из них часто входит в состав нормальной микрофлоры желудочно-кишечного тракта животных и человека, а также обитает в объектах внешней среды. Однако среди этих микроорганизмов имеются рода, виды, варианты и штаммы, способные вызывать у животных и людей, как самостоятельные заболевания, так и совместно с другими микробами различные воспалительные процессы (энтериты, нагноение ран, абсцессы, маститы, эндометриты, менингиты, пневмонии, сепсис и т.п.), а также пищевые и кормовые токсикозы и токсикоинфекции.

Известно что, эффективность лечебных мероприятий во многом зависит от своевременной диагностики болезни, поэтому совершенствование методов лабораторной диагностики заболеваний, вызываемых этими микроорганизмами, имеет важное практическое значение.

При постановке диагноза бактериологическим методом нередко возникает ряд трудностей, связанных с тем, что основой идентификации большинства бактерий являются их биохимические (ферментативные) свойства, изучение которых не позволяет быстро и всегда идентифицировать названные микроорганизмы. Современные методы лабораторной диагностики (ПЦР, ИФА, РИА), которые могут быть использованы для их индикации и идентификации, хотя и являются высокоспецифичными и чувствительными, но сложность методик, высокая стоимость оборудования и реактивов для постановки этих реакций, делает их пока недоступными для большинства рядовых диагностических лабораторий.

В связи с этим возникла необходимость поиска альтернативных методов лабораторной диагностики, которые были бы менее трудоёмкими, более быстрыми и доступными для лабораторий

любого уровня. Одним из таких методов является фагодиагностика. Специфичность бактериофагов позволяет использовать их с диагностической целью для ускоренной индикации и идентификации гомологичных бактерий.

Методы фагодиагностики, разработанные в середине прошлого века, являются специфичными, не требуют больших затрат времени, материалов и общедоступны лабораториям всех уровней. Отсутствие на вооружении практических лабораторных работников диагностических наборов бактериофагов и послужило поводом для их создания.

С конца прошлого и начала текущего столетия на базе кафедры ведется большая работа по выделению бактериофагов, активных против многих таксономических групп микроорганизмов. Нами изучаются биологические свойства выделенных фагов, отбираются изоляты фагов с характерными, заданными для целей использования свойствами для формирования производственных штаммов. В лабораториях центра разрабатываются биотехнологические параметры изготовления и схемы применения бактериофагов не только для индикации и идентификации гомологичных микроорганизмов, но и возможность использования в целях санации помещений, обработки пищевого сырья и готовых продуктов питания, профилактики поражения растений и растительной продукции фитопатогенными бактериями.

В задачи решаемые коллективом кафедры и центра вошло выделение, изучение биологических свойств, селекция и разработка опытно-промышленной технологии производства высокоэффективных биопрепаратов из композиций бактериофагов около полусотни видов бактерий: *Enterobacter spp.*, *Klebsiella spp.*, *Morganella spp.*, *Providencia spp.*, *Citrobacter spp.*, *Ervinia spp.*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocitogenes et al.*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis et al.*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus mesentericus*, *B.pumilus* *Bacillus megaterium*, *Bacillus mycoides*, *Bordetella bronchiseptica et al.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas chlororaphis*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Aeromonas sobria*, *Aeromonas caviae*, *Aeromonas veronii*, *Flavobacterium psychrophilum*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli* O 157.

Целью для постановки задач послужили вопросы связанные с – фагоидентификации и индикации потенциально опасных микроорганизмов,

- бактериофаг - опосредованного биоконтроля,
- фагового биопроцессинга, в качестве профилактической биологически активной добавки к кормам сельскохозяйственных животных, птицы для снижения риска развития спорадических случаев и эпизоотических вспышек инфекций, что позволит ограничить распространение;
- фитопатогенных бактерий в посевном материале, почве, удобрениях, мелиоративной воде, а так же в пищевых продуктах растительного происхождения;
- желудочно-кишечных инфекций молодняка сельскохозяйственных животных и птицы;
- порчи пищевого сырья и пищевой продукции (растительного и животного происхождения) при бактериальной контаминации.

В предлагаемой монографии представлены основные результаты научных исследований сотрудников кафедры микробиологии и научного инновационного центра микробиологии и биотехнологии, по примерно ста бактериофагам бактерий различных видов.

Внедрение результатов наших исследований включают четырнадцать выделенных и изученных штаммов бактериофагов депонированных в государственной коллекции Всероссийского государственного центра качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов, признанных, перспективными и рекомендованы для изготовления диагностических и лечебно-профилактических препаратов.

Разработки примерно двух десятков нормативно-технических документов по изготовлению диагностических фаговых препаратов.

Результаты исследований по разработке методов фагодиагностики вошли в следующие нормативные документы федерального уровня:

1. Методические рекомендации по ускоренной индикации и идентификации энтерогеморрагической кишечной палочки в *E. coli* O157:H7 и O157:H- в патологическом материале, кормах,

пищевом сырье и объектах внешней среды с применением специфических бактериофагов, утверждены Отделением ветеринарной медицины РАСХН 4 октября 2004 года;

2. Методические рекомендации по ускоренной индикации и идентификации энтеробактерий вида *Morganella morganii* в патологическом материале, кормах, пищевом сырье и объектах внешней среды с применением специфических бактериофагов, утверждены Отделением ветеринарной медицины РАСХН 4 октября 2004 года;

3. Методических рекомендаций по ускоренной индикации и идентификации энтеробактерий рода *Citrobacter* в патологическом материале, кормах, пищевом сырье и объектах внешней среды с применением специфических бактериофагов, утверждены Отделением ветеринарной медицины РАСХН 4 октября 2004 года;

4. Методических рекомендаций по ускоренной индикации и идентификации энтеробактерий вида *Yersinia enterocolitica* в патологическом материале, кормах, пищевом сырье и объектах внешней среды с применением специфического бактериофага, утверждены Отделением ветеринарной медицины РАСХН 26 июня 2006 года;

5. Методических рекомендаций по ускоренной индикации и идентификации энтеробактерий рода *Proteus* в патологическом материале, кормах, пищевом сырье и объектах внешней среды с применением специфических бактериофагов, утверждены Отделением ветеринарной медицины РАСХН 26 июня 2006 года;

6. Методических рекомендаций по ускоренной индикации и идентификации энтеробактерий рода *Klebsiella* в патологическом материале, кормах, пищевом сырье и объектах внешней среды с применением специфических бактериофагов, утверждены Отделением ветеринарной медицины РАСХН 26 июня 2006 года;

7. Методических рекомендаций по ускоренной индикации и идентификации энтеробактерий рода *Enterobacter* в патологическом материале, кормах, пищевом сырье и объектах внешней среды с применением специфических бактериофагов, утвержденных Отделением ветеринарной медицины РАСХН 26 июня 2006 года.

О СТРУКТУРЕ ДАННОЙ КНИГИ

Представленные главы научной монографии являются результатом исследований конкретного автора данного раздела, который выполнен на кафедре, в центре и оформлен в виде диссертационного материала с последующей защитой. В книге нет материалов исследований в области бактериофагии нынешних аспирантов и соискателей кафедры, они представлены в материалах конференции.

Так как все основные исследования проводимые на кафедре в области бактериофагии направлены на выделение, изучение биологических свойств выделенных фагов и на разработку параметров постановки РНФ для целей индикации и идентификации того или иного микроорганизма предлагаемая монография выглядит бы однобоко и нераскрывала весь возможный спектр применения бактериофагов. В связи с этим мы обратились к д.б.н., зав. лабораторией клинической микробиологии и биотехнологии бактериофагов ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора Алешкину Андрею Владимировичу, с просьбой предоставить нам для предлагаемого издания свои соображения о перспективах иного применения бактериофагов. Учитывая наши деловые и дружеские отношения он любезно согласился восполнит существующий пробел в предлагаемой книге войдя соавтором в эту работу. Все научные исследования проводимые на кафедре и в центре осуществляются под руководством заведующего кафедрой и одновременно директора центра профессора Васильева Д.А, а исследования энтеробактерий и фагов бактерий данного семейства проводятся и под руководством профессора Золотухина С.Н, то они являются соавторами предлагаемых публикаций.

ГЛАВА 1

ОБЛАСТИ ПРИМЕНЕНИЯ БАКТЕРИОФАГОВ

CHAPTER 1. ALYOSHKIN A.V. APPLICATION FIELD OF PHAGES

1.1. ОБЗОР ПО ТРЕМ ПОСЛЕДНИМ МЕЖДУНАРОДНЫМ КОНФЕРЕНЦИЯМ ПО БАКТЕРИОФАГАМ

Уважаемые коллеги! Разрешите представить Вашему вниманию наиболее интересные, на мой взгляд, направления исследований по бактериофагам, которые были представлены в виде научных сообщений на трех международных конференциях, проходивших в 2012 году.

С 1 по 4 июля в Тбилиси, проходила конференция «Бактериофаги и пробиотики как альтернатива антибиотикам», посвященная 120-летию со дня рождения Георгия Элиавы, основателя первого в России института, занимающегося изучением бактериофагов, соратнику и продолжателю исследований Феликса Де Эреля, первооткрывателя вирусов бактерий. В конференции приняли участие около 150 человек, преимущественно западно-европейские ученые и наши соотечественники из бывших стран СНГ. Теме бактериофагов были посвящены первые 2 дня работы конференции. Среди всех прозвучавших на форуме выступлений, хотелось бы выделить следующие доклады:

Александра Ракина, из Мюнхенского института Петенкоффера, озаглавленный «Резидентные бактериофаги в борьбе с глобальными инфекциями». В презентации было отмечено, что бактериофаги – самая распространённая форма жизни на Земле. По численности они превосходят бактерии в соотношении как минимум 10 к 1. Фаги как правило крайне специфичны и чрезвычайно узким спектром литической активности. Обычно круг бактерий-хозяев фагов ограничивается отдельными штаммами внутри вида бактерий. Таким образом, фаги, изолированные в од-

них географических зонах, могут быть неактивными в отношении бактериальных штаммов, выделенных в других просто оттого, что у них нет истории предыдущих контактов и взаимодействия. Чтобы проверить это, автор проанализировал чувствительность 65 бактериальных патогенов, включая MRSA штаммы, полирезистентные *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, карбапенем-резистентные *Escherichia coli* и *Enterobacter cloacae*, и ванкомицин-резистентные *Enterococcus faecium*, изолированных в сингапурских больницах, на коллекции соответствующих бактериофагов, которые продемонстрировали литическую активность в отношении бактериальных культур германского происхождения, и по большей части изолированные в мюнхенских сточных водах. Оказалось, что только MRSA и *Pseudomonas aeruginosa* продемонстрировали 80% и 90% чувствительность к имеющимся в музее фагам соответственно. Напротив, 80% *Kl. pneumonia* и 80% *E. coli* а также неоднократно тестировавшиеся штаммы *Acinetobacter* и *Ent. cloacae* были резистентны к резидентным фагам, выделенным в Германии. Также, только половина изолятов *E. faecium* были чувствительны к фагам, активным в отношении бактериальных культур, изолированных в Германии. В попытках выделить и селекционировать фаги, активные к вышеупомянутым фагорезистентным бактериям, докладчик проверил ряд образцов воды из коллекторов сточных вод Мюнхена. Он смог получить литические фаги к большинству патогенных бактерий из Сингапура. Некоторые фаги были штаммо-специфичными, другие демонстрировали групповую специфическую активность. В общем и целом из сточных вод Мюнхена удалось изолировать литические бактериофаги, активные в отношении всех антибиотико-резистентных бактериальных культур из Сингапура. В то время как определённые бактерии (вроде MRSA, демонстрирующей клоновое размножение) имеют повсеместное распространение вместе с соответствующими фагами, другие представлены локально. Однако оказалось возможным изолировать фаги, активные в отношении штаммов бактерий, резидентных для Сингапура, из сточных вод Мюнхена. Подобное всемирное распространение фагов служит основанием для создания репрезентативной всемирной коллекции литических фагов для быстрого использования в борьбе с

патогенными микроорганизмами, представленными как повсеместно, так и локально.

Следующее сообщение, на котором мне хотелось бы остановиться, «Реакция иммунной системы на фаги: потенциальная связь с фаготерапией», представленное Яном Борисовским из группы польских ученых фагологов, возглавляемой Анджеем Горским. В докладе прозвучало, что в то время как основным хозяином для бактериофага являются бактерии, многие экспериментальные исследования показывают, что фаги могут взаимодействовать с некоторыми популяциями клеток млекопитающих, не вызывая при этом их лизис. По словам авторов оказалось, что фаги воздействуют на различные функции клеток иммунной системы, участвующие как во врождённом, так и в приобретённом иммунитете. Они влияют на производство цитокинов, пролиферацию Т-клеток, выработку антител, и, в конце концов, фагоцитоз и респираторные взрывы фагоцитов. Вдобавок к прямому воздействию на функции иммунных клеток, фаги также модулируют некоторые иммунные реакции, первоначально вызванные как патогенными бактериями, так и вирусами, что может положительно проявляться в виде синергетического эффекта, состоящего из иммуномодуляторного и прямого антибактериального действия фагов.

Следующий доклад чешских исследователей озаглавленный «Восприимчивость MRSA штаммов, изолированных в республике Чехия к анти-стафилококковому препарату бактериофагов Stafal®Lyo», был представлен Романом Пантучеком из Университета Мазарика в Брно. По словам авторов, метицилин-резистентный *Staphylococcus aureus* (MRSA) является главной причиной нозокомиальных инфекций с 1960-х годов. Относительно недавнее возникновение, успешное распространение, выживаемость и доминирование вирулентных и антибиотико-резистентных клонов широко распространённого метицилин-резистентного *S. aureus* (CA-MRSA, внебольничная) является крайне важной проблемой для здоровья человека. Бактериофаги с широким спектром литической активности являются подходящими кандидатами для борьбы с такими патогенными бактериями в качестве альтернативы антибиотикотерапии. В докладе обобщены результаты по чувствительности MRSA штаммов разного происхождения

изолированных в Чешской республике в период с 1999 по 2010 г. Все эти штаммы были секвенированы. Девяносто четыре MRSA штамма человеческого и 6 животного происхождения были классифицированы по 48 различным генотипам и протестированы с помощью антистафилококкового бактериофагового препарата STAFAL®LYO и пяти другим стафилококковым бактериофагам из семейства *Myoviridae*. Чувствительность к индивидуальным фагам составляла от 52 до 68%, а к STAFAL®LYO - 75%. Двадцать три штамма были резистентны ко всем фагам. Дополнительный набор из 271 штамма *S. aureus*, включавший 93 MRSA штамма был исследован в лаборатории клинической микробиологии больницы Св. Анны в 2011 г. Из этого набора 99,3% штаммов были чувствительны к STAFAL®LYO. На основании проведенных исследований авторы пришли к заключению, что лиофилизированному бактериофаговому препарату STAFAL®LYO может быть использован для лечения стафилококковой (в т.ч. вызванной MRSA штаммами) инфекции.

Из постерных сообщений, представленных на конференции в Тбилиси, хотелось бы отметить презентацию турецких коллег «Применение фагов для обеспечения безопасности при производстве пищевых продуктов». Данное сообщение также как и доклад, который я делал в Тбилиси, раскрывает одну из новых сфер использования бактериофагов, в качестве средств деkontаминации пищевых полуфабрикатов. В презентации Ишил Вар из Чукурова Университета в частности отмечалось, что бактериофаги могут инфицировать бактерии, которые вызывают пищевые инфекции, поэтому они пользуются всё большим интересом, особенно в сфере производства продуктов питания. Фаги присутствуют повсеместно в окружающей среде, особенно высока их концентрация в воде (пресной, соленой, сточных водах). Люди не замечая этого употребляют фаги с пищей постоянно. Поэтому, логичным является использование фагов для уничтожения бактерий наиболее часто вызывающих пищевые инфекции: *Campylobacter spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Enterobacter sakazakii*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*. Далее авторы основываясь как на собственных данных по использованию листериозного фага P100 при деkontаминации сыра, так и на данных представленных в научной литературе резюмируют, что

фаги относятся к антимикробным агентам быстро решающим проблему обеззараживания и могут широко использоваться в пищевой промышленности.

Следующая специализированная конференция, в которой мне посчастливилось участвовать с докладом, «Еврофаги 2012: Бактериофаги в медицине, пищевой промышленности и биотехнологии», проводилась Оксфорде, Великобритания, 24-26 сентября 2012 года.

Первый доклад, на котором мне бы хотелось остановиться, касается применения бактериофагов в ветеринарии, в частности на птицефабриках. Доклад на тему «Уменьшение горизонтального переноса сальмонелл в процессе инкубации яиц посредством фаготерапии» представляла Аделаида Алмеда из португальского университета Авеиро. Автор в своем докладе отмечал, что сальмонелла – это серьёзная проблема касающаяся не только животноводства, но и здоровья человека, который может инфицироваться посредством контакта с заражёнными животными или при употреблении заражённой пищи. Сальмонеллез распространяется среди птиц через корм, воду и заражённую среду птицефабрики. У птиц серотип *Enteridis* является наиболее распространённым. Способность сальмонеллы к внутриклеточному выживанию создаёт предпосылки для развития хронических инфекций и затрудняет использование антимикробных препаратов. Кроме того, использование антибиотиков приводит к развитию у популяций микробов антибиотикорезистентности, а также к наличию их остатков в пище, произведенной из леченой птицы. Фаготерапия может использоваться как альтернативный метод, позволяющий предотвращать инфицирование мяса птицы сальмонеллой *Enteridis*. С целью изучения эффективности бактериофагов в отношении сальмонелл, из стоков птицефабрики был изолированы два фага, F1055S и F12013S, коктейль из которых был аэрозольно нанесён на оплодотворённые яйца, предварительно заражённые сальмонеллой *Enteridis*. По утверждению авторов, это был первый эксперимент *in vivo* по аэрозольному нанесению фагов на оплодотворённые яйца. Две группы яиц были заражены сальмонеллой (в концентрации 3×10^8 КОЕ/мл), и одна из них была обработана фаговой суспензией (с титром 2×10^6 БОЭ/мл). Третья группа была использована в качестве контрольной. В те-

чение восьми дней после вылупления за цыплятами наблюдали на предмет развития симптомов артрита и слипания клоаки, по истечении восьми дней птиц взвесили, забили, а их внутренние органы (слепая кишка, сердце, печень и селезёнка) проанализировали на предмет наличия сальмонелл. Средний вес цыплят из незаражённой контрольной группы (1-й группы) в конце эксперимента был сходен с весом заражённой и обработанной фагами группы (3-й группы). Средний вес заражённых необработанных фагом птиц (2-й группы) был значительно ниже, чем в 1-й и 3-й группах. Количество цыплят с артритом и слипанием клоаки в конце эксперимента было намного выше во 2-й группе, чем в 1-й и 3-й группах. Различия в частоте излечения от сальмонеллезной инфекции между 2-й и 3-й группами при поражении слепой кишки были статистически достоверными. Таким образом, авторы предположили, что аэрозольная обработка фагами яиц, перед их переносом из инкубаторов на вылупление, может являться эффективным и низкзатратным методом для снижения горизонтального переноса *Salmonella Enteridis*.

Следующий интересный доклад также касался применения бактериофагов в ветеринарии. Профессор Вилар Гарсия из Испании представил доклад на тему: «Бактериофаги в качестве нового способа обеспечения микробиологической безопасности при производстве молочной продукции». По словам автора, коровий мастит является основным источником контаминации молока *Staphylococcus aureus*, поскольку этот патоген является одним из главных возбудителей внутригрудных инфекций у молочного скота. Другие источники заражения молочной продукции *S. aureus* включают работников, контактирующих с продукцией и развитие биоплёнок в перерабатывающей промышленности. Принимая во внимание, что бактериофаги и их литические белки (эндолизины) обладают антибактериальным потенциалом, из окружающей среды были изолированы два бактериофага (vB_SauS-phi-IPLA35 и vB_SauS-phi-IPLA88), которые проявляли антистафилококковую активность в молоке, твороге и сырах. Так смесь из этих двух фагов сокращала число бактерий *S. aureus* в молочных продуктах, сохраняя их органолептические свойства. Кроме того, эндолизин (LysH5) и вирион-ассоциированный пептидогликан гидролаза (HydH5), белки с антистафилококковой

активностью, продуцируемые фагом vB_SauS-phi-IPLA88, показали свою литическую эффективность в отношении *S. aureus* в молоке. Авторы продемонстрировали возможность усиления литической активности HvdH5 путём смешения этого белка с лизостафином, бактериоцином с пептидогликан гидролазной активностью. HvdH5 проявлял также антимикробную синергию с эндолизином LysH5 и бактериоцином низином, что даёт основания считать, что белки, продуцируемые фагами, можно использовать более эффективно в комплексе с другими средствами деконтаминации молочной продукции.

Польские исследователи наряду с российскими коллегами в период до 1991 активно внедряли в клиническую практику фаготерапию. В этой связи был интересен доклад Ричарда Медзибровского, озаглавленный «Экспериментальная фаготерапия, проводимая в отделении фаготерапии во Вроцлаве» посвященный клиническому использованию бактериофагов в период после вступления Польши в ЕЭС. В своем выступлении автор отмечал, что Польша – одна из немногих стран в мире с длительным опытом клинического использования фагов. С тем, чтобы богатая польская традиция фаготерапии продолжалась и после вступления Польши в Евросоюз, в 2005 г. при Институте Иммунологии и Экспериментальной Терапии имени Людвика Хирсцфельда Польской Академии Наук во Вроцлаве в соответствии с новым регламентом Евросоюза было открыто отделение фаготерапии. Амбулаторная фаготерапия в этом отделении проводится в рамках европейского протокола «Экспериментальная фаготерапия полирезистентных бактериальных инфекций, включая инфекции MRSA», по правилам клинических испытаний, основной целью которых является скорее лечение, чем научные исследования. Взрослые пациенты с различными хроническими бактериальными инфекциями, подписавшие письменное согласие, получают лечение путём орального, местного и/или ректального введения специфических фаговых препаратов, с подтвержденной эффективностью против патогенных штаммов бактерий, из коллекции института. В докладе автор обобщил результаты лечения 153 пациентов, получавших бактериофаги с 2008 по 2010 гг. Эффективность лечения оценивалась на основании оценки поведения бактериальных культур в организме пациента, интен-

сивности симптомов инфекции, результатов специфических диагностических тестов и мнения консультирующих медицинских специалистов. В общем и целом, у 39,9% пациентов была прослежена положительная реакция на фаготерапию, в то время как эрадикация патогена и/или выздоровление, характеризующееся как полное затухание инфекционных симптомов, были отмечены в 18,3% случаев. Самый высокий процент положительных исходов (48,3%), а также эрадикация патогена и/или выздоровление были обнаружены в группе мужчин с урогенитальными инфекциями (37,9%). Препараты на основе фагов в целом хорошо переносились 77,8% пациентов, и только в 3,9% случаях фаготерапия была прекращена вследствие побочных реакций. 17,0% штаммов стафилококка, 36,4% - *Pseudomonas*, 42,9% - *E. faecalis*, и 86% - *E. coli* были резистентны к бактериофагам. В заключении докладчик резюмировал, что фаготерапия может давать хорошие клинические результаты у пациентов, с неизлечимыми иными способами хроническими бактериальными инфекциями, и при этом хорошо переносится пациентами. Авторы надеются, что представленные данные могут иметь значения для принятия решения об использовании фаготерапии как стандартной лечебной процедуры в Евросоюзе.

Грузинские ученые-фагологи в лице Майи Мерабишвили представили в Оксфорде доклад на тему: «Опыт лечения бактериофагами, полученный на базе Брюссельского ожогового центра». Во вступлении она отметила, что проблема антибиотикорезистентности – одна из главных в современной медицине. Все учреждения здравоохранения на всех уровнях сталкиваются с этой проблемой и им нужно что-то предпринимать в этой критической ситуации. На сегодняшний день полирезистентные патогены, такие как *Acinetobacter baumannii* (часто упоминаемый в связи с военными действиями на Ближнем Востоке), NDM-1 (фермент новой дели металло-бета-лактамаза) продуцирующие энтеробактерии (эшерихия коли, клебсиелла пневмонии, энтеробактер клоаце), панрезистентные клоны *Pseudomonas aeruginosa* и метициллин-резистентный *Staphylococcus aureus* (MRSA) являются основными причинами вспышек нозокомиальных инфекций в больницах. В дополнение, «гражданские» случаи заражения MRSA, и отдельные вспышки (например недавняя вспышка,

вызванная энтерогемморагической кишечной палочкой – ЕНЕС, в Германии) демонстрируют, что общество в целом всё больше находится под угрозой высоковирулентных антибиотикорезистентных штаммов бактерий. Фаготерапия, по словам Мерабишвили, считается одним из перспективных ответов на эту глобальную угрозу. Переходя к собственным исследованиям на базе Военного Госпиталя Королевы Астрид, докладчик отметил, что группой представляемых ее ученых ведётся работа по направлениям, включающим 1) научные исследования, 2) клинические испытания, одобренные ведущими медико-этическими комитетами и 3) лечение пациентов под эгидой «Хельсинкской декларации». Исследовательские проекты включают: 1) выделение из окружающей среды, селекцию и описание биологических свойств штаммов-претендентов в лечебные фаги против различных клинически важных патогенов, таких как *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* и *E. coli* (включая недавний штамм из Германии ЕНЕС), 2) изучение коэволюции фагобактерий, необходимое для разработки наиболее подходящей концепции фаготерапии и 3) исследование, направленное на устранение регистрационных препон, препятствующих внедрению фаготерапии в Западной Европе. На сегодняшний день грузинскими коллегами проведено небольшое (на 10 пациентах с ожогами) исследование клинической безопасности, и до сих пор проводится (на данный момент 12 пациентов из 40 намеченных) двойное слепое плацебо-контролируемое мультицентровое исследование по санации носоглотки от *S. aureus* и *P. aeruginosa* у пациентов блока интенсивной терапии. Кроме этих исследований, спорадически и под эгидой программы «Хельсинки», небольшая группа пациентов с «неизлечимыми» инфекциями костной (напр. остеомиелит) и мягких тканей были пролечены коктейлем бактериофагов (BFC-1) против *S. aureus* и *P. aeruginosa*. В заключение Мерабишвили отметила, что с годами она осознала, что текущая фармацевтическая экономическая модель (подразумевающая затратные по финансам и времени разработку и продвижение медицинской продукции, надежно защищенной патентами) несовместима с широким распространением фаготерапии в мире. Поэтому она решили заняться развитием модели специфической фаготерапии с реалистичными требованиями по производству и документации, которая позво-

лит обеспечить своевременную (быструю) поставку безопасных индивидуально подобранных бактериофагов пациентам. Комментируя последние слова грузинских коллег, отмечу, что данная позиция подразумевает переход от созданной в СССР модели крупномасштабного производства на базе институтов вакцин и сывороток продукции на основе бактериофагов к польской модели, отличающейся индивидуальным сугубо лабораторным подбором бактериофагов из имеющегося музея штаммов для каждого конкретного пациента.

Последним в программе конференции выступил бельгийский врач-исследователь Гилберт Вербакен из ожогового центра военного госпиталя им. королевы Астрид с докладом: «Взгляды экспертов на существующую схему регистрации медицинской продукции: призыв к созданию специальной директивы разрешающей применение бактериофагов в клинической практике». В своей презентации он отметил, что распространение антибиотикорезистентных бактериальных штаммов в мире и отсутствие разработок новых антибиотиков подстегнули к поиску альтернативной и/или комплиментарной формы антибактериальной терапии. Бактериофаги - это вирусы бактерий, которые уже почти сто лет используются в борьбе с бактериальными инфекциями и особенно интенсивно в бывшем Советском Союзе. Антибиотиковый кризис пробудил интерес к бактериофагам как с целью их использования в клинической практике, так и в сельском хозяйстве, что, вкупе с новыми научными открытиями, ставит бактериофаги в авангард борьбы с бактериями. Введение бактериофаговой терапии в клиническую практику в сегодняшней Европе с её 27 государствами-членами сталкивается с определенными трудностями. Во-первых – являются ли бактериофаги человеческими лекарствами, которые попадают под существующий Европейский Кодекс лекарств, используемых у людей (Директива 2001/83/ЕС). Во-вторых, могут ли лечебные препараты, содержащие природные бактериофаги быть категоризованы в рамках имеющейся европейской регистрационной системы, или, наоборот, следует адаптировать европейский регламент? Авторы доклада изучили мнения экспертов касательно необходимости выработки адаптированного (или полностью нового) регламента для внедрения фаготерапии в Европе, проанализировав теку-

щие европейские регистрационные процедуры. Было проведено 35 собеседований (май-октябрь 2011) с различными экспертами по бактериофагам и/или регистрационным правилам. Эксперты представляли различные группы заинтересованных лиц, включавшие фармацевтическую промышленность (11), научных работников (18), медицинский персонал (5) и др (1). Собеседования проводились в Бельгии (15), Франции (8), Грузии (2), Германии (1), Польше (1), Португалии (1), Швейцарии (1), Нидерландах (1), Великобритании (2) и США (3). Респонденты рекомендовали каким образом бактериофаги могут (или не могут) вписываться в существующие регистрационные правила. Анкеты респондентов были проанализированы количественным перекрёстным методом для определения согласующихся моделей. Таким образом, суммированные предложения по более удобным и адекватным регистрационным стандартам были переданы в законодательный Совет Европы. В заключении Гилберт Вербакен отметил, что лишь специальная европейская директива по бактериофагам могла бы быть прямым ответом на препоны, возникающие из-за существующего регистрационного регламента, затрудняющего введение в настоящее время в Евросоюзе «пациент-ориентированной» бактериофаговой терапии.

Последняя конференция, на которой я представлял институт с устным докладом по разработанному на основе бактериофага специализированному продукту профилактического питания, была «Вторая международная конференция по антимикробным исследованиям», проводившаяся 21-23 ноября 2012 в Лиссабоне, Португалия. Всего в ней приняли участие 425 ученых из 59 стран мира. В том числе известный фаголог Мартин Леснер из цюрихского института Продуктов, питания и здоровья, с докладом, посвященным очень перспективному направлению использования бактериофагов «Конструированию бактериофаговых тест-систем для быстрой диагностики и контроля за патогенными бактериями». В своей презентации, которая была следующей по программе конференции после моего выступления, он подтвердил правомерность использования фаговых коктейлей с целью профилактики пищевых инфекции и продолжил, что *Listeria*, *Bacillus*, *Salmonella*, *Staphylococcus* и др. патогены достаточно часто встречающиеся при производстве продуктов питания и при

определенных условиях, вызывающие пищевые инфекции у человека, которые можно предотвратить с помощью новых методик быстрого обнаружения и эффективного контроля над этими организмами. Для этих целей в бактериофагах присутствует целый набор инструментов, которые можно элегантно использовать с помощью методов молекулярной биологии. Анализ генома фагов позволяет нам определить индивидуальные свойства фагов, предсказать механизмы упаковки их ДНК и идентифицировать гены, как потенциально связанные с нежелательными эффектами, так и кодирующие основные инструменты, обеспечивающие литическую активность бактериофагов, а именно эндолизины и хвостовые отростки. Пептидогликан-гидролазы – эндолизины, кодированные фаговым геномом, имеют определённые функциональные домены: EAD N-фрагмент отвечающий за пептидогликан гидролазную активность и CBD C-конец, домен прикрепления к стенке клетки, направляющий фермент к субстрату с высокой степенью сродства и специфичности. Белки, сшитые из фрагмента CBD и флюоресцентных белков могут использоваться в качестве моментальных маркеров для быстрого обнаружения бактериальных клеток-мишеней. Домены CBD позволяют провести эффективную идентификацию бактериальных штаммов даже в смешанных бактериальных сообществах и обогащенных культурах. Основываясь на структурных данных, эндолизины также могут быть использованы для расширения литической активности или модификации их распознавания и связывающих свойств. Перемена местами или мультипликация функциональных доменов позволяет конструировать химерные ферменты с улучшенными характеристиками, как в отношении усиления литических свойств, так и для более точной диагностической идентификации. Также возможно комбинированное использование доменных модулей, полученных от фагов разных бактериальных родов. Комбинация различных подходов, включающая геномику, протеомику и конфокальную и электронную микроскопию высокого разрешения позволяет определять архитектуру хвостового отростка и базальной пластины фага. Белки хвостового отростка по структуре близки к CBD домену эндолизинов; они также отвечают за специфическое распознавание и связывание с бактериальной клеткой. Они особенно полезны при использовании

с Грам отрицательными бактериальными клетками, где домены CBD эндолизиннов использовать нельзя. Другое не менее перспективное направление использования бактериофагов представил в своем докладе «Пестициды на основе бактериофагов, активные в отношении бактериальных патогенов растений» Томас Ковач из венгерского Центра нанофаготерапии. Автор в своем выступлении отмечал, что им удалось изолировать бактериофаги против *Erwinia amylovora*, патогена, вызывающего бактериальный ожог растений семейства розоцветных. Эффективность фагов против *E. amylovora* была доказана как в лабораторных, так и в полевых испытаниях, после чего в 2012 г. биопестицид против *E. amylovora* на основе фагов был разрешён для использования в сельском хозяйстве Венгерской республики. Электронномикроскопические исследования показали, что эти фаги принадлежат к семействам *Caudovirales* и *Myoviridae*. Авторами была определена полнотеловая последовательность 1 из этих фагов, состоящая из 243050 пар оснований. Наиболее эффективным способом обработки авторы считают разбрызгивание фагового коктейля в виде спрея на растения. Также в докладе были представлены предварительные результаты обработки фагами патогенов растений *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*.

Грузинские ученые Мая Мирабешвили и Нина Чанишвили в содружестве со специалистами бельгийского военного госпиталя им. королевы Астрид представляли доклад на тему: «Выделение, селекция и характеристика претендента в лечебные бактериофаги, вирулентного по отношению к шигаподобному токсину/ веротоксину продуцирующему штамму O104:H4 *Escherichia coli* (EAggEC STEC/VTEC), вызвавшему эпидемию 2011 г в Германии». Данный доклад также был мне очень интересен в связи с тем, что в коктейль, разработанный нашим институтом был включен фаг активный в отношении данного штамма эшерихий. В своей презентации авторы отмечали, что летом 2011 г. в Германии появился штамм *Escherichia coli* O104:H4, продуцирующий шигаподобный токсин, и вызвал серьёзную вспышку пищевой токсикоинфекции, сопровождавшуюся ГУС и кровавой диареей. Лечение антибиотиками не дало ожидаемого эффекта, в то время как насчитывалось более 3800 случаев заражения с 54 смертельными исходами. Все имевшиеся в распоряжении авторов

изоляты штаммов VTEC *Escherichia coli* O104:H4 показывали резистентность к бета-лактамам и цефалоспорином третьего поколения. Поскольку сводный анализ чувствительности к антибиотикам вкуче с карбапенемами и ципрофлоксацином не показали значительных преимуществ, было предложено рассмотреть другой способ антибактериального лечения, а именно фаготерапию. Были выделены 17 бактериофагов, активных в отношении штамма *E. coli* O104:H4. Некоторые бактериофаги были взяты из коллекции института бактериофага им. Г. Элиавы в Тбилиси, другие были «случайными» изолятами из сточных вод Военного Госпиталя Королевы Астрид в Брюсселе. Были получены несколько претендентов в лечебные бактериофаги, эффективно лизирующие штамм VTEC *Escherichia coli* O104:H4. Фаги кандидаты затем были оценены посредством геномного, протеомного анализа и электронной микроскопии, чтобы быть примененными в качестве специфических антибактериальных агентов, которые можно использовать для предотвращения подобных вспышек. В заключение автор отмечал, что фаготерапия должна чаще рассматриваться в качестве устойчивого потенциального естественного антибактериального оружия против растущей угрозы бактериальных инфекций, в т.ч. резистентных к различным препаратам.

1.2. БАКТЕРИОФАГИ – ПРОБИОТИЧЕСКИЕ СРЕДСТВА ДЕКОНТАМИНАЦИИ

Бактериофаги – это вирусы, характеризующиеся специфической способностью к избирательному инфицированию бактериальных клеток, принадлежащих к одному штамму или антигенно-гомологичным штаммам одного вида или рода [27]. По многочисленным данным литературы фаги могут быть использованы в качестве природных антимикробных агентов для борьбы с бактериальными инфекциями у людей, животных и сельскохозяйственных культур [14, 28, 37]. Весь спектр лечебных мероприятий такого рода обозначается исследователями как фаготерапия [57]. Ряд авторов допускают возможность практического применения бактериофагов в составе санитарно-гигиенических мероприятий в пищевой промышленности, сфере общественного питания, в детских и воинских коллективах, а также лечебно-профилактических учреждениях [1, 4, 8, 47, 69, 78]. Объединяя

все возможности такого применения бактериофагов термином биоконтроль, специалисты подразумевают их использование как непосредственно человеком в виде пероральных или иных форм фагокомпозиций, так и для обработки сельскохозяйственных культур и животных (до сбора урожая и забоя), инструментария и оборудования больниц и предприятий пищевой промышленности, полуфабрикатов или готовых продуктов питания с целью сокращения количества присутствующих на этих объектах определенных штаммов патогенных бактерий, в том числе вызывающих пищевые инфекции, а также для фагоидентификации потенциально опасных микроорганизмов [45, 46]. В данном обзоре, прежде всего, рассматриваются вопросы безопасного и эффективного применения бактериофагов в качестве пищевых добавок – средств деконтаминации пищевых продуктов (на всех стадиях производства) и пробиотических биологически активных добавок к пище, служащих дополнительным источником бактериофагов для организма человека, присутствие которых в нормофлоре позволяет снизить риск развития у индивидуума таких высококонтагиозных пищевых инфекций как эшерихиоз, сальмонеллез, дизентерия и т.д.

Вирусы бактерий были открыты в 1915 Frederick Twort, однако «Эра бактериофагов» начинается с публикаций Felix d'Herelle, который 95 лет назад впервые продемонстрировал присутствие фагов в нормальной микрофлоре людей и животных [27, 74]. Более поздние многочисленные исследования подтверждают присутствие и выделение фагов из организма человека и животных с калом, мочой, слюной и мокротой в норме и при патологии в концентрациях достигающих 10^6 БОЕ/мл [16, 35, 36, 40, 42, 44, 55, 56, 61, 62]. Кроме того доказано, что вирусы бактерий присутствуют повсеместно на объектах окружающей среды в воде, почве, на растениях и т.д. в количествах превышающих миллионы частиц на единицу субстрата (например, в капле морской воды) [30]. Таким образом, вопрос использования бактериофагов как части пищевого рациона может носить скорее количественный (исходя из содержания вирусных частиц в продукте), а не качественный характер, как это рассматривается в случае с химическими антибактериальными средствами. Ряд авторов относят бактериофаги к разряду пробиотиков, подчеркивая, что по своей

биологической природе они полностью подходят под определение ВОЗ: «Пробиотики – живые микроорганизмы, которые при применении в адекватных количествах полезны для организма хозяина» [25, 63, 75]. Специфичность характера взаимодействия фаговой частицы с индикаторной бактериальной культурой в принципе ограничивает возможность прямого отрицательного воздействия бактериофагов на организм (клетки) человека, что и является основой их безопасного применения для деконтаминации продуктов и предотвращения бактерионосительства. Однако теоретически при использовании бактериофагов можно предположить возникновение ряда побочных эффектов, которые могут реализовываться:

- во-первых, путем инфицирования бактерий нормальной флоры человека с развитием ятрогенного дисбактериоза как это происходит в случае применения других антимикробных агентов. Селекция производственных штаммов бактериофагов, используемых в целях фагопрофилактики, позволяет отобрать вирусные частицы с максимально узкими диапазонами специфической литической активности, ограниченной в рамках вида или даже штамма бактериального хозяина [21, 64]. Включение в фаговый коктейль, используемый в целях снижения риска развития пищевых инфекций, известных, по данным литературы, вирусов поражающих бифидобактерии и лактобациллы исключено [30]. Более чем 50-летний опыт применения моно и поливалентных фаговых рецептур как лекарственных средств в терапии ОКИ и декомпенсированных форм дисбактериоза в России (Советском Союзе) и Польше также подтверждает невозможность реализации неспецифической литической фаговой активности в отношении нормальной микрофлоры человека [6, 9, 15, 43];

- во-вторых, посредством стимуляции иммунных реакций человека. В результате проведенных клинических исследований было показано, что бактериофаги оказывают влияние на различные функции основных популяций клеток иммунной системы человека участвующих как в формировании врожденного, так и приобретенного иммунитета: продукцию цитокинов, пролиферацию Т-клеток, синтез антител, и, наконец, фагоцитоз и респираторные взрывы фагоцитов [34, 43]. В тоже время в процессе местной и системной фаготерапии (профилактики) не были

выявлены существенные анафилактические реакции за исключением эндотоксической, связанной как с качеством используемой фаговой композиции (что будет рассмотрено ниже), так и с реакцией бактериолиза (реакция Яриша-Геркстеймера) *in situ* [60]. Минимизируя концентрацию фаговых частиц при профилактическом использовании бактериофагов до титра высеваемого из организма человека (10^3 - 10^6 БОЕ/мл) можно уменьшить количество эндотоксина одномоментно образующего при бактериолизе [60]. Польские исследователи акцентируют внимание на модулирующем влиянии бактериофагов на некоторые иммунные реакции, вызванные патогенными бактериями и вирусами, что может положительно проявляться в синергетическом (антибактериальном и иммуномодулирующем) эффекте бактериофагов [34, 43];

– в-третьих, путем модуляции вирулентности бактерии-хозяина. Предотвращение данного воздействия бактериофагов на организм человека, также напрямую связано с направленной селекцией производственных штаммов, подразумевающей включение в композицию исключительно вирулентных фагов, не образующих ни при каких условиях устойчивых лизогенов на бактериальной культуре [41, 76, 77]. Таким образом, можно избежать как прямой модификации фенотипа бактерии за счет прикрепления к ДНК хозяина профагового генома, так и трансдукции генов, кодирующих токсины, от лизогенных токсигенных бактериальных культур к непатогенным (т.н. горизонтальный перенос), а также снизить вероятность переноса между микроорганизмами генов антибиотикорезистентности и возникновения фагоустойчивых лизогенных бактериальных культур [25].

– в-четвертых, путем спонтанной трансдукции неумеренных (вирулентных) фагов. Опасность данного феномена заключается в переносе известных локусов патогенности, которые могут находиться в геноме бактериофага. Используя ПЦР-типирование на токсин-кодирующие штаммы или полное секвенирование фагового генома, можно максимально обезопасить применение бактериофагов у человека [45, 51].

– в-пятых, посредством введения в организм человека токсинов бактерии-хозяина, содержащихся в стерильном фильтрате фаголизата. Качество готового фагового коктейля обязательно

контролируется на содержание эндо- и экзотоксинов [33]. Концентрацию экзотоксинов можно свести к нулю используя непатогенные бактериальные культуры для наращивания биомассы бактериофагов (например, *E. coli* K-12 для эшерихиозного и *L. innosua* для листериозного фага) [38]. Содержание эндотоксина в композиции, определяемое после дополнительной очистки стерильного фильтрата фаголизата, нормируется в единицах эндотоксина на мл согласно регулирующих правил страны производителя (так, по документам EFSA – 50 ЕЭ/мл) [41]. Количество же эндотоксина, выделяющегося *in situ*, не подлежит контролю, однако может быть отрегулировано с помощью дозы и кратности приема бактериофагового коктейля.

Таким образом, после более чем восьмидесятилетнего изучения фагов и их взаимодействия с эукариотическими клетками (в т.ч. животных и человека) свидетельств негативного специфического воздействия бактериофагов на здоровье человека не выявлено [57].

Рассматривая вопрос «полезности для организма хозяина» или эффективности применения бактериофагов у человека необходимо отметить, что уже более сорока лет в Советском Союзе сначала на базе Тбилисского научно-исследовательский института вакцин и сывороток им. Г. Элиавы и Уфимского научно-исследовательский института вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, а позднее и в Российской Федерации на филиалах предприятия ФГУП «Микроген» (Нижегородском, Пермском и Уфимском) производятся свыше десятка наименований лекарственных средств как на основе отдельных видов бактериофагов, так и их комбинаций для лечения и профилактики острых кишечных инфекций и декомпенсированных форм дисбактериоза, а также против возбудителей ряда гнойно-воспалительных инфекций [6, 7]. Это жидкие и таблетированные формы лечебных моновалентных препаратов стафилококкового, стрептококкового, коли, клебсиеллезного, сальмонеллезного, дизентерийного, брюшнотифозного, протейного и синегнойного бактериофагов и комбинированные рецептуры содержащие несколько видов фагов: коли-протейный, пиобактериофаг (против стафило-, стрептококков, клебсиелл, протеев, синегнойной и кишечной палочек), интести-фаг (против шигелл, сальмонелл, стафило-, энтерококков, протеев, кишечной и синег-

нойной палочек) и др. [13]. Лекарственные препараты представляют собой стерильные фильтраты бактериальных фаголизатов, их назначают внутрь и местно: орошение ран и слизистых оболочек, введение в полость матки, мочевого пузыря, уха, придаточных пазух носа, конъюнктиву глаза, а также в дренированные полости – брюшную, плевральную, в полости абсцессов после удаления гноя (табл. 1а.). В последние годы в России бактериофаги в качестве терапевтических средств нашли свое применение в стоматологической и дерматологической практике. На их основе выпускаются зубная паста и крем [11].

Мировая практика фаготерапии значительно уступает российской (за исключением, может быть, польской и грузинской). На фоне десятков тысяч пациентов, принимающих бактериофаги по назначению врачей в Российской Федерации (что количественно согласуется с объемом продаж лекарственных препаратов на основе бактериофагов по данным ежегодного розничного аудита, проводимого кампаниями IMS Health, DSM, RMBC и Фармэксперт) в рамках отраслевого стандарта медицинской помощи: «Дисбактериоз кишечника. Протокол ведения больных.» [22], немногочисленные современные сообщения западных коллег (в сороковые годы прошлого столетия массовый выпуск бактериофагов осуществлялся компаниями L'Oreal во Франции – 5 наименований препаратов и Eli Lilly в США – 6 разновидностей моно и поливалентных лекарственных фагосодержащих средств) о проводимых начальных стадиях клинических испытаний в США, Великобритании и Бельгии выглядят более чем скромно [74] (табл.16). Однако опыт применения фагов в комплексе санитарно-эпидемиологических процедур в странах ЕЭС, США и Канады представлен в научной литературе достаточно широко [45, 46, 47]. Эти мероприятия включают в себя четыре сферы деятельности: (1) бактериофаг-опосредованный биоконтроль – использование фагов для борьбы с бактериями поражающими сельскохозяйственные растения и животных на этапе предшествующем их попаданию на перерабатывающие заводы (овощи, фрукты и т.д., до сбора урожая; мясной и молочный скот, домашняя птица и т.д. до забоя); (2) фаговый биопроцессинг – применение бактериофагов для деконтаминации овощей, фруктов, мяса, рыбы и т.д. в процессе их заводской переработки перед упаков-

Табл. 1а. Опыт клинического применения бактериофагов в России и Советском Союзе.

Автор	Год публикации	Ссылка	Этиологический фактор	Нозология	Количество пациентов	Наименование бактериофагового препарата	Эффективность фаготерапии	Детали исследования
Акимкин и др.	2002, 2010	1, 2	Сальмонелла	Нозокомальный сальмонеллез	459 пациентов и 2500 сотрудников	сальмонеллезный	Отсутствие фактов бактериовыделения в течение 12 месяцев после санации	Доза: 2-4 таблетки 3 раза в день в течение 5-7 дней; описан феномен «самоизлечения» - при наличии собственных штаммов фагов в организме пациентов
Анпилов и др.	1984	4	Шигелла Флекснера	Дизентерия	3000 человек	Поливалентный дизентерийный в таблетках с кислотоустойчивым покрытием	Эффективное средство профилактики вспышек в замкнутых коллективах	Доза: 2 таблетки 1 раз в 3 дня с июня по октябрь в разных географических зонах СССР
Бабалова и др.	1968	5	Шигелла Флекснера и Зонне, <i>E. coli</i>	Дизентерия	30 769 детей в возрасте от 0,5 года до 7 лет	Дизентерийный в таблетках	Количество заболевших в 3,8 раз ниже по сравнению с контрольной группой	
Ворошилова и др.	2010	10	<i>E. aerogenes</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>E. agglomerans</i>	Кишечные инфекции Септические заболевания новорожденных Урологическая инфекция Хирургическая инфекция	110 детей 26 детей 50 20	Энтеробактер поливалентный очищенный	Эффективность чем традиционная антибиотикотерапия на 20-40%	
Жуков-Вережников и др.	1978	12	Стафилококк, стрептококк, <i>E. coli</i> , протей, <i>P. aeruginosa</i>	Хирургическая гнойная инфекция	60	Индивидуально адаптированные и производственные штаммы стафило-, стрепто-, коли-, протей- и синегнойного фагов	Применение препаратов бактериофагов оказалось высокоэффективным	Индивидуально адаптированные штаммы более эффективны чем производственные
Захарова и др.	2010	13	<i>E. coli</i> , <i>S. pyogenes</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Kl. pneumoniae</i>	Инфекция мочевыводящих путей (ИМВП)	65 беременных женщин	Коли-, стафило- и стрептококковый бактериофаги	использование фагов у беременных с ИМВП позволила предотвратить возникновение и развитие осложнений беременности и родов, тяжелых гнойно-септических заболеваний, как со стороны матери, так со стороны новорожденного, снизить материнскую и детскую смертность	Доза: через рот по 20,0 мл препарата 2-3 раза в день, натошак, и параллельно по 5-10,0 мл 2 раза в день (на 40-60 мин.) вагинально в тампонах, Продолжительность курса 7-10 дн.
Литвинова и др.	1978	17	<i>E. coli</i> , протей	Сепсис новорожденных	500 недоношенных детей	Коли-протейный бактериофаг	Применение бактериофага позволило значительно снизить летальность	Суточная доза 4 мл/кг в 2 приема в течение 3 дней 2 курсами с перерывом 3-4 дня
Милютин	1990	19	<i>S. typhimurium</i> , <i>S. enteritidis</i> , шигелла Флекснера	Сальмонеллез, дизентерия	45 детей до года, 67 детей старше года	Сальмонеллезный, дизентерийный бактериофаги	Санитизирующий эффект сальмонеллезного фага 81,8-85,4%, дизентерийного – 90,9%	Отмечен синергизм фаго-и антибиотикотерапии
Нилова	2009	20	УПМ: <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella spp.</i> , <i>Proteus spp.</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. faecalis</i>	Дисбактериоз	80 детей до года, 47 детей от 1 до 3 лет	Стафилококковый, протейный, колифаг, азругинозафаг, колипротейный, пиолифаг, секстафаг, интести, клебсиелла пневмонии, клебсиллезный поливалентный	Фаготерапия - перспективный метод коррекции дисбактериоза толстого кишечника	Проводилась предварительное тестирование чувствительности УПМ к препаратам различных производителей (Филиалов ФГУП «Микроген»)
Погорельская	1969	21	Энтеропатогенные кишечные палочки, <i>Pr. vulgaris</i> , <i>Pr. mirabilis</i> , шигелла Флекснера	ОКИ	3547 детей ясельного возраста	Колипротейный бактериофаг, дизентерийный бактериофаг	Фагопрофилактика в течение эпидемического сезона снижала заболеваемость кишечными инфекциями	Многократное и регулярное фагирование (16-20 раз в год)
Шахмарданов М.З.	1997	2	Шигелла Флекснера, сальмонелла	Дизентерия, сальмонеллез	29 41	Пиобактериофаг поливалентный	Уменьшение продолжительности диарей и болей в животе по сравнению со стандартной терапией	Суточная доза 30 мл

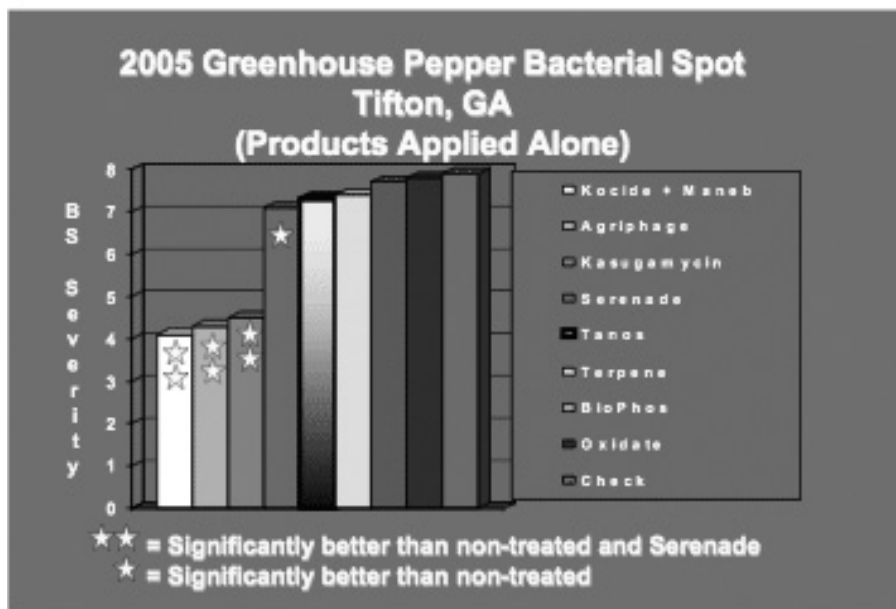
кой готовой к употреблению продукции; (3) профилактический прием бактериофагов людьми в качестве пробиотической биологически активной добавки к пище для снижения риска развития спорадических случаев и эпидемических вспышек пищевых ин-

Табл. 16. Зарубежный опыт клинического использования бактериофагов.

Авторы	Год публикации	Ссылка	Нозология	Количество пациентов	Наименование препарата	Эффективность фаготерапии	Детали исследования
Markoishvili et al. (Маркошвили К. и др.)	1999	18	Кожные язвы на фоне венозного застоя	100	PhagoBioDerm (Фагобиодерм)	Полное рубцевание язв в 70% случаев	Комбинированный препарат пролонгированного действия на основе пропитанного бактериофагом и антибиотиком полимера
Slopek et al.	1987	73	Варикоз вен с изъязвлением и воспалением Фурункулез и воспаление соединительной ткани и лимфатических сосудов Гнойная инфекция Гнойный перикардит Метициллинрезистентная стафилококковая инфекция Пиогенный артрит и миозит Пиогенный остеомиелит Заболевания ЖКТ (в т.ч. пищевые инфекции) Заболевания дыхательной системы Конъюнктивит, блефароконъюнктив и средний отит Заболевания урогенитального тракта Септицемия	36 162 370 7 550 взрослых и 90 детей 19 40 48 180 16 42 98	Индивидуально подобранные штаммы фагов	В 75% случаев положительный результат фаготерапии Выздоровление - 95% В 92,4% - положительный эффект 100% эффективность Эффективность - 93% Эффективность - 95,5% Положительный эффект в 89,5% и 90% случаев, соответственно Эффективность фаготерапии достигала 100% 86,7% положительных случаев 93,8% эффективность фаготерапии 92,9% случаев положительная динамика 88,8% - выздоровления	
Weber-Dabrowska et al.	2003	79	Септическая инфекция	94	Индивидуально подобранные штаммы фагов	80 больных - полное выздоровление, 14 - только падение температуры (не удачная терапия)	
Cislo et al.		39	Хроническая гнойничковая инфекция кожи	31	Индивидуально подобранные штаммы фагов	У 25 пациент на фоне фаготерапии наступило улучшение	Фаги принимали через рот и местно
Abdul-Hassan et al.	1990	24	Раневая ожоговая инфекция, вызвавшая антибиотикорезистентный сепсис (<i>P. aeruginosa</i>)	30	Штаммы фага против <i>P. aeruginosa</i> предварительно выделены из раны	Улучшение (в том числе грануляции) у 24 пациентов	3 раза в день меняли бинты пропитанные фагами в титре 10^{10} БОЕ/мл
Merabishvili et al.	2009	64	Раневая ожоговая инфекция, вызванная <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i>	8	BFC-1	Побочных эффектов не наблюдалось	Наносили аэрозольно на раневую поверхность
Lang et al.	1979	53	Септические осложнения ортопедических операций	7		Эффективность в 6 случаях	
Wright et al.	2009	80	Хронический отит, вызванный <i>P. aeruginosa</i>	24	Biophage-PA	Полное выздоровление - 25%, улучшение - 92% случаев	

фекций; (4) фагоидентификация потенциально опасных микроорганизмов (не рассматривается в данном обзоре).

Примером фаг-опосредованного биоконтроля может служить зарегистрированный в декабре 2005 года Агентством охраны окружающей среды США (US EPA) биопестицид AgriPhage, содержащий коктейль вирулентных фагов лизирующих *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* и *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato*, поражающих плоды томата и перца (т.н. «черная» бактериальная пятнистость) [76]. Первоначально бактериофаги, вошедшие в биопестицид, были выделены (изолированы) с плодов овощей, инфицированных этими бактериями. Эффективность использования бактериофагов на культуре парникового перца в сравнении с химическими пестицидами представлена на рисунке 1. В литре фагового коктейля, производимого американской фирмой OmniLytics, содержится не менее $4,1 \times 10^{12}$ вирусных частиц (т.е. $4,1 \times 10^9$ БОЕ/мл). Для опрыскивания 1 акра овощных плантаций



Rating scale is 1=little disease spread, 10=100% spread.

Ratings taken by three separate people, then results were compared for consistency.

Рис. 1. Сравнение эффективности использования 8 видов пестицидов, активных в отношении бактериальной пятнистости парникового перца. Все пестициды использовались по отдельности. Второй столбец слева – AgriPhage, девятый (красный) – контроль, звездочками отмечены существенные различия в распространении болезни по парниковым плантациям перца, деления шкалы от 1 – локальное распространение болезни, до 10 – 100% поражение плантации [84].

используется 1 или 2 пинты AgriPhage, разведенного в 100 галлонах воды [84].

В 2006-2007 годах OmniLytics получила одобрение Департамента сельского хозяйства США (USDA) на использование композиции на основе бактериофагов против *E.coli* O157:H7 и сальмонелл (BacWash) для обработки перед забоем шкур домашнего скота, а также всех мест возможного инфицирования животных перед их умерщвлением (загонов, транспортных контейнер и т.д.) [43]. В таблице 2 приведены исследования подтверждающие высокую эффективность бактериофагов в сфере биоконтроля растений и животных в последствии употребляемых человеком в пищу.

В качестве примера фагового биопроектирования может быть представлена зарегистрированная в 2006 году Управлением по продовольствию и медикаментам США (US FDA) фагосодержащая пищевая добавка (вспомогательное техническое средство – processing aid) на основе поливалентного листериозного коктейля – ListShield (LMP-102, производитель Intralytix, США) – «*Listeria monocytogenes* Specific Phage Preparation», включающего 6 различных фагов, к ко-

Табл. 2. Примеры бактериофаг-опосредованного биоконтроля у растений и животных, используемых в производстве продуктов питания.

Вид растения или животного	Контролируемая инфекция	Бактериальный штамм-хозяин для используемого бактериофага	Ссылка
Культивируемые грибы	Бактериальная пятнистость	<i>Pseudomonas tolaasii</i>	65
Томаты	Бактериальная пятнистость	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	31
Яблоки	Бактериальный ожог	<i>Erwinia amylovora</i>	71
Косточковые фрукты	Бактериальная пятнистость слив	<i>X. campestris</i> pv. <i>pruni</i>	70
Ростки (бобовых)	Контаминация семян	<i>Salmonella enteritidis</i>	67
Рыба	Болезнь красного плавника	<i>Aeromonas hydrophila</i>	81
	Геморрагический асцит	<i>Pseudomonas piecoglossicida</i>	68
Курица	Сальмонеллез слепой кишки	<i>Salmonella enteritidis</i>	72
	Летальная инфекция	<i>Salmonella typhimurium</i>	32
	Респираторная инфекция	<i>Escherichia coli</i>	50
Мясной скот	Бактериальное выделение	<i>E. coli</i> O157:H7	29
Молочный скот	Мастит	<i>Staphylococcus aureus</i>	47
Свины	Сальмонеллез миндалин и слепой кишки	<i>Salmonella typhimurium</i>	54

торому чувствительны 170 штаммов *L. monocytogenes*, позволяющая производить обработку готового к употреблению (т.н. RTE products) мяса домашних животных и птиц. Эта пищевая добавка применяется непосредственно перед упаковкой на мясокомбинатах и птицефабриках для деконтаминации полуфабрикатов, колбас, мясных нарезок путем аэрозольной обработки их поверхности в дозе не более 1 мл на 500 см² площади пищевых продуктов [69, 77]. Экспериментально доказана эффективность этого коктейля и при обработке фруктов [58, 59].

В том же году FDA признало, что пищевую добавку Listex (производитель Microcos, Нидерланды) на основе штамма листериозного бактериофага P100 можно отнести к классу пищевых добавок GRAS – Generally Recognised as Safe – как правило безопасных, т.е. не требующих дополнительных исследований подтверждающих безопасность их применения в пищевой промышленности, и использовать при производстве сыра, а позже (в 2007 году) и других продуктов питания (EFSA дало разрешение на деконтаминацию с помощью Listex сырой рыбы в 2012 году) [41, 45, 51, 83]. Примеры использования данной пищевой добавки на основе листериозного бактериофага в биопроцессинге различных пищевых полуфабрикатов приведены на рисунках 2 и 3. Показательно, что эффективные концентрации бактериофага различаются в зависимости от деконтаминируемого продукта. Так в жидких пищевых продуктах (молоко и сырный рассол), распространение фаговых частиц происходит

равномерно и свободно. Иначе дело обстоит в случае продуктов с ровной твердой поверхностью (хот-доги, листья салата и т.д.), где общая площадь поверхности и ее способность впитывать жидкость из фаговой суспензии являются решающими параметрами. Самыми сложными с точки зрения фагового биопроцессинга являются продукты с неровной поверхностью обладающие большой площадью (рыба, мясо и морепродукты), что физически ограничивает доставку фаговых частиц ко всем бактериальным клеткам-мишеням. Таким образом экспериментально была подобрана универсальная (с точки зрения достижения максимального эффекта деконтаминации пищевых продуктов) концентрация суспензии листерийного бактериофага – не менее 10^8 БОЕ/мл или см^2 [48].

В 2011 году Intralytics представила на рассмотрение в US FDA коктейль из 3 вирулентных бактериофагов (EcoShield или ECP-100) относящихся к семейству *Myoviridae*, первично выделенных из пресной и морской воды, активных в отношении 111 штаммов *E. coli* O157:H7, 76 штаммов *E. coli* других серотипов и 20 штаммов иных видов бактерий и получила разрешение (Food Contact Notification) на его использование в процессе переработки сырого мяса и фарша [26, 45]. Авторы показали высокую эффективность (количество бактерий *E. coli* сократилось на 95% за 24 часа) разработанной пищевой добавки при деконтаминации разрешенного класса полуфабрикатов (см. рис.4).

В том же году Голландский медицинский экспертный совет выдал Microeos временное разрешение на использование пищевой добавки на основе сальмонеллезного бактериофага (Salmonex) с целью проведения полномасштабных испытаний на базе одной из крупнейших в Европе птицеперерабатывающих фабрик [83]. А уже в 2012 году Intralytics представила на рассмотрении FDA с целью последующего получения разрешение на пищевую добавку категории GRAS SalmoFresh – коктейль литических бактериофагов, специфически активных против высоко патогенных штаммов сальмонелл серотипов Typhimurium, Enteritidis, Heidelberg, Newport, Hadar, Kentucky, Thompson, специально разработанный для деконтаминации сырого мяса и птицы до разделки туш [82]. В экспериментальных работах при искусственном инфицировании *S. enteritidis* куриной кожи, *S. typhimurium* куриных ножек и сосисок из куриного мяса независимые исследователи показали

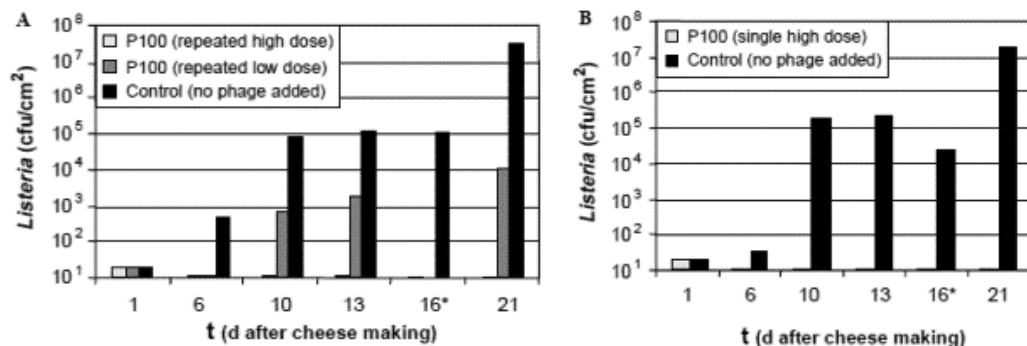


Рис. 2. Деконтаминация мягкого сыра листериозным бактериофагом P100. Искусственную контаминацию мягкого сыра проводили в процессе его изготовления суспензией содержащей *L. monocytogenes* в концентрации 6×10^3 КОЕ/мл, что приблизительно соответствовало 2×10^1 КОЕ/см² поверхности сыра, далее сыр омывался раствором листериозного бактериофага P100: а) многократно в дозировках 3×10^9 БОЕ/мл (high dose), что приблизительно соответствовало 6×10^7 БОЕ/см² поверхности сыра и $1,5 \times 10^8$ БОЕ/мл (low dose) – 2×10^6 БОЕ/см² поверхности сыра и б) однократно из расчета 1 мл фага с титром 6×10^8 БОЕ/мл на 65 см² поверхности круглого плоского куска сыра, что соответствовало приблизительно 6×10^7 БОЕ/см², в контрольных образцах фаг не использовался [38].

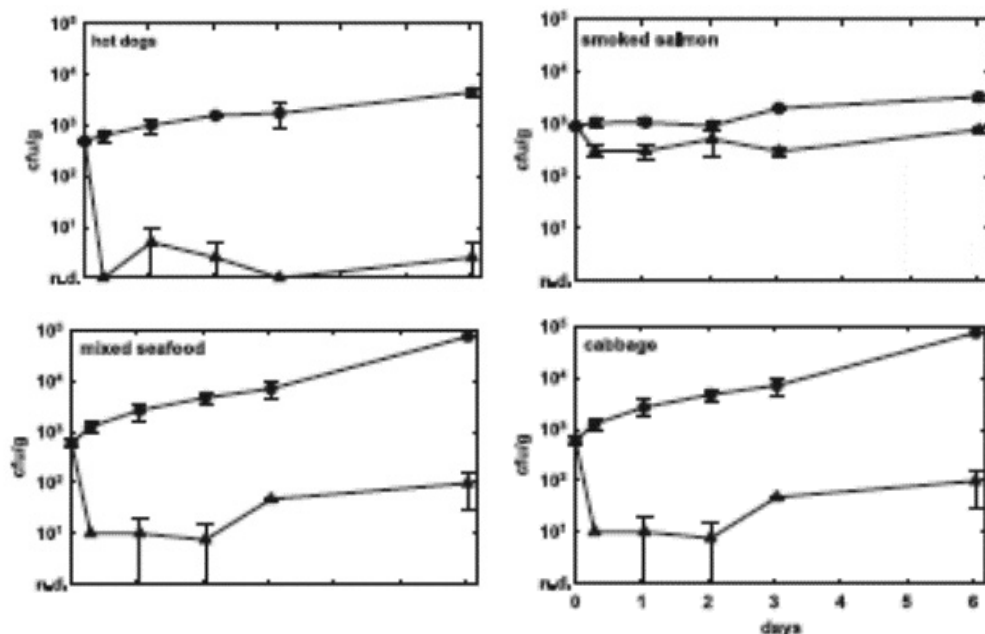


Рис. 3. Эффективность использования фага P100 при обработке четырех различных RTE продуктов (слева на право: хот-дог, копченый лосось, смесь из морепродуктов и кабачки) контаминированных *L. monocytogenes* WSLC 1001. Образцы контаминировали бактериями в титре 1×10^3 КОЕ/г или мл, а затем примерно через час обрабатывали P100 (3×10^8 БОЕ/г или мл). Продукты хранили в течение 6 дней при температуре 6°C и ежедневно регистрировали количество бактерий присутствующих на их поверхности. Кружками на графике обозначены контрольные образцы (без добавления фага), треугольниками – образцы обработанные P100 [48].

эффективность фагового коктейля, позволившего на 2 lg снизить контаминацию полуфабрикатов [45, 46, 47]. Обработка коктейлем бактериофагов (PC1), содержащем в своем составе фаг Felix 01 с широким спектром литической активности, инфицированной *S. typhimurium* кожи свиньи, также позволила существенно снизить плотность бактериального обсеменения, а в случае использования концентрации фаговых частиц в 10 и более раз превышающих плотность искусственного бактериального инфицирования удалось добиться 99% деконтаминации её поверхности [49].

Третья сфера санитарно-эпидемиологического использования бактериофагов, позволяющая существенно снизить риск возникновения вспышечных и sporadических случаев пищевых инфекций, полностью отражена в разработанной компанией Intralytics пробиотической БАД на основе шигеллезного бактериофага («phage-based probiotic dietary supplement» цитата по оригиналу) ShigActive. В настоящее время проходит 3 фаза проекта предполагающего широкомасштабное использование данной БАД в армии США [52, 82]. Идея профилактического приема дизентерийного и других видов бактериофагов (сальмонеллезного, брюшнотифозного и т.д.) не нова и использовалась в Вооруженных Силах и других замкнутых коллективах еще в период Советского Союза [4, 3, 21]. Однако бактериофаговые препараты до сих пор использовались в форме лекарственных средств. Идея их введения в пищевой рацион без назначения врача принадлежит американским ученым (Sulakvelidze и Kutter) [25, 63, 75].

В заключение следует отметить, что в настоящее время в мире насчитывается немногим более 10 компаний-производителей лекарственных препаратов, ветеринарных средств и пищевых добавок на основе бактериофагов (табл. 3). Рост антибиотикоустойчивых штаммов стафилококка, синегнойной палочки, кампилобактерий, клостридий, ацинетобактер и многих других служит непрерывным стимулом для создания этими фирмами новых фаговых препаратов активных в отношении данных патогенных микроорганизмов. Когорта российских ученых и клиницистов, занимающихся новыми разработками в области бактериофагов, одна из наиболее многочисленных в мире, что и позволяет нашей стране удерживать передовые позиции в этой области медицины.

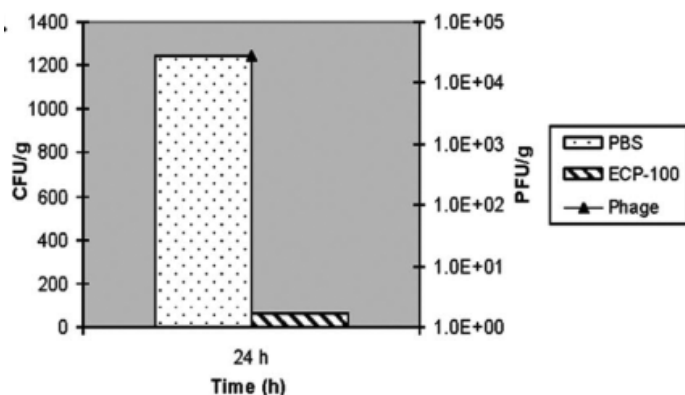


Рис. 4. Деконтаминация мясного фарша, обсемененного 3 штаммами *E. coli* O157:H7 (Ec 229, Ec 230 и Ec 231) в титре $3,4 \times 10^3$ КОЕ/г, в течении 24 после использования 1,9 мкл/г ECP-100 [26].

Табл/ 3. Производители и разработчики фагосодержащих средств.

Наименование фирмы	Страна	Ключевая компетенция	Адрес сайта
Biochimpharm или Biopharm Pharmaceuticals	Грузия	Производство на базе института Г. Элиавы (моно и поливалентные фаги: стафило-, стрепто-, колифаг, интести-, фиофаг и др.)	www.biochimpharm.ge , biopharm@got.ge
AmpliPhi Biosciences (ранее Biocontrol и Targeted Genetics)	США и Великобритания	Клинические испытания синегнойного фара BioPhage-PA (лечение отитов) и BioPhage-RA (кистозный фиброз)	www.ampliphio.com
Biophage Pharma Inc.	Канада	Клинические испытания на свиньях и птицах <i>E. coli</i> и <i>S. typhimurium</i> [66]	www.biophagepharma.net
GangaGen Biotechnologies	США, Индия	Разработка препаратов на основа фагов против MRSA штаммов <i>S. aureus</i> и <i>P. Aeruginosa</i>	www.gangagen.com
ФГУП «НПО Микроген»	Россия	Серийное производство на базе 3-х заводов (моно и поливалентных фагов: стафило-, стрепто-, синегнойного, протейного, колифага, интести-, пикокомбинированного, секстафага и др.)	www.microgen.ru
Intralix	США	пробиотический БАД на основе шигеллезного бактериофага – ShigActive, поливалентный листериозный коктейль – ListShield для обработки готовых к употреблению продуктов, EcoShield – поливалентный эшерихиозный коктейль для обработки сырого мяса и фарша, SalmoFresh – коктейль литических сальмонеллезных бактериофагов для обработки сырого мяса и птицы	www.intralix.com
Microcos	Нидерланды	Listex – поливалентный листериозный фаз P100 для обработки любых полуфабрикатов, Salmoalex – сальмонеллезный бактериофаг для обработки сырого мяса и птицы	www.microcos.com
Omnilytics	США	биопестицид AgriPhage, содержащий коктейль вирулентных фагов лизирующих <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> и <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>Tomato</i> , поражающих плоды томата и перца (т.н. «черная» бактериальная пятнистость)	www.omnilytics.com
Novolytics	Великобритания	Разработка фагов против MRSA штаммов <i>S. aureus</i> для местного применения и обработки катетеров и других вводимых в организм медицинских устройств на основе геля	www.novolytics.co.uk
Phage Biotech	Израиль	Клинические испытания глазных и ушных капель на основе синегнойного фага	www.phage-biotech.com
Special Phage Services	Австралия	Клинические испытания MediPhage – стафилококкового бактериофага (MRSA) штаммы, а также разработка коктейлей фагов против полирезистентной <i>P. aeruginosa</i> (VRPA) и ванкомицин-резистентного энтерококка (VRE)	www.specialphageservices.com.au
Viridax	США	Разработка фагов против <i>S. aureus</i> и других видов стафилококка	www.viridax.com

ЛИТЕРАТУРА

- Акимкин В.Г. Дарбеева О.С., Колков В.Ф. Бактериофаги: исторические и современные аспекты их применение: опыт и перспективы. Клиническая практика, 2010, №4, С. 48-54.
- Акимкин В.Г., Покровский В.И. Нозокомиальный сальмонеллез взрослых. Москва, из-во РАМН, 2002, с. 136.
- Андреева Е. И. Эпидемиологические особенности и профилактика нозокомиального сальмонеллеза в детских инфекционных стационарах. Автореф. дисс. канд. мед. наук, 2005, с. 28.

4. Анпилов Л.И., Прокудин А.А. Профилактическая эффективность сухого поливалентного дизентерийного бактериофага в организованных коллективах. Военно-медицинский журнал, 1984, №5, С. 39-40.
5. Бабалова Г.Г., Кацитадзе К.Т., Сакварелидзе Л.А. и др. О профилактическом значении дизентерийного сухого бактериофага. Ж. микробиол. эпидемиол. и иммунобиол., 1968, №2, С. 143-145.
6. Бойцов А.Г., Порин А.А., Ластовка О.Н. и др. Бактериофаги. Под. Ред. В.П. Иванова, Санкт-Петербург : Санкт-Петербургская медицинская академия, 2006, с. 99.
7. Бондаренко В.М. Клинический эффект и пути рационального использования лечебных бактериофагов в медицинской практике. Приложение к Журналу инфектологии, 2011, Том 3, №3, С. 15-19.
8. Брусина Е.Б. Принципы профилактики внутрибольничных гнойно-септических инфекций в хирургических стационарах. Главная медицинская сестра, 2002, №11, С.113-115.
9. Воробьев А.А., Пак С.Г., Савицкая К.И. и др. Дисбактериозы у детей. Учебн. пособие ММА им. И. М. Сеченова, М., 1998, с.64.
10. Ворошилова Н.Н., Алферова Э.В., Дарбеева О.С. и др. Изучение клинической эффективности препарата бактериофага Энтеробактер поливалентного очищенного. Биопрепараты, 2010, №2 (38), С.31-33.
11. Желудева И.В., Жиленков Е.Л., Максимовская Л.Н. и др. Обоснование выбора бактериофагов для лечения воспалительных заболеваний пародонта. Пародонтология, 2002, № 1/2., С. 46-50.
12. Жуков-Вережников Н. Н. Перемитина Л.Д., Берило Э.А. и др. Изучение терапевтического эффекта препаратов бактериофага в комплексном лечении гнойных хирургических заболеваний. Советская медицина, 1978, № 12, С. 64-66.
13. Захарова Ю. А., Николаева А. М., Падруль М. М. Использование препаратов бактериофагов у беременных при инфекциях мочевыводящих путей. Биопрепараты, 2010, №2 (38), С.14-17.
14. Красильников И. В. Лобастова А. К., Лыско К. А. Некоторые аспекты современного состояния и перспективных направлений развития производства и применения лечебно-профилактических препаратов бактериофагов. Биопрепараты, 2010, №2 (38), С.28-33.
15. Крылов В.Н. Фаготерапия с точки зрения генетики бактериофага. Генетика, июль 2001, Том 37, №7, С. 869-887.
16. Куликов Е.Е., Исаева А.С., Роткина А.С. и др. Разнообразие и динамика бактериофагов в фекалиях лошадей. Микробиология, 2007, Том 76, №2, С.271-278.
17. Литвинова А. М., Тчецова В.М., Кавтрева И.Г. К оценке эффективности применения коли-протейного бактериофага при дисбактериозе кишечника у новорожденных недоношенных детей. Вопросы охраны материнства и детства, 1978, Т. 23, С.42-44.
18. Маркошвили К., Джавакишвили Н., Гордедзишвили М. и др. Фагобиодерм — новые перспективы для лечения ран и трофических язв. Эксперим. клин. медицина, 1999, № 2. - С. 83-84.
19. Милютин Л.Н. Фаготерапия острых кишечных инфекций у детей. Актуальные вопросы кишечных инфекций, Тез. докл. научн.-практ. конф., Ташкент, из-во «ФАН», 1990, С. 107-109.
20. Нилова Л. Ю. Характеристика условно-патогенных микроорганизмов, выделенных при диагностике дисбактериоза толстого кишечника. Автореф. Дисс. канд. мед. наук, 2009, с. 22.
21. Погорельская С.А. Коли-протейный бактериофаг. Принципы его приготовления и применения для терапии и профилактики кишечных заболеваний детей ясельного возраста. Автореф. Дисс. докт. мед. наук, 1969.
22. Отраслевой стандарт. Система стандартизации в здравоохранении российской федерации. Дисбактериоз кишечника. Протокол ведения больных. Утверждено приказом Минздрава России от «9» июня 2003 г. № 231.
23. Суворова М.А., Рябчук Ф.Н. Чувствительность микробиоты кишечника к бактериофагам и пробиотикам у детей с заболеваниями органов пищеварения. Лечащий врач, 2011, №6, С. 21-23.
24. Abdul-Hassan H.S., El-Tahan K., Massoud B., Gomaa R. Bacteriophage therapy of Pseudomonas burn wound sepsis. Ann Med Burn Club, 1990, Vol. 3, P.262-264.
25. Abedon T. Stephen, Kuhl J. Sarah, Blasdel G. Bob, Kutter Martin Elizabeth. Phage treatment of human infections. Bacteriophage, 2011, Vol. 1:2, P. 66-85.
26. Abuladze Tamar, Li Manrong, Menetrez Y. Marc et al. Bacteriophages Reduce Experimental Contamination of Hard Surfaces, Tomato, Spinach, Broccoli, and Ground Beef by Escherichia coli O157:H7. Applied and Environmental Microbiology, Oct. 2008, Vol. 74, No. 20, P. 6230-6238.
27. Adams H. Mark. Bacteriophages, 1959, Interscience Publishers, Inc., New York, Interscience Publishers Ltd., London, p. 592
28. Alisky J. Iczkowski K, Rapoport A, Troitsky N. Bacteriophages show promise as antimicrobial agents. J Infect, 1998, Vol. 36, P. 5-15.
29. Bach S.J., McAlister T.A., Veira D.M. et al. Transmission and control of Escherichia coli O157:H7 – a review. Can. J. Anim. Sci., 2002, Vol. 82, P. 475-490.
30. Bacteriophages. Ed. Ipek Kurtboke, InTech, 2012, p. 268.
31. Balogh B., Jones J.B., Momol M.T. et al. Improved efficacy of newly formulated bacteriophages for management of bacterial spot on tomato. Plant Dis., 2003, Vol. 87, P. 949-954.
32. Berchieri A., Jr., Lovell M.A., Barrow P.A. The activity in the chicken alimentary tract of bacteriophages lytic for Salmonella typhimurium. Res. Microbiol., 1991, Vol. 142, P. 541-549.

33. Boratyński Janusz, Syper Danuta, Weber-Dabrowska Beata et al. Preparation of endotoxin-free bacteriophages Cellular & molecular biology letters, 2004, Vol. 9, P. 253-259.
34. Borysowski Jan, Dąbrowska Krystyna, Ohams Monika et al. The response of the immune system to phage: potential associations with phage therapy Abstract book, conference: "Bacteriophages and Probiotics – Alternatives to Antibiotics" dedicated to the 120th birth anniversary of Professor George Eliava, July 1-4, 2012, Tbilisi, Georgia, P. 33.
35. Breitbart Mya, Hewson Ian, Felts Ben et al. Metagenomic analyses of an uncultured viral community from human feces Journal of bacteriology, Oct.2003, Vol. 185, No 20, P. 6220-6223.
36. Breitbart Mya, Haynes Matthew, Kelley Scott et al. Viral diversity and dynamics in an infant gut. Research in Microbiology, 2008, Vol. 159, P. 367-373.
37. Brussow Harald Phage therapy: the Escherichia coli experience. Microbiology, 2005, Vol. 151, P. 2133-2140.
38. Carlton R.M., Noordman W.H., Biswas B. et al. Bacteriophage P100 for control of Listeria monocytogenes in foods: Genome sequence, bioinformatic analyses, oral toxicity study, and application Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2005, Vol. 43, P. 301-312.
39. Cisło M., Dąbrowski M., Weber-Dabrowska B., Woyton A. Bacteriophage treatment of suppurative skin infections. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 1987, Vol.35, P.175-183.
40. Cornax R. Morinigo M.A., Gonzalez-Jaen F., et al. Bacteriophages presence in human faeces of healthy subjects and patients with gastrointestinal disturbances. Zentralbl Bakteriol. 1994 Aug, Vol.281(2), P.214-224.
41. EFSA. Scientific Opinion on the evaluation of the safety and efficacy of Listex™ P100 for the removal of Listeria monocytogenes surface contamination of raw fish. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ) European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy, EFSA Journal 2012;10(3):2615, p. 43.
42. Finkbeiner Stacy R., Allred Adam F., Tarr Phillip I. et al. Metagenomic analysis of human diarrhea: viral detection and discovery PLoS Pathogens, 2008, Vol. 4, Iss. 2, e1000011.
43. Fortuna Wojciech, Międzybrodzki Ryszard, Weber-Dąbrowska Beata, Górski Andrzej. Bacteriophage therapy in children: Facts and prospects. Med Sci Monit, 2008, Vol. 14(8), P. 126-132.
44. Furuse K., Osawa S., Kawashiro J., et al. Bacteriophage Distribution in Human Faeces: Continuous Survey of Healthy Subjects and Patients with Internal and Leukaemic Diseases J. gen. Virol., 1983, Vol. 64, P. 2039-2043.
45. Goodridge D. Lawrence, Bisha Bledar. Phage-based biocontrol strategies to reduce foodborne pathogens in foods. Bacteriophage, May/June 2011, Vol. 1, Iss. 3, P. 130-137.
46. Goodridge D. Lawrence, Abedon T. Stephen. Bacteriophage biocontrol and bioprocessing: application of phage therapy to industry. SIM News, November/December 2003, Vol. 53, No. 6, P. 254-262.
47. Greer G. Gordon. Bacteriophage control of foodborne bacteria. Journal of Food Protection, 2005, Vol. 68, No. 5, P. 1102-1111.
48. Guenther Susanne, Huwyler Dominique, Richard Simon, Loessner J. Martin. Virulent Bacteriophage for Efficient Biocontrol of Listeria monocytogenes in Ready-To-Eat Foods. Applied And Environmental Microbiology, Jan. 2009, Vol. 75, No. 1, P. 93-100.
49. Hooton S.P., Atterbury R.J., Connerton I.F. Application of a bacteriophage cocktail to reduce Salmonella Typhimurium U288 contamination on pig skin. Int J Food Microbiol, 2011 Dec, Vol. 151., No.2, P. 157-163.
50. Huff W.E., Huff G.R., Rath N.C. et al. Prevention of Escherichia coli respiratory infection in broiler chickens with bacteriophage (SPR02). Poult. Sci., 2002, Vol. 81, P. 437-441.
51. Klumpp Jochen, Dorscht Julia, Lurz Rudi et al. The Terminally Redundant, Nonpermuted Genome of Listeria Bacteriophage A511: a Model for the SPO1-Like Myoviruses of Gram-Positive Bacteria. Journal of Bacteriology, Sept. 2008, Vol. 190, No. 17, P. 5753-5765.
52. Intralytix Wins U. S. Army Contract to Develop Phage-Based Probiotic Against Shigella Infection GEN News Highlights, Oct.9, 2009, www.genengnews.com.
53. Lang G.P., Kehr P., Mathevon H. et al. Bacteriophage therapy of septic complications of orthopaedic surgery. Rev Chir Orthop Repar Appr Mot, 1979, Vol.1, P.33-37.
54. Lee N., Harris D.L. The effect of bacteriophage treatment to reduce the rapid dissemination of Salmonella in pigs. Proc. Am. Assoc. Swine Vet., 2001, Vol. 32, P. 555-557.
55. Lepage P., Colombet J, Marteau P, et al. Dysbiosis in inflammatory bowel disease: a role for bacteriophages? Gut, March, 2008, Vol. 57, No 3, P. 424-425.
56. Letarov A., Kulikov. E. The bacteriophages in human- and animal body-associated microbial communities Journal of Applied Microbiology, 2009, Vol.107, P. 1-13.
57. Letarov A., Golomidova A.K., Tarasyan K.K. Ecological basis of rational phage therapy Acta Naturae, 2010, Vol. 2, P.60-71.
58. Leverentz Britta, Conway William S., Camp Mary J. et al. Biocontrol of Listeria monocytogenes on Fresh-Cut Produce by Treatment with Lytic Bacteriophages and a Bacteriocin Applied and Environmental Microbiology, Aug. 2003, Vol. 69, No. 8, P. 4519-4526.
59. Leverentz Britta, Conway William S., Janisiewicz-Wojciech, Camp Mary J. et al. Optimizing Concentration and Timing of a Phage Spray Application To Reduce Listeria monocytogenes on Honeydew Melon Tissue Journal of Food Protection, 2004, Vol. 67, No. 8, P. 1682-1686.
60. Loc-Carrillo Catherine, Abedon T. Stephen Pros and cons of phage therapy Bacteriophage, 2011, Vol.1, No.2, P.111-114.

61. Lusiak-Szelachowska Marzanna, Annabhani Abdulhabib, Weber-Dabrowska Beata et al. *Escherichia coli* bacteriophages in human stool of patients with gastrointestinal tract diseases *Gastroenterologia Polska*, 2008, Vol.15, No.2, P.87-90.
62. Lusiak-Szelachowska M., Weber-Dabrowska B., Gorski A. The presence of bacteriophages in human faces and their potential importance. *Pol. Merk. Lek.*, 2006, Vol. XX, № 121, P. 381-383.
63. Mai Volker, Ukhanova Maria, Visone Lee et al. Bacteriophage administration reduces the concentration of *Listeria monocytogenes* in the gastrointestinal tract and its translocation to spleen and liver in experimentally infected mice *International Journal of Microbiology*, 2010, Vol. 2010, P.1-6.
64. Merabishvili M, Pirnay JP, Verbeken G, et al. Quality-controlled small-scale production of a well-defined bacteriophage cocktail for use in human clinical trials. *PLoS One*, 2009, Vol.4, e4944.
65. Munsch P., Olivier J.V., Houdeau G. Experimental control of bacterial blotch by bacteriophages. Ed. Maher M.J., In *Science and cultivation of edible fungi*, 1991, Balkema, Rotterdam, The Netherlands, P. 389-396.
66. Murthy Kishore, Allain Béatrice, Roman Jean-Louis Phage Therapy: an innovative approach to treat antibiotic-resistant bacterial infections. *American Association of Swine Veterinarians*, 2002, P. 217-220.
67. Pao S., Randolph S.P., Westbrook E.W., Shen H. Use of bacteriophages to control *Salmonella* in experimentally contaminated sprout seeds. *J.Food Sci.*, 2004, Vol. 69, P. 127-130.
68. Park S.C., Shimamura I., Fukunaga M., et al. Isolation of bacteriophages specific to a fish pathogen, *Pseudomonas plecoglossicida*, as a candidate for disease control. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, Vol. 66, P. 1416-1422.
69. Peek Richard and Reddy K. Rajender. FDA Approves Use of Bacteriophages to be Added to Meat and Poultry Products. *Gastroenterology*, 2006, Vol. 131, 1370-1372.
70. Randhawa P.S., Civerolo E.L. Interaction of *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* with pruniphage and epiphytic bacteria on detached peach leaves. *Phytopathology*, 1986, Vol. 76, P.549-553.
71. Schnaebel F.L., Fernando W.G.D., Meyer M.P., Jones A.I. Bacteriophages of *Erwinia amylovora* and their potential for biocontrol. Eds. Mornol M.T., Saygili H. *Proc. of the 8th International Workshop on Fireblight*. International Society of Horticultural Science, 1999, Leven, Belgium, P. 649-653.
72. Sklar I.B., Joerger R.D. Attempts to utilize bacteriophage to combat *Salmonella enteric* serovar *Enteritidis* infection in chickens. *J. Food Saf.*, 2001, Vol. 21, P. 15-29.
73. Slopek S, Weber-Dabrowska B, Dabrowski M, Kucharewicz-Krukowska A. Results of bacteriophage treatment of suppurative bacterial infections in the years 1981-1986. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 1987, Vol.35, P.569-583.
74. Stone Richard. Stalin's Forgotten Cure. *Science*, 25 October 2002, Vol. 298, P. 728-731.
75. Sulakvelidze A. A new journal for the most ubiquitous organisms on Earth. *Bacteriophage*, 2011, Vol. 1, P. 1-2.
76. US EPA. Biopesticides registration action document (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* and *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* specific Bacteriophages) (Chemical PC Codes 006449 and 006521), 2005, p. 25.
77. US FDA. Department of health and Human services Food and Drug Administration, 21 CFR Part 172 [Docket No. 2002F-0316 (formerly 02F-0316)], Food Additives Permitted for Direct Addition to Food for Human Consumption; Bacteriophage Preparation. Agency: Food and Drug Administration, HHS. Action: Final rule. *Federal Register* Vol. 71, No. 160 (Friday, August 18, 2006) Rules and Regulations, P.47729-47732.
78. Walker Kathy. Use of bacteriophages as novel food additives. FS06 ANR 490/811 Food Regulation in the United States, Michigan State University, October 29, 2006, p. 9.
79. Weber-Dabrowska B, Mulczyk M., Gorski A. Bacteriophages as an efficient therapy for antibiotic-resistant septicemia in man. *Transplant Proc*, 2003, Vol. 35, P. 1385-1386.
80. Wright A., Hawkins C.H., Anggård E.E., Harper D.R. A controlled clinical trial of a therapeutic bacteriophage preparation in chronic otitis due to antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*; a preliminary report of efficacy. *Clinical Otolaryngology*, 2009, Aug. Vol. 34 (4), P. 349-357.
81. Wu J.-L., Lin H.-M., Jan L. et al. Biological control of fish bacterial pathogen, *Aeromonas hydrophila*, by bacteriophage AH 1. *Fish Pathol.*, 1981, Vol. 15, P. 271-276.
82. www.intralytix.com. Сайт компании Intralytix.
83. www.micreos.com. Сайт компании Micreos.
84. www.omnilytics.com. Сайт компании OmniLytics.

ГЛАВА 2 БАКТЕРИОФАГИ БАКТЕРИЙ СЕМЕЙСТВА *ENTEROBACTERIACEAE*

CHAPTER 2. BACTERIOPHAGES OF THE ENTEROBACTERIACEAE FAMILY

БАРТ Н.Г.

2.1. ВЫДЕЛЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ ОСНОВНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БАКТЕРИОФАГОВ БАКТЕРИЙ РОДА *PROVIDENCIA*

BART N.G. ISOLATION AND STUDY OF THE MAIN QUALITIES OF
PROVIDENCIA GENUS PHAGES

Известно, что заболеваемость острыми кишечными инфекциями в нашей стране в настоящее время остается довольно высокой, но лабораторное подтверждение кишечных заболеваний в среднем не превышает 50-60% и значителен удельный вес кишечных инфекций с невыясненной этиологией. В то же время данные литературы последних лет свидетельствуют, что этиологическим фактором при кишечных заболеваниях могут быть многие малоизученные родовые группы семейства кишечных бактерий, к которым относятся и бактерии рода *Providencia*. Интерес, проявляемый в последние годы к малоизученным группам семейства *Enterobacteriaceae*, в том числе и к бактериям рода *Providencia* вызван тем, что эти бактерии рассматриваются как возможный этиологический фактор в возникновении кишечных заболеваний (Львов, 1968; Sedlak, Rische, 1968; Авдеева и соавт., 1970 и др.). Представители рода *Providencia* широко распространены в природе, их выделяют из воды, почвы, фекалий и мочи животных и человека. Бактерии рода *Providencia* патогенны для разных видов лабораторных животных (белых мышей, морских свинок, кроликов, хомяков). Имеются литературные данные о заболеваниях людей: диареи, гастроэнтероколиты у детей, урологические заболевания, вспышки гастроэнтеритов и токсикоинфекций, внутрибольничные инфекции вызванные бактериями рода *Providencia*

(Батуро 1988; Романенко, 1989; Venieri D., Vantarakis A., Komninou G., Papapetropoulou M., 2006). Бактерии рода *Providencia* способны вызывать у животных и людей самостоятельные или в ассоциации с другими микроорганизмами заболевания. Известно о случаях обнаружения вида *Providencia rettgeri* в фекалиях больных диареей поросят-сосунов и новорожденных телят в период массовых желудочно-кишечных заболеваний молодняка (Кононенко, Бритова, Каврук, 1994; Золотухин с соавт., 1999, 2004).

Выделение и идентификация бактерий рода *Providencia* в основном проводится бактериологическим методом. Трудоемкость и длительность изучения биологических свойств бактерий не позволяет быстро идентифицировать бактерии рода *Providencia*. Существующие современные высокоспецифичные методы лабораторной диагностики (ИФА, РИА, ПЦР) из-за сложности методик, высокой стоимости оборудования и реактивов недоступны для большинства лабораторий. В связи с выше изложенным возникает необходимость изыскания эффективных и доступных для ветеринарных лабораторий методов индикации и идентификации бактерий рода *Providencia*.

Ряд исследователей (Гольдфарб, 1961; Ганюшкин, 1988; Габрилович, 1981; 1983; Русалеев, 1990; Кольпикова, Бакулов, Котляров, 1990; 1992; Натидзе с соавт., 2005; Золотухин, 2005, 2007) приводят убедительные данные о положительных результатах индикации и идентификации возбудителей некоторых заболеваний с помощью бактериофагов. Метод фагодиагностики является специфичным, не требующий больших затрат времени, материалов и доступен лабораториям всех уровней.

Выделением и изучением бактериофагов рода *Providencia* занимались (Габрилович с соавт., 1998). Однако в арсенале ветеринарных лабораторий отсутствуют бактериофаги рода *Providencia*. Поэтому получение специфических бактериофагов, активных в отношении бактерий рода *Providencia* и их применение с целью индикации и идентификации, является актуальным.

Целью исследований являлось выделение бактериофагов, активных в отношении штаммов бактерий рода *Providencia* и разработка на их основе диагностического биопрепарата для индикации и идентификации гомологичных энтеробактерий.

В работе были использованы как гомологичные, так и гетеро-

логичные штаммы бактерий, полученные из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии и выделенные из объектов внешней среды и патологического материала.

В качестве гомологичных бактерий использовали 28 штаммов бактерий рода *Providencia*, из них:

- 2 референс штамма *Providencia rettgeri* 104a и 175, полученные из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии,

- 26 полевых штаммов *Providencia rettgeri*: А 101, Н 20, М 45, С 17, Н 5, Н 11, Н 15, Н 10, Н 3, Н 4, Д 1, Н 12, Д 73, Н 2, Н 87, Н 8, Н 6, К 1, Н 14, Д 102, Н 13, Н 9, Н 7, Н 67, Н 16, Н 17, выделенных нами из объектов ветеринарного надзора и патологического материала. Все штаммы бактерий рода *Providencia* обладали типичными для данного рода морфологическими, культуральными и биохимическими свойствами.

В качестве гетерологичных бактерий использовали 96 штаммов, из них:

21 штамм *Proteus mirabilis*, 15 штаммов *Morganella morganii*, 11 штаммов бактерий рода *Citrobacter*, 7 штаммов *Enterococcus faecalis*, 14 штаммов *Proteus vulgaris*, 5 штаммов *Shigella sonnei*, 7 штаммов *Salmonella typhimurium*, 3 штамма бактерий рода *Serratia*, 3 штамма *Pseudomonas aeruginosa*, 2 штамма *Pseudomonas putida*, по 1 штаммы бактерий следующих родов и видов: *Pseudomonas fluorescens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp.*, *E. coli*, *Enterobacter cloacae*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Yersinia enterocolitica*. Все названные штаммы бактерий обладали типичными для них биологическими свойствами.

Исследуемые объекты: сточные воды, водопроводная вода, фекалии животных, комбикорм, патологический материал от больных и погибших животных.

14 штаммов бактериофагов рода *Providencia*, выделенные из объектов внешней среды.

Методы: Выделение и идентификацию бактерий рода *Providencia* проводили в соответствии с «Методическими указаниями по бактериологической диагностике смешанной кишечной инфекции молодняка животных, вызываемой патогенными

энтеробактериями», утвержденными Департаментом ветеринарии МСХ и П 11 октября 1999 года, использовали схему Б.С. Киселевой, В.И. Покровского, О.К. Поздеева (1999).

Выделение бактериофагов проводили по методам, предложенным Л.И. Адельсон (1962), С. Лурия, Д. Дарнел (1970), И.П. Ревенко (1978), В.Я. Ганюшкиным (1988), С.В. Лeneвым (1991), Золотухиным С.Н. (2004), Молофеевой Н.И. (2005), Пульчеровской Л.П. (2005), Феоктистовой Н.А. (2006) Ковалевой Е.Н. (2009), Шестаковым А.Г. (2010), Журавской Н.П. (2010), Викторовым Д.А. (2011), Семаниной Е.Н. (2011).

Биологические свойства фагов изучали по методам М. Адамса (1961), Гольдфарба (1961), Тихоненко (1968), Габрилович (1973), Ганюшкина (1988), Н.-W. Ackermann (1997), Золотухиным С.Н. (2004).

Индикацию бактерий рода *Providencia* в объектах ветеринарного надзора и патологическом материале проводили с помощью реакции нарастания титра фага по методике описанной В.Д. Тимаковым, Д.М. Гольдфарбом (1961), В.Я. Ганюшкиным (1988), Золотухиным С.Н. (2004).

Статистическую обработку результатов исследований проводили по стандартным методикам (Бейли, 1970; Ашмарин, Воробьев, 1987). Обработку результатов осуществляли с помощью программы SPSS statistics 17.0.

Выделение бактерий рода *Providencia* из объектов ветеринарного надзора и патологического материала

Исследуемый материал высевали на дифференциально-диагностические среды (ДДС): Эндо, Плоскирева, Левина и инкубировали при температуре 37 °С в течение 18-24 часов. На среде Эндо отбирали пышные лактозоположительные колонии серо-белого цвета диаметром 2-4 мм, или бледно-розовые, мелкие (1-1,5 мм в диаметре). На агаре Плоскирева – бледно-желтые или бежевые колонии. На висмут-сульфит агаре – темно-зеленые колонии размером от 4 до 8 мм. Для дальнейшей идентификации по 4-6 колоний пересевали с чашек Петри на МПБ. Культуры микроорганизмов инкубировали при 37 °С 6-18 часов до появления выраженного помутнения среды.

Бульонные культуры, полученные после пересева колоний с ДДС, окрашивали по Граму и микроскопировали. В случае об-

наружения в мазках однородных мелких грамотрицательных палочек с закругленными концами, располагающихся одиночно, парами или короткими цепочками, идентифицировали культуру по ферментативным свойствам.

Идентификацию бактерий проводили по следующим тестам (в скобках указаны результаты тестов, характерные для бактерий рода *Providencia*): образование сероводорода (–), расщепление мочевины (+/–), определение подвижности (–), усвоение цитрата (на среде Симмонса) (+), реакция с метиленовым красным (–/+), Фогес-Проскауэра (+/–). Указанные тесты позволяли нам дифференцировать бактерии рода *Providencia* от других родов семейства *Enterobacteriaceae*. При получении соответствующих результатов продолжали изучение ферментативных свойств на средах с углеводами: глюкозой (+), лактозой (+), мальтозой (–), малонатом натрия (+/–), ставили тесты на образование индола (–/+), утилизацию ацетата (+/–) и ферментацию сорбита (+).

В результате проведенных исследований, из объектов ветеринарного надзора и патологического материала, были выделены и идентифицированы 26 штаммов *Providencia rettgeri*.

Выделение бактериофагов *Providencia* и селекция клонов фагов

Исследования, направленные на выделение умеренных бактериофагов из предположительно лизогенных бактериальных культур рода *Providencia* путём спонтанной индукции (Гольдфарб, 1961), а также под воздействием ультрафиолетового излучения (Лурия, Дарнелл, 1970), не позволили выявить лизогенное состояние у рассматриваемых штаммов.

Следующим этапом наших исследований стало выделение бактериофагов из объектов внешней среды (Гольдфарб, Тимаков, 1961). Материалом служили следующие объекты: сточные воды свиноводческих хозяйств и молочно-товарных ферм из разных хозяйств Ульяновской, Самарской областей, республики Татарстан, сточные воды мясокомбината.

Сточные воды фильтровали через бумажный фильтр для освобождения от механических примесей. В колбу, содержащую стерильный МПБ в количестве 50 мл, вносили 20 мл фильтрата сточных вод и по 1 мл всех имеющихся у нас штаммов бактерий рода *Providencia*. Таким образом, каждая проба сточной воды ис-

пытывалась на наличие фагов ко всем имеющимся культурам бактерий рода *Providencia*. Колбу помещали в термостат и инкубировали в течение 5 дней при 37 °С. После этого содержимое колбы разливали в стерильные пробирки, центрифугировали, одну из пробирок с супернатантом обрабатывали хлороформом (в соотношении 1:10), а вторую прогревали на водяной бане при

58-60 °С в течение 30 минут. Такая обработка смеси позволяет выделить термоустойчивые и устойчивые к воздействию хлороформа фаги. Полученные пробы исследовали методом агаровых слоев по Грациа. Чашки ставили в термостат на 18-24 часа при 37 °С. Наличие негативных колоний или зон лизиса на газоне роста индикаторной культуры свидетельствовало о присутствии в исследуемом материале бактериофага.

Образовавшиеся негативные колонии или часть зоны лизиса отщипывали на МПБ с индикаторными культурами. Для этого в две пробирки с 4,5 мл МПБ (рН 7,4 – 7,6) добавляли стерильной пипеткой 0,2 мл 18-часовой бульонной индикаторной культуры бактерий рода *Providencia*. В одну из пробирок отщипывали негативную колонию, а вторая пробирка служила контролем. Посевы поме-

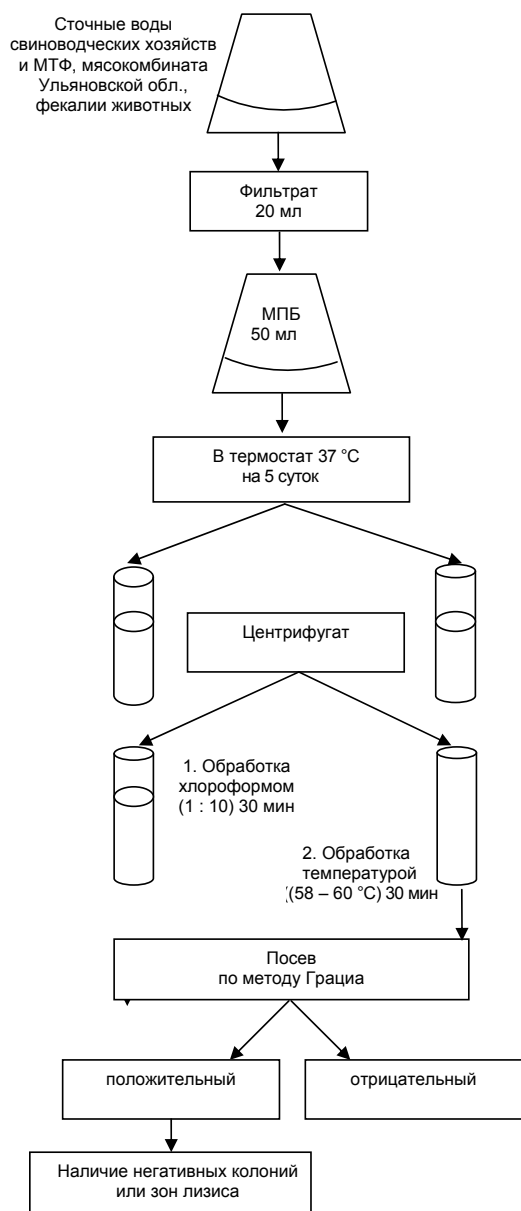


Рис. 1. Схема выделения бактериофагов *Providencia* из объектов ветеринарного надзора

щали в термостат и инкубировали их при 37 °С до выраженного помутнения в контрольной пробирке (4-6 часов). Затем содержимое опытной пробирки освобождали от микробных клеток прогреванием на водяной бане при 58-60 °С в течение 30 минут. Прогретый фильтрат переносили стерильной пипеткой в пробирку и использовали для дальнейшего пассирования фага.

Селекцию и повышение литической активности выделенных бактериофагов осуществляли с помощью пассирования фага на индикаторной культуре с периодической отбивкой типичных негативных колоний по методике, предложенной И.М. Габриловичем (1992); С.Н. Золотухиным (1994, 2007).

Готовили разведение фага в мясопептонном бульоне рН (7,2-7,4) от 10^{-1} до 10^{-9} . Фаг высевали методом агаровых слоев (по Грация), используя разведения 10^{-6} - 10^{-9} , таким образом, чтобы на питательном агаре сформировались отдельные негативные колонии. После 24-часового инкубирования в термостате, отбивали бактериологической петлей одну негативную колонию, расположенную изолированно от других не менее чем на 10 мм и помещали в пробирку с мясопептонным бульоном, туда же вносили 18-часовую бульонную индикаторную культуру *Providencia* в количестве 0,2 мл. Одновременно ставили контроль – мясопептонный бульон с индикаторной культурой без фага. Опытные и контрольные пробирки культивировали в термостате при 37 °С в течение 4-6 часов. Полученные фаголизаты прогревали на водяной бане при 58-60 °С 30 минут и исследовали методом агаровых слоев. Отбирали идентичную исходной негативную колонию и пассировали. В результате проведенных исследований из объектов внешней среды нами выделены и селекционированы 14 штаммов бактериофагов *Providencia*.

Характеристика фагов бактерий рода *Providencia*

Морфологию негативных колоний изучали в разведении фагов 10^{-7} - 10^{-9} с индикаторной культурой на питательном агаре в посевах методом агаровых слоев по Грация. Учет проводили через 18-24 часа инкубации в термостате при температуре 37 °С. Отмечали величину негативных колоний, форму, степень прозрачности, характер краев колоний, наличие и величину неполного лизиса. Образовавшиеся негативные колонии разделили на два типа (Бабков, 1973).

Табл. 1. – Литическая активность бактериофагов рода *Providencia*

№ п.п.	Название фага серии УГСХА	Индикаторная культура	Активность фагов	
			по методу Аппельмана	по методу Грация
1	К - 281	<i>K. pneumoniae</i> № 8172	10^{-5}	1×10^8
2	К - 210	<i>K. pneumoniae</i> № 1071	10^{-6}	$1,5 \times 10^8$
3	К - 41	<i>K. pneumoniae</i> № 4463	10^{-6}	7×10^8
4	К - 42	<i>K. pneumoniae</i> № 4463	10^{-6}	5×10^8
5	К - 4	<i>K. pneumoniae</i> № 4463	10^{-6}	1×10^9
6	К - 14	<i>K. pneumoniae</i> № 4463	10^{-5}	$1,1 \times 10^9$
7	К - 24	<i>K. pneumoniae</i> № 4463	10^{-5}	1×10^9
8	К - 101	<i>K. pneumoniae</i> № 01	10^{-5}	7×10^9
9	К - 201	<i>K. pneumoniae</i> № 01	10^{-5}	2×10^9
10	К - 2	<i>K. pneumoniae</i> № 265	10^{-5}	4×10^7
11	К - 12	<i>K. pneumoniae</i> № 265	10^{-5}	1×10^9
12	К - 10	<i>K. pneumoniae</i> № 1017	10^{-6}	2×10^9
13	К - 60	<i>K. pneumoniae</i> № 60	10^{-5}	$2,5 \times 10^9$
14	К - 11	<i>K. pneumoniae</i> № 1	10^{-8}	$2,5 \times 10^9$
15	К - 0x1	<i>K. oxytoca</i> № 1/1	10^{-5}	8×10^9
16	К - 33	<i>K. oxytoca</i> № 5	10^{-8}	5×10^9
17	К - 44	<i>K. pneumoniae</i> № 4463	10^{-6}	2×10^9
18	К - 03	<i>K. pneumoniae</i> № 03	10^{-7}	1×10^9
19	К - 03 ₂	<i>K. pneumoniae</i> № 03	10^{-7}	1×10^9
20	К - 81	<i>K. pneumoniae</i> № 8172	10^{-6}	4×10^9
21	К - 8	<i>K. pneumoniae</i> № 423	10^{-7}	1×10^9

К первому типу относятся четкие прозрачные колонии округлой формы, с ровными краями, диаметром от 1,0 до 2,0 мм. Колонии второго типа – прозрачные колонии округлой формы, с ровными краями, диаметром от 3,0 до 4,0 мм, с отсутствием зоны неполного лизиса, без вторичного роста культуры.

Литическая активность бактериофага оценивается по его способности вызывать лизис бактериальной культуры в жидких или плотных питательных средах. Результаты исследований представлены в таблице 1.

Для изучения спектра литической активности использовали метод нанесения капель бактериофагов на газон исследуемой культуры (Ганюшкин, 1988; Золотухин, 2004). В качестве исследуемых культур использовали 28 штаммов бактерий рода *Providencia*.

В результате проведенных исследований нами установлено, что изученные фаги обладали разным диапазоном литической активности. Широким диапазоном по отношению к изучаемым культурам обладают фаги F-73 УГСХА и F-17 УГСХА – 60,7 %, F-20 УГСХА, F-1 УГСХА и F-28 УГСХА – 64,3 %, F- 9 УГСХА и F-41 УГСХА – 53,6 %, F-67 УГСХА – 85,7%, F-87 УГСХА – 82,1 %.

Для дальнейшего изучения отобрали два бактериофага с наибольшим диапазоном по отношению к изучаемым культурам – фаг F-87 УГСХА, который лизировал 82,1 % и фаг F-67 УГСХА – 85,7 % штаммов бактерий рода *Providencia*, а в сумме фаги проявили литическое действие в отношении 96,4 % всех исследованных культур.

Изучение специфичности бактериофагов рода *Providencia* по отношению к представителям следующих видов: *Proteus mirabilis*, *Morganella morganii*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus vulgaris*, *Shigella sonnei*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Enterobacter cloacae*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Yersinia enterocolitica*, а так же *Streptococcus spp.*, *Citrobacter spp.*, *Serratia spp.* проводили методом нанесения капель фагов на газон исследуемой культуры (Ганюшкин, 1988).

В результате изучения чувствительности бактериофагов к действию температуры, установили, что фаги F-87 УГСХА, F-67 УГСХА понижали свою физиологическую активность при температуре 67 °С и инактивировались при температуре 81 °С (F-87) и 88 °С (F-67 УГСХА) в течение 30 минут.

Обработка бактериофагов F-87 УГСХА, F-67 УГСХА хлороформом, выявила выраженную устойчивость к воздействию данного агента в течение 40 минут.

Разработка технологических параметров изготовления и контроля индикаторных фагов *Providencia*

Для разработки технологических параметров изготовления и контроля индикаторных бактериофагов *Providencia* использовали отобранные штаммы фагов F-87 УГСХА, F-67 УГСХА и индикаторные культуры *Providencia rettgeri* Н 87, *Providencia rettgeri* Н 67. Индикаторные бактериофаги *Providencia* изготавливали путем культивирования в питательном бульоне (рН 7,4-7,6) с индикаторными бактериальными культурами.

Индикаторные культуры хранили на полужидком МПА (рН 7,2-7,4) с 0,3% агара при температуре 2-4 °С и пересеивали каждые 2-3 месяца.

Разработка схемы ускоренной идентификации бактерий рода *Providencia*

Учитывая строгую специфичность отобранных бактериофагов F-87 и F-67 серии УГСХА по отношению к штаммам бактерий

рода *Providencia*, мы разработали схему ускоренной идентификации данных микроорганизмов (рис. 2). Посев материала производили на среды: Эндо, Плоскирева, Левина, инкубировали при 37 °С 18-20 часов. Для дальнейшего изучения отобранные колонии с чашек пересевали в МПБ, МПА и инкубировали при 37 °С 6-18 часов до появления выраженного помутнения среды. Бактериальные культуры микроскопировали (окраска по Граму) и при обнаружении в мазках однородных мелких грамотрицательных палочек с закругленными концами, располагающихся единично парами или короткими цепочками, подвергали фагоидентификации и идентифицировали по биохимическим свойствам.

Бактериологический метод

Биохимические свойства выделенных штаммов изучали в соответствии с выше упомянутыми методическими указаниями. По результатам изучения биохимических свойств определили родовую принадлежность культур (табл. 2).

Фагоидентификация

На поверхность МПА в чашки Петри пипеткой наносили 3-4 капли бульонной 6-18 часовой культуры исследуемых микроорганизмов, равномерно распределяли по поверхности среды. Чашки ставили в термостат для подсушивания газона на 15-20 минут. Дно чашки маркером делили на три сектора: на поверхность

Табл. 2 – Идентификация выделенных штаммов бактериологическим методом.

Объекты исследования	Обозначение пробы	Тесты										Род и вид микроорганизмов
		образование H ₂ S	подвижность	цитрат Симмонса	p-я фогес-Проскауэра	p-я с метилротом	образование индола	ацетат	Малонат	фенилаланин	сорбит	
вода	1 в	–	+	–	–	+	+	+	–	–	+	<i>E. coli</i>
	2 в	–	–	+	+	+	–	+	+	–	+	<i>spp. Providencia</i>
	3 в	+	+	+	–	+	–	+	–	–	+	<i>spp. Citrobacter</i>
комбикорм	1 к	–	+	–	–	+	+	+	–	–	+	<i>E. coli</i>
	2 к	–	–	+	+	–	–	+	+	–	+	<i>spp. Providencia</i>
	3 к	+	+	+	–	+	–	+	–	–	+	<i>spp. Citrobacter</i>
фекалии	1 ф	+	+	–	–	+	+	–	–	+	–	<i>spp. Proteus</i>
	2 ф	–	+	+	–	+	–	+	+	–	+	<i>spp. Serratia</i>
	3 ф	–	–	+	+	–	–	+	+	–	+	<i>spp. Providencia</i>
	4 ф	–	+	–	–	+	+	+	–	–	+	<i>E. coli</i>
	5 ф	+	+	–	–	+	+	–	–	+	–	<i>spp. Proteus</i>
	6 ф	–	+	–	–	+	+	+	–	–	+	<i>E. coli</i>
мясо	1 м	–	–	+	+	–	–	+	+	–	+	<i>spp. Providencia</i>

засеянной среды первого и второго секторов, пипеткой легким прикосновением капли, наносили по одному штамму фагов, на третий сектор по центру в качестве контроля наносили стерильный МПБ. Чашки после подсушивания помещали в термостат на 18-24 часов при 37 °С. Результат считали положительным, если на месте нанесения хотя бы одного из штаммов фагов на газоне сплошного роста культуры образовывалась прозрачная зона лизиса. Фагоидентификация выделенных изолятов бактерий рода *Providencia* во всех объектах подтверждена результатами исследований биохимических свойств (табл. 3).

Были проведены исследования по определению минимальной концентрации микробных клеток в исследуемых объектах (табл. 4), при которой возможно обнаружить бактерии рода *Providencia* бактериологическим методом.

По результатам данных исследований заражающая концентрация микробных клеток бактерий рода *Providencia* в объектах исследования составила $2,3 \times 10^4$ м.к./мл. При исследовании

Табл. 3 – Фагоидентификация выделенных штаммов.

Исследуемый объект	Обозначение пробы	F-87 УГСХА	F-67 УГСХА	Результат фагоидентификации	Результаты идентификации по биохимическим свойствам
вода	1 в	–	–	–	<i>E. coli</i>
	2 в	+	+	<i>Providencia</i>	<i>spp.Providencia</i>
	3 в	–	–	–	<i>spp.Citrobacter</i>
комбикорм	1к	–	–	–	<i>E. coli</i>
	2к	–	+	<i>Providencia</i>	<i>spp.Providencia</i>
	3к	–	–	–	<i>spp.Citrobacter</i>
фекалии	1 ф	–	–	–	<i>spp.Proteus</i>
	2 ф	–	–	–	<i>spp.Serratia</i>
	3 ф	+	+	<i>Providencia</i>	<i>spp.Providencia</i>
	4 ф	–	–	–	<i>spp.Citrobacter</i>
	5 ф	–	–	–	<i>E. coli</i>
	6 ф	–	–	–	<i>spp.Proteus</i>
	7 ф	–	–	–	<i>E. coli</i>
мясо	1 м	+	–	<i>Providencia</i>	<i>spp.Providencia</i>
Время, затраченное на исследование, час				48	96

Табл. 4 – Обнаружение бактерий рода *Providencia* в различных концентрациях бактериологическим методом.

Объекты исследования	Количество микробных клеток в 1 мл (г)				
	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5
Вода	–	–	–	+	+
Мясо	–	–	–	+	+
Комбикорм	–	–	–	+	+
Фекалии	–	–	–	–	+

Примечание: «+» – положительный результат, «–» – отрицательный результат.

фекалий чувствительность понижается до $3,5 \times 10^5$ м.к./мл из-за обильной обсемененности посторонней микрофлорой.

Таким образом, схема фагоидентификации в сравнении с традиционной схемой, изложенной в вышеупомянутых методических указаниях, позволяла сократить сроки исследования в два раза, результат получали спустя 48 часов с меньшими затратами посуды и реактивов. В то время как бактериологическим методом время исследования занимало 96 часов (рис.2).

Разработка оптимальных условий постановки РНФ

Для определения параметров постановки РНФ и разработки количественного показателя реакции, имеющего диагностическое значение, при разной заражающей концентрации, исследование проводили по методике, предложенной В.Я. Ганюшкиным (1988), с использованием МПБ контаминированного 18-часовыми индикаторными культурами (*Providencia rettgeri* H 87, *Providencia rettgeri* H 67) от 10^1 до 10^5 м.к./мл.

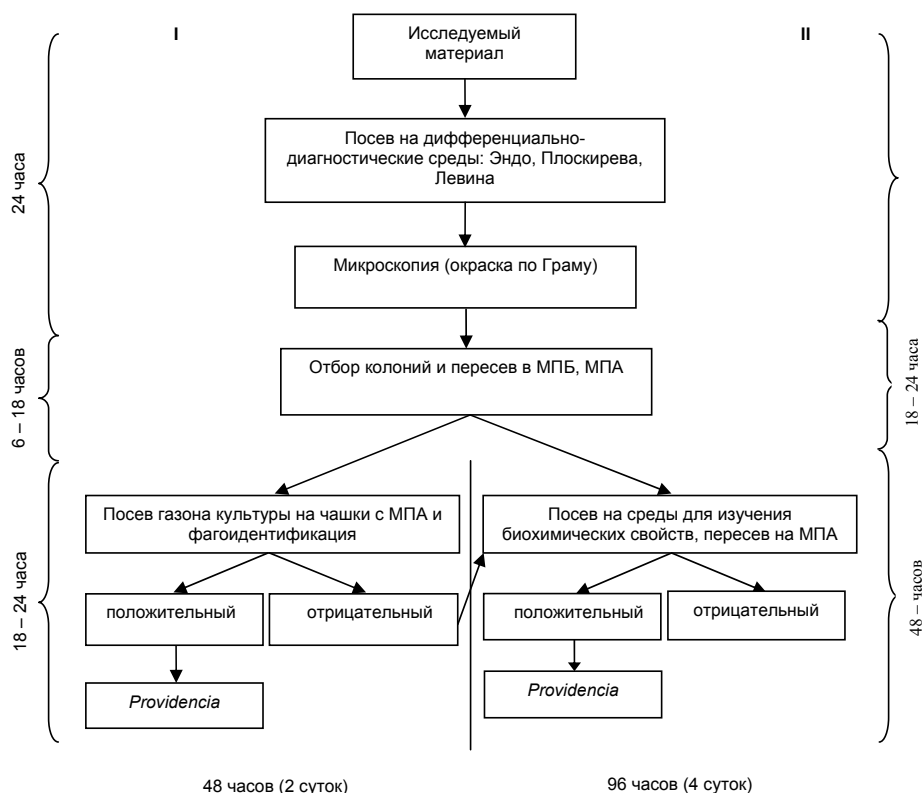


Рис.2. Выделение и ускоренная идентификация бактерий рода *Providencia* с помощью бактериофагов (I) в сравнении со схемой бактериологического исследования (II).

Фаги F-87 УГСХА, F-67 УГСХА использовали в рабочем разведении, содержащем не более 10^5 фаговых корпускул в миллилитре. В колбы с 50 мл МПБ вносили индикаторные культуры в концентрации 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 м.к./мл. Готовили 3 широких пробирки для каждого разведения культуры и контроля. В пробирки № 1, № 2 вносили по 9 мл МПБ с культурой, в пробирку № 3 – 9 мл стерильного МПБ. Затем в пробирки № 1, № 3 добавляли 1 мл индикаторного фага в рабочем разведении, а в пробирку № 2 вносили по 1 мл МПБ (контроль на присутствие свободного фага).

Пробирка № 1 с контаминированным МПБ и индикаторным фагом является опытной. Пробирка № 2 (контаминированная бактериями рода *Providencia*) без фага была контрольной для выявления в пробе МПБ свободного фага. Пробирки № 3 – контроль на титр индикаторного фага. После культивирования при 37 °С содержимое каждой пробирки разводили МПБ (рН 7,4-7,6) так, чтобы при высеве 1 мл содержимого из пробирки № 3 (контроль на титр фага) на чашках образовалось несколько десятков негативных колоний фага. В пробирке № 3 индикаторный фаг находился в концентрации нескольких тысяч корпускул в 1 мл, и для того, чтобы получить в конечном разведении несколько десятков корпускул в 1 мл, содержимое пробирки № 3 разводили в 20 раз, т.е. 0,25 мл исследуемой смеси вносили в 4,5 мл МПБ. Содержимое опытных пробирок № 1 и № 2 разводили аналогично. Инактивацию бактерий разведенных смесей пробирок № 1, № 2, № 3 проводили прогреванием в водяной бане при температуре 58-60 °С в течение 30 минут. После этого, содержимое пробирок исследовали на определение числа корпускул фага методом агаровых слоев. Высевы методом агаровых слоев проводили через 5 часов инкубации исследуемого материала с фагом в термостате при 37 °С. Учет результатов проводили через 12-16 часов инкубирования, подсчитывая число негативных колоний фага, образовавшихся на плотной питательной среде в опытной пробе и в контроле.

При наличии в исследуемом материале свободного фага (пробирка № 2) подсчитывали число фаговых частиц на чашке и вычитали из числа фаговых частиц индикаторного фага в опытных чашках (пробирка № 1). Полученную разницу сравнивали с контролем (пробирка № 3). РНФ, оцененная как сомнительная или

слабо положительная, не имела диагностического значения. Учитывалось увеличение титра в 5 и более раз.

Установлено, что количество фаговых частиц более чем в 5 раз превышает количество фаговых корпускул в контрольных пробах при контаминации МПБ бактериями рода *Providencia* в концентрации $2,5 \times 10^3$ м.к./мл для фага F-87 УГСХА и $2,8 \times 10^4$ м.к./мл для фага F-67 УГСХА.

Для установления оптимального времени, обеспечивающего наиболее полноценное взаимодействие фага с бактериями, необходимо было провести эксперименты на тест-объекте по выявлению наиболее эффективного временного показателя взаимодействия фага и индикаторной культуры при сохранении остальных параметров (температурный режим, концентрация бактериальной культуры и фаговых корпускул в 1 мл) постановки РНФ.

Наиболее оптимальным являлся режим РНФ при 6-часовой инкубации исследуемого материала с фагом, когда удается провести индикацию бактерий в концентрации 10^3 микробных клеток в 1 мл исследуемого субстрата, на исследование которого затрачивается 18 часов. Однако чувствительность РНФ повышается там, где режим инкубации общего времени составляет 22 часа, и позволяет обнаруживать бактерии (*Providencia rettgeri* Н 87, *Providencia rettgeri* Н 67) в концентрации 10^2 м.к./мл. Бактериологическим методом удалось обнаружить бактерии рода *Providencia* в концентрации $3,8 \times 10^4$ м.к./мл, при этом на исследование затрачивалось до 96 часов.

Результат проведенных исследований свидетельствует

1. В объектах ветеринарного надзора и патологическом материале *Providencia* обнаружены в 8 из 18 хозяйств, неблагополучных по желудочно-кишечным заболеваниям молодняка животных. Изолировано и идентифицировано 26 штаммов *Providencia rettgeri*.

2. Из 120 проб объектов внешней среды было выделено и селекционировано 14 бактериофагов, активных в отношении бактерий рода *Providencia*.

3. Выделенные фаги имеют литическую активность от 10^{-5} до 10^{-10} по Аппельману и от $4,2 \times 10^7 \pm 0,1 \times 10^7$ до $8,3 \times 10^9 \pm 0,2 \times 10^9$ фаговых корпускул в 1 мл по Грациа. Установлено, что два бактериофага отличались широким диапазоном литической активности: F-87 УГСХА лизировал 82,1 % штаммов бактерий рода

Providencia, F-67 УГСХА – 85,7 %, а в сумме фаги лизировали 96,4 % всех исследованных культур. Они обладали строгой специфичностью: не лизировали бактерии других родов и семейств.

4. Разработанные биотехнологические параметры изготовления и контроля бактериофагов *Providencia* позволяют получить специфический диагностический препарат штаммов F-87 УГСХА и F-67 УГСХА с высокой литической активностью. Разработанная схема с применением фагов F-87 УГСХА и F-67 УГСХА, позволяет выделить и идентифицировать бактерии рода *Providencia* за 48 часов.

5. Штаммы фагов F-87 УГСХА и F-67 УГСХА были устойчивы к воздействию высокой температуры. Нижний порог термоинактивации составляет 67 °С, верхний – 88 °С. Фаги не меняют литической активности при воздействии хлороформа в течение 40 минут.

6. Разработанные технологические параметры ускоренной индикации бактерий рода *Providencia* в объектах ветеринарного надзора и в патологическом материале с помощью РНФ с использованием индикаторных бактериофагов (F-87 УГСХА и F-67 УГСХА), позволяют обнаружить бактерии рода *Providencia* в концентрации 10^3 м.к./мл (г) исследуемого субстрата за 18-22 часа.

Практическая значимость работы

Селекционированы два изолята бактерий рода *Providencia* F – 67 УГСХА и F – 87 УГСХА, обладающие выраженными биологическими свойствами, соответствующие требованиям, предъявляемым к производственным штаммам фагов, которые можно использовать для изготовления диагностических фаговых препаратов.

По материалам диссертационных исследований разработаны «Методические рекомендации по выделению и идентификации бактерий рода *Providencia* из патологического материала, кормов, пищевых продуктов и объектов внешней среды с применением специфических бактериофагов F-67 УГСХА и F-87 УГСХА» (рассмотрены на заседании НТС ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина и утверждены первым проректором-проректором по науке В.А. Исайчевым 29.11.2012г.).

«Методические рекомендации по ускоренной индикации методом реакции нарастания титра фага (РНФ) энтеробактерий рода

Providencia в патологическом материале, кормах, пищевых продуктах и объектах внешней среды с применением специфических бактериофагов F-67 УГСХА и F-87 УГСХА» (рассмотрены на заседании НТС ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина и утверждены первым проректором-проректором по науке В.А. Исайчевым 29.11.2012г.).

Разработана «Временная инструкция по изготовлению и контролю лабораторной серии индикаторных фагов бактерий рода *Providencia* F – 67 УГСХА и F – 87 УГСХА» (рассмотрены на заседании НТС ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина и утверждены первым проректором-проректором по науке В.А. Исайчевым 29.11.2012г.).

На базе ОГУ «Ульяновская областная ветеринарная лаборатория» проведены производственные испытания с положительным результатом по оценке эффективности реакции нарастания титра фага проб фекалий, полученных от поросят свинокомплекса «Поволжский» Чердаклинского района Ульяновской области на наличие бактерий вида *Providencia* с помощью специфических бактериофагов F – 67 и F – 87 серии УГСХА. Исследования проводились с 18 ноября по 23 ноября 2012 года (акт производственных испытаний утвержден директором ОГУ «Ульяновская областная ветеринарная лаборатория» Р.М. Юсуповым 23.11.2012г.).

ЛИТЕРАТУРА

1. Адельсон Л.И. Современное состояние проблемы теории бактериофага и его практическое применение / Л.И. Адельсон, В.Д. Гуторова, Г.Г. Ключарева // Тезисы докладов юбилейной научной сессии Ленинградского сан.-гиг. мед. ун-та. – Ленинград, 1958. – С.34.
2. Бабков В.В. Биологическая характеристика умеренных бактериофагов *E. coli* 0124:B17 / В.В. Бабков // Проблемы бактериофагии и биология кишечных бактерий: сб. кафедры микробиологии I Лен. мед. ин-та им. акад. И.П. Павлова Л., 1973. – 53 с.
3. Викторов Д.А. Усовершенствование методов выделения, идентификации и индикации бактерий *Pseudomonas putida* // Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – 2011. – 22 с.
4. Габрилович И.М. Общая характеристика бактериофагов / И.М. Габрилович // Основы бактериофагии. – Минск. – 1973. – С. 5-24.
5. Гольдфарб Д.М. Бактериофагия / Д.М. Гольдфарб // М.: Медгиз. – 1961. – 225 с.
6. Ганюшкин В.Я. Бактериофаги сальмонелл и их применение в ветеринарии / В.Я. Ганюшкин // Ульяновск. – 1988. – С.45.
7. Золотухин С.Н. Малоизученные энтеробактерии и их роль в патологии животных / С.Н. Золотухин // Ульяновск. – 2004. – С. 64 – 75.
8. Золотухин С.Н. Смешанная кишечная инфекция телят и поросят, вызываемая патогенными энтеробактериями / С.Н. Золотухин, Л.С. Каврук, Д.А. Васильев // Ульяновск ГСХА. – 2005. – С. 43 – 48.
9. Золотухин С.Н. Создание и разработка схем применения диагностических биопрепаратов на основе выделенных и изученных бактериофагов энтеробактерий / С.Н. Золотухин // Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. - Ульяновск, 2007. – 39 с.
10. Катмакова Н.П. Разработка и применение диагностического биопрепарата «УР – 09 УГСХА» на основе бактериофагов *Yersinia pseudotuberculosis* / Н.П. Катмакова // Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Ульяновск, 2010 – 24 с.

11. Ковалева Е.Н. Создание биопрепарата на основе выделенных и изученных бактериофагов *Enterococcus faecalis* // Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – 2009. – 20 с.
12. Ковалева Е.Н. Создание биопрепарата на основе выделенных и изученных бактериофагов *Enterococcus faecalis* // Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – 2009. – 20 с.
13. Кольпикова Т.И. Фаготипирование листерий / Т.И. Кольпикова // Ветеринария. – 1990. – №6. – С. 31-32.
14. Ленев С.В. Способ выделения и свойства бактериофагов / С.В. Ленев // Сб. науч. трудов Всеросс. науч. ин-та вет. препаратов. – М. – 1991. – С. 24.
15. Лурия С. Общая вирусология / С. Лурия, Д. Дарнелл – М.: Мир, 1970. – 397 с.
16. Молофеева Н.И. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов *Escherichia coli* O157 и их применение в диагностике / Н.И. Молофеева // Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Саратов, 2004. – 20 с.
17. Пульчеровская Л.П. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов *Citrobacter* и их применение в диагностике / Л.П. Пульчеровская // Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Саратов, 2004. – 21с.
18. Ревенко И.П. Бактериофаги и их использование в ветеринарной практике. – Киев: Урожай. – 1978. – С. 41-88.
19. Русалеев В.С. Фагочувствительность аэробных спорообразующих бактерий / В.С. Русалеев // Ветеринария. – 1990. – № 8. – С. 29.
20. Семанина Е.Н. Выделение и изучение биологических свойств бактериофагов *Bordetella bronchiseptica* и разработка на их основе биопрепарата для индикации и идентификации // Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – 2012. – 21 с.
21. Тимаков В.Д. Реакция нарастания титра фага (РНФ) / В.Д. Тимаков, Д.М. Гольдфарб – М., 1962. – С. 65-71.
22. Тихоненко А.С. Ультраструктура вирусов бактерий / А.С. Тихоненко – М.: Наука, 1968. – С. 89-168.
23. Феоктистова Н.А. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов *Proteus*, конструирование на их основе биопрепарата и разработка параметров практического применения // Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Саратов. – 2006. – 22 с.
24. Шестаков А.Г. Усовершенствование методов выделения, идентификации и индикации бактерий *Pseudomonas aeruginosa* / А.Г. Шестаков // Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Саратов, 2010 – 22 с.

ЛЯШЕНКО Е. А

2.2. ВЫДЕЛЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ ОСНОВНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БАКТЕРИОФАГОВ БАКТЕРИЙ РОДА *KLEBSIELLA*

LYASHENKO E.A. ISOLATION AND STUDY OF THE MAIN QUALITIES OF
KLEBSIELLA GENUS PHAGES

В настоящее время особое внимание уделяют диагностике малоизученных инфекционных заболеваний, характеризующихся тяжелым течением, а нередко и летальным исходом. К их числу относятся клебсиеллезные инфекции. Представители рода *Klebsiella* широко распространены в природе, а вид *K. pneumoniae* подвид *pneumonia* является постоянной микрофлорой кишечника животных и человека. Однако среди этих микроорганизмов имеются патогенные варианты, способные вызывать у животных и людей самостоятельные заболевания. Клебсиеллы известны как возбудители пневмонии, заболеваний мочеполовой системы, острых кишечных инфекции, различных гнойно-септических осложнений, а также внутрибольничных инфекций, менингитов. Заболевания, вызываемые клебсиеллами, протекающие по типу острого сепсиса, предложено рассматривать как самостоятельную нозологическую единицу – клебсиеллез (Ковалева, Рейзис,

1993; Киселева, Красноголовец, 1996; Покровский, 1985; 1999). Известно так же, что *K. pneumoniae* играет этиологическую роль при маститах, пневмониях, септицемиях коров, свиней, лошадей, обезьян, инфекционной диареи молодняка животных (Воронин, Дервишов, Ставцева, 1989; Каврук, 1994; Кукава с соавт., 1998; Шахов, 2003; Золотухин, 2004; 2005; Семенцов с соавт., 2009).

Выделение и идентификация клебсиелл в основном проводится бактериологическим методом. Трудоемкость и длительность изучения биологических свойств бактерий не позволяет быстро идентифицировать бактерии рода *Klebsiella*. Существующие современные высокоспецифичные методы лабораторной диагностики (ИФА, РИА, ПЦР) из-за сложности методик, высокой стоимости оборудования и реактивов пока недоступны для большинства лабораторий. В связи с вышеизложенным возникает необходимость изыскания эффективных и доступных для ветеринарных лабораторий методов индикации и идентификации бактерий рода *Klebsiella*.

Ряд исследователей сообщают о положительных результатах индикации и идентификации возбудителей некоторых заболеваний с помощью специфических бактериофагов (Гольдфарб, 1961; Ганюшкин, 1988; Габрилович, 1981; 1983; Русалеев, 1990; Кольпинова, Бакулов, Котляров, 1990; 1992; Золотухин, 2005; Натидзе с соавт., 2005). Метод фагодиагностики является специфичным, не требующий больших затрат времени, материалов и доступен лабораториям всех уровней.

В арсенале ветеринарных лабораторий отсутствуют диагностические клебсиеллезные бактериофаги. Поэтому получение специфических бактериофагов, активных в отношении бактерий рода *Klebsiella*, выделенных из объектов ветеринарного надзора, с целью диагностики, является актуальным.

Цель исследования. Разработка технологических параметров по индикации и идентификации бактерий рода *Klebsiella* с помощью специфических бактериофагов.

В работе были использованы 38 штаммов бактерий рода *Klebsiella*, из них 5 референс-штаммов, полученных из ГНЦ прикладной микробиологии г. Оболенск и Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб» г. Саратов, 10 штаммов из коллекции Всероссийского государственного

го центра качества и стандартизации лекарственных препаратов для животных и кормов (ВГНКИ), 11 музейных штаммов кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии, 12 культур выделенные нами из патологического материала и объектов ветеринарного надзора, 123 штамма других родов семейства Enterobacteriaceae: *Escherichia* spp., *Proteus* spp., *Morganella* spp., *Citrobacter* spp., *Salmonella* spp., *Enterobacter* spp., *Providencia* spp., *Yersinia enterocolitica*, а также родов семейств *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Pseudomonas* spp.

21 изолят бактериофагов, выделенный нами из объектов окружающей среды.

Выделение и идентификацию бактерий рода *Klebsiella* проводили в соответствии с «Методическими указаниями по бактериологической диагностике смешанной кишечной инфекции молодняка животных, вызываемой патогенными энтеробактериями», утвержденными Департаментом ветеринарии МСХ и П 11 октября 1999 г.

Выделение и селекцию бактериофагов проводили по методам Л.И. Адельсона (1962), С. Лурия, Д. Дарнела (1970), И.П. Ревенко (1978), В.Я. Ганюшкина (1988), С.В. Ленева (1991), Габриловича (1992). Биологические свойства фагов изучали по методам М. Адамса (1961), Гольдфарба (1961), Тихоненко (1968), Габриловича (1973), Ганюшкина (1988), Н.-W. Ackermann (1997). Индикацию бактерий рода *Klebsiella* в объектах ветеринарного надзора проводили с помощью реакции нарастания титра фага по методике описанной В.Д. Тимаковым, Д.М. Гольдфарбом (1961), В.Я. Ганюшкиным (1988). Подготовку препаратов для электронной микроскопии проводили сосаждением вирусных частиц в режиме низкоскоростного центрифугирования (Пономарев, Андреева, Артамонова, 2002).

Полученный в исследованиях цифровой материал обрабатывали с использованием стандартных программ статистического анализа «STATISTIKA».

Выделение бактерий рода Klebsiella из объектов ветеринарного надзора

При изучении распространения бактерий рода *Klebsiella* названные микроорганизмы были выделены в 8 из 18 хозяйств

Ульяновской, Самарской областей и республики Татарстан, неблагополучных по желудочно-кишечным заболеваниям молодняка животных. В результате проведенных исследований из патологического материала и объектов ветеринарного надзора, нами изолировано и идентифицировано 12 штаммов, из них 10 штаммов *K. pneumoniae*, и 2 штамма *K. oxytoca*.

Следующим этапом нашей работы стало исследование 28 (5 референс-штаммов, 11 музейных и 12 выделенных нами) штаммов бактерий рода *Klebsiella* на наличие в них профага. В первой серии опытов выделение бактериофагов из бактерий проводили без воздействия индуцирующего фактора (Гольдфарб, 1961). В результате проведенных исследований штаммы *Klebsiella* не проявили лизогенных свойств.

Во второй серии опытов на исследуемые культуры воздействовали индуцирующим фактором (Лурия, Дарнелл, 1970), в качестве которого использовали ультрафиолетовое облучение и хлороформ. Суточную бульонную культуру обрабатывали ультрафиолетовыми лучами в течение 10, 15, 20, 30, 40, 60 минут с помощью прибора «Изоolda» с ртутной лампой ДРБ8, 18 % мощности которой приходится на область 254 нм. С такой же экспозицией воздействовали хлороформом на исследуемую культуру в соотношении 1 : 10. В наших опытах исследуемые штаммы *Klebsiella* в результате индукции не проявили лизогенных свойств.

Вторым этапом наших исследований стало выделение бактериофагов из объектов внешней среды (Гольдфарб, Тимаков, 1961).

Материалом служили следующие объекты: сточные воды свиноводческих и молочно-товарных ферм из разных хозяйств Ульяновской области, сточные воды Ульяновского мясокомбината. В результате проведенных исследований, нами был выделен и селекционирован 21 штамм бактериофагов *Klebsiella*.

Характеристика фагов бактерий рода Klebsiella

Морфологию негативных колоний изучали в разведении фагов 10^{-7} – 10^{-9} с индикаторной культурой на питательном агаре в посевах методом агаровых слоев (по Грация). Учет проводили через 18 – 24 часа инкубации в термостате при температуре 37 °С. Отмечали величину негативных колоний, форму, степень прозрачности, характер краев колоний, наличие и величина не-

полного лизиса. Образовавшиеся негативные колонии разделили на два типа (Бабков, 1973). К первому типу относятся круглые, прозрачные в центре негативные колонии диаметром от 2 мм и более с зоной неполного лизиса по периферии шириной 1 – 8 мм. Негативные колонии первого типа образуют фаги серии УГСХА: К - 4, К - 2, К - 60, К - 0x1, К - 33, К - 12, К - 24, К - 210, К - 210, К - 03, К - 032, К - 10, К - 8. Колонии второго типа круглые, прозрачные с ровными краями в диаметре до 2,5 мм с отсутствием зоны неполного лизиса. Колонии второго типа образуют фаги К - 41, К - 42, К - 11, К - 101, К - 14, К - 201, К - 281, К - 44, К - 81.

Литическая активность бактериофага оценивается по его способности вызывать лизис бактериальной культуры в жидких или плотных питательных средах. Активность по методу Аппельмана выражается 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 (по Грациа). Изученные нами фаги имели литическую активность от 10^{-5} до 10^{-8} (по Аппельману) и от 4×10^7 до 8×10^9 фаговых корпускул в 1 мл (по Грациа). Результаты исследований представлены в таблице 1.

Спектр литической активности. Для изучения спектра литической активности использовали метод нанесения капель бактериофагов на газон исследуемой культуры (Ганюшкин, 1988). В качестве исследуемых культур использовали 28 (5 референс-штаммов, 11 музейных и 12 выделенных нами) штаммов бактерий рода *Klebsiella*.

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о разном диапазоне литической активности изолятов фагов, который колеблется от 14 % до 75 %

Два отобранных бактериофага исследовали дополнительно на 10 штаммах клебсиелл из коллекции Всероссийского государственного центра качества и стандартизации лекарственных препаратов для животных и кормов (ВГНКИ). В результате было установлено что, фаг К - 10 УГСХА лизировал 76 % штаммов бактерий рода *Klebsiella*, К - 81 УГСХА – 73 %, а в сумме фаги проявили литическое действие в отношении 97 % всех исследованных культур (табл. 2).

Два активных бактериофага К - 10 УГСХА и К - 81 УГСХА с широким спектром литической активности были отобраны для конструирования диагностического биопрепарата.

Специфичность фагов бактерий рода *Klebsiella*. Изучение специфичности бактериофагов К - 10 УГСХА, К - 81 УГСХА проводили по отношению к представителям других родов семейства *Enterobacteriaceae*: *Escherichia* spp., *Proteus* spp., *Morganella* spp., *Citrobacter* spp., *Salmonella* spp., *Enterobacter* spp., *Providencia* spp., *Yersinia enterocolitica*, а также родов семейств *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Pseudomonas* spp.

Установлено, что селекционированные фаги неактивны по отношению к представителям бактерий других родов и семейств.

Температурная устойчивость фагов бактерий рода *Klebsiella*. В результате изучения чувствительности бактериофагов к действию температуры, установили, что фаги К - 10 УГСХА, К - 81 УГСХА понижали свою физиологическую активность при температуре 67 °С и инактивировались при температуре 81 °С (К - 10 УГСХА) и 88 °С (К - 81 УГСХА) в течение 30 минут (табл. 3).

Устойчивость фагов бактерий рода *Klebsiella* к воздействию хлороформа. Чувствительность бактериофагов к хлороформу определяли в соотношении 1 : 10 при постоянном встряхивании в течение 10, 15, 20, 25, 30, 40 минут. Количество негативных колоний в 1 мл исследовали методом агаровых слоев (по Грация). Обработка бактериофагов К - 10 УГСХА, К - 81 УГСХА хлороформом выявила выраженную устойчивость их к воздействию данного агента в течение 40 минут (табл. 4).

Данный химический агент использовали в исследованиях для освобождения фаголизата от жизнеспособных бактерий.

Морфология фаговых корпускул. Для электронной микроскопии подготовку препаратов проводили соосаждением вирусных частиц в режиме низкоскоростного центрифугирования по методике, предложенной А.П. Пономаревым, О.Г. Андреевой, Т.Н. Артамоновой (2002).

Исследования проводили на электронном микроскопе JEM-100В в лаборатории Всероссийского научно-исследовательского института защиты животных, совместно с профессором А.П. Пономаревым. В результате проведенных исследований было установлено, что вирионы фагов К - 81 и К - 10 серии УГСХА имеют

Табл. 1 – Литическая активность фагов бактерий рода *Klebsiella*.

№ п.п.	Название фага серии УГСХА	Индикаторная культура	Активность фагов	
			по методу Аппельмана	по методу Грациа
1	К - 281	<i>K. pneumoniae</i> № 8172	10^5	1×10^5
2	К - 210	<i>K. pneumoniae</i> № 1071	10^5	$1,5 \times 10^5$
3	К - 41	<i>K. pneumoniae</i> № 4463	10^5	7×10^5
4	К - 42	<i>K. pneumoniae</i> № 4463	10^5	5×10^5
5	К - 4	<i>K. pneumoniae</i> № 4463	10^5	1×10^5
6	К - 14	<i>K. pneumoniae</i> № 4463	10^5	$1,1 \times 10^5$
7	К - 24	<i>K. pneumoniae</i> № 4463	10^5	1×10^5
8	К - 101	<i>K. pneumoniae</i> № 01	10^5	7×10^5
9	К - 201	<i>K. pneumoniae</i> № 01	10^5	2×10^5
10	К - 2	<i>K. pneumoniae</i> № 265	10^5	4×10^7
11	К - 12	<i>K. pneumoniae</i> № 265	10^5	1×10^5
12	К - 10	<i>K. pneumoniae</i> № 1017	10^5	2×10^5
13	К - 60	<i>K. pneumoniae</i> № 60	10^5	$2,5 \times 10^5$
14	К - 11	<i>K. pneumoniae</i> № 1	10^5	$2,5 \times 10^5$
15	К - 0x1	<i>K. oxytoca</i> № 1/1	10^5	8×10^5
16	К - 33	<i>K. oxytoca</i> № 5	10^5	5×10^5
17	К - 44	<i>K. pneumoniae</i> № 4463	10^5	2×10^5
18	К - 03	<i>K. pneumoniae</i> № 03	10^7	1×10^5
19	К - 03 ₂	<i>K. pneumoniae</i> № 03	10^7	1×10^5
20	К - 81	<i>K. pneumoniae</i> № 8172	10^5	4×10^5
21	К - 8	<i>K. pneumoniae</i> № 423	10^7	1×10^5

Табл. 2 – Спектр литической активности фагов бактерий рода *Klebsiella*.

Бактериофаги	Кол-во исследованных штаммов культур	Общее кол-во лизируемых штаммов культур	Кол-во лизируемых штаммов культур	% лизируемых штаммов культур
К - 10 УГСХА	38	37	29	76
К - 81 УГСХА			28	73
Общий % лизируемых штаммов культур	97			

Табл. 3 – Температурная устойчивость бактериофагов *Klebsiella*.

Температура, °С	Количество активных фаговых корпускул в 1 мл после действия температуры	
	К - 10 УГСХА	К - 81 УГСХА
60 – 63	1×10^5	2×10^5
64 – 67	$4,5 \times 10^5$	$1,8 \times 10^7$
68 – 71	$7,5 \times 10^4$	1×10^5
73 – 75	$6,5 \times 10^3$	$2,2 \times 10^4$
76 – 78	$2,1 \times 10^2$	$4,3 \times 10^3$
78 – 81	3×10^1	$4,8 \times 10^4$
82 – 84	–	$2,1 \times 10^4$
85 – 88	–	2×10^1
88 – 90	–	–
Контроль фага	$1,2 \times 10^5$	3×10^5

Табл. 4 – Устойчивость фагов бактерий рода *Klebsiella* к воздействию хлороформа.

№ п.п.	Фаги	Количество активных фаговых корпускул в 1 мл после воздействия хлороформа						Контроль
		10 мин	15 мин	20 мин	25 мин	30 мин	40 мин	
1	К – 10 УГСХА	1×10^9	$1,5 \times 10^9$	$2,5 \times 10^9$	2×10^9	1×10^9	$1,5 \times 10^9$	$1,2 \times 10^9$
2	К – 81 УГСХА	3×10^9	3×10^9	4×10^9	2×10^9	3×10^9	$3,2 \times 10^9$	3×10^9

структуры, состоящие из симметричной головки в виде многогранника с отростком.

Вирусные частицы фага К - 10 УГСХА имеют следующие размеры: высота головки 62 нм, диаметр головки: 50 нм и длина отростка – 10^5 нм. Отношение высоты головки к ее диаметру у фагов равно 1,24. Морфология бактериофага К - 10 УГСХА представлена на рисунке 1.

У фага К - 81 УГСХА корпускулы имеют головку высотой 60 нм, диаметр 55 нм, длина отростка – 85 нм. Отношение высоты головки к ее диаметру равно 1,09 нм. Морфология бактериофага К - 81 УГСХА представлена на рисунке 2.

В соответствии с морфологическими параметрами бактериофаг К - 10 УГСХА согласно Международной классификации и номенклатуре вирусов (Murphy с соавт., 1995) относится к семейству Siphoviridae, по классификации А.С. Тихоненко к IV группе – «Фаги с длинным несокращающимся отростком», а фаг К - 81 УГСХА к семейству Myoviridae и к V морфологической группе – «Фаги с отростком сложного строения, чехол которого способен к сокращению» (Тихоненко, 1968).

Для получения фагов с высокой литической активностью нами была установлена множественность инфекции, выраженная в соотношении между количеством фаговых корпускул и количеством микробных клеток индикаторной культуры. Для штамма фага К - 10 УГСХА множественность инфекции составила 2,17 корпускул фага на 1 бактериальную клетку, фага К - 81 УГСХА – 0,21 к 1. Оптимальная экспозиция пассажа при 37 °С составила 4 часа. Был осуществлен контроль бактериофагов: определение стерильности, литической активности, спектра лизиса, специфичности; степень нарастания титра фага.

Разработанные нами технологические параметры индикаторных фагов позволили получить специфический биопрепарат

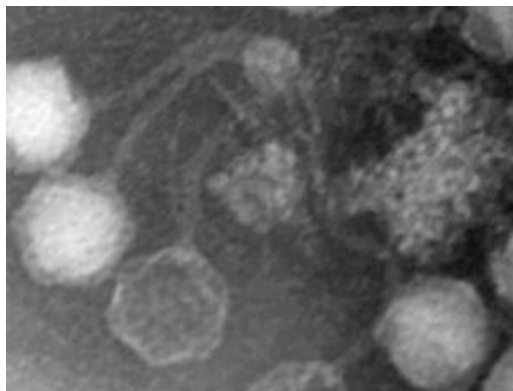


Рис. 1. Электронная микрофотография морфологии бактериофага К - 10 УГСХА (увел. x 110 000)



Рис. 2. Электронная микрофотография морфологии бактериофага К - 81 УГСХА (увел. x 110 000)

с литической активностью 10^9 . При исследовании литической активности полученного препарата в условиях хранения при 2 – 4 °С с периодичностью 3 – 4 месяца в течение года было установлено, что фаги сохраняли свою активность за весь период наблюдения.

Учитывая строгую специфичность отобранных бактериофагов К - 10 и К - 81 серии УГСХА, нами была разработана схема ускоренной идентификации бактерий рода *Klebsiella*. Исследования проводили в сравнении с традиционной схемой, представленной в «Методических указаниях по бактериологической диагностике смешанной кишечной инфекции молодняка животных, вызываемой патогенными энтеробактериями». В качестве материала для исследований использовали воду, комбикорм, мясо и фекалии, контаминированные бактериями рода *Klebsiella* в концентрациях 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 м.к. в 1 мл. Выделение и идентификацию чистых культур микроорганизмов проводили в соответствии с правилами, изложенными в выше упомянутых методических указаниях. Фагоидентификация основывалась на обнаружении прозрачной зоны лизиса бактериофагов К - 10 УГСХА, К - 81 УГСХА.

Проведенные исследования подтверждают возможность идентификации бактерий рода *Klebsiella* индикаторными фагами К - 10 УГСХА, К - 81 УГСХА, с уменьшением времени исследования с 96 до 48 часов, сократив при этом расход реактивов, питательных сред и лабораторной посуды.

Решение следующей поставленной задачи заключалось в разработке оптимальных условий постановки реакции нарастания титра фага (РНФ) с различными субстратами.

Определение количественного показателя РНФ, имеющего диагностическое значение. Для постановки РНФ опытным путем установили показатели нарастания титра фагов, имеющие диагностическое значение. В наших исследованиях РНФ считали положительной, если увеличение титра фагов произошло в 5 и более раз. Данный критерий гарантировал достоверность результатов, поскольку он позволял исключить технические погрешности при титровании, при которых возможно выявление невысокой степени увеличения количества фага.

Установление оптимального времени, обеспечивающее наиболее полноценное взаимодействие фага с бактериями. Для решения поставленной задачи проведены эксперименты на тест-объекте по выявлению наиболее эффективного временного показателя взаимодействия фага и индикаторной культуры при сохранении остальных параметров (температурный режим, концентрация бактериальной культуры и фаговых корпускул в 1 мл) постановки РНФ. В качестве тест-объекта использовали МПБ, контаминированный бактериями рода *Klebsiella*. Оптимальное время экспозиции выбирали из следующих параметров:

- предварительное подращивание исследуемого материала в течение 5, 16, 24 часов при 37 °С, после добавления фагов смесь выдерживали в течение 5 часов при температуре 37 °С;
- увеличение времени контакта исследуемого материала с фагом до 6, 10, 16 и 24 часов при температуре 37 °С.

Установлено, что с помощью исследуемых бактериофагов в РНФ при подращивании материала в течение 5 часов можно обнаружить клебсиеллы в концентрации 10^3 м.к./мл. С увеличением времени подращивания материала до 16 часов чувствительность реакции повышается и позволяет обнаружить бактерии в количестве 10^2 м.к./мл. На проведение исследования затрачивается 33 часа. Результаты исследований представлены в таблице 5.

Во втором варианте опыта МПБ, контаминированный бактериями рода *Klebsiella* от 10^1 до 1×10^5 м.к./мл не подращивали, а сразу же вносили в пробирки. За 5 часов инкубации исследуемого материала с фагом К - 81 УГСХА обнаруживались бактерии *K. pneumoniae* № 8172 в концентрации 10^4 м.к./мл, при увеличении времени культивирования до 6 часов повышает чувствитель-

ность реакции с указанным фагом до 10^3 м.к./мл, а 10 часовая инкубация – до 10^2 м.к./мл (табл. 6).

На основании полученных данных можно сделать вывод, что наиболее оптимальным является режим РНФ при 6 часовой экспозиции исследуемого материала с фагом, когда удастся провести индикацию бактерий в количестве 10^3 микробных клеток в миллилитре исследуемого субстрата, на исследование которого затрачивается 18 часов. Одновременное исследование бактериологическим методом позволяло обнаружить бактерии рода *Klebsiella* в концентрации 10^4 м.к./мл, при этом на исследование затрачивалось 96 часов: выделение возбудителя (48 часов), изучение биохимических свойств (48 часов).

Следующим этапом наших исследований была разработка схемы постановки РНФ для индикации бактерий рода *Klebsiella* в объектах ветеринарного надзора и патологическом материале. Данные исследования предполагали изучение возможности использования РНФ с индикаторными бактериофагами К - 10 и К - 81 серии УГСХА для обнаружения бактерий рода *Klebsiella* в объектах ветеринарного надзора и патологическом материале (вода, комбикорм, фекалии и мясо). Одновременно исследования проводили бактериологическим методом.

По результатам проведенных исследований водопроводной воды, комбикорма и мяса установлено, что нарастание титра фа-

Табл. 5. – Чувствительность РНФ в зависимости от времени подрачивания исследуемого материала, контаминированного бактериями рода *Klebsiella*.

№ п.п.	Длительность подрачивания исследуемого материала, ч	Бактериофаг		Время, затраченное на проведение исследований, ч
		К - 10 УГСХА	К - 81 УГСХА	
1	5	10^3	10^3	22
2	16	10^2	10^2	33
3	24	10^2	10^2	41

Табл. 6. – Чувствительность РНФ в зависимости от времени инкубирования исследуемого материала с индикаторными бактериофагами.

№ п.п.	Длительность инкубирования исследуемого материала, ч	Бактериофаг		Время, затраченное на проведение исследований, ч
		К - 10 УГСХА	К - 81 УГСХА	
1	5	10^3	10^4	17
2	6	10^3	10^3	18
3	10	10^2	10^2	22
4	16	10^2	10^2	33
5	24	10^2	10^2	41

гов более чем в 5 раз произошло при минимальной концентрации бактерий рода *Klebsiella* 10^3 м.к./мл.

При исследовании проб фекалий нарастание титра фагов более чем в 5 раз произошло при концентрации бактерии рода *Klebsiella* 10^4 м.к./г. При увеличении времени инкубации бактериофага с фекалиями до 10 часов обнаруживали клебсиеллы в концентрации 10^3 м.к./г за 22 часа.

При исследовании воды, комбикорма, фекалий и мяса мы наблюдали видимое преимущество метода фагоиндикации – РНФ над бактериологическим методом исследования. Таким образом, диагностическая чувствительность РНФ позволяет обнаруживать бактерии рода *Klebsiella* в минимальной концентрации 10^3 – 10^4 м.к./мл за 18 – 22 часа.

Оценивая эффективность реакции нарастания титра фага в условиях производства мы провели исследования по фагодиагностике кишечной инфекции телят, протекающей с участием бактерий рода *Klebsiella*. Телята принадлежали молочно-товарной ферме учебно-опытного хозяйства УГСХА Чердаклинского района Ульяновской области. Исследованию подвергали 13 проб фекалий от больных диареей телят в возрасте от 2 – 15 суток.

В пробах фекалий телят методом фагоиндикации с помощью бактериофагов К - 10 УГСХА и К - 81 УГСХА бактерии рода *Klebsiella* были обнаружены в 38 % случаях (5 проб). Время исследования составило 22 часа. Бактериологическим методом данные бактерии были обнаружены в 15 % случаях (в 2 пробах) за 96 часов.

Результаты производственных испытаний указывают на более высокую чувствительность РНФ при обнаружении бактерий рода *Klebsiella* в сравнении с бактериологическим методом исследования с меньшей затратой времени, реактивов и посуды.

В качестве усовершенствования предложенного метода нами изучалась возможность использования смеси из монофагов. Определение активности монофагов К - 10 УГСХА и К - 81 УГСХА

Табл. 7. – Активность монофагов К - 10 УГСХА, К - 81 УГСХА и их смеси.

Фаги	Индикаторная культура	Количество корпускул в 1 мл (по Грациа)
К - 10 УГСХА	<i>K. pneumoniae</i> № 1017	2×10^9
К - 81 УГСХА	<i>K. pneumoniae</i> № 8172	4×10^9
Смесь К - 10 УГСХА и	<i>K. pneumoniae</i> № 1017	$1,2 \times 10^9$
К - 81 УГСХА	<i>K. pneumoniae</i> № 8172	$2,1 \times 10^9$

и активности смеси данных фагов на индикаторных штаммах, показало равнозначные результаты (табл. 7). Интерференция, то есть взаимное усиление или подавление при взаимодействии фагов отсутствовала.

Результаты проведенных исследований подтверждают возможность использования монофагов К - 10 УГСХА и К - 81 УГСХА в смеси. Следовательно, полученный биопрепарат, состоящий из двух фагов, может использоваться для идентификации, а также в реакции нарастания титра фага для индикации бактерий рода *Klebsiella* в объектах ветеринарного надзора и патологическом материале. Предложены оптимальные технологические параметры постановки РНФ, позволяющие повысить эффективность обнаружения бактерий рода *Klebsiella*.

Выводы. Выделены и селекционированы специфичные бактериофаги, используемые для приготовления диагностического биопрепарата.

Два штамма бактериофагов депонированы во Всероссийском государственном центре качества и стандартизации ветеринарных препаратов (ВГНКИ) и признаны перспективными для приготовления диагностического препарата.

Разработана «Временная инструкция по изготовлению и контролю индикаторных бактериофагов *Klebsiella* К - 10 УГСХА и К - 81 УГСХА», одобренная Ученым советом Ульяновской ГСХА и утвержденная ректором академии 17.01.2006 года.

По материалам диссертационных исследований разработаны «Методические рекомендации по ускоренной индикации и идентификации энтеробактерий рода *Klebsiella* в патологическом материале, кормах, пищевом сырье и объектах внешней среды с применением специфических бактериофагов», утвержденные Отделением ветеринарной медицины РАСХН 26.06.2006 года.

ЛИТЕРАТУРА

1. Адамс, М. Бактериофаги - М.: изд-во иностр. Лит-ра, 1961.
2. Бабков, В.В. Биологическая характеристика умеренных бактериофагов *E. coli* 0124:B17 // Проблемы бактериофагии и биология кишечных бактерий: сб. кафедры микробиологии ИЛен. мед. ин-та им. акад. И.П. Павлова Л., 1973. – 53 с.
3. Воронин, Е.С., Девришов Д.А., Ставцева Л.Я. // Вестник с.-х. науки. – 1989. – № 9. – С. 105 – 110.
4. Габрилович, И.М. Общая характеристика бактериофагов / И.М. Габрилович // Основы бактериофагии. – Минск, 1973. – С.5-24.
5. Ганюшкин, В.Я. Бактериофаги сальмонелл и их применение в ветеринарии. – Ульяновск, 1988. – 45 с.
6. Гольдфарб, Д.М. Бактериофагия / Д.М. Гольдфарб – М.: Медгиз, 1961. – С. 6-184.

7. Золотухин, С.Н. Бактериофаги *M.organii* и их применение при желудочно-кишечных заболеваниях поросят // Автореф. дис. ... канд. вет. наук. – М., 1994. – С. 14.
8. Золотухин, С.Н. Смешанная кишечная инфекция телят и поросят, вызываемая патогенными энтеробактериями / С.Н. Золотухин, Л.С. Каврук, Д.А. Васильев. – Ульяновск: УГСХА, 2005. – С.20-25.
9. Каврук, Л.С. // Тесты, критерии и методы ускоренной санитарно-бактериологической оценки репродуктивных помещений животноводческих ферм и пути оптимизации в них микробиоценоза. дисс. в форме науч. докл. на соискание учен. степ. докт. ветер. наук – М., 1994.
10. Ковалева, Е.П., Рейзис, А.Р. Инфекции, вызванные условно-патогенными микроорганизмами // Профилактика внутрибольничных инфекций / Под ред. Е.П. Ковалевой, Семиной: руководство для врачей. – М., 1993. – С. 56 – 69.
11. Колпикова, Т.И. Перспективы практического применения листериозных бактериофагов / Т.И. Колпикова, И.А. Бакулов, В.М. Котляров // Вопросы ветеринарной вирусологии, микробиологии и эпизоотологии: Материалы научной конференции ВНИИВиМ. Часть 11. – Покров, 1992. — С.211-212.
12. Красноголовец, В.Н., Киселева, Б.С. Клебсиеллезные инфекции. – М.: Медицина, 1996. – С.256.
13. Лурия, С. Общая вирусология / Лурия С., Дарнелл Д. – М.: «Мир», 1970. – С.36-47.
14. Натидзе, Л., Ригвава, С., Натидзе, М., Гваладзе, П., Пиранишвили Н. Бактериофаги в ветеринарии: реальность и перспективы // Перспективы использования препаратов бактериофага для превенции и лечения инфекции, вызванных патогенными и условно-патогенными микроорганизмами: матер. междунар. семинара. – Тбилиси, 2005. – С. 15.
15. Покровский, В.И., Поздеев, О.К. Медицинская микробиология. – М.: Медицина, 1999. – С. 389 – 393.
16. Пономарев, А.П., Мищенко, В.А. Электронная микроскопия вирусов животных и некоторых условно-патогенных микроорганизмов // В.: Фолиант. – 2005. – 160 с.
17. Ревенко, И.П. Бактериофаги и их использование в ветеринарной практике / И.П. Ревенко. – Киев: «Урожай», 1978. – С. 41-88.
18. Семенцов, В.И., и др. Клебсиеллез поросят. / В.И. Семенцов, И.А. Болоцкий, О.П. Ольховик и др. // Ветеринария Кубани. – 2009. - № 6. - С. 15-17.
19. Русалеев, В.С. Фагочувствительность аэробных спорообразующих бактерий // Ветеринария. – 1990. – № 8. – С. 29.
20. Тимаков, В.Д., Гольдфарб, Д.М. Реакция нарастания титра фага (РНФ).– М., 1962.– 32 с.
21. Тихоненко, А.С. Ультраструктура вирусов бактерий / А.С. Тихоненко. – М.: «Наука», 1968. – С. 89.
22. Шахов, А.Г. Этиология и профилактика желудочно-кишечных и респираторных болезней телят и поросят // Ветеринарный консультант. – 2003. – № 1. – С. 4 – 5.
23. Ackermann, H.-W., DuBow M.S., Gershman M. Taxonomic changes in tailed of enterobacteria // Archives of virology. – 1997. – № 142. – P. 1381 – 1390.

КОРИТНЯК Б.М.

2.3. ВЫДЕЛЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ ОСНОВНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БАКТЕРИОФАГОВ БАКТЕРИЙ ВИДА *YERSINIA ENTEROCOLITICA*

KORYTNYAK B.M. ISOLATION AND STUDY OF THE MAIN QUALITIES OF
YERSINIA ENTEROCOLITICA SP. PHAGES

Заболевания, которые в настоящее время называют кишечными иерсиниозами, лет 30 – 40 назад считались редкими и не привлекали к себе внимания специалистов.

По данным Российских исследователей, в нашей стране заболевания вызываемые бактериями вида *Yersinia enterocolitica* занимает второе место среди пищевых зоонозов, после сальмонеллёза (Черкасский, Подунова, Акулова, 1995).

Несмотря на большой интерес, проявляемый к данному возбудителю, в России до сих пор не ясна картина заболеваемости, структура и динамика (Смирнов, Ценева, 1992). Отдельные серо и биовары *Y. enterocolitica*, являющимися документированными этиологическими агентами, попрежнему находятся в 4-й группе «условно» патогенных бактерий. Это является основной из причин унифицированного подхода к их индикации и идентификации в условиях клиники и эпидемиологической практики (Волкова, Степанова, Ценева и соавт., 2000).

Широкое распространение иерсиниоза, многообразие клиники и трудоёмкость в постановке диагноза сделали актуальной проблему кишечного иерсиниоза в мировом масштабе. Различные методы индикации и дифференциации *Y. enterocolitica* не идеальны и обладают некоторыми особенностями, поэтому разработка новых методов позволит исследователям более эффективно изучать данную проблему. Фаготипирование, как один из методов дифференциации и идентификации, позволяет быстро и точно определить принадлежность исследуемой бактерии не только к определённому виду, но и к разным фаготипам в пределах вида.

Цель исследования – разработка параметров и технологических приёмов по индикации и идентификации бактерий вида *Y. enterocolitica* с помощью специфических бактериофагов.

В работе были использованы как гомологичные, так и гетерологичные штаммы бактерий. В качестве гомологичных бактерий использовали: 38 штаммов бактерии вида *Y. enterocolitica* полученные из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ УГСХА и выделенные нами из объектов окружающей среды и патологического материала. Культуры бактерий обладали типичными для данного вида культурально-морфологическими и биохимическими свойствами, выделены из разных источников. Использовали 101 штамм бактерий гетерологичных родов и семейств: *Proteus*, *Morganella*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas aureginosa*, *Bacillus cereus*, *E.coli*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Y. pseudotuberculosis* получены из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ УГСХА; 9 бактериофагов бактерий вида *Y. enterocolitica*, выделенные нами из сточных вод животноводческих хозяйств.

В качестве объектов внешней среды использовали: водопроводную воду, фекалии животных и комбикорм, материал от больных и погибших животных, мясо.

В работе использовались методы для выделения бактерий вида *Y. enterocolitica*, приведённые в «Методических указаниях по бактериологической диагностике смешанной кишечной инфекции молодняка животных, вызываемой патогенными энтеробактериями», утверждёнными Департаментом ветеринарии МСХиП 11 октября 1999 года. Из культур выделяли бактериофаги методами, предложенными С. Лурия, Д. Дарнел (1970), И.П. Ревенко (1978), В.Я. Ганюшкиным (1988). Фаги выделяли из объектов окружающей среды методом, предложенным Адельсоном (1962), В.Я. Ганюшкиным (1988). Изучение биологических свойств фагов проводили по методам, предложенным М. Adams (1961), Д.М. Гольдфарбом (1961), А.С. Тихоненко (1968), Т.Г. Чинашвили (1968), И.М. Габриловичем (1973), В.Я. Ганюшкиным (1988). Селекцию бактериофагов и повышение их литической активности проводили по методике, описанной и использованной И.М. Габриловичем (1992), С.Н. Золотухиным (1994). Обнаружение бактерий вида *Y. enterocolitica* в объектах окружающей среды, кормах и пищевых продуктах проводили с помощью реакции нарастания титра фага. Реакцию нарастания титра фага ставили по методике В.Д. Тимакова и Д.М. Гольдфарба (1962), В.Я. Ганюшкина (1988). Подготовку препаратов для электронной микроскопии проводили осаждением вирусных частиц в режиме низкоскоростного центрифугирования (Пономорёв, Андреева, Артамонова, 2002).

Для статистической обработки результатов исследования использовали общепринятые статистические методы (Ашмарин, Воробьев, 1962; Бейли, 1962).

Первым этапом нашей работы была попытка выделить бактериофаги бактерий вида *Y. enterocolitica* из имеющихся у нас штаммов бактерий вида *Y. enterocolitica*. Мы надеялись обнаружить лизогенные культуры, так как бактериофаги, выделенные из таких культур, обладают более выраженной специфичностью (Жугова, 1985).

Из имеющихся у нас культур *Y. enterocolitica* мы пробовали выделить бактериофаги различными методами. Все штаммы, изученные нами, исследовались как индикаторные и как “лизогенные”.

В первой серии опытов использовали методику, предложенную С. Лурия, Д. Дарнелл (1970), для выделения бактериофагов энтеробактерий из бактерий вида *Y. enterocolitica* без воздействия на них индуцирующего фактора. Результаты опыта свидетельствуют, что из культур бактерий вида *Y. enterocolitica* в опытах по выделению бактериофагов без воздействия на них индуцирующего фактора не приводило к появлению свободного фага.

Во второй серии опытов на культуры, исследуемые как “лизогенные”, воздействовали индуцирующим фактором, затем фильтровали через бактериальные свечи Шамберлана L-3 (Ревенко, 1978). Полученный фильтрат исследовали на наличие фага на имеющихся культурах *Y. enterocolitica* методом агаровых слоев предложенного А. Грациа (Гольдфарб, 1961). Установлено, что при действии индуцирующего фактора на бактерии вида *Y. enterocolitica* в наших опытах не приводили к появлению зон лизиса. Резюмируя полученные данные, можно утверждать, что мы не обнаружили явления перехода профага в свободный фаг у имеющихся штаммов бактерий по данным схемам. Дальнейшие исследования были посвящены выделению бактериофагов *Y. enterocolitica* из объектов внешней среды (Андельсон, 1958; Ганюшкин, 1988).

Для проведения исследований, брали сточные воды из общественных туалетов, свиноводческих хозяйств и молочно-товарных ферм в различных хозяйствах Ульяновской и Самарской областей, а также на Ульяновском мясокомбинате. Селекцию выделенных бактериофагов и повышение их литической активности проводили с помощью пассирования фага на индикаторной культуре с периодической отбивкой типичных негативных колоний по методике, описанной и использованной И.М. Габриловичем (1992), С.Н. Золотухиным (1994). В результате проведенных опытов, нами были выделены и изолированы 9 штаммов фагов бактерий вида *Y. enterocolitica*. Из выделенных фагов, мы отобрали 3 штамма фагов, обладавших стабильными биологическими. Анализируя свойства данных бактериофагов, мы отобрали бактериофаг Y/9 УГСХА, который лизировал 78,6% бактерий вида *Y. enterocolitica* и был специфичен только в отношении данного вида бактерий.

Характеристика выделенных фагов бактерий вида *Y. enterocolitica*

Изучение биологических свойств фагов проводили по методам, предложенным М. Адамсом (1961), А.С. Тихоненко (1968), Т.Г. Чинашвили (1968), И.М. Габриловичем (1973).

а) Морфология негативных колоний. Морфологию негативных колоний фагов изучали при посевах фагов методом агаровых слоев. Негативные колонии, образуемые изучаемыми бактериофагами, разделены нами на два типа. К первому типу относятся фаги: Y/9 УГСХА, который образует округлые колонии с ровными краями, в диаметре 2-3 мм, прозрачные, без вторичного роста, и фаг Y/4 УГСХА, который образует колонии с ровными краями, прозрачные, без вторичного роста и без зоны неполного лизиса, в диаметре от 1 до 2 мм. Ко второму типу относится фаг Y/3 УГСХА, который образует колонии округлые, с ровными краями, в диаметре 20-30 мм, с зоной неполного лизиса, ширина зоны 0,5-1 мм.

б) Литическая активность выделенных бактериофагов бактерий рода. Литическую активность селекционированных бактериофагов определяли по методу Аппельмана и Грация (Гольдфарб, 1961). Литическая активности селекционированных бактериофагов Y/9 УГСХА, Y/4 УГСХА, Y/3 УГСХА по методу Аппельмана составила: 10^{-10} , 10^{-8} , 10^{-8} ; по Грация составил: 1×10^{10} , 4×10^9 , 2×10^9 фаговых корпускул в 1 мл.

в) Спектр литической активности изученных бактериофагов *Y. enterocolitica*. Спектр литической активности является характерной особенностью штаммов фага, и его используют для их идентификации. Определение спектра литической активности проводили методом нанесения фага на газон бактериальной культуры (Адамс, 1961; Ганюшкин, 1988).

Для изучения спектра литической активности трёх селекционированных фагов (Y/9 УГСХА, Y/4 УГСХА, Y/3 УГСХА) мы использовали 12 референс и 2 полевых штаммов иерсиний. Опыты показали, что изученные фаги характеризуются различным спектром литической активности. Наиболее широким спектром литической активности по отношению к изучаемым культурам обладает штамм фага Y/9 УГСХА, который лизировал 11 из имеющихся у нас 14 штаммов бактерий рода *Y. enterocolitica* (78,6%). Фаг Y/4 УГСХА лизировал 8 (57,1%) и Y/3 УГСХА лизировал 2 (14,3%) из имеющихся у нас 14 штаммов бактерий вида *Y. enterocolitica*.

Поэтому фаг Y/9 УГСХА был выбран для конструирования диагностического препарата.

г) Специфичность действия исследуемых бактериофагов бактерий рода *Y. enterocolitica*. Видовая специфичность фагов используется в практике для дифференциации бактерий. Эта способность фагов определяется, прежде всего, сродством их к рецепторам лизируемых бактерий. Определение видовой специфичности 3-х изучаемых бактериофагов бактерий вида *Y. enterocolitica* (Y/9 УГСХА, Y/4 УГСХА, Y/3 УГСХА) проводили на агаровых средах путём нанесения фага на газон культуры. В результате изучения специфичности трёх бактериофагов *Y. enterocolitica* (Y/9 УГСХА, Y/4 УГСХА, Y/3 УГСХА) по отношению к представителям других семейств и родов использовали: *Proteus* 6 штаммов, *Morganella* 6 штаммов, *Klebsiella* 4 штамма, *Salmonella* 6 штаммов, *Staphylococcus* 4 штамма, *Streptococcus* 2 штамма, *Pseudomonas aureginosa* 4 штамма, *Bacillus cereus* 3 штамма, *E. coli* 46 штаммов, *Enterobacter* 4 штамма, *Citrobacter* 13 штаммов, *Y. pseudotuberculosis* 6. Установлено, что данные фаги не лизировали ни одну из испытываемых культур других видов бактерий. На основании полученных результатов можно сделать вывод, о том, что селекционированные фаги являются специфичными по отношению к бактериям вида и не активны к представителям других видов бактерий.

д) Температурная устойчивость выделенных фагов бактерий вида *Y. enterocolitica*

Степень устойчивости бактериофагов и клеточных хозяев к инактивирующим факторам физического воздействия имеет теоретическое и практическое значение, поэтому при изучении биологических свойств фагов определение их чувствительности к таким агентам является обязательным. Были проведены исследования по изучению термочувствительности вышеперечисленных объектов по методикам, предложенным Д.М. Гольдфарбом (1961); М. Адамсом (1961); И.М. Габриловичем (1992). В результате исследований было установлено, что селекционированные нами фаги обладали разной температурной устойчивостью. Полученные данные свидетельствуют о выраженной устойчивости фага Y/4 УГСХА к воздействию высокой температуры до 70 °С. При температуре выше 70 °С фаг Y/4 УГСХА терял свою физиологическую активность и погибал при температуре выше 89 °С.

Бактериофаги Y/9 УГСХА, Y/3 УГСХА умеренно устойчивы к воздействию температурного фактора и показали стабильные результаты только при 50 °С.

е) Устойчивость выделенных бактериофагов к воздействию хлороформа

Бактериофаги обычно устойчивее к хлороформу, чем клетки микроорганизмов, поэтому данный химический агент является хорошим средством для освобождения фаголизата от жизнеспособных бактерий. Определение чувствительности бактериофагов и бактерий проводили путем обработки фаговой суспензии и бульонных культур иерсиний хлороформом в соотношении 1:10 при постоянном встряхивании.

Обработка бактерий индикаторных штаммов *Y. enterocolitica* O9, *Y. enterocolitica* O8 в течение 15 минут хлороформом приводила к их полной инаktivации. Результаты проведённых исследований свидетельствуют о том, что селекционированные бактериофаги Y/9 УГСХА, Y/3 УГСХА проявили выраженную устойчивость к воздействию хлороформа. В то время как бактериофаг Y/4 УГСХА терял свою активность при воздействии хлороформа на фаголизаты в течение 60 минут, и является умеренно устойчивым к воздействию хлороформа.

Определение температурных параметров культивирования выделенных бактериофагов

Определение температурных условий культивирования фагов бактерий вида *Y. enterocolitica*: Y/3 УГСХА, Y/4 УГСХА, Y/9 УГСХА проводили по методикам, предложенным Д.М. Гольдфарбом (1961); М. Адамсом (1961); И.М. Габриловичем (1992). Результаты исследований свидетельствуют о том, что оптимальная температура культивирования фагов бактерий вида *Y. enterocolitica*: Y/3 УГСХА, Y/4 УГСХА, Y/9 УГСХА - 37 °С.

При исследовании условий культивирования выделенных фагов бактерий вида *Y. enterocolitica*: Y/3 УГСХА, Y/4 УГСХА, Y/9 УГСХА необходимо было выяснить оптимальное количественное соотношение фага и индикаторных бактерий вида *Y. enterocolitica*, для производства диагностического препарата. В результате проведенных исследований было установлено, что для фагов *Y. enterocolitica* Y/9 УГСХА (титр 1×10^{10} фаговых корпускул в 1 мл), Y/3 УГСХА (титр 2×10^9 фаговых корпускул в 1 мл) оптимальным

соотношением бактериофага 0,2 мл фага х 1,0 мл (800000 м.кл./мл) индикаторной культуры, а для фага *Y. enterocolitica* Y/4 УГ-СХА (титр 4×10^9 фаговых корпускул в 1 мл) 0,2 мл фага х 0,5 мл (800000 м.кл./мл) индикаторной культуры.

Используя строгую специфичность селекционированных нами бактериофагов по отношению к бактериям вида *Y. Enterocolitica* мы разработали схему ускоренной идентификации этих микроорганизмов. Результаты исследований представлены на схеме (рис. 1). Результат исследований считали положительным, если на месте нанесения фага на газоне сплошного роста культуры образовывалась прозрачная зона лизиса с вторичным ростом фаго-

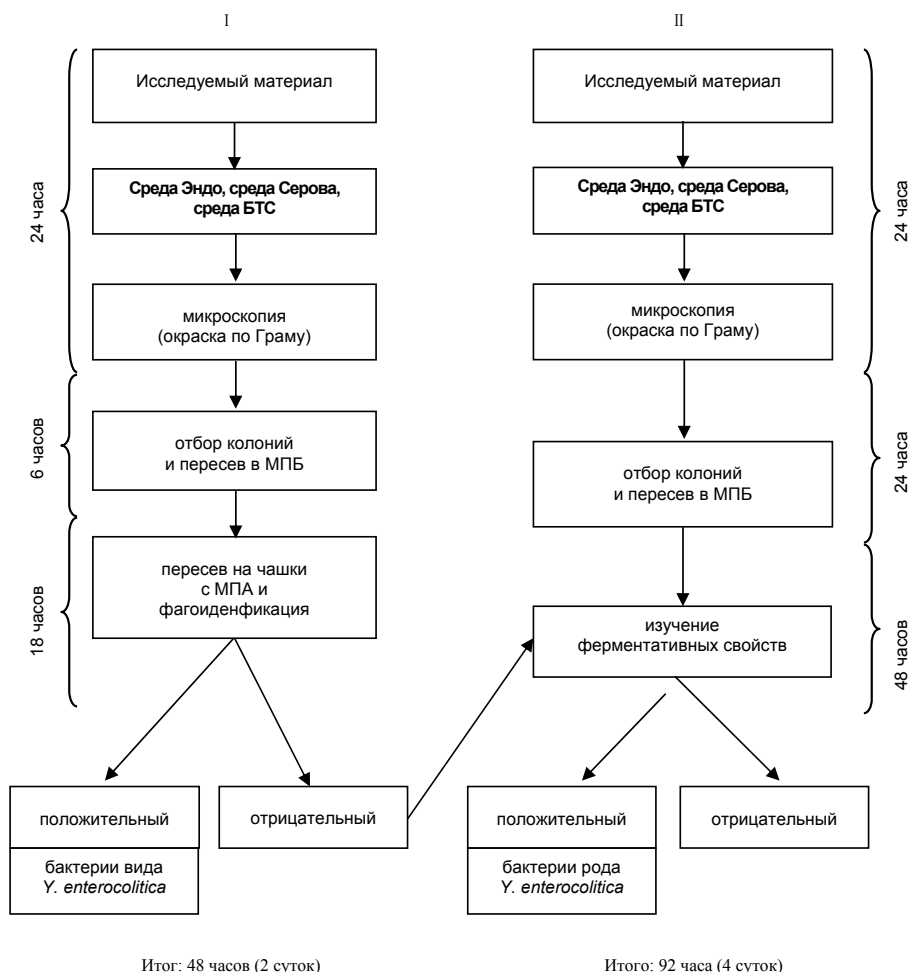


Рис. 1. Схема ускоренной идентификации бактерий вида *Y. enterocolitica* с помощью селекционированных нами бактериофагов (I) в сравнении со схемой бактериологического исследования, изложенной в "Методических указаниях по бактериологической диагностике смешанной кишечной инфекции молодняка животных, вызываемой патогенными энтеробактериями (II)

резистентных микроорганизмов или без него, а также образование негативных колоний фага. Отрицательным считали результат при отсутствии лизиса на газоне роста исследуемой культуры микроорганизмов и отсутствии лизиса в контроле. В результате проведенных исследований из проб сточных вод были выделены штаммы кишечных иерсиний, о чем свидетельствовали результаты изучения их биологических свойств. Предлагаемая нами схема позволяет идентифицировать *Y. enterocolitica* за 48 часов (2 суток). Срок бактериологического исследования по схеме изложенной в «Методических указаниях по бактериологической диагностике смешанной кишечной инфекции молодняка животных, вызываемой патогенными энтеробактериями» составил 92 часа (4 суток) при большей затрате посуды и реактивов.

Определение параметров постановки РНФ и разработку количественного показателя реакции, имеющего диагностическое значение, проводили по методике, предложенной В.Д.Тимаковым и Д.М.Голтдфарбом (1962). Проведены эксперименты с использованием МПБ, контаминированного 18 часовыми индикаторными культурами *Y. enterocolitica* О9 от 10^1 до 10^5 м.к./мл, и с бактериофагом Y/9 УГСХА в рабочем разведении, содержащем не более 104 фаговых корпускул в миллилитре. В качестве контроля использован интактный МПБ. Учет результатов проводили через 12-16 часов инкубирования. С этой целью подсчитывали число негативных колоний фага, образовавшихся на плотной питательной среде в опытной пробе и в контроле (контроль титра фага). Оценку РНФ проводили согласно таблицы 1. В случае наличия в исследуемом материале свободного фага число корпускул фага на чашке подсчитывали и вычитали из числа корпускул индикаторного фага в опытных чашках. Разницу сравнивали с контролем. При высоком титре свободного фага (сплошной лизис индикаторной культуры) реакция не учитывалась. РНФ, оцененная как сомнительная, не имела диагностического значения. По результатам проведенных опытов установлено, что количество

Табл. 1. 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

фаговых частиц более чем в 5 раз превышает количество фаговых частиц в контрольных пробах, при контаминации МПБ бактериями вида *Y. enterocolitica* в концентрации 10^3 м.к/мл для фага Y/9 УГСХА.

Для решения указанной задачи необходимо было провести эксперименты на тест- объекте по выявлению наиболее эффективно-го временного показателя взаимодействия фага и индикаторной культуры при сохранении остальных параметров (температурный режим, концентрация бактериальной культуры и фаговых корпускул в 1 мл) постановки РНФ. В качестве тест объектов использовали сточную воду, комбикорм, мясо, фекалии, контаминированные бактериями вида *Y. enterocolitica*, оптимальное время экспозиции выбирали из шести следующих параметров. Оптимальное время экспозиции выбирали из шести следующих параметров:

- в предварительном подращивании исследуемого материала в течение 5, 16, 24 часов при температуре 37 °С, после добавления фагов смесь выдерживали в течение 5 часов при температуре 37 °С;

- в увеличении времени контакта исследуемого материала с фагом до 10, 16 и 24 часов при температуре 37 °С.

- в предварительном подращивании исследуемого материала в течение 5, 10, 16, 24 часов при температуре 37 °С, после добавления фагов смесь выдерживали в течение 7 часов при температуре 37 °С;

- в увеличении времени контакта исследуемого материала с фагом до 10, 16 и 24 часов при температуре 37 °С.

Помещали в термостат на 12-16 часов. Изучение чувствительности РНФ в зависимости от времени подращивания исследуемого материала нами проводилось при инкубации контаминированных бактериями вида *Y. enterocolitica* МПБ при температуре 37 °С в течение 5, 10, 16 и 24 часов. Бактериологическим методом обнаруживались бактерии вида *Y. enterocolitica* в концентрации 10^4 м.к/мл, при этом затрачивалось 96 часов. Результаты этих исследований приведены в таблицах 2, 3.

Установлено, что результаты исследования при подращивании зависят от вида исследуемого материала:

- при исследовании проб сточных вод и комбикорма: в течение 7-и часов фаг Y/9 УГСХА позволяет обнаружить *Y. enterocolitica*

с помощью РНФ в концентрации 10^3 м.к./мл в исследуемых образцах (на опыт затрачено 24 часа);

- при исследовании проб фекалий и мяса в течение 16 часов фаг Y/9 УГСХА с помощью РНФ позволяет обнаружить бактерии вида *Y. enterocolitica*, при содержании 10^3 м.к./мл (на опыт затрачено 35 часов).

- бактериологическим методом это же количество кишечных иерсиний обнаружить не удавалось.

Во втором варианте опыта объекты исследования (сточные воды, комбикорм, мясо, фекалии), контаминированные бактериями рода *Y. enterocolitica* от 10^1 до 1×10^5 м.к./мл не подращивали, а сразу же вносили в пробирки. Результаты исследования приведены в таблицах 4, 5.

Установлено, что результаты исследования при инкубировании исследуемого материала с бактериофагом без подращивания варьируют в зависимости от вида исследуемого материала:

- при исследовании проб сточных вод и комбикорма: в течение 7-и часов фаг Y/9 УГСХА позволяет обнаружить *Y. enterocolitica* с помощью РНФ в концентрации 10^3 м.к./мл в исследуемых образцах (на опыт затрачено 19 часов);

- при исследовании проб фекалий и мяса в течение 16 часов фаг Y/9 УГСХА с помощью РНФ позволяет обнаружить бактерии вида *Y. enterocolitica*, при содержании 10^3 м.к./мл (на опыт затрачено 35 часов).

- бактериологическим методом это же количество кишечных иерсиний обнаружить не удавалось.

На основании полученных данных, считаем, что наиболее эффективными являются режимы РНФ для проб воды и комбикорма 7 часовой, а для проб фекалий и мяса в течение 16 часов, экспозиции исследуемого материала с фагом, когда удастся провести индикацию бактерий в количестве 10^3 в миллилитре исследуемого субстрата, на исследование которого затрачивается – 19 и 35 часов соответственно, поэтому данные режимы используем в дальнейших исследованиях. По результатам исследования метод подращивания по чувствительности не уступает методу экспозиции исследуемого материала с фагом в течение 10, 16, 24 часов, но недостаток в том, что при этом затрачивается больше времени.

Табл. 2. Чувствительность РНФ в зависимости от времени подращивания исследуемого материала (вода, комбикорм), контаминированного *Y. enterocolitica* (Y/9 УГСХА).

№ п.п.	Варианты исследований	Минимальное количество бактерий, обнаруживаемое с помощью		Время, затраченное на проведение исследований (в часах)	
	Длительность подращивания исследуемого материала	РНФ	бактериологический метод	РНФ	бактериологический метод
	Часы				
1.	5	10 ³	10 ⁴	24	96
2.	10	10 ²	н.о.	27	н.о.
3.	16	10 ²	н.о.	35	н.о.
4.	24	10 ²	н.о.	42	н.о.

Примечание: н.о. – не обнаружено.

Табл. 3. Чувствительность РНФ в зависимости от времени подращивания исследуемого материала (фекалии, мясо), контаминированного *Y. enterocolitica* (Y/9 УГСХА).

№ п.п.	Варианты исследований	Минимальное количество бактерий, обнаруживаемое с помощью		Время, затраченное на проведение исследований (в часах)	
	Длительность подращивания исследуемого материала	РНФ	бактериологический метод	РНФ	бактериологический метод
	Часы				
1.	5	10 ⁵	10 ⁴	24	96
2.	10	10 ⁴	н.о.	29	н.о.
3.	16	10 ³	н.о.	35	н.о.
4.	24	10 ²	н.о.	44	н.о.

Примечание: н.о. – не обнаружено.

Табл. 4. Чувствительность РНФ в зависимости от времени инкубирования исследуемого материала (сточная вода, комбикорм), контаминированного *Y. enterocolitica* (Y/9 УГСХА)

№ п.п.	Варианты исследований	Минимальное количество бактерий, обнаруживаемое с помощью		Время, затраченное на проведение исследований (в часах)	
	Длительность подращивания исследуемого материала	РНФ	бактериологический метод	РНФ	бактериологический метод
	Часы				
1.	7	10 ³	10 ⁴	19	96
2.	10	10 ²	н.о.	22	н.о.
2.	16	10 ²	н.о.	28	н.о.
3.	24	10 ²	н.о.	36	н.о.

Примечание: н.о. – не обнаружено.

Табл. 5. Чувствительность РНФ в зависимости от времени инкубирования исследуемого материала (фекалии, мясо) *Y. enterocolitica* (Y/9 УГСХА)

№ п.п.	Варианты исследований	Минимальное количество бактерий, обнаруживаемое с помощью		Время, затраченное на проведение исследований (в часах)	
	Длительность инкубирования исследуемого материала	РНФ	бактериологический метод	РНФ	бактериологический метод
	Часы				
1.	7	10 ⁵	10 ⁴	19	96
2.	10	10 ⁴	н.о.	22	н.о.
2.	16	10 ³	н.о.	28	н.о.
3.	24	10 ²	н.о.	36	н.о.

Примечание: н.о. – не обнаружено.

В последние годы исследователи уделяют большое внимание проблеме обнаружения патогенных микроорганизмов в объектах внешней среды: в воде, кормах и фекалиях. Эти субстраты, подвергающиеся постоянному загрязнению выделениями больных животных и людей, в эпизоотологическом и эпидемиологическом отношении заслуживают особого внимания. Поэтому разработка и внедрение в практику более простых и надежных методов обнаружения данного возбудителя в объектах внешней среды не теряют своей актуальности.

Для определения возможности использования РНФ для обнаружения бактерий вида *Y. enterocolitica* в объектах внешней среды исследовали образцы воды, комбикорма и фекалий.

Для определения возможности использования РНФ для обнаружения бактерий вида *Y. enterocolitica* в объектах внешней среды исследовали образцы сточных вод, комбикорма и фекалий.

Пробы сточных вод в объеме 10 мл вносили в колбы и контаминировали *Y. enterocolitica* серовариантом О9 168-033 в концентрации 10^5 ; 10^4 ; 10^3 ; 10^2 ; 10^1 м.к./мл, заливали МПБ из расчета 10 мл бульона на 1 мл сточной воды. Брали колбу с пробой воды, не контаминированной бактериями вида *Y. enterocolitica*. Реакцию нарастания титра фага проводили по методике В.Д. Тимакова и Д.М. Гольдфарба (1962), В.Я. Ганюшкина (1988). Учет результатов проводили согласно показателям таблицы 1. По результатам проведенных опытов установлено, что увеличение титра фага более чем в 5 раз произошло уже при концентрации 10^3 микробных клеток *Y. enterocolitica* в 1 мл водопроводной воды для фагов Y/9 УГСХА (на опыт затрачено 24 часа).

Пробы комбикорма, весом 5-10 г вносили в стерильные колбы объемом 100 мл, заливали стерильным МПБ из расчета 10 мл бульона на 1 г. В опытные колбы вносили индикаторную культуру *Y. enterocolitica* серовариант О9 168-033 в концентрации 10^5 ; 10^4 ; 10^3 ; 10^2 ; 10^1 м.к. в 1 мл и брали колбы с пробой комбикорма не контаминированных бактериями вида *Y. enterocolitica*. Реакцию нарастания титра фага проводили по методике предложенной В.Д. Тимаквым и Д.М. Гольдфарбом (1962), В.Я. Ганюшкиным (1988). Учет результатов проводили согласно таблицы 1. Из результатов проведенных опытов видно, что увеличение титра фагов Y/9 УГСХА более чем в 5 раз произошло уже при концен-

трации 10^3 микробных клеток *Y. enterocolitica* в 1 г комбикорма. Таким образом, в комбикорме, контаминированном бактериями вида *Y. enterocolitica*, с помощью РНФ данные бактерии обнаруживаются в количестве 10^3 м.к./г без выделения чистой культуры, при наличии посторонней микрофлоры. На обнаружение возбудителя – бактерий вида *Y. enterocolitica*, в комбикорме с помощью РНФ затрачивается не более 24 часов.

Пробы фекалий весом 5-10 г вносили в стерильные колбы объемом 100 мл, заливали стерильным МПБ из расчета 10 мл бульона на 1 г. В опытные колбы вносили индикаторную культуру *Y. enterocoliticaserovариант* О9 168-033 в концентрации 10^5 ; 10^4 ; 10^3 ; 10^2 ; 10^1 м.к./мл и колбы с пробой фекалий, не контаминированных бактериями вида *Y. enterocolitica*. Реакцию нарастания титра фага проводили по методике предложенной В.Д. Тимаковым и Д.М. Гольдфарбом (1962), В.Я. Ганюшкиным (1988). Учет результатов проводили согласно вышеизложенной схемы в таблице 1. Из результатов проведенных опытов видно, что увеличение титра фагов Y/9 УГСХА более чем в 5 раза произошло при концентрации 10^4 микробных клеток *Y. enterocolitica* в 1 г фекалий (на опыт затрачено 35 часов).

Кусочки свинины массой 5-10 г растирали в стерильной фарфоровой ступке и вносили в колбы объемом 100 мл, заливали стерильным МПБ из расчета 10 мл бульона на 1 г. В опытные колбы вносили индикаторную *Y. enterocoliticaserovариант* О9 168-033 в концентрации 10^5 ; 10^4 ; 10^3 ; 10^2 ; 10^1 м.к./мл и брали колбы с пробой мяса, не контаминированного бактериями вида *Y. enterocolitica*. Реакцию нарастания титра фага проводили по методике предложенной В.Д. Тимаковым и Д.М. Гольдфарбом (1962), В.Я. Ганюшкиным (1988). Учет результатов проводили согласно таблицы 1. Из результатов проведенных опытов видно, что увеличение титра фага Y/9 УГСХА более чем в 5 раза произошло уже при концентрации 10^3 микробных клеток бактерий в 1 г мяса (на опыт затрачено 35 часов).

Для оценки эффективности реакции нарастания титра фага в условиях производства, нами были проведены исследования сточных вод хозяйств Самарской области, по выделению бактерий вида *Y. enterocolitica*, бактериологическим методом и с помощью реакции нарастания титра фага. Результаты исследований отражены в таблице 6, видно, что в результате проведенных ис-

Табл. 6. Чувствительность РНФ в зависимости от времени инкубирования исследуемого материала (фекалии, мясо) *Y. enterocolitica* (Y/9 УГСХА)

Исследовано проб	Количество проб, в которых обнаружены <i>Y. enterocolitica</i>					
	Бактериологический метод				РНФ	
	Без холодого обогащения		Методом холодого обогащения			
	Кол-во	%	Кол-во	%	Кол-во	%
40	3	17,5	12	30	24	60

следований сорока проб сточных вод из четырех хозяйств удалось выделить бактерии вида *Y. enterocolitica*: без холодого обогащения из 3 проб (17,5 %), на исследование затрачивалось 96 часов; методом холодого обогащения из 12 проб (30%), на исследование затрачено 16 суток. При исследовании материала в РНФ с использованием иерсиниозного фага Y/9 УГСХА положительная реакция была в 24 (60 %) пробах сточных вод. Время индикации при этом составило 24-35 часов.

В результате проведенных исследований выделены и селекционированы специфичные бактериофаги, активные в отношении бактерий вида *Y. enterocolitica*. Выделенный и изученный штамм бактериофага депонирован в лаборатории бактериальных инфекций ВГНКИ, признан перспективным и рекомендован для изготовления диагностических препаратов. Разработана “Временная инструкция по изготовлению и контролю лабораторной серии индикаторного бактериофага *Y. enterocolitica* Y/9 УГСХА”. Для врачей бактериологов предложены “Методические рекомендации по ускоренной индикации методом реакции нарастания титра фага (РНФ) бактерий вида *Y. enterocolitica* в патологическом материале, пищевых продуктах, кормах и объектах внешней среды” и “Методические рекомендации по выделению и фагоидентификации бактерий вида *Y. enterocolitica* из патологического материала, кормов, пищевых продуктов и объектов внешней среды с применением диагностического бактериофага Y/9 УГСХА, которые были одобрены Ученым советом УГСХА и утверждены ректором академии.

Предложен штамм бактериофага Y/9 УГСХА, активный в отношении бактерий вида *Y. enterocolitica*, обладающий строгой специфичностью, широким спектром литической активности. Фаг депонирован в ВГНКИ ветеринарных препаратов (справка о депонировании фага Y/9 УГСХА – Phagum *Yersinia enterocolitica* Y/9 УГСХА ДЕП от 23.04.04г.)

2.4. ВЫДЕЛЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ ОСНОВНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БАКТЕРИОФАГОВ БАКТЕРИЙ ВИДА *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS*

GHURAVSKAYA N.P. ISOLATION AND STUDY OF THE MAIN QUALITIES OF
YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS SP. PHAGES

Инфекция, вызываемая *Yersinia pseudotuberculosis*, привлекает к себе внимание исследователей в связи с ростом заболеваемости и все более широким ее распространением (Г.П. Сомов, 1990; Г.В. Ющенко, 2000; Н. Fukushima, 2001; В.Ф. Учайкин, 2008).

Несмотря на достигнутые успехи в изучении многих аспектов иерсиниозов, актуальность этой проблемы сохраняется. Стабильные показатели заболеваемости по РФ псевдотуберкулезом (данные официальной статистики) – 7,1 на 100 тыс. населения – в последние 5 лет не отражают истинного распространения инфекций (Г.Я. Ценева, 2006). Анализ изученных факторов патогенности подтверждает абсолютную патогенность бактерий вида *Y. pseudotuberculosis* для людей и животных (Г.Я. Ценева, 1984; Ю.Е. Полоцкий, 1987; Н.Ф. Тимченко, 1997; Н.Д. Ющук, 2003).

О выделении штаммов *Y. pseudotuberculosis* из отдельных регионов при эпидемических вспышках, групповых заболеваниях или спорадических случаях людей и животных сообщается в работах М. Tsubokura et al. (1989); Г.Г. Головиной (2000); С.Н. Бениовой (2000); М.В. Чесноковой (2003); К. Jalava et al. (2004); S. Kangas et al. (2008) и др.

В последние годы выражена тенденция к активному изучению и применению в лабораторно-диагностической практике фагов бактерий различных родов и видов (В.Я. Ганюшкин, 1988; С.Н. Золотухин, 1994; Н.Е. Гаевская, 2004; Л.Д. Македонова, 2006; Т.А. Кудрякова, 2010). Бактериофаги применяются для идентификации и фаготипирования бактерий, а также ускоренной индикации возбудителей бактериальных инфекций в различных субстратах. Все большую актуальность приобретают фаготерапия и фагопрофилактика инфекционных болезней как альтернатива использованию антибиотиков.

Многообразие клинических форм псевдотуберкулезной инфекции, высокая стоимость современных лабораторных методов, отсутствие квалифицированных кадров зачастую затрудняют постановку диагноза в рядовых лабораториях, в связи с чем поиск и разработка методов своевременной индикации возбудителя, вызывающего заболевание, являются актуальной задачей.

Цель – разработка технологических параметров изготовления и применения биопрепарата «УР – 09 УГСХА» на основе выделенных специфических фагов для индикации и идентификации бактерий вида *Y. pseudotuberculosis*.

В работе использовали 96 штаммов бактерий: 5 референс-штаммов бактерий вида *Y. pseudotuberculosis*, полученные из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы Ульяновской ГСХА, а также 19 штаммов, выделенных нами из патологического материала, фекалий больных животных, объектов внешней среды; 72 штамма бактерий других родов и видов, полученные из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы (*Y. enterocolitica* – 17, *Staphylococcus* – 3, *Escherichia* – 5, *Proteus* – 5, *Citrobacter* – 5, *Klebsiella* – 5, *Enterococcus* – 5, *Providencia* – 5, *Aeromonas* – 5, *Pseudomonas* – 5, *Salmonella* – 3, *Serratia* – 2, *Bacillus* – 5, *Shigella* – 2).

Объектами исследования являлись 7 штаммов фагов бактерий вида *Y. pseudotuberculosis*, выделенные нами из объектов внешней среды.

Выделение и идентификацию бактерий вида *Y. pseudotuberculosis* проводили в соответствии с «Методическими указаниями по бактериологической диагностике смешанной кишечной инфекции молодняка животных, вызываемой патогенными энтеробактериями», утвержденными Департаментом ветеринарии МСХ и П РФ (1999), «Методическими указаниями по лабораторной диагностике иерсиниоза животных и обнаружению возбудителя болезни в мясном сырье, молоке и растительных кормах», утвержденными МСХ РФ (2005), «Методическими рекомендациями по эпидемиологии, клинике, диагностике и терапии псевдотуберкулеза и иерсиниоза» (Ценева, 2005). При необходимости использовали дополнительные тесты, изложенные в определителе бактерий Берджи (1997).

Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов проводили с помощью методов, предложенных предложенным М. Адамсом (1961), Д.М. Гольдфарбом (1961), С. Лурья, Д. Дарнелл (1970), И.П. Ревенко (1978), И.М. Габриловичем (1992), С.Н. Золотухиным (2006). Постановку РНФ для индикации бактерий вида *Y. pseudotuberculosis* в объектах внешней среды проводили по методикам, предложенным В.Д. Тимаковым, Д.М. Гольдфарбом (1961), В.Я. Ганюшкиным (1988).

Статистическую обработку результатов исследований проводили общепринятыми методами (Ашмарин, 1962; Бейли, 1970) с использованием программ Statistica – 6.0, Microsoft Excel 2007.

Необходимым этапом наших исследований являлось выделение бактериофагов *Y. pseudotuberculosis* из объектов внешней среды. В качестве материалов исследования использовали сточные воды и фекалии животных свиноводческих и молочно-товарных ферм, частных хозяйств Ульяновской и Самарской областей, всего исследовано 52 пробы.

Исследуемый материал фильтровали через бумажный фильтр для освобождения от механических примесей. В колбу с 200 мл мясопептонного бульона вносили 50 мл исследуемого фильтрата сточных вод и по 1,0 мл 18-часовых культур бактерий *Y. pseudotuberculosis*. Содержимое колбы инкубировали в термостате при температуре 37 °С. Через 24 – 48 часов исследуемый материал из колбы переносили в стерильную пробирку, обрабатывали хлороформом (1:10), а также центрифугировали при 700 g в течение 30 минут с целью инактивации и удаления бактериальной массы. В качестве контроля на чашки засекали индикаторные штаммы бактерий вида *Y. pseudotuberculosis* методом агаровых слоев с 1 мл стерильного мясопептонного бульона.

Обработанный фильтрат исследовали методом агаровых слоев на присутствие псевдотуберкулезных бактериофагов. Наличие прозрачных негативных колоний или зон лизиса на газоне роста культуры указывало на присутствие бактериофага в исследуемом фильтрате.

Выделение чистых линий фага проводили путем последовательных пассажей морфологически однотипных негативных колоний. Селекцию бактериофагов и повышение их литической

активности проводили методом пассирования фага на индикаторной культуре *Y. pseudotuberculosis*.

В результате исследований выделено 7 изолятов бактериофагов *Y. pseudotuberculosis* (табл. 1).

Характеристика биологических свойств выделенных бактериофагов

Морфология негативных колоний

Морфологию негативных колоний бактериофагов определяли на плотной питательной среде при посеве фагов методом Грация (1936). Выделенные штаммы бактериофагов формировали негативные колонии двух типов: четкие прозрачные колонии округлой формы, с ровными краями, диаметром от 1,5 до 2,5 мм; прозрачные колонии округлой формы, с ровными краями, диаметром от 3,0 до 8,5 мм, с зоной неполного лизиса, без вторичного роста культуры.

Литическая активность

Литическую активность выделенных бактериофагов определяли методами Аппельмана (метод серийных разведений в жидкой питательной среде) и Грация (метод агаровых слоев на плотной питательной среде).

Литическая активность исследуемых фагов составила от 10^{-8} до 10^{-10} по методу Аппельмана и от 5×10^7 до 1×10^9 по методу Грация. Все изоляты фагов обладали литической активностью, достаточной для использования их в качестве диагностических препаратов (табл. 2).

Спектр литической активности

Определение спектра литической активности проводили методом нанесения бактериофага на газон роста культуры бактерий вида *Y. pseudotuberculosis*. Установлено, что спектр литической активности фагов находился в пределах от 47,5 до 93,2 % из числа изучаемых штаммов. Максимальный совместный спектр литического действия (94 %) был обнаружен у двух штаммов бактериофагов – УР – 2 УГСХА и УР – 7 УГСХА (табл. 3).

Специфичность

Определение специфичности проводили методом нанесения бактериофага на газон роста бактериальных культур штаммов гетерологичных родов, видов. Установлено, что бактериофаги обладают выраженной специфичностью к бактериям вида *Y.*

Табл. 1. – Источники выделения фагов *Y. pseudotuberculosis*

Фаги	Индикаторный штамм <i>Y.ps.</i>	Источник	Место и год выделения
УР – 1 УГСХА	19 ВИЭВ	Сточные воды	Учебно-опытное хозяйство УГСХА, 2005
УР – 2 УГСХА	ВИЭВ III	Сточные воды	п. Тимирязевский, Ульяновский р-н, 2005
УР – 3 УГСХА	№19 ВИЭВ	Сточные воды	п. Октябрьский, Чердаклинский р-н, 2006
УР – 4 УГСХА	№19 ВИЭВ	Фекалии поросят	Самарская область, 2006
УР – 5 УГСХА	01№7	Сточные воды	Птицефабрика «Ульяновская», Чердаклинский р-н, 2007
УР – 6 УГСХА	РЯ3	Фекалии поросят	Ставропольский район, Самарская область, 2006
УР – 7 УГСХА	0630	Сточные воды	п. Тимирязевский, Ульяновский р-н, 2007

Табл. 2. – Литическая активность бактериофагов *Y. pseudotuberculosis*

Бактериофаги	Литическая активность	
	по методу Алпельмана (степень разведения)	по методу Грация (количество корпускул в 1 мл)
УР – 1 УГСХА	10^{-9}	1×10^8
УР – 2 УГСХА	10^{-9}	4×10^8
УР – 3 УГСХА	10^{-9}	1×10^8
УР – 4 УГСХА	10^{-8}	5×10^7
УР – 5 УГСХА	10^{-8}	3×10^8
УР – 6 УГСХА	10^{-8}	2×10^8
УР – 7 УГСХА	10^{-10}	1×10^9

Табл. 3. – Спектр литической активности и специфичность бактериофагов *Y. pseudotuberculosis*.

Род (вид) бактерий	Количество штаммов	Бактериофаги серии УГСХА						
		УР-1	УР-2	УР-3	УР-4	УР-5	УР-6	УР-7
		Процент лизируемых культур						
<i>Y.pseudotuberculosis</i>	24	47,5	83,3	54,2	58,6	63,4	68,2	93,2
<i>Y.enterocolitica</i>	17	–	–	–	–	–	–	–
<i>Staphylococcus</i>	3	–	–	–	–	–	–	–
<i>Serratia</i>	2	–	–	–	–	–	–	–
<i>Escherichia</i>	5	–	–	–	–	–	–	–
<i>Proteus</i>	5	–	–	–	–	–	–	–
<i>Salmonella</i>	3	–	–	–	–	–	–	–
<i>Citrobacter</i>	5	–	–	–	–	–	–	–
<i>Shigella</i>	2	–	–	–	–	–	–	–
<i>Klebsiella</i>	5	–	–	–	–	–	–	–
<i>Enterococcus</i>	5	–	–	–	–	–	–	–
<i>Providencia</i>	5	–	–	–	–	–	–	–
<i>Aeromonas</i>	5	–	–	–	–	–	–	–
<i>Pseudomonas</i>	5	–	–	–	–	–	–	–
<i>Bacillus</i>	5	–	–	–	–	–	–	–

* Примечание: «–» - отсутствие лизиса

pseudotuberculosis и проявляют себя неактивными по отношению к бактериям других родов, видов (табл. 3).

Температурная устойчивость

В результате изучения воздействия температурного фактора на бактериофаги *Y. pseudotuberculosis* установлено, что все изо-

ляты выделенных фагов проявляют чувствительность к воздействию высокой температуры, т.е. являются термолабильными: температура в пределах 58 – 64 °С снижает литическую активность испытуемых фагов с 10^8 до 10^1 активных корпускул фага в 1мл фаголизата, температура выше 66 °С полностью их инактивирует (табл. 4). Обработка полученных данных методом дисперсионного анализа показала, что степень влияния температурного фактора на литическую активность фагов составляет от 41, 04 % до 95, 66 % при коэффициенте достоверности Фишера 2, 78 – 58, 78. Опыты с прогреванием индикаторных бактериальных культур *Y. pseudotuberculosis* при температуре 58 – 66 °С показали аналогичные результаты.

Чувствительность бактериофагов к воздействию хлороформа

При изучении устойчивости фагов *Y. pseudotuberculosis* к воздействию хлороформа установлено, что обработка хлороформом в течение 60 минут не оказывает существенного влияния на активность фагов (табл. 5). Дисперсионный анализ полученных данных показал, что степень влияния хлороформа составляет от 14, 29 до 26, 91 % при недостоверном влиянии факториальной

Табл. 4. – Температурная устойчивость бактериофагов *Y. pseudotuberculosis**.

Фаги	Титр фагов после обработки температурой, количество активных корпускул в 1 мл					Контроль активности фагов
	58 °С	60 °С	62 °С	64 °С	66 °С	
УР – 1	$1,5 \times 10^5 \pm 0,3 \times 10^5$	$3,0 \times 10^3 \pm 1,0 \times 10^3$	$1,3 \times 10^1 \pm 0,3 \times 10^1$	–	–	$1,3 \times 10^5 \pm 0,3 \times 10^5$
УР – 2	$3,0 \times 10^3 \pm 1,1 \times 10^4$	$2,7 \times 10^3 \pm 1,6 \times 10^4$	$6,3 \times 10^2 \pm 1,3 \times 10^2$	$4,7 \times 10^1 \pm 0,8 \times 10^1$	$3,0 \times 10^1 \pm 1,1 \times 10^1$	$4,6 \times 10^5 \pm 1,2 \times 10^5$
УР – 3	$3,3 \times 10^3 \pm 1,8 \times 10^4$	$2,3 \times 10^3 \pm 0,8 \times 10^3$	–	–	–	$1,6 \times 10^5 \pm 0,6 \times 10^5$
УР – 4	$6,0 \times 10^3 \pm 2,0 \times 10^{20}$	$3,0 \times 10^4 \pm 0,5 \times 10^{20}$	$3,1 \times 10^2 \pm 1,0 \times 10^{20}$	–	–	$8,0 \times 10^1 \pm 1,1 \times 10^1$
УР – 5	$8,7 \times 10^4 \pm 0,8 \times 10^4$	$11,7 \times 10^4 \pm 0,8 \times 10^4$	$2,3 \times 10^4 \pm 0,6 \times 10^4$	$5,0 \times 10^1 \pm 1,1 \times 10^1$	–	$1,3 \times 10^5 \pm 0,3 \times 10^5$
УР – 6	$3,7 \times 10^5 \pm 1,2 \times 10^5$	$4,7 \times 10^5 \pm 0,8 \times 10^5$	$9,0 \times 10^5 \pm 2,6 \times 10^5$	$7,0 \times 10^2 \pm 1,5 \times 10^{20}$	–	$5,0 \times 10^1 \pm 0,5 \times 10^1$
УР – 7	$7,0 \times 10^4 \pm 1,0 \times 10^4$	$1,3 \times 10^3 \pm 0,3 \times 10^3$	$1,4 \times 10^2 \pm 0,2 \times 10^2$	$2,7 \times 10^1 \pm 0,8 \times 10^1$		$2,6 \times 10^5 \pm 1,2 \times 10^5$

Табл. 5. – Температурная устойчивость бактериофагов *Y. pseudotuberculosis**.

Фаги	Титр бактериофагов после обработки хлороформом, количество активных корпускул в 1 мл				Контроль активности фагов
	15 мин	30 мин	45 мин	60 мин	
УР – 1	$2,0 \times 10^5 \pm 1,0 \times 10^5$	$2,3 \times 10^5 \pm 1,3 \times 10^5$	$1,3 \times 10^5 \pm 0,3 \times 10^5$	$9,0 \times 10^1 \pm 1,0 \times 10^1$	$1,3 \times 10^5 \pm 0,3 \times 10^5$
УР – 2	$1,2 \times 10^5 \pm 0,3 \times 10^5$	$2,3 \times 10^5 \pm 1,3 \times 10^5$	$1,6 \times 10^5 \pm 0,7 \times 10^5$	$7,7 \times 10^5 \pm 2,3 \times 10^5$	$1,3 \times 10^5 \pm 0,3 \times 10^5$
УР – 3	$1,6 \times 10^5 \pm 0,6 \times 10^5$	$2,0 \times 10^5 \pm 0,5 \times 10^5$	$2,3 \times 10^5 \pm 0,8 \times 10^5$	$1,3 \times 10^5 \pm 0,3 \times 10^5$	$4,0 \times 10^5 \pm 3,0 \times 10^5$
УР – 4	$4,3 \times 10^5 \pm 1,2 \times 10^5$	$6,0 \times 10^5 \pm 2,6 \times 10^5$	$2,9 \times 10^5 \pm 1,2 \times 10^5$	$4,0 \times 10^5 \pm 0,5 \times 10^5$	$1,3 \times 10^5 \pm 0,3 \times 10^5$
УР – 5	$5,0 \times 10^5 \pm 1,5 \times 10^5$	$2,3 \times 10^5 \pm 0,3 \times 10^5$	$3,3 \times 10^5 \pm 1,2 \times 10^5$	$3,2 \times 10^5 \pm 1,0 \times 10^5$	$6,0 \times 10^5 \pm 1,5 \times 10^5$
УР – 6	$1,3 \times 10^5 \pm 0,3 \times 10^5$	$6,3 \times 10^1 \pm 2,0 \times 10^1$	$4,0 \times 10^1 \pm 1,0 \times 10^1$	$2,7 \times 10^1 \pm 1,2 \times 10^1$	$5,7 \times 10^1 \pm 0,8 \times 10^1$
УР – 7	$4,0 \times 10^5 \pm 3,0 \times 10^5$	$5,0 \times 10^5 \pm 0,5 \times 10^5$	$4,0 \times 10^5 \pm 3,0 \times 10^5$	$1,5 \times 10^5 \pm 0,7 \times 10^5$	$2,7 \times 10^5 \pm 0,3 \times 10^5$

* Примечание: *P < 0,05; **P < 0,01

дисперсии на активность фагов. Воздействие хлороформом на индикаторные бактериальные культуры *Y. pseudotuberculosis* в течение 15 минут вызывает полную инактивацию исследуемых штаммов. Полученные данные позволяют использовать хлороформ в качестве средства для освобождения фаголизата от жизнеспособных бактерий.

На основании изученных биологических свойств выделенных бактериофагов были отобраны два изолята псевдотуберкулезных фагов УР – 2 УГСХА и УР – 7 УГСХА с целью конструирования диагностического биопрепарата. Фаги обладали литической активностью не ниже 108 и строгой специфичностью, совместный спектр литического действия данных фагов составил 94 %.

Определены оптимальные технологические параметры для изготовления диагностического препарата с высокой литической активностью: соотношение концентрации фаговых корпускул и бактериальных клеток индикаторного штамма бактерий вида *Y. pseudotuberculosis* составляет 1:2, время инкубации при температуре 37 °С – 6 часов.

С учетом строгой родовой специфичности селекционированных бактериофагов УР – 2 УГСХА и УР – 7 УГСХА в отношении бактерий вида *Y. pseudotuberculosis*, была разработана схема выделения и ускоренной идентификации вышеуказанных микроорганизмов (рис. 1). В исследованиях использовали воду, комбикорм, пищевое сырье, контаминированные бактериями вида *Y. pseudotuberculosis* в концентрации 10^5 – 10^1 м.к. в 1 мл.

Посев исследуемого материала производили на среды Эндо, Серова и СБТС. Посевы инкубировали в термостате 18 – 20 часов при температуре 37 °С. Бульонные культуры, полученные после пересева колоний, подвергали микроскопии (окраска по Граму). При наличии в мазках мелких грамотрицательных палочек проводили идентификацию выделенных культур бактериологическим методом и фагоидентификацию методом нанесения бактериофага на газон роста изучаемой культуры. Наличие зоны лизиса на сплошном газоне роста культуры в месте нанесения фагов указывало на принадлежность исследуемого штамма к виду *Y. pseudotuberculosis*. Результаты фагоидентификации выделенных штаммов как бактерий вида *Y. pseudotuberculosis* подтверждены данными исследований биохимических свойств.

Экспериментальные данные подтверждают возможность идентификации бактерий вида *Y. pseudotuberculosis* с помощью фагов УР – 2 УГСХА и УР – 7 УГСХА, срок исследования по сравнению с бактериологическим методом при этом сокращается с 4 до 2 суток при меньшем расходе питательных сред, реактивов, лабораторной посуды.

Разработка оптимальных условий постановки РНФ

Определение количественного показателя РНФ

Для определения уровня нарастания титра, при котором РНФ можно считать положительной, были проведены эксперименты по обнаружению культур *Y. pseudotuberculosis* в разных заражающих концентрациях (от 10^5 до 10^1 м.к./мл) в мясопептонном бульоне. Установлено, что результат реакции является положительным (увеличение количества корпускул фагов УР – 2 УГСХА и УР – 7 УГСХА более чем в 5 раз) в пробах при контаминации мясопептонного бульона бактериями *Y. pseudotuberculosis* в концентрации 103 м.к./мл.

Определение оптимального времени постановки РНФ

Разработка оптимальных условий постановки РНФ включает определение времени наиболее полноценного взаимодействия фага с бактериями. Оптимальное время экспозиции выбирали из следующих параметров:

- предварительное подращивание исследуемого материала в течение 5, 16 и 24 часов при температуре 37 °С, после добавления фагов смесь выдерживали в течение 5 часов при температуре 37 °С;
- увеличение времени контакта исследуемого материала с фагом до 7, 10, 16, 24 часов при температуре 37 °С.

В результате исследований установлено, что метод РНФ с предварительным подращиванием исследуемого материала в течение 5 часов позволяет обнаружить бактерии *Y. pseudotuberculosis* в количестве 10^3 м.к./мл, время проведения исследований составляет 22 часа (табл. 6).

Увеличение времени подращивания исследуемого материала до 16 часов повышает чувствительность реакции до 101 м.к./мл с увеличением сроков исследования до 33 часов. Подращивание материала в течение 24 часов существенно не повлияло на результаты РНФ.

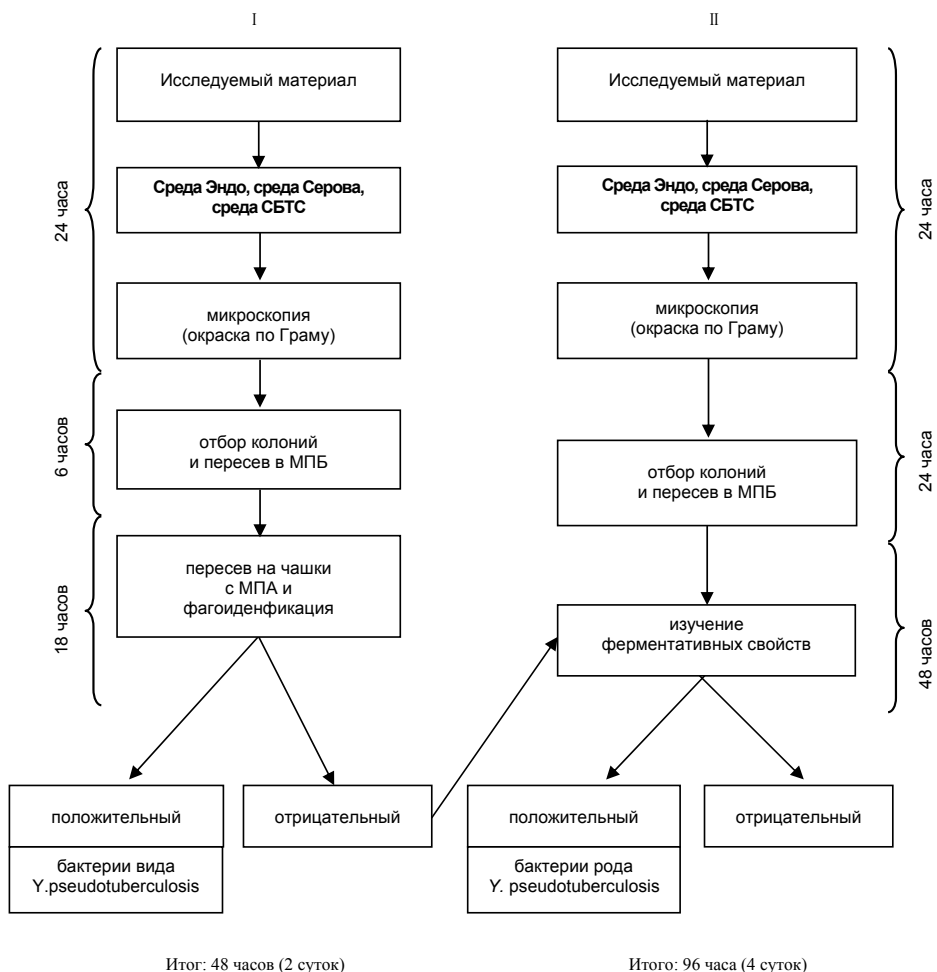


Рис. 1. Выделение бактерий вида *Y. pseudotuberculosis* и ускоренная идентификация с помощью бактериофагов (1) в сравнении с традиционной схемой бактериологического исследования (2)

Опыты по изучению чувствительности реакции в зависимости от времени контакта исследуемого материала с фагом показали, что РНФ с 7-часовой экспозицией материала с фагами УР – 2 УГ-СХА и УР – 7 УГСХА позволяет провести индикацию бактерий вида *Y. pseudotuberculosis* в концентрации 10^3 м.к./мл за 19 часов (табл. 7, 8).

Инкубация исследуемого материала с фагом в течение 16 часов повышает чувствительность РНФ до 10^2 – 10^1 м.к./мл, время исследований составляет 28 часов. 24-часовая экспозиция материала с фагами характеризуется одинаково высокой чувствительностью реакции (10^1 м.к./мл) с увеличением сроков исследования до 36 часов.

В результате проведенных исследований установлено, что РНФ с предварительным подрачиванием материала является одинаково чувствительной по сравнению с РНФ без подрачивания, но более продолжительной по времени. Таким образом, наиболее оптимальным является режим РНФ при инкубации исследуемого материала с фагом в течение 7 часов, поскольку позволяет обнаружить бактерии *Y. pseudotuberculosis* в количестве $10^3 - 10^2$ м.к./мл за 19 – 28 часов. Данный режим рекомендован для дальнейших исследований.

В настоящее время исследователи уделяют большое внимание разработке простых и надежных методов обнаружения патогенных микроорганизмов в объектах внешней среды. Для определения возможности использования РНФ для индикации бактерий вида *Y. pseudotuberculosis* в объектах внешней среды были проведены исследования различных проб воды, контаминированных *Y. pseudotuberculosis*.

Результаты исследований показали, что увеличение титра фагов УР – 2 УГСХА и УР – 7 УГСХА более чем в 5 раз произошло при концентрации бактерий вида *Y. pseudotuberculosis* в материале 10^3 м.к./мл при наличии посторонней микрофлоры.

Табл. 6. – Чувствительность РНФ в зависимости от времени подрачивания исследуемого материала с фагами УР – 2 УГСХА и УР – 7 УГСХА.

Время контакта, часов	Концентрация бактерий <i>Y. ps.</i> , обнаруживаемая методом РНФ	Время исследований, часов
5+5	10^3	22
16+5	10^1	33
24+5	10^1	41

Табл. 7. – Чувствительность РНФ в зависимости от времени контакта исследуемого материала с фагом УР – 2 УГСХА.

Время контакта, часов	Концентрация бактерий <i>Y. ps.</i> , обнаруживаемая методом РНФ	Время исследований, часов
7	10^3	19
10	10^3	22
16	10^1	28
24	10^1	36

Табл. 7. – Чувствительность РНФ в зависимости от времени контакта исследуемого материала с фагом УР – 7 УГСХА.

Время контакта, часов	Концентрация бактерий <i>Y. ps.</i> , обнаруживаемая методом РНФ	Время исследований, часов
7	10^3	19
10	10^3	22
16	10^2	28
24	10^1	36

По результатам исследования установлено преимущество РНФ перед бактериологическим методом исследования. С помощью РНФ можно обнаружить бактерии *Y. pseudotuberculosis* в концентрации 10^3 за 19 – 22 часа. Бактериологическим методом удавалось обнаружить искомые бактерии в минимальной концентрации 10^4 м.к./мл, при этом затрачивается не менее 96 часов.

Для возможности использования биопрепарата «УР – 09 УГСХА» на основе псевдотуберкулезных фагов необходимым условием было изучение эффекта их совместного действия. Установлено, что биопрепарат на основе фагов УР – 2 УГСХА и УР – 7 УГСХА по некоторым показателям (высокая литическая активность, широкий спектр литической активности, выраженная видовая специфичность, более высокий по сравнению с бактериями порог инактивации) соответствует отдельным монофагам. Антагонистический эффект при взаимодействии данных фагов отсутствует.

В результате проведенных исследований выделены и селекционированы специфичные псевдотуберкулезные бактериофаги, пригодные для изготовления диагностического биопрепарата с целью индикации и идентификации бактерий вида *Y. pseudotuberculosis* в объектах внешней среды. Разработана «Инструкция по изготовлению и контролю серии индикаторных псевдотуберкулезных бактериофагов УР – 2 УГСХА, УР – 7 УГСХА», предложены «Методические рекомендации по выделению и идентификации бактерий вида *Y. pseudotuberculosis* из патологического материала, пищевых продуктов, кормов и объектов внешней среды с использованием диагностических бактериофагов УР – 2 УГСХА, УР – 7 УГСХА» и «Методические рекомендации по ускоренной индикации методом реакции нарастания титра фага бактерий вида *Y. pseudotuberculosis* в патологическом материале, пищевых продуктах, кормах и объектах внешней среды», утвержденные ректором Ульяновской ГСХА (3 сентября, 2010).

Материалы диссертационных исследований используются при чтении лекций и проведении лабораторно-практических занятий по биотехнологии, вирусологии, микробиологии для студентов факультета ветеринарной медицины, биотехнологического факультета Ульяновской ГСХА, а также при выполнении научно-исследовательских работ на кафедре микробиологии, ви-

русологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы Ульяновской ГСХА.

Результаты изучения биологических свойств бактериофагов УР – 2 УГСХА, УР – 7 УГСХА и индикации бактерий вида *Y. pseudotuberculosis* в объектах внешней среды методом РНФ подтверждены актами комиссионных испытаний в Ульяновской ГСХА (11 – 12 февраля 2010 года).

ЗОЛОТУХИН Д.А.

2.5. БАКТЕРИОФАГИ *HAFNIA ALVEI*, БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

ZOLOTUKHIN D.A. ISOLATION AND STUDY OF THE MAIN QUALITIES OF *HAFNIA ALVEI* SP. PHAGES

Hafnia alvei – подвижная, факультативная анаэробная, грамотрицательная палочка семейства Enterobacteriaceae. Эти микроорганизмы обитают в различных объектах окружающей среды, особенно часто их можно обнаружить в почве и сточных водах, и, как полагалось ранее, они редко проявляют патогенные свойства. Однако в последние годы появились научные сообщения о способности гафний самостоятельно обострять и вызывать серьезные инфекции, такие как сепсис у радужной форели и у куриц-несушек, аборт у лошадей, пневмонию у коз и маститы у коров. Эти микроорганизмы были также изолированы из пищевых продуктов, включая коровье молоко, мед, сыр и рыба. У людей заболевания, вызываемые *H. alvei*, проявляются с признаками гастроэнтерита, сепсиса и инфекциями мочеполовой системы [3,4,6,7,9,12,13].

В большинстве случаев энтеробактерии *Hafnia alvei* вызывают заболевания у животных и людей с ослабленной иммунной системой, чаще всего в ассоциации с другими патогенными и условно-патогенными микроорганизмами. Однако, общеизвестно, что эти бактерии могут самостоятельно вызывать инфекционное заболевание пчёл (гафниоз, паратиф), характеризующееся поражением кишечника и интенсивным размножением возбудителя в гемолимфе пчёл, нанося большой экономический ущерб пчеловодческим хозяйствам из-за гибели пчел, потери их продуктив-

ности и затрат на мероприятия по ликвидации болезни [4,7,10]. Кроме того, инфицированный мед и перга могут служить фактором передачи возбудителя животным и человеку.

Успех борьбы с любым заболеванием зависит от своевременной диагностики. В настоящее время лабораторная диагностика гафниоза основана на выделении чистой культуры возбудителя и изучении его биологических свойств (тинкториально-морфологических, культуральных, ферментативных), длительность которых составляет не менее 4-6-ти суток с затратой большого количества питательных сред, реактивов и посуды [1,6].

Поэтому возникла необходимость в изыскании эффективных и недорогих средств с целью разработки ускоренных методов лабораторной диагностики этого заболевания. В медицинской и ветеринарной практике для этих целей предложены бактериофаги [2,5,6,8,9,11].

Основным средством уничтожения возбудителя гафниоза являются антибиотики, отрицательное воздействие которых на организм человека и животных (дисбактериоз, аллергические реакции, снижение иммунитета, селекция антибиотико-резистентных штаммов и др.) подтверждены многими научными исследованиями.

Исходя из вышеизложенных фактов, перед микробиологами и биотехнологами стоит задача изыскания экологически безопасных и эффективных средств борьбы с этим заболеванием. Таковыми препаратами также являются бактериофаги, которые давно зарекомендовали себя как экологически безопасные, безвредные для макроорганизма и эффективные лечебно-профилактические биопрепараты [2,5,11].

Отсутствие в арсенале предприятий биологической промышленности страны производственных штаммов фагов *Hafnia alvei*, необходимых для изготовления диагностических и лечебно-профилактических бактериофагов и послужило поводом для наших исследований.

Выделение и изучение биологических свойств фагов проводили по методам, предложенным Dulbeio, Vogt (1954), M. Adams (1961), Д.М. Гольдфарбом (1961), Адельсоном (1962), А.С. Тихоненко (1968), Т.Г. Чинашвили (1968), С. Лурия, Д. Дарнелом (1970), И.М. Габриловичем (1973), И.П. Ревенко (1978), D. Reaney,

Н.-W. Ackermann (1982), В.Я. Ганюшкиным (1988) С.В. Леневым (1988), И.М. Габриловичем, Р.Х. Гайдабековым (1992). Исследуемые пробы для повышения вероятности обнаружения фагов обогащали индикаторными культурами гафний, находящимися в логарифмической фазе роста.

Для выделения бактериофагов исследовали пробы сточных вод животноводческих помещений, птицефабрик и мясокомбината.

В качестве индикаторной культуры при выделении штаммов фагов использовали штаммы *Hafnia alvei* № 438, *Hafnia alvei* № 861 и *Hafnia alvei* № 923.

Сточные воды фильтровали через бумажный фильтр для освобождения от механических примесей.

Исследование материала на наличие фагов вышеуказанных энтеробактерий проводили по следующей методике: в колбу со стерильным питательным бульоном в объеме 50,0 см³ добавляли 20,0 см³ исследуемого материала и 2,0 см³ бульонной индикаторной культуры 18 часового роста. Колбу с содержимым инкубировали при 37 °С в течение 24 часов. После этого содержимое колбы, в количестве 10 см³ помещали в стерильные пробирки (по 2 от каждой пробы).

Затем, с целью инактивации посторонней микрофлоры, материал центрифугировали при 3000 об/ми, надосадочную жидкость прогревали в водяной бане при 58-60 °С в течение 30 минут. Прогретый материал засевали методом агаровых слоев.

Контролем служила индикаторная культура *Hafnia alvei* № 438, засеянная методом агаровых слоев, а в качестве исследуемого материала брали 1,0 см³ стерильного питательного бульона.

Чашки с посевами инкубировали в термостате 18-20 часов при 37 °С. Наличие негативных колоний или зон лизиса на газоне роста индикаторной культуры свидетельствовало о присутствии в исследуемом материале бактериофага. В случае положительного результата негативные колонии или участок лизиса пересекали с помощью бактериологической петли или пастеровской пипетки в питательный бульон с индикаторной культурой. Для этого в две пробирки с 4,5 см³ питательного бульона добавляли стерильной пипеткой 0,2 см³ индикаторной бульонной культуры энтеробактерий 18-20 часового роста, в одну из которых пересекали негативную колонию, вторая пробирка служила контролем.

Посевы помещали в термостат и инкубировали их при 37 °С в течение 4-6 часов или 11-12 часов при комнатной температуре (до просветления бульона в опытной пробирке и выраженного помутнения среды в контроле). После чего, содержимое опытной пробирки прогревали. Прогретый фаголизат использовали для проведения пассирования фага (рис 2.1.). По этим методикам нами было исследовано 5 проб материала.

С целью получения чистых линий фагов и повышения их литической активности проводили селекцию клонов бактериофагов методом пассирования выделенных изолятов на индикаторных культурах с периодической 5-6-ти кратной отбивкой типичных негативных колоний до получения однородной популяции.

Для этого готовили разведения фагов в питательном бульоне от 10^{-1} до 10^{-9} . Фаги засеивали по методу агаровых слоев на 3 чашки по 1,0 см³ из разведений 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , чтобы на питательной среде сформировались отдельные негативные колонии. Одну негативную колонию (прозрачную, округлой формы, хорошо выраженную на газоне бактерий) расположенную от других колоний на расстоянии не менее 10,0 мм, отбирали бактериологической петлей и засеивали в МПБ с индикаторной культурой. Результаты учитывали после 4-6 часового инкубирования посевов в

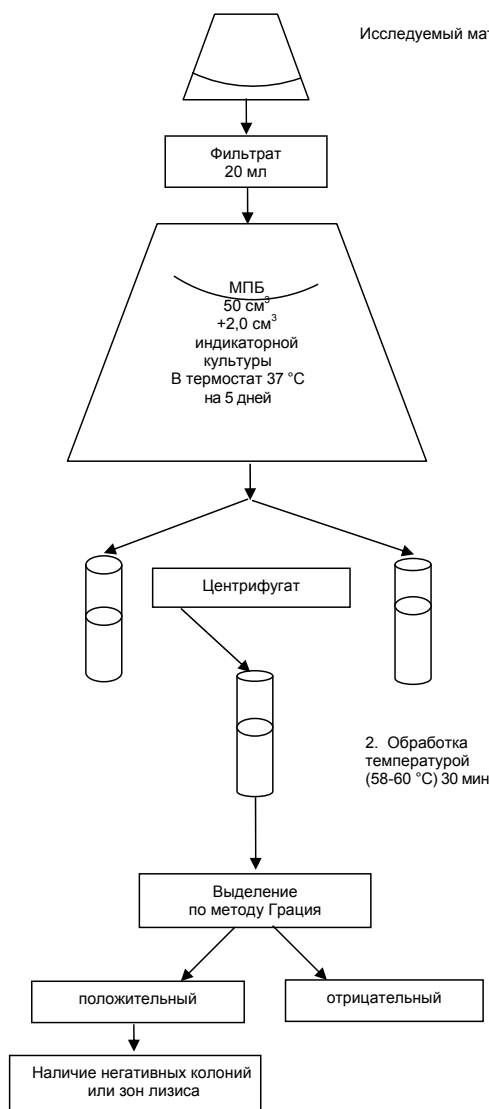


Рис. 2.1. Схема выделения бактериофагов *Hafnia alvei*

термостате (37-38 °С) или 11-13 часов нахождения при комнатной температуре (18-22 °С). Параллельно ставился контроль: питательный бульон, засеянный индикаторной культурой без фага. За этот период времени питательная среда в опытных пробирках просветлялась, а в контроле – оставалась мутной.

Содержимое опытных пробирок прогревали по вышеуказанным методикам. Полученные изоляты фагов вновь исследовали методом агаровых слоев и опять отбирали негативные колонии идентичные исходным, с которыми вновь проводили такую же операцию.

Выделенные клоны фагов пассировали на индикаторных культурах гафний 10-16 раз до получения популяции вирусов имеющих однородные негативные колониями и стабильно-высокий титр.

В результате проведенных исследований было выделено и селекционировано 4 изолята фагов лизирующих бактерий вида *Hafnia alvei*.

Морфология негативных колоний селекционированных бактериофагов

Морфология негативных колоний (бляшек, стерильных пятен) бактериофагов является фенотипическим признаком, поэтому может изменяться в зависимости от условий культивирования, прежде всего от концентрации агара в плотной питательной среде и от культуральных свойств используемого индикаторного штамма. В стандартных условиях морфология негативных колоний относительно стабильна и описание их всегда используют при характеристике фагов.

По морфологии и размерам негативных колоний селекционированные гафниозные бактериофаги были подразделены на 3 типа: 2 изолята имели прозрачные негативные колонии, округлые с ровными краями диаметром 1,5-2,0 мм; один изолят имел крупные прозрачные колонии с ровными краями диаметром 5,0-8,0 мм; один изолят – мелкие прозрачные округлые негативные колонии с ровными краями, диаметром 0,5-1,0 мм.

Литическую активность фагов изучали на плотных и в жидких питательных средах (методом агаровых слоев по Грациа и методом серийных разведений по Аппельману). Результаты исследований представлены в таблице 2.2.

Проведенные исследования показали, что выделенные нами бактериофаги гафаний имели литическую активность от 10^{-7} до 10^{-8} (по Аппельману) и $1,2-3,1 \times 10^9$ фаговых корпускул в $1,0 \text{ см}^3$ (по Грация).

Изучение диапазона литической активности бактериофагов в отношении гомологичных штаммов энтеробактерий

Для изучения диапазона литической активности селекционированных гафниозных бактериофагов использовали 16 штаммов *Hafnia alvei* (табл. 2.3).

Таким образом, выделенные и селекционированные нами гафниозные бактериофаги имели разный диапазон литической активности по отношению к гомологичным культурам *Hafnia alvei*. Наименьший спектр имел фаг Haf-1 УГСХА, который составил 50%, т.ч. числа исследуемых культур, наибольшую активность проявил изолят фага Haf-3 УГСХА, он лизировал все имеющиеся у нас штаммы гафний (100%).

Специфичность выделенных изолятов фагов изучали на культурах гетерологичных микроорганизмов, относящихся к различным родам и семействам (табл. 2.4). Из показателей таблицы видно, что все изученные изоляты фагов обладали строгой специфичностью, ни один из них не лизировал гетерологичных бактерий.

Табл. 2.1. Источники выделения фагов

№	Индикаторный штамм микроорганизма	Источник выделения и количество выделенных штаммов фага					
		Сточные воды свиноводов	Сточные воды Коровников	Бытовые сточные воды	Сточные воды мясокомбината	Сточные воды птицефабрики	Итого
1	<i>Hafnia alvei</i> № 438	0	0	1	1	2	4

Табл. 2.2. Литическая активность фагов *Hafnia alvei*.

№	Название фага	Активность фагов	
		Титр по Аппельману	Титр по Грация
1	Haf-1 УГСХА	10^{-7}	$1,2 \times 10^9$
2	Haf-2 УГСХА	10^{-8}	$2,0 \times 10^9$
3	Haf-3 УГСХА	10^{-9}	$3,1 \times 10^9$
4	Haf-4 УГСХА	10^{-7}	$2,5 \times 10^9$

Табл. 2.3. Диапазон литической активности гафниозных фагов.

№	Фаги	Количество исследуемых штаммов	Из них чувствительных к фагу	% лизируемых штаммов Фаги
1	Haf-1 УГСХА	16	8	50,0
2	Haf-2 УГСХА	16	9	56,3
3	Haf-3 УГСХА	16	16	100,0
4	Haf-4 УГСХА	16	13	81,2

Табл. 2.4. Специфичность выделенных изолятов фагов.

Название фага серии УГСХА	Название рода (вида) микроорганизмов														
	Количество исследуемых штаммов														
	E.coli O157	E. coli др. серогрупп	Morganella spp	Proteus spp	Klebsiella spp	Enterobacter spp	Citrobacter spp	Y. enterocolitica	Y. pseudotuberculosis	Salmonella spp	Pseudomonas spp	Staphylococcus spp	Bacillus spp	Streptococcus spp	Listeria spp
	6	12	21	12	10	14	7	5	8	2	18	3	18	14	2
Haf-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Haf-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Haf-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Haf-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ПРИМЕЧАНИЕ: «-» - ОТСУТСТВИЕ ЛИЗИСА.

Таким образом из четырех изолятов селекционированных нами гафниозных бактериофагов наиболее выраженными биологическими свойствами обладает фаг Haf-3 УГСХА, он имеет высокую литическую активность (10^9 фаговых корпускул в 1 мл на плотных питательных средах и 10^{-8} – в жидких), строгую видовую специфичность (не лизирует микроорганизмы других родов и семейств) и обладает широким диапазоном литического действия (лизирует 100% изученных культур вида *Hafnia alvei*. Полученные результаты исследований позволяют использовать вышеуказанный изолят бактериофага в качестве производственного для изготовления диагностического фагового биопрепарата. Этот изолят мы использовали в дальнейших исследованиях.

Пороги термоинактивации селекционированного фага Haf-3 УГСХА

Степень устойчивости бактериофагов и клеток-хозяев к инактивирующим факторам физического воздействия имеет теоретическое и практическое значение, поэтому при изучении биологических свойств фагов определение их чувствительности к таким агентам является обязательным.

Нами были проведены исследования по изучению термочувствительности вышеназванного фага объектов по методикам, предложенным Д.М. Гольдфарбом (1961); М. Адамсом (1961); И.М. Габриловичем (1998).

В результате исследований было установлено, что бактериофаг Haf-3 УГСХА обладал выраженной устойчивостью к температуре 60-65 °С.

При нагревании от 59 до 65 °С снижения активности последнего не происходило. Нижний порог термоинактивации гафниозного фага составил 66-67 °С. При последующем повышении температуры среды титр фага понижался. При воздействии температуры выше 75 °С активных корпускул фага не обнаруживали (табл. 2.5). Таким образом, верхний порог термоинактивации для него составил 75-76 °С.

Индикаторная культура *Hafnia alvei* погибала при 58-60 °С за 10-15 минут.

Таким образом в качестве инактивирующего фактора при работе с бактериофагом и при разработке РНФ мы можем использовать метод прогревания фаголизата и исследуемого материала при 58-60 °С в течение 30 минут.

Изменение литической активности бактериофага при хранении

Штамм фага Haf-3 УГСХА, в виде лизата бульонной культуры, хранили в запаянных ампулах по 2,0 см³ и герметически закрытых флаконах объемом 50-100,0 см³ в условиях холодильника при 2-4 °С в течение 6 месяцев (период наблюдения). Литический титр фагов определяли методом агаровых слоев по Грациа после приготовления и по истечении 2,4 и 6 месяцев.

Из показателей таблицы 6 видно, что хранение бактериофага Haf-3 УГСХА в условиях холодильника при 2-4 °С в течение

Табл. 2.5. Изучение температурной устойчивости фага Haf-3 УГСХА.

Температура, °С	Титр фагов
	М17 УГСХА
59-60	2,1×10 ⁹
62-63	1,1×10 ⁹
64-65	1,2×10 ⁹
67	3,4×10 ⁷
71-73	2,0×10 ²
74-75	0
76-77	0
78-80	0
81-82	0
Контроль фага	3,5×10 ⁹

Табл. 2.6. Изменение литической активности бактериофага Haf-3 УГСХА при хранении.

Фаг	Литическая активность при хранении через время в месяцах			
	0	2	4	6
Haf-3	5,6×10 ⁹	6,1×10 ⁹	3,8×10 ⁹	5,0×10 ⁹

ние 6 месяцев не снизило его литическую активность. Работа по наблюдению за изменением активности фага при хранении продолжается.

Разработка схем исследования материала с целью выделения и ускоренной идентификации возбудителя гафниоза пчел

Используя строгую видовую специфичность селекционированного бактериофага, нами были разработаны схемы ускоренной идентификации вышеуказанного микроорганизма. При выделении и идентификации энтеробактерий из объектов внешней среды и патологического материала первичные посевы и выделение чистых культур микроорганизмов проводили в соответствии с существующими нормативными документами.

Для выделения гафний посев материала производили на среды Эндо, Плоскирёва, инкубировали при температуре 36-37 °С 18-20 часов.

Гафнии на плотных средах первые сутки роста образовывали мелкие и средние по размеру выпуклые колонии округлой формы с ровными краями, гладкой блестящей поверхностью, серовато-белого цвета. Цвет среды Эндо не изменяли, на агаре Плоскирева колонии имели росинчатые вид, полупрозрачные, голубовато-серого цвета. Выросшие характерные для данного варианта, вида или рода колонии пересевали в питательный бульон (не менее 5-6 колоний с одной чашки) и инкубировали при 37 °С в течение 6-18 часов (до появления выраженного помутнения среды).

Первичные бульонные культуры, полученные после пересева колоний с вышеперечисленных сред, микроскопировали (окраска по Граму) и при обнаружении в мазках мелких грамотрицательных палочек с закруглёнными концами, не образующих спор, располагающихся одиночно и попарно, подвергали фагоидентификации. Фагоидентификацию энтеробактерий проводили по методике В.Д. Тимакова и Д.М. Гольдфарба.

В результате проведенных исследований искусственно контаминированных тест-объектов (меда и суспензии их павших пчел) индикаторным штамме гафний в концентрациях от 10^1 до 10^5 м.к. было установлено, что названные микроорганизмы удалось обнаружить бактериологическим методом из всех объектов только в концентрации 10^4 - 10^5 микробных клеток в $1,0 \text{ см}^3$ (г) исследуемого субстрата.

Схема фагоидентификации представлена в сравнении с традиционной схемой, изложенной в вышеупомянутых методических указаниях, из которой видно, что время исследований в разработанной нами схеме короче на 42 часа с меньшими затратами посуды и реактивов (рис. 2.2).

Определение количественного показателя РНФ, имеющего диагностическое значение

В задачу данных исследований входило определение количественного показателя реакции, которое имеет диагностическое значение. Для этого мы использовали методику, предложенную В.Я. Ганюшкиным (1988).

Питательный бульон контаминировали гафниями выращенными при 37 °С в течение 18 часов.

В качестве контроля был использован интактный питательный бульон.

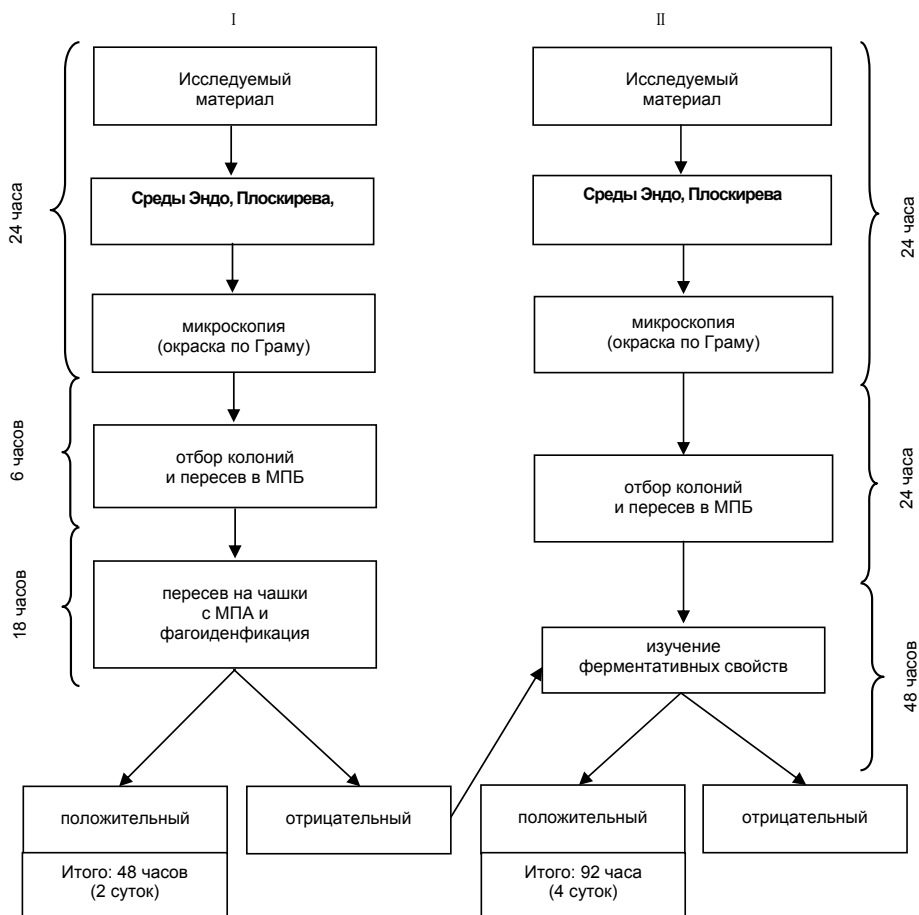


Рис. 2.2. Схема ускоренной идентификации гафний с помощью бактериофага Haf-3 УГСХА (I) в сравнении со схемой бактериологического исследования.

Гафниозный индикаторный бактериофаг Haf-3 серии УГСХА использовали в рабочем разведении, содержащем не более 104 фаговых корпускул в 1,0 см³.

Для постановки РНФ в опытные колбы с 50,0 см³ питательно-го бульона вносили индикаторную культуру гафний по 1,0 см³ в концентрации 10¹, 10², 10³, 10⁴, 10⁵ м.к./см³. Содержимое колбы встряхивали в течение 10 минут. Для каждого опыта подготавливали 3 опытные широкие пробирки для каждого разведения культуры и контроля. В пробирки №1 и №2 вносили по 9,0 см³ содержимого колбы с разведением культуры. В пробирки №1 и №3 – по 1,0 см³ бактериофагов. Мясопептонный бульон в пробирки №2 добавляли в количестве по 1,0 см³, №3 – 9,0 см³. Таким образом, пробирки №1 являются опытными, где присутствуют фаги в смеси с исследуемым материалом. В пробирках №2 находится только исследуемый материал, и она служит контролем на присутствие «свободного» фага. В пробирках №3 добавлены индикаторные фаги, что позволяет контролировать их титр (рис. 2.3).

Описанным способом проводили исследования для каждого разведения культуры.

После культивирования при температуре 37 °С в течение 5 часов содержимое пробирок разводили мясопептонным бульоном (рН 7,4 – 7,6) так, чтобы при высеве 1,0 см³ содержимого пробирки №3 на чашках образовывалось до двух десятков негативных колоний. В пробирке №3 индикаторный фаг находился в концентрации 10⁴ корпускул в 1,0 см³, и для того, чтобы получить в конечном разведении сосчитываемое число корпускул, 0,25 см³ содержимого пробирки №3 вносили в 4,5 см³ мясопептонного бульона (разведение в 20 раз). Содержимое пробирок №1 и №2 разводили аналогично. Инактивацию бактерий проводили методом прогревания на водяной бане при температуре 58 – 60 °С в течение 30 минут. После этого содержимое пробирок исследовали на определение числа корпускул бактериофага в 1,0 см³ методом агаровых слоев. Посевы методом агаровых слоев (по Грация) производили через 5 часов инкубации исследуемого материала с фагом. Реакция нарастания титра фага, оцененная как сомнительная, не имела диагностического значения.

Оценку результатов реакции нарастания титра фага произ-

водили согласно таблице используя показатели, разработанные В.Д. Тимakovым, Д.М. Гольбфарбом (1962).

В результате проведенных исследований, установлено, РНФ имеет положительный результат с фагом Hsf-3 УГСХА при контаминации питательного бульона гомологичными бактериями 10^3 м.к./см³.

Полученные экспериментальные данные позволяют считать, что наиболее оптимальным являются режимы РНФ при 5-6 часовой экспозиции исследуемого материала с фагами без подрачивания, когда удастся провести индикацию энтеробактерий в количестве 10^3 м.к./см³ изучаемого субстрата, на исследование которого затрачивается 16-24 часов. Поэтому данный режим мы использовали в дальнейших исследованиях.

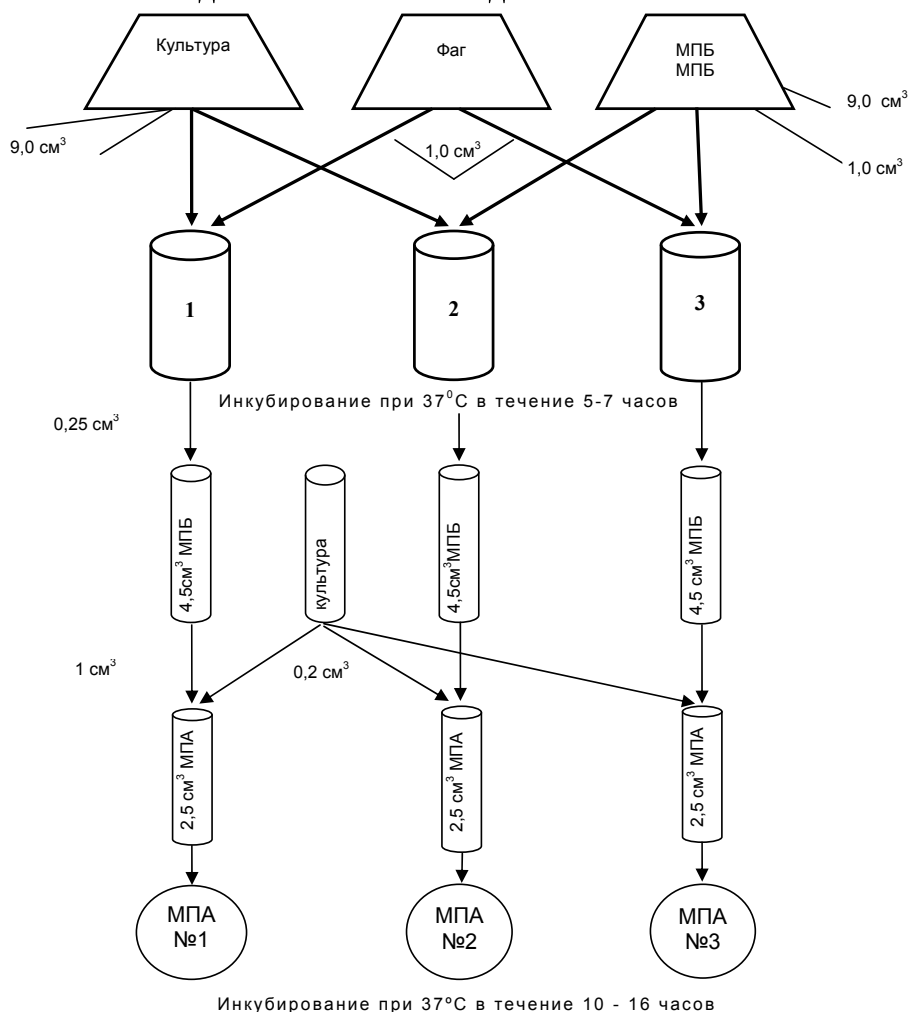


Рис. 2.3. Схема постановка реакции нарастания титра фага

Табл. 2.9. Нарастание титра фагов в контаминированном гафниями МПБ.

№ п/п	Штаммы энтеробактерий	Бактериофаг серии УГСХА	Результаты исследований: количество негативных колоний при разной контаминирующей концентрации энтеробактерий										Контроль БОЕ в контроле	Контроль "дикого" фага (Количество БОЕ)
			10 ⁵		10 ⁴		10 ³		10 ²		10 ¹			
			Количество БОЕ М±m	Увеличение количества фага (раз)	Количество БОЕ М±m	Увеличение количества фага (раз)	Количество БОЕ М±m	Увеличение количества фага (раз)	Количество БОЕ М±m	Увеличение количества фага (раз)	Количество БОЕ М±m	Увеличение количества фага (раз)		
1	Hafnia alvei	Haf-3 УГСХА	Лизис	>20	Лизис	>20	170,1±2,6	6,3	90±3,5	3,3	29,2±2	-	27,3	0

Исследование в РНФ контаминированной гафниями суспензии из павших пчел с помощью индикаторного фага Haf-3 УГСХА

Павших пчел, в которых не были обнаружены гафнии, растирали в стерильной ступке с добавлением небольшого количества физраствора (5,0 см³ на 5 г. пчел) контаминировали гафниями в концентрациях от 10¹ до 10⁵ м.к./см³. Контаминированные образцы тщательно перемешивали и вносили в колбы, содержащие по 50,0 см³ питательного бульона.

Ставили реакцию как указано в схеме (рис. 3) для каждого разведения культуры.

Результаты исследований свидетельствуют о том, что гафнии были обнаружены с помощью фага Haf-3 УГСХА в концентрации 10³ м.к./см³.

Бактериологическим способом удалось выделить названных микроорганизмов в концентрации 10⁴ и идентифицировать за 96 часов.

Таким образом, постановка РНФ с искусственно контаминированными гафниями объектами ветеринарно-санитарного надзора с применением специфического бактериофага Haf-3 УГСХА, показала более высокую чувствительность, чем результаты бактериологических исследований. При этом сокращаются сроки исследования и расход материалов.

Заключение

Впервые выделены штаммы бактериофагов, активные в отношении штаммов бактерий вида *Hafnia alvei* – возбудителей гафниоза пчел. Изучены основные биологические свойства выделенных фагов. Получен новый диагностический биопрепарат – индикаторный бактериофаг гафниозный.

Впервые разработаны биотехнологические параметры фагоиндикации и фагоидентификации бактерий вида *Hafnia alvei* в объектах ветеринарно-санитарного надзора. Доказана эффективность использования селекционированных бактериофагов с диагностической целью.

Предложен специфичный бактериофаг, который используются для изготовления диагностического препарата.

Создана коллекция гафниозных бактериофагов, которые в перспективе можно использовать для конструирования лечебно-профилактического фагового противогафниозного биопрепарата.

Разработаны «Методические рекомендации по ускоренной индикации бактерий *Hafnia alvei* в патологическом материале, пищевом сырье и объектах внешней среды с помощью реакции нарастания титра фага (РНФ) с применением специфического бактериофага Haf-3 УГСХА» и «Методические рекомендации по выделению и ускоренной идентификации бактерий *Hafnia alvei* из патологического материала, пищевого сырья и объектов внешней среды с применением специфического бактериофага Haf-3 УГСХА».

Результаты научно-исследовательской работы используются в учебном процессе и научно-исследовательской работе студентов, аспирантов и сотрудников факультета ветеринарной медицины УГСХА.

ЛИТЕРАТУРА

1. Адамс М. Бактериофаги. – М., 1961. – С. 26-121.
2. Адельсон Л.И. Бактериофаги, активные по отношению к энтеропатогенным кишечным палочкам // Вопросы микробиологической диагностики и бактериофагии. – М., 1962. – С. 184-194.
3. Блохина И.Л., Соколова К.Я., Левалова Г.Ф. Новое в классификации энтеробактерий // ЖМЭИ. – 1992. – №1. – С.49-52.

4. Борисова М.А., Николаевский В.В., Генералов О.В. и др. //Условно-патогенные микробы и их бактериофаги. Нальчик, 1985, с. 96-99.
5. Васильев Д.А., Золотухин С.Н., Хайруллин И.Н. и др. Характеристика биологических свойств бактериофагов вида *Bacillus subtilis*. Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. Ульяновск, 2011, №1 (13) стр. 79-83.
6. Воронин Е.С., Грязнева Т.Н., Дервишов Д.А., Тихонов И.В. Выделение и идентификация бактерий желудочно-кишечного тракта животных с целью постановки диагноза и производства вакцинных и пробиотических препаратов: Учебно-методическое пособие. – М.: ФГОУ ВПО МГАВМиБ им. К.И. Скрябина, 2004. - С. 72.
7. Габрилович И.М. Основы бактериофагии. // Минск: «Высшая школа», 1973.
8. Ганюшкин В.Я. Реакция нарастания титра фага при диагностике паратифа поросят // Ветеринария. – 1967. – № 3. – С. 69 – 71.
9. Ганюшкин В.Я. Бактериофаги сальмонелл и их применение в ветеринарии. – Ульяновск, 1988
10. Егоров В.В. Практикум по микробиологии / В.В. Егоров. – М.: Изд-во МГУ, 1986. - С. 35-42.
11. Жумагельдина З.Т. Клинико-эпидемиологические особенности гафниоза человека. - Алматы, 2009. - С. 4, 7, 13, 37-40, 45, 57, 58-64.
12. Золотухин С.Н. Малоизученные энтеробактерии и их роль в патологии животных. – Ульяновск, 2004. – С. 3-9.
13. Золотухин С.Н., Каврук Л.С., Васильев Д.А. Смешанная кишечная инфекция телят и поросят, вызываемая патогенными энтеробактериями. – Ульяновск, 2005. - С. 5-8.
14. Катмакова, Н.П., Васильев Д.А., Золотухин С.Н. Разработка оптимальных технологических параметров постановки РНФ с бактериофагом *Y. pseudotuberculosis* - 09 УГСА. Естественные и технические науки, №6, с. 202-204. 2009.
15. Лурия С., Дарнелл Д. Общая вирусология – М., Мир, 1970. – С.36-47.
16. Методические указания по бактериологической диагностике смешанной кишечной инфекции, вызываемой патогенными энтеробактериями. М.: - 1999, 20 с.
17. Новиков В. Б. Пчёлы, цветы и здоровье//Пчеловодство. – 2005. - №1. – С. 12-15.
18. Пожарникова, Е.Н., Золотухин С.Н. Выделение и изучение биологических свойств бактериофагов рода *Enterobacter*, конструирование на их основе биопрепарата и разработка параметров практического применения. Проблемы профил-ки и борьбы с особо опасными, экзотич. и малоизученными инфекционными болезнями животных: матер. Междун. научно-практ. конф. ВНИИВВиМ. Том II. – Покров, 2008. – С. 228-230
19. Покровский В.И., Дунаевский О.А. Современные принципы и методы диагностики инфекционных болезней // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2001. – № 4. – С. 5 – 7.
20. Понявин Б.Я. Изучение реакции нарастания титра фага в условиях практической лаборатории // ЖМЭИ. – 1960. – № 6. – 135 с.
21. Пульчеровская Л.П., Золотухин С.Н., Васильев Д.А. Методы индикации и идентификации бактерий рода *Citrobacter* в воде открытых водоемов. Аграрная наука и образование на совр. этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения: матер. Междун. научно-практ. конф. Том IV. - Ульяновск, 2009. – С. 87-91.
22. Сидоров М.А., Скородумов Д.И., Федотов В.Б. // Определитель зоопатогенных микроорганизмов. Справочник. – М.: Колос – 1995. – 320.
23. Тарасова А.В., Феоктистова Н.А., Золотухин С.Н. Роль бактерий рода *Hafnia* в патогенезе желудочно-кишечных заболеваний сельскохозяйственных животных. - ФГОУ ВПО «Ульяновская ГСХА», 2007. – С. 175-176, 178.
24. Хейс У. Генетика бактерий и бактериофагов. Основы генетики и молекулярной биологии. – М.: Мир, 1965. – С. 275 – 368.
25. Цветков К.И. Применение специфического бактериофага для диагностики паратифозного аборта кобыл // Ветеринария. – 1941. – № 6. – С. 4 – 6.
26. Чанишвили Т.Г., Чанишвили Н.А. Научные и методологические основы практического применения бактериофагов// Перспективы использования препаратов бактериофага для превенции и лечения инфекции, вызванных патогенными и условно-патогенными микроорганизмами: матер. междунар. семинара. – Тбилиси, 2005. – С. 9-10.
27. Abbott S.L., O'Connor J., Robin T. et al. Biochemical properties of a newly described *Escherichia* species, *Escherichia albertii*. // J. Clin. Microbiol. - 2003. - V. 41. - P. 4852-4854
28. Albert M.J., Alam K., Islam M. et al. *Hafnia alvei*, a probable cause of diarrhea in humans. // Infect. Immun. - 1991. - V. 59. - P. 1507-1513
29. Albert M.J., Faraque S.M., Ansaruzzaman M. et al. Sharing of virulence-associated properties at the phenotypic and genotypic levels between enteropathogenic *Escherichia coli* and *Hafnia alvei*. // J. Med. Microbiol. - 1992. - V. 37. - P. 310 – 314.

2.6. БАКТЕРИОФАГИ БАКТЕРИЙ ВИДА *MORGANELLA MORGANII* И ИХ ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

ZOLOTUKHIN S.N., KUZNETSOV A.U. PHAGES
OF *MORGANELLA MORGANII* SP. AND THEIR APPLICATION

Одной из основных причин гибели молодняка сельскохозяйственных животных являются желудочно-кишечные заболевания. В настоящее время, благодаря работам отечественных и зарубежных исследователей установлено, что наряду с общепризнанными возбудителями инфекционной диареи новорожденных животных (энтеропатогенные эшерихии, сальмонеллы, клостридии перфрингенс) важную роль в возникновении кишечных инфекций играют и другие микроорганизмы, в частности представители семейства *Enterobacteriaceae*, относящиеся к роду *Morganella* (вид *M. morganii*) [4,5,6].

С 2000 года ветеринарные лаборатории страны используют для выделения и идентификации морганелл схему, изложенную в «Методических указаниях по бактериологической диагностике смешанной кишечной инфекции, вызываемой патогенными энтеробактериями» [2,6,7]. Предлагаемая в них схема основана на выделении чистой культуры возбудителя и ее идентификации на основе изучения биохимических свойств бактерий. Общий срок бактериологического исследования патологического материала составляет 6-7 суток.

Л.С. Кавруком с соавторами предложен ускоренный метод обнаружения морганелл в смешанных культурах с одновременной их серологической типизацией в реакции нейтрализации антител (РНАт) в соответствии с действующим «Наставлением по применению диагностикумов морганеллезных эритроцитарных» (1991). Указанный метод позволяет обнаруживать морганелл, принадлежащих лишь к ограниченному числу О-серогрупп (01, 016, 026, 029, 033, 045, 049, «13»), хотя, согласно результатам исследования автора и данным наших исследований, в репродукторных животноводческих помещениях нередко встречаются патогенные штаммы морганелл других серогрупп.

В настоящее время в ветеринарной практике для ускоренного обнаружения некоторых микроорганизмов в патологическом

материале и объектах внешней используют индикаторные бактериофаги в реакции нарастания титра фага РНФ.

Исходя из вышеизложенного, нами была поставлена цель: разработать метод ускоренного обнаружения морганелл в объектах внешней среды, патологическом материале и кормах, а также для ускоренной идентификации эпизоотических штаммов морганелл.

Материалы и методы

В работе было использовано 38 штаммов морганелл: международной коллекции, полученные нами из коллекций ВНИИВСГЭ, производственные штаммы эпизоотических серогрупп из музея ВГНКИ и эпизоотические штаммы морганелл выделенные нами из патологического материала и от больных диареей телят и поросят, а так же из объектов внешней среды с неустановленной серогрупповой принадлежностью.

Культуры бактерий рода *Citrobacter* (*C. diversus* и *C. freundii*) в количестве 26 штаммов, 45 штаммов бактерий рода *Escherichia* (*E. coli*), 36 штаммов рода *Proteus* (*P. vulgaris*, *P. mirabilis* *P. mixofaciens*). 29 штаммов бактерий рода *Pseudomonas* (*Ps. aeruginosa*). 11 штаммов бактерии рода *Klebsiella* (*Klebsiella pneumonia*). 2 штамма *Enterobacter cloace* 2 штамма *Listeria monocitogenes*. 8 штаммов *Staphylococcus aureus*, 8 штаммов рода *Bacillus* (*Bac. cereus* и *Bac. subtilis*). Для выделения бактериофагов использовали пробы сточных вод свиарников-маточников, коровников, телятников, больниц и содержимое толстого отдела кишечника больных и павших телят и поросят. Животные: белые мыши в количестве 90 голов.

Бактериологическое исследование материала проводили в соответствии с действующими «Методическими указаниями по бактериологической диагностике смешанной кишечной инфекции, вызываемой патогенными энтеробактериями» [6]. Выделение и изучение штаммов морганеллезных фагов проводилось по классическим методикам.

Диапазон литического действия и специфичность морганеллезных бактериофагов изучали по методу J. Gragie, A. Felix, описанным В.Я. Ганюшкиным и использованным С.Н. Золотухиным при изучении морганеллезных фагов[1,3].

Все опыты ставили с числом повторностей (более 3-х), обеспечивающих получение воспроизводимых и достоверных резуль-

татов. Достоверность полученных результатов определяли по методу Стьюдента - Фишера.

Результаты исследований

Для изучения распространения морганелл в животноводческих хозяйствах Ульяновской области и пополнения коллекции музейных штаммов морганелл, которые использовали для изучения диапазона литической активности фагов, нами были проведены бактериологические исследования патологического материала от больных и павших животных. Материал исследовали из 15 хозяйств Ульяновской области: 3-х молочно-товарных ферм и 11 свиноферм.

В ходе наших исследований по выделению и идентификации морганелл бактериологическим методом возникла необходимость ускорить процесс биохимической идентификации выделенных культур и сократить набор дифференциально-диагностических сред до минимума. Для этого мы использовали трехсахарную питательную среду, предложенную С.Н. Золотухиным с соавт. [4]. С помощью предлагаемой авторами среды можно на первом этапе идентификации выявить микроорганизмы родов *Proteus*, *Morganella*, *Providencia*, *Edwardsiella* и отличить их от других родов энтеробактерий.

Нами было исследовано бактериологическим методом материал от 23 трупов поросят, павших от диареи в возрасте 2-14 суток; трех трупов телят, павших в возрасте 2-10 дней; 44 проб фекалий от больных диареей поросят; 11 проб фекалий от больных телят; 31 пробу сточных вод из сви-ноферм, неблагополучных по диарейным заболеваниям; 8 проб сточных вод из МТФ.

В результате проведенных исследований морганеллы были обнаружены на восьми свинофермах и двух молочно-товарных фермах. Частота выделения морганелл из патологического материала от трупов поросят была в пределах 25-100% случаев, из фекалий больных - 25-50% и из сточных вод свиноферм - 23-50% случаев.

Из фекалий телят морганеллы выделяли в пределах 33% случаев.

В результате проведенных исследований было выделено и идентифицировано 29 штаммов морганелл.

Патогенные свойства определяли у культур бактерий, относящихся к роду *Morganella* по совокупности изученных биологических свойств методом внутрибрюшинного введения 0,5 млрд.

микробных клеток изучаемых бактерий. Для чего использовали агаровые культуры микроорганизмов суточного роста. Взвесью каждой культуры морганелл заражали по три белых мыши. Штамм считали патогенным в случае гибели двух или более мышей в течение трех суток после заражения.

В результате проведенных исследований установили, что абсолютное большинство штаммов *M. morganii* (27 из 29) были патогенными, что составило 93,1%. Следует отметить, что из патологического материала от больных и павших животных патогенным оказались культуры в 100% случаях. 2 культуры морганелл из 8-ми изученных (25%), выделенные из сточных вод были отнесены к R-формам и гибели мышей не вызывали.

При выделении морганеллезных фагов нами исследовался материал, взятый из прямой кишки у поросят-сосунов и телят, больных диареей, а так же сточные воды из свинарников-маточников хозяйств Ульяновской области, неблагополучных по желудочно-кишечным заболеваниям поросят-сосунов.

Выделение штаммов фагов *Morganella morganii* производили на индикаторных штаммах морганелл серогрупп: O33 (№36/82); O16; O1 (№619) и «13», 029.

Нами было выделено и селекционировано 13 расс фагов активных в отношении морганелл.

После 10-16-ти кратного пассирования на индикаторных культурах морганелл фаги УГСХА М8, УГСХА М), УГСХА М10, УГСХА МП, УГСХА М1 2, УГСХА М14, М16 оказались умеренными и проявили невысокую литическую активность (102 -103). Фаги УГСХА М15, УГСХА М13, УГСХА М1 7, УГСХА М18, УГСХА М19, УГСХА М 20 имели титр 10⁹ по Грациа и 10⁻⁷ по Аппельману. Негативные колонии диаметром 2-4 мм, прозрачные с ровными краями без вторичного роста фагорезистентных клеток.

У вирулентных штаммов, фагов были изучены специфичность и диапазон литической активности на 56 штаммах морганелл и 95 -ти штаммах бактерий гетерологичных родов и семейств.

Диапазон литической активности вирулентных фагов был в пределах 50-87%.

Наиболее широким спектром литической активности обладал фаг УГСХА М20 (87,5%). Наиболее узкий спектр имел штамм фага УГСХА М18 (50%).

Табл. 1 Диапазон литической активности фагов в отношении производственных штаммов морганелл эпизоотических серогрупп, депонированных в ВГНКИ вет. препаратов

Фаги Сери и УГСХ	№ штамма и серогруппа исследуемых культур								%
	O1	O16	O26	O29	O33	O45	O49	"13"	
M13	+	+	+	+	+	-	-	-	62,5
M15	+	+	+	+	+	+	-	-	75,0
M17	-	+	+	-	+	+	-	+	62,5
M18	+	+	-	-	+	+	-	-	50,0
M19	+	+	-	-	+	+	+	-	62,5
M20	+	+	+	+	+	+	+	-	87,5

Все фаги лизировали штаммы серогрупп O16, O33, штамм морганелл серогруппы O1 лизировали только две расы фагов (УГСХА M13, УГСХА M17 и УГСХА M20), а культуру бактерий серогруппы «13» лизировал только и только штамм фага УГСХА M17 (табл. 1).

Исходя из диапазона литической активности выделенных фагов, для дальнейшей работы использовали фаги штаммов УГСХА M17 и M20, так как их совместный спектр литической активности по отношению к изучаемым культурам составил 100%.

У этих фагов мы изучили литическую активность в отношении 38-ми полевых и музейных штаммов морганелл эпизоотических серогрупп и с неустановленной серогрупповой принадлежностью. Результаты исследований отражены в таблице 2, из результатов которой видно, что оба штамма фагов не лидировали 7 культур морганелл (18,4%) с неустановленной серогрупповой принадлежностью. Штамм УГСХА M17 лизировал 17 культур (44,7%), а фаг M20 - 63,1%. Совместный спектр литической активности был равен 81,6%.

Изучение специфичности бактериофагов проводили в отношении 45 штаммов *E.coli*, 26 штаммов бактерий рода *Citrobacter*, 39 штаммов рода *Proteus*, 20 штаммов *P. aeruginosa*, 2 штамма *Listeria*, 3 штамма *Enterobacter*, 5 - *Salmonella*, 8 - *Bacillus*, 8 - *Staphylococcus* и 11 штаммов рода *Klebsiella*. Результаты исследований показали, что селекционированные нами фаги обладают строгой специфичностью – ни один из вышеперечисленных родов не визировался изучаемыми фагами.

Для определения количественного показателя реакции, имеющего диагностическое значение, были поставлены опыты с заражением, фекалий, фуража, мясокостной муки и Паренхиматоз-

ных органов *M. morganii* серогруппы 029 для фага УГСХА» М20 и О16 для фага УГСХА М17 различным числом (от 10^1 до 1×10^8 м.к./см³) и без заражения с выявлением в субстратах морганелл методом РИФ.

Использовали фаги М17 и М20 в рабочем разведении 10^4 корпускул/см³. Высевы методом агаровых слоев производили через 6-8 часов инкубации исследуемого субстрата при температуре 37 °С. Учет результатов проводили через 12-16 часов инкубирования. С этой целью подсчитывали число негативных колоний фага, выросших на плотной питательной среде (метод агаровых слоев) в опытной пробе и в контрольной пробе (контроль титра фага).

Результат реакции учитывают путем подсчета негативных колоний фага в опытных и контрольных чашках (табл. 3).

В случае наличия в исследуемом материале свободного фага число корпускул фага на чашке подсчитывают и вычитают из числа корпускул индикаторного фага в опытных чашках. Разницу сравнивали с контролем. При высоком титре свободного фага (сплошной лизис индикаторной культуры) реакция не учитывалась. РНФ, оцененная как сомнительная, не имела диагностического значения.

Результаты проведенной серии опытов свидетельствуют о положительной РНФ при концентрации морганелл в фекалиях, фу-

Табл. 2. Изучение диапазона логической активности фагов УГСХА М17 и УГСХА М20 в отношении морганелл полевых и музейных штаммов морганелл.

№ п.п.	№ штамма	Серогруппа	Результаты исследования	
			УГСХА М17	УГСХА М20
Диапазон литического действия (%)			44,7	63,1
Диапазон совместного литического действия (%)			81,6	

Табл. 3. Изучение диапазона логической активности фагов УГСХА М17 и УГСХА М20 в отношении морганелл полевых и музейных штаммов морганелл.

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

раже и мясокостной муке 10^3 м.к./г и более и 10^2 м.к./г и более - при исследовании паренхиматозных органов.

Для проведения дальнейших исследований необходимо было определить оптимальные условия, обеспечивающие наиболее полноценное взаимодействие фага с бактериями. Практическое значение настоящего исследования определялось необходимостью выяснить диапазон чувствительности реакции в зависимости от режима исследования, то есть решить вопрос о том, какой режим необходим для того, чтобы по нарастанию количества фага выявить присутствие малых концентраций бактерий в исследуемом субстрате. Опыты состояли в определении минимального количества морганелл, выявляемых с помощью РНФ при исследовании искусственно контаминированных объектов.

Опыт проводили при предварительном подращивания исследуемого материала и без него.

Исследуемый субстрат (паренхиматозные органы и фекалии) заражали минимальным количеством морганелл и заливали стерильным МПБ в соотношении 1:10. Смесь в течение 5-10 минут встряхивали и ставили в термостат при 37°C в течение 23, 4, 16 часов, затем разливали в 2 пробирки по 9 мл. Пробирка №3 содержала 9 мл МПБ. В пробирки №1 и 3 вносили по 1 мл индикаторных бактериофагов в рабочем разведении в дозе 1 мл. После добавления к материалу фага, смесь выдерживали в течение 8-ми часов при температуре 37°C . По окончании инкубации из каждой пробирки брали по 0,1 мл материала и вносили в пробирку с 9,9 мл МПБ. Все пробирки прогревали при 60°C в течение 30 минут и подвергали дальнейшему исследованию методом агаровых.

При исследовании материала без предварительного подращивания материал после встряхивания отстаивали в течение 10 минут и разливали в 2 пробирки по 9 мл. В пробирку №3 вносили по 9 мл стерильного МПБ. После встряхивания все пробирки помещали в термостат при 37°C на 2-16 часов. По истечению 2, 4, 6, 16 часов материал исследовали, так же как и материал при подращивании.

Для контроля материал высевался на среды Эндо и Плоскирева для исследования бактериологическим методом. Результаты опытов отражены в таблице 4.

Результаты проведенных опытов по чувствительности РНФ в зависимости от времени подращивания исследуемого материала в МП Б при температуре 37 °С показало преимущество предлагаемой реакции над бактериологическим методом исследования. Из результатов таблицы видно, что положительная РНФ была при содержании в фекалиях и паренхиматозных органах морганелл 10^3 м.к./г при подращивании материала в течение 2-х и 4-х часов. При увеличении времени подращивания до 6-ти часов позволило обнаружить морганеллы в концентрации 10^2 м.к./г. и подращивание материала в течение 16 часов позволило обнаружить морганеллы в концентрации 10^1 как в фекалиях, так и в паренхиматозных органах. Бактериологическим методом исследования при такой концентрации не удалось выделить культуры морганелл.

Таким образом, наиболее оптимальным временем подращивания является 16 часов, при котором хотя и увеличивается время исследования до 38 часов, но повышается чувствительность реакции. Время исследования бактериологическим методом насчитывает не менее 96-ти часов.

Чувствительность РНФ в зависимости от времени инкубирования исследуемого материала с фагом нами проводилось при выращивании контаминированных фекалий и паренхиматозных органов при температуре 37 °С в течение 4,6, 16 и 24 часов. Результаты исследований отражены в таблице 5. Из данных таблицы видно, что при контакте материала с фагом в течение 4-х часов позволяет обнаружить морганелл с помощью РНФ в концентрации 10^4 м.к./г. При увеличении времени до 6-ти часов чувствительность РНФ повышается до 10^3 м.к./г. Общее количество времени, затраченное при постановки РНФ было равно 22 часам, что на 72 часа короче, чем время затраченное на исследование бактериологическим методом.

Увеличение времени контакта до 16 и 24 часов позволило обнаружить морганелл в концентрации 10^3 как в фекалиях, так и в паренхиматозных органах. Бактериологическим методом в такой концентрации морганеллы выделить не удалось.

Таким образом, оптимальным временем контакта исследуемого материала с бактериофагом явилось 16 часов. Общее время на

исследование составляет при этом 32 часа, тогда как бактериологическим методом исследования данное количество морганелл не было обнаружено.

Заключение

В результате проведенных исследований для целенаправленного выделения и идентификации морганелл целесообразно использовать трехсарную среду, прототипом которой явилась среда Клигlera. Применение ее позволяет сократить набор используемых питательных сред, времени и посуды.

Предложены два штамма активных морганеллезных бактериофагов для производства диагностических препаратов обладаю-

Табл. 4. Чувствительность РНФ в зависимости от времени подращивания исследуемого материала.

№ п.п.	Варианты исследований	Минимальное количество морганелл, обнаруживаемое с помощью				Время, затраченное на проведение исследований (в часах)			
	Предварительное подращивание	РНФ		Бак. метод		РНФ		Бак. метод	
	Время (часы)	фекалии	паренхиматозные органы	фекалии	паренхиматозные органы	фекалии	паренхиматозные органы	фекалии	паренхиматозные органы
1	2	10^3	10^3	10^3	10^3	24	24	96	96
2	4	10^3	10^3	10^3	10^3	26	26	96	96
3	6	10^2	10^2	н.о.	10^2	28	28	н.о.	96
4	16	10^2	10^2	н.о.	н.о.	38	38	н.о.	н.о.

Примечание: н.о. — не обнаружено

Табл. 5. Чувствительность РНФ в зависимости от времени инкубирования с фагом.

№ п.п.	Варианты исследований	Минимальное количество морганелл, обнаруживаемое с помощью				Время, затраченное на проведение исследований (в часах)			
	Предварительное подращивание	РНФ		Бак. метод		РНФ		Бак. метод	
	Время (часы)	фекалии	паренхиматозные органы	фекалии	паренхиматозные органы	фекалии	паренхиматозные органы	фекалии	паренхиматозные органы
1	2	10^4	10^4	10^4	10^4	20	20	96	96
2	4	10^3	10^3	10^3	10^3	22	22	96	96
3	16	10^2	10^2	н.о.	10^2	32	32	н.о.	н.о.
4	24	10^2	10^2	н.о.	н.о.	40	40	н.о.	н.о.

Примечание: н.о. — не обнаружено

щих строгой специфичностью широким диапазоном логической активности.

Для ускоренной идентификации морганелл предложен набор диагностических морганеллезных бактериофагов, применение которых проводят согласно «Методическим указаниям по идентификации морганелл с помощью бактериофагов», утвержденными ректором УГСХА.

Индикацию морганелл в патологическом материале, кормах, объектах внешней среды и пищевых продуктов необходимо проводить с помощью РНФ с применением набора индикаторных морганеллезных бактериофагов УГСХА М17 и УГСХА М20 согласно «Методическим указаниям по индикации морганелл в патологическом материале, кормах, объектах внешней среды и пищевых продуктов с помощью РНФ», утвержденными ректором УГСХА.

ЛИТЕРАТУРА

1. Адамс М. Бактериофаги. – М., 1961. – С. 26-121.
2. Воронин Е.С., Грязнева Т.Н., Дервишов Д.А., Тихонов И.В. Выделение и идентификация бактерий желудочно-кишечного тракта животных с целью постановки диагноза и производства вакцинных и пробиотических препаратов: Учебно-методическое пособие. – М.: ФГОУ ВПО МГАВМиБ им. К.И. Скрябина, 2004. - С. 72.
3. Ганюшкин В.Я. Бактериофаги сальмонелл и их применение в ветеринарии. – Ульяновск, 1988
4. Золотухин С.Н. Малоизученные энтеробактерии и их роль в патологии животных. – Ульяновск, 2004. – С. 3-9.
5. Золотухин С.Н., Каврук Л.С., Васильев Д.А. Смешанная кишечная инфекция телят и поросят, вызываемая патогенными энтеробактериями. – Ульяновск, 2005. - С. 5-8.
6. Методические указания по бактериологической диагностике смешанной кишечной инфекции, вызываемой патогенными энтеробактериями. М.: - 1999, 20 с.
7. Покровский В.И., Дунаевский О.А. Современные принципы и методы диагностики инфекционных болезней // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2001. – № 4. – С. 5 – 7.

МОЛОФЕЕВА Н.И.

2.7. ВЫДЕЛЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ ОСНОВНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БАКТЕРИОФАГОВ ESCHERICHIA COLI O157

MOLOFEYEVA N.I. ISOLATION AND STUDY OF THE MAIN QUALITIES
OF ESCHERICHIA COLI O157 PHAGES

Escherichia coli являются распространенными возбудителями инфекционных заболеваний желудочно-кишечного тракта у животных и человека (Покровский и др., 1989; Cantey, 1993; Тутаринов, Пирожков, Малахов, 2001).

В последнее время в научной литературе появилось большое число сообщений о заболевании людей, протекающих в тяжелой форме, вызванных *E. coli* сероваром O157, который образует шигоподобный вероцитотоксин (Riley, Remis, Heigerson, 1985; Покровский др., 1989; Ратинер, Бондаренко, 1998). Вспышки этой инфекции, зарегистрированы во многих странах Северной и Южной Америки, Австралии, Европы, Азии, Африки и в нашей стране. Эшерихии серогруппы O157 вызывают у молодняка животных диарею, геморрагический энтероколит и отечную болезнь у поросят (Тугаринов, Пирожков, Малахов, 2001). Так как основным резервуаром инфекции является крупный и мелкий рогатый скот, свиньи, реже лошади, олени, птица, то особенно опасны для людей пищевые продукты, полученные от этих животных, (Armstrong, Hollingsworth, Morris, 1996; Easton, 1997), а также растительные продукты, выращенные на полях, куда мог вывозиться, необеззараженный навоз, от животных-носителей этого серовара эшерихий (Cielask et.al., 1983). По данным J. Tuttle (1999) в ноябре 1992 года – феврале 1993 года наблюдалась вспышка (более 700 случаев) на Западе США, вызванная *Escherichia coli* O157:H7, связанная с гамбургерами, приготавливаемых в ресторанах. Исследования показали, что для заражения человека достаточна инфицирующая доза не превышающая 700 бактерий.

Эффективность профилактических мероприятий во многом зависит от своевременной диагностики болезни у сельскохозяйственных животных, поэтому совершенствованию методов лабораторной диагностики вышеуказанной инфекции уделяется большое внимание. Современные методы иммунодиагностики (ПЦР и ИФА), предлагаемые для индикации этих бактерий, хотя и являются высокоспецифичными и чувствительными, но сложность методик, высокая стоимость оборудования и реактивов, делает их пока недоступными для большинства лабораторий. В лабораторной практике для ускоренного обнаружения микроорганизмов в патологическом материале и объектах внешней среды, а также для их быстрого типирования, предложены индикаторные бактериофаги (Гольдфарб, 1961; Ганюшкин, 1988; Русалиев, 1990; Кольпикова, Бакулов, Котляров, 1990, 1992). Методы фагодиагностики просты в постановке, специфичны, не требуют больших затрат времени, материалов и общедоступны.

Таким образом, разработка параметров и технологических приёмов по индикации и идентификации *E.coli* серогруппы O157 с помощью реакции нарастания титра фагов (РНФ) является актуальной проблемой.

В работе использованы гомологичные - 6 штаммов *E.coli* O157, так и гетерологичные – 67 штаммов *E.coli*, в том числе 12 штаммов получены из лаборатории ООИ центра санэпиднадзора Ульяновской обл, 56 штаммов *E.coli* выделены нами из хозяйств Московской, Ульяновской и Самарской области. Помимо этого, при определении специфичности бактериофагов использовались 71 штамм других видов бактерий – представители родов: *Proteus*, *Citrobacter*, *Morganella*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, полученные из музея кафедры. Они обладали типичными для данных культур биологическими свойствами. Объектами исследования явились фаги *E coli* O157, выделенные нами из объектов внешней среды хозяйств Ульяновской и Самарской областей.

При работе с бактериями все посеы инкубировались при температуре 37 °С в течение 24-48 часов, а при работе с бактериофагами в течение 16-20 часов, для выделения бактерий использовали схемы, изложенные в «Методических указаниях «по бактериологической диагностике смешанной кишечной инфекции молодняка животных, вызываемой патогенными энтеробактериями» утверждёнными ГУВ 12.11.91 г., «Методических указаниях «по бактериологической диагностике колибактериоза (эшерихиоза) животных» утвержденными Департаментов ветеринарии 27.07.00, «Методических указаниях «по методам выделения и идентификации энтерогеморрагической кишечной палочки *E.coli* O157:H7», МУК 4.2.992-00. Исследования фагов проводили общепринятыми методами Грация (1936), Д.М. Гольдфарб (1961), И.М. Габрилович (1973), А.П. Парамонова, О.Г. Андреевой и Т.Н. Артамоновой (2002).

Первым этапом нашей работы была попытка выделить бактериофаги *E.coli* O157 из имеющихся у нас штаммов бактерий *E.coli* O157. Все изученные нами штаммы бактерий исследовались как индикаторные и как «лизогенные».

В первой серии опытов, культуры исследуемые как «лизогенные», воздействовали индуцирующим фактором, затем фильтро-

вали через бактериальные свечи Шамберлана L-3 (Ревенко, 1978). В качестве индуцирующего фактора, применяли воздействие ультрафиолетовыми лучами, в диапазоне 254 нм., в течение 30 секунд на бактерии, одновременно приводили исследование «лизогенных» культур фильтруя их через свечи Шамберлана, но не воздействуя на них ультрафиолетовыми лучами. По данным этих исследований, можно сделать вывод, что культуры E.coli O157 штаммы РЛ. № 904, № 35150, № 43895, № 51659, XLI не являются лизогенными.

Во втором этапе – серии опытов, использовали методику предложенную С. Луриа, Д. Дарнелл (1970), для выделения бактериофагов энтеробактерий из культур E.coli O157 без воздействия на них индуцирующего фактора. Проведя эти исследования нам не удалось выделить бактериофаги E.coli O157 из имеющихся у нас штаммов бактерий E.coli O157.

Резюмируя полученные данные, можно утверждать, что мы не обнаружили явления лизогении у имеющихся штаммов бактерий.

Дальнейшее выделение бактериофагов E.coli O157 проводили из объектов внешней среды (Адельсон, 1962). Для этого мы использовали сточные воды из свиноводческих хозяйств и молочно-товарных ферм в различных хозяйствах Ульяновской и Самарской областей. При исследовании 26 образцов. Удалось выявить из 4 образцов присутствие искомого фага по наличию на газоне индикаторной культуры E.coli O157, негативных колоний. Результаты представлены в таблице 1.

Для получения чистой линии фага проводили до 5 пассажей из изолированных негативных колоний по методике, описанной Dylbeio, Vogt (1954) и использованной И.М Габриловичем (1992), С.Н. Золотухиным (1994).

В результате проведённых опытов нами были выделены и изолированы методом прогревания 5 штаммов фагов E.coli O157

Табл. 1. Источники выделений бактериофагов E.coli O157

№	Название фага	Лизис референс штаммов	Из чего выделен	Место и год выделения
1.	Е –61 УГСХА	РЛ, 43895, 51659, XLI	Сточные воды МТФ	УЧХОЗ, 2000
2.	Е –2 УГСХА	РЛ, 43895, 51659, XLI	Сточные воды МТФ	УЧХОЗ, 2000
3.	Е -3 УГСХА	904,43895, 51659, XLI	Сточные воды СТФ	УЧХОЗ, 2001
4.	Е-4 УГСХА	904, 43895, 51659, XLI	Сточные воды СТФ	УЧХОЗ, 2001
5.	Е –67 УГСХА	РЛ, 904, 35150, 43895, 51659, XLI	Сточные воды МТФ	САМАРА, 2001

Е-61 УГСХА, Е-2 УГСХА, Е-3 УГСХА, Е-4 УГСХА, Е-67 УГСХА. Фаг Е-4 УГСХА при хранении при температуре 2-4 °С в течение 3 месяцев потерял свою активность и в дальнейшем в наших исследованиях не использовался.

Изучение биологических свойств фагов проводили по современным схемами классификации бактериофагов (А.С. Тихоненко, 1968; Т.Г. Чинашвили, 1968; И.М. Габрилович, 1973; D. Reanneу Н.-W. Ackermann, 1982). Исследовались следующие свойства фагов E.coli O157: а) морфология негативных колоний; в) литическая активность; г) спектр литической активности; д) специфичность действия; е) температурная устойчивость; ж) устойчивость к хлороформу; з) электронная микроскопия.

Морфология негативных колоний изучалась при посевах фагов методом агаровых слоёв по Грация на питательном агаре. Учёт производился через 18-20 часов инкубации при температуре 37 °С. Негативные колонии, образуемые изученными бактериофагами разделены нами на три типа по классификации Тихоненко (1968). Колонии типа «а» образуют округлые с ровными краями, от 1,5 до 2,5 мм в диаметре. У двух бактериофагов (Е-61 УГСХА и Е-62 УГСХА) отмечались негативные колонии типа «а». Один бактериофаг (Е-3 УГСХА) образовывал крупные, полупрозрачные колонии, с ровными краями, центр с вторичным ростом индикаторной культуры, от 2,5 до 3,0 в диаметре – тип «в». Тип «с» образовывал один бактериофаг (Е-67 УГСХА), прозрачные колонии, округлые с ровными краями, от 0,5 до 1,0 мм в диаметре.

Литическую активность селекционированных бактериофагов проводили по методу Аппельмана и Грация (Д.М. Гольдфарб, 1961). Определение активности фага Е-61 УГСХА по методу Аппельмана составила 10^{-7} , фага Е-2 УГСХА составила 10^{-5} , фага Е-3 УГСХА составила 10^{-6} , фага Е-67 УГСХА составила 10^{-7} . Результаты изучения литической активности выделенных фагов по Грация представлены в таблица № 2 и на плотном питательном агаре по Грация от $1,0 \times 10^9$ до $3,2 \times 10^9$ фаговых корпускул в 1 мл.

Спектр литической активности является характерной особенностью фага, и им пользуются для его идентификации (М. Адамс, 1961). Для изучения спектра литической активности четырех селекционированных фагов (Е –61 УГСХА, Е –2 УГСХА, Е –3 УГСХА, Е-67 УГСХА) мы использовали 6 референс штаммов E.coli

Табл. 2. Литическая активность бактериофагов E.coli O157 по Грациа

№	Фаги	Литическая активность по методу Грациа
1.	Е-61 УГСХА	$3,2 \times 10^9$
2.	Е-2 УГСХА	$1,0 \times 10^9$
3.	Е-3 УГСХА	$2,0 \times 10^9$
4.	Е-67 УГСХА	$1,5 \times 10^9$

Табл. 3. Спектр литической активности эшерихиозных фагов по отношению к штаммам бактерий E.coli O157.

№	Фаги	Кол-во испытан. штаммов	Из них чувствит. к фагу	Лизируемые штаммы	% лизируемых штаммов
1	Е-61 УГСХА	6	4	РЛ, 43895, 51659, XLI	66,6
2	Е-2 УГСХА	6	4	РЛ, 43895, 51659, XLI	66,6
3	Е-3 УГСХА	6	4	904, 43895, 51659, XLI	66,6
4	Е-67 УГСХА	6	6	РЛ, 904, 35150, 43895 51659, XLI	100

серологической группы O157 (шт. РЛ, № 904, № 35150, № 43895, № 51659 и XLI) и эпизоотические штаммы бактерий E.coli других серологических групп (67 штаммов) и проводили его методом нанесения фага на газон бактериальной культуры (Ганюшкин, 1988). Результаты опыта представлены в таблице 3.

Исследования показали, что наиболее широким диапазоном литической активности по отношению к изучаемым культурам обладает штамм фага Е –67 УГСХА, который лизировал все имеющиеся у нас штаммы E.coli O157, что составляет 100%.

Специфичность фагов определяется прежде всего сродством их к антигенной структуре лизируемых бактерий и используется в практике для дифференциации бактерий. Изучения специфичности четырех бактериофагов E.coli O157 (Е-61 УГСХА, Е-2 УГСХА, Е-3 УГСХА, Е-67 УГСХА) проводили по отношению к представителям полевых штаммов E.coli -67 штаммов, Proteus -36 штаммов, Citrobacter -12 штаммов, Morganella -6 штаммов, Klebsiella -4 штамма, Salmonella -6 штаммов, Staphylococcus -3 штамма, Pseudomonas aureginisa -2 штамма, Bacillus cereus -2 штамма. Установлено, что фаги не лизировали ни одну из испытуемых бактерий E.coli других сероваров, поэтому можно сделать вывод, о том, что селекционированные фаги являются специфичными по отношению к E.coli O157.

Степень устойчивости бактериофагов к инактивирующим температурным факторам имеет таксономическое значение. Исследования по изучению термочувствительности селекционирован-

Табл. 4. Температурная устойчивость бактериофагов E.coli O157.

Температура, °С	ФАГИ			
	Е-61 УГСХА	Е-2 УГСХА	Е-3 УГСХА	Е-67 УГСХА
60 –63	1,2x10 ⁸	3,7x10 ⁸	2,3x10 ⁸	3x10 ⁸
64 –66	3,2x10 ⁸	4,5x10 ⁸	1,2x10 ⁸	1,8x10 ⁸
67 –70	2,5x10 ⁸	3,1x10 ⁸	2,4x10 ⁸	1,8x10 ⁸
71 –73	1,4x10 ⁸	1,3x10 ⁸	2,3x10 ⁸	1,4x10 ⁸
74 –76	6,2x10 ⁸	3,1x10 ⁸	2,6x10 ⁸	1,0x10 ⁸
77 –80	5,3x10 ⁸	1,7x10 ⁸	2,6x10 ⁸	3x10 ⁸
81 –83	1,5x10 ⁶	1,2x10 ⁶	3,4x10 ⁶	4,1x10 ⁶
84 –85	3,1x10 ²	1x10 ¹	8x10 ¹	2,5x10 ²
86 –88	4±1,2	-	1±0,1	1,5x10 ¹
88-90	-	-	-	-
Контроль фага	4x10 ⁸	5x10 ⁸	1x10 ⁸	1x10 ⁸
Контроль культуры	Рост бактерий	Рост бактерий	Рост бактерий	Рост бактерий

ных бактериофагов были проведены по методике, предложенной М. Адамс (1961); Д.М. Гольдфарб (1961); И.М. Габрилович (1973). Результаты исследования представлены в таблице 4.

Полученные данные свидетельствуют о выраженной устойчивости фагов к воздействию высокой температуры в 80 °С.

Хлороформ является хорошим средством для освобождения фаголизата от жизнеспособных бактерий. Определение чувствительности бактериофагов и бактерий проводили путем обработки фаговой суспензии и бульонной культуры эшерихий хлороформом в соотношении 1:10 при постоянном встряхивании. Обработка бактерий E.coli O157 из индикаторных штаммов РЛ, № 904, № 51659 в течение 17 минут хлороформом приводила к их полной инаktivации. Бактериофаги проявили выраженную устойчивость к воздействию хлороформа. При его воздействии на фаголизаты в течение 40 минут существенного уменьшения активных фаговых корпускул в 1 мл не наблюдалось.

Литические ферменты бактериофагов играют существенную роль в процессе фаговой инфекции. Литический фермент, образующийся в бактериальной клетке, проявляется на плотной питательной среде вокруг негативных колоний, обработанных хлороформом. Отмечено, что характер ореолов имеет таксономическое значение для ряда бактериофагов (Габрилович, 1973; Жугова, 1985; Васильев, Золотухин и др., 2003). Определение свободного литического фермента определяли по методике описанной Д.М. Гольдфарбом и В.А. Зуевым (1963). По показателям образования литического фермента бактериофаги E.coli O157 мы

распределили в 2 группы. В 1 отнесли фаг Е-61 УГСХА и Е-2 УГСХА, по характеру проявления свободного литического фермента они однотипны и образую вокруг негативных колоний ореолы крупных размеров от 5 до 7 мм, больше, а фаг Е-3 УГСХА и Е-67 УГСХА образуют ореолы мелких размеров от 2,6 до 3,3 мм.

Для электронно-микроскопических исследований использовали лизаты бульонных культур *E. coli* O157 с бактериофагами Е-61 УГСХА, Е-2 УГСХА, Е-3 УГСХА, Е-67.

Электронно-микроскопические исследования проводили по методике, предложенной А.П. Пономаревым, О.Г. Андреевой, Т.Н. Артамоновой (2002). Методика отработана для работы с вирусами и успешно применяется при подготовке препаратов для электронной микроскопии. В результате проведенных исследований было установлено, что вирионы фага имеют структуры, состоящие из головки в форме растянутого многогранника и имеет цилиндрическую форму. Концевая структура отростка ограничивается базальной мембраной, от которой отходят короткие нити. Единичные вирионы имеют отросток в сокращенном состоянии то есть чехол отростка укорачивается и расширяется. При этом просматривается внутренний стержень отростка.

Вирусные частицы имеют следующие размеры: диаметр головки: 68 нм, высота – 106 нм и длина отростка – 135 нм. Отношение высоты головки к её диаметру равно 1, 55, что позволяет заключить о растянутости многогранника частиц данного фага.

Таким образом, в соответствии с морфологическими параметрами изучаемые фаги Е-61 УГСХА, Е-2 УГСХА, Е-3 УГСХА, Е-67 УГСХА согласно Международной классификации и номенклатуре вирусов относятся к семейству *Myoviride* (F.A. Murphy и др., 1995), а по классификации А.С.Тихоненко - к V морфологической группе: «Фаги с отростком сложного строения, чехол которого способен к сокращению» (Тихоненко, 1968).

Используя строгую специфичность селекционированных нами бактериофагов по отношению к патогенным штаммам *E.coli* O157 мы разработали схему выделения и ускоренной идентификации этих микроорганизмов и сравнили ее со схемой бактериологического исследования патологического материала, изложенной в действующих «Методических указаниях по бактериологической диагностике колибактериоза (эшерихиоза) животных», утверж-

денные Департаментом ветеринарии МСХ и П РФ 27.07.2000. Результаты исследований представлены на схеме 1.

Результат исследований считали положительным, если на месте нанесения одного или трех штаммов фагов на газоне сплошного роста культуры образовывалась прозрачная зона лизиса с вторичным ростом фагорезистентных микроорганизмов или без него, а также рост негативных колоний фага. Отрицательным считали результат при отсутствии лизиса на газоне роста исследуемой культуры микроорганизмов и отсутствии лизиса в контроле. При положительном результате культуру относили к виду *E.coli* O157. В результате проведенных исследований из всех 12 проб фекалий были выделены исходные культуры эшерихий, принадлежащих к серогруппе O157, о чем свидетельствовали результаты изучения их ферментативных и антигенных свойств.

Предлагаемая нами схема позволяет выделить и идентифицировать *E.coli* O157 за 48 часов (2 суток), тогда как срок бактерио-

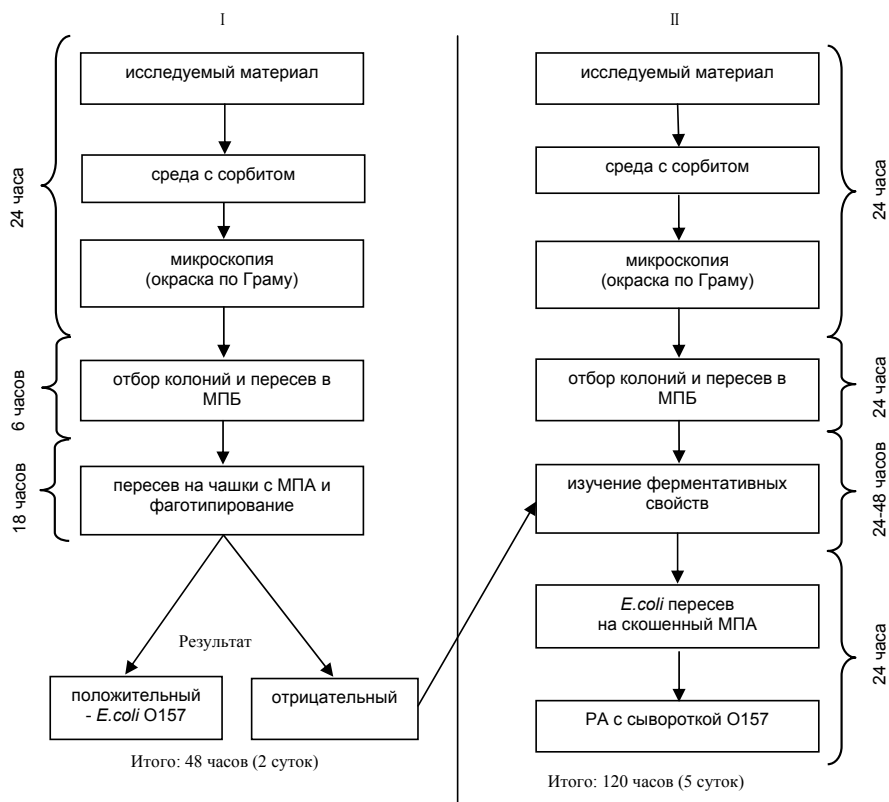


Схема 1. Выделение и ускоренная идентификация *E.coli* O157 с помощью селекционированных нами бактериофагов (I) в сравнении со схемой бактериологического исследования, изложенной в "Методических указаниях по бактериологической диагностике колибактериоза (эшерихиоза) животных" (II)

логического исследования по схеме изложенной в «Методических указаниях по бактериологической диагностике колибактериоза (эшерихиоза) животных» составил 120 часов (5 суток) при большей затрате посуды и реактивов.

При разработке оптимальных условий постановки РНФ необходимо прежде всего: а) иметь биопрепарат из штаммов бактериофагов, обладающих строгой специфичностью и наибольшим совместным спектром литической активности; в) определить количественный показатель реакции, имеющий диагностическое значение; с) определить оптимальное время, обеспечивающее полноценное взаимодействие фага с бактериями. Нами было установлено, что спектр активности бактериофагов Е-61 и Е-67 УГСХА равен 100%, они обладают высокой литической активностью по Аппельману 10^{-7} и по Грациа от $1,5 \times 10^9$ до $3,2 \times 10^9$, а также высокой температурной устойчивостью до 80 °С и проявили 100 % устойчивость к воздействию хлороформа в течение 40 минут.

Определение параметров постановки РНФ и разработки количественного показателя реакции, имеющего диагностическое значение, проводили по методу, предложенному В.Д. Тимаковым и Д.М. Гольдфарбом (1962). Проведены эксперименты с использованием МПБ контаминированного 18 часовыми референс культурами *E.coli* O157 штамм РЛ для фага Е-61 УГСХА и *E.coli* O157 штамм № 51659 для фага Е-67 УГСХА различным числом (от 10^1 до 1×10^5 м.к./мл). В качестве контроля использовали интактный МПБ.

Учет результатов проводили через 12-16 часов инкубирования. С этой целью подсчитывали число негативных колоний фага, выросших на питательной среде в опытной пробе и в контроле (контроль титра фага). Оценку РНФ проводили согласно таблицы 5. В случае наличия в исследуемом материале свободного фага число корпускул свободного фага число корпускул фага на чашке подсчитывали и вычитали из числа корпускул индикаторного фага в опытных чашках. Разницу сравнивали с контролем. При высоком титре свободного фага (сплошной лизис индикаторной

Табл. 5. Показатели увеличения титра фага в РНФ.

Увеличение количества частиц бактериофага в опытной по отношению к его контролю	Оценка результатов
Увеличение до 2.5 раз	Отрицательная
Увеличение до 5 раз	Сомнительная
Увеличение в 5 и более раз	Положительная

культуры) реакция не учитывалась. РНФ, оцененная как сомнительная, не имела диагностического значения.

В случае наличия в исследуемом материале свободного фага число корпускул фага По результатам проведенных опытов установлено, что количество фаговых частиц более чем в 5 раз превышает количество фаговых частиц в контрольных пробах при контаминации МПБ *E.coli* O157 в концентрации 10^3 микробных клеток эшерихий в 1 мл МПБ.

Для установления оптимального времени, обеспечивающего наиболее полноценное взаимодействие фага с бактериями. проводили эксперименты на тест-объекте по выявлению наиболее эффективного временного показателя взаимодействия фага и индикаторной культуры при сохранении остальных параметров (температурный режим, концентрация бактериальной культуры и фаговых корпускул в 1 мл) постановки РНФ. В качестве тест-объекта использовали МПБ, оптимальное время экспозиции выбирали из шести следующих параметров:

- в предварительном подращивании исследуемого материала в течение 5, 16, 24 часов при температуре 37 °С, после добавления фагов смесь выдерживали в течение 5 часов при температуре 37 °С;
- в увеличении времени контакта исследуемого материала с фагом до 10, 16 и 24 часов при температуре 37 °С.

Для изучения чувствительности РНФ в зависимости от времени подращивания МПБ контаминировали бактериями *E.coli* O157 в контаминации 10^1 - 10^5 м.к/мл и инкубировали в термостате при температуре 37 °С в течение 5, 16 и 24 часов. Результаты исследования представлены в таблице 6.

Установлено, что при подращивании материала в течение 5-ти часов позволяет обнаружить эшерихии с помощью РНФ в концентрации 10^3 м.к./мл. При подращивании исследуемого материала в течение 16 часов чувствительность реакции повышается и позволяет обнаружить бактерии в количестве 10^2 м.к/мл. На проведение исследования затрачивается 32 часа. Бактериологическим методом это же количество эшерихий обнаружить не удавалось. При подращивании исследуемого материала в течение 24 часов чувствительность реакции не увеличивается, также позволяет обнаружить бактерии в количестве 10^2 м.к/мл. На проведение этого варианта реакции необходимо 40 часов.

Во втором варианте опыта МПБ, контаминированный E.coli O157 штаммами РЛ и № 51659 от 10^1 до 10^5 м.к./мл не подращивали, а увеличивали время контакта материала с фагом до 10, 16, 24 часов. Результаты представлены в таблице 7.

По результатам изучения чувствительности РНФ в зависимости от времени инкубирования исследуемого материала с фагом установлено, что увеличение времени до 10-ти часов позволяет обнаружить эшерихии с помощью РНФ в концентрации 10^3 м.к./мл. При инкубировании исследуемого материала с фагом в течение 16 часов чувствительность реакции повышается, что позволяет обнаружить бактерии в количестве 10^2 м.к./мл. На проведение исследования затрачивается 32 часа. Бактериологическим методом это же количество эшерихий обнаружить не удавалось. При инкубировании с фагом исследуемого материала в течение 24 часов чувствительность реакции не увеличивается и позволяет обнаружить бактерии в количестве 10^2 м.к./мл. На проведение этого варианта реакции необходимо 40 часов. Бактериологическим методом E.coli O157 удавалось обнаружить в концентрации 10^4 м.к./мл, на проведение исследования затрачивается 96 часов.

На основании наших данных, считаем, что наиболее эффективными являются режимы РНФ при 5 часовой экспозиции иссле-

Табл. 6. Чувствительность РНФ в зависимости от времени подращивания исследуемого материала, контаминированного E.coli O157

№ п.п.	Варианты исследований	Минимальное количество эшерихий, обнаруживаемое с помощью		Время, затраченное на проведение исследований (в часах)	
	Длительность подращивания исследуемого материала	РНФ	бак. метод	РНФ	бак. метод
	часы	МПБ	МПБ	МПБ	МПБ
Е-61	5	10^3	10^4	22	96
	16	10^2	н.о	32	н.о
	24	10^2	н.о	40	н.о
Е-67	5	10^3	10^4	22	96
	16	10^2	н.о	32	н.о
	24	10^2	н.о	40	н.о

Табл. 7. Чувствительность РНФ в зависимости от времени инкубирования исследуемого материала с фагом Е-61 УГСХА.

№ п.п.	Варианты исследований	Минимальное количество эшерихий, обнаруживаемое с помощью		Время, затраченное на проведение исследований (в часах)	
	Длительность подращивания исследуемого материала	РНФ	бак. метод	РНФ	бак. Метод
	часы	МПБ	МПБ	МПБ	МПБ
Е-61	10	10^3	10^4	22	96
	16	10^2	н.о	32	н.о
	24	10^2	н.о	40	н.о
Е-67	10	10^3	10^4	22	96
	16	10^2	н.о	32	н.о
	24	10^2	н.о	40	н.о

дуемого материала с фагом, когда удастся провести индикацию бактерий в количестве 10^3 в миллилитре исследуемого субстрата, на исследование которого затрачивается 16-18 часов, поэтому данный режим используем в дальнейших исследованиях, хотя наиболее эффективным по чувствительности является инкубирование исследуемого материала с фагом в течение 16 часов на которое затрачивается до 32 часов.

В последние годы исследователи уделяют большое внимание проблеме обнаружения патогенных микроорганизмов в объектах внешней среды: в воде, кормах и фекалиях. Эти субстраты, подвергающиеся постоянному загрязнению выделениями больных животных и людей, в эпизоотологическом и эпидемиологическом отношениях заслуживают особого внимания. По мнению ряда исследователей *E.coli* O157 не только длительное время сохраняют свою жизнеспособность в объектах внешней среды, но и способны размножаться в них.

Поэтому разработка и внедрение в практику более простых и надежных методов обнаружения данного возбудителя в объектах внешней среды не теряют своей актуальности.

Для определения возможности использования РНФ для обнаружения *E.coli* O157 в объектах внешней среды использовали образцы воды, комбикорма и фекалий.

Пробы образцов (водопроводная вода, комбикорм, фекалии) вносили в колбы объемом 100 мл вносили в колбы и контаминировали *E.coli* O157 штамм РЛ и №51659 в концентрации 10^5 ; 10^4 ; 10^3 ; 10^2 ; 10^1 м.к./мл, заливали МПБ из расчета 10 мл бульона на 1 мл (г). Исследования проводили по методу предложенному В.Д. Тимаковым и Д.М.Гольдфарбом (1962).

Нами установлено, что увеличение титра фагов Е-61 УГСХА и Е-67 УГСХА более чем в 5 раза произошло уже при концентрации 10^3 микробных клеток эшерихий в 1 мл взвеси водопроводной воды, комбикорма и фекалий.

Согласно литературным данным, заражение людей *E.coli* O157 происходит чаще всего при употреблении пищевых продуктов, в том числе мясных, которые не подвергались достаточной термической обработке, поэтому разработка методов вышеуказанных микроорганизмов в мясе и других продуктах питания имеет актуальное значение (Bitzan, et al, 1993).

Кусочки свинины массой 5-10 г растирали в стерильной фарфоровой ступке, контаминировали *E.coli* O157 штаммами РЛ и №51659 в концентрации 10^5 ; 10^4 ; 10^3 ; 10^2 ; 10^1 м.к. в 1 г вносили в колбы объемом 100 мл, заливали МПБ из расчета 10 мл бульона на 1 г. Для контроля использовали пробу мяса, не контаминированного бактериями *E.coli* O157. Дальнейшие исследования проводили по методу, предложенному В.Д. Тимаковым и Д.М.Гольдфарбом (1962). Учет результатов проводили согласно показателям таблицы 5.

По результатам проведенных опытов установлено, что увеличение титра фага Е-61 УГСХА и Е-67 УГСХА более чем в 5 раз произошло уже при контаминации 10^3 микробных клеток эшерихий на 1 г мяса.

Основываясь на полученных данных можно отметить, что РНФ является высокочувствительным методом индикации, позволяющим обнаружить *E.coli* O157 даже в тех биосубстратах, которые содержат обильную сопутствующую разнообразную микрофлору и выделение культуры в чистом виде очень затруднено.

В результате проведенных исследований из объектов внешней среды было выделено 5 расов фагов активных по отношению к эшерихиям серогруппы O157. Разработана схема выделения и ускоренной идентификации бактерий *E.coli* O157 с использованием выделенных фагов. Разработана схема ускоренной индикации *E.coli* O157 в объектах ветеринарного надзора с помощью РНФ с использованием созданного биопрепарата. Разработаны технологические параметры изготовления и контроля набора бактериофагов для индикации *E.coli* O157 и диагностики эшерихиоза.

Выделены и селекционированы специфичные бактериофаги, активные в отношении патогенных штаммов эшерихий серологической группы O157. Два выделенных и изученных штамма депонированы в лаборатории бактериальных инфекций ВГНКИ, признаны перспективными и рекомендованы для изготовления диагностического и лечебно-профилактического препаратов. Разработаны: – «Временная инструкция по изготовлению и контролю лабораторной серии индикаторных бактериофагов *E.coli* O157 Е-61 УГСХА и Е-67 УГСХА», «Методические рекомендации по ускоренной индикации методом реакции нарастания титра фага (РНФ) энтерогеморрагической кишечной палочки *E.coli* O157 в

патологическом материале, пищевых продуктах, кормах и объектах внешней среды», «Методические рекомендации по выделению и фаготипированию энтерогеморрагической кишечной палочки *E.coli* O157 из патологического материала, кормов, пищевых продуктов и объектов внешней среды с применением диагностических бактериофагов Е-61 УГСХА и Е-67 УГСХА». Они одобрены ученым советом и утверждены ректором академии 16.02.04 г.

ЛИТЕРАТУРА

1. Адамс, М. Бактериофаги. /М.Адамс. – Москва, . 1961. – С. 521.
2. Адельсон, Л.И. Бактериофаги, активные по отношению к энтеропатогенным кишечным палочкам. / Л.И Адельсон. // Вопросы микробиологической диагностики и бактериофагии. 1962. – С. 184-194.
3. Васильев, Д.А., Померанцев, Д.А. Схема бактериологического выделения и идентификации *Yersinia enterocolitica*. / Д.А. Васильев, Д.А. Померанцев // Методы частной бактериологии. – Ульяновск, 1999. – С. 147-152.
4. Габрилович, И.М. Биологические свойства бактериофагов *Serratia marcescens*. / И.М Габрилович // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 1992. – С. 10-12.
5. Габрилович, И.М. Общая характеристика бактериофагов. /И.М. Габрилович // Основы бактериофагии. – Минск, 1973. – С.5-24.
6. Ганюшкин, В.Я. Бактериофаги сальмонелл и их применение в ветеринарии. / В.Я. Ганюшкин // Учебное пособие. – Ульяновск, 1988. – С. 45.
7. Гольдфарб, Д.М. Бактериофагия. / Д.М. Гольдфарб. – М.: Медгиз, 1961. – С. 297.
8. Жугова, Т.Ч. Бактериофаги *Yersinia enterocolitica*. /Т.Ч. Жугова //Автореф. дис. канд. мед. наук. – Минск, 1985. – С. 21.
9. Золотухин, С.Н. Бактериофаги *M.morganii* и их применение при желудочно-кишечных заболеваниях поросят.: Автореферат дис. канд. вет. наук. - Ульяновск, 1994.
10. Колпикова, Т.И., Бакулов, И.А., Котляров, В.М. Перспективы практического применения листериозных бактериофагов. / Т.И. Колпикова, И.А. Бакулов, В.М. Котляров. Вопросы ветеринарной вирусологии, микробиологии и эпизоотологии. //Материалы научной конференции ВНИИВиМ. – Покров, 1992. – Часть 11. – С. 211-212.
11. Колпикова Т.И., Бакулов И.А., Котляров В.М. Фаготипирование листерий. / Т.И. Колпикова, И.А. Бакулов, В.М. Котляров. Ветеринария. 1990. – №6. – С.31-32.
12. Методические указания по методу выделения и идентификации энтерогеморрагической кишечной палочки *E.coli* O157:H7, утвержденные главным государственным санитарным врачом Российской Федерации, 2001.
13. Пономарев, А.П., Андреева, О.Г., Артамонова, Т.Н. Электронно-микроскопическое выявление вирусов животных в неконцентрированных вирусосодержащих суспензиях. / А.П.Пonomarev, О.Г. Андреева, Т.Н. Артамонова. Вестник РАСХН. 2002. – №2. – С. 74-77.
14. Покровский, В.И., Полоцкий, Ю.Е., Ющук, Н.Д., Бондаренко, В.М. / Журн. микробиол. 1989. – № 4. – С. 80-87.
15. Ратинер, Ю.А., Канарейкина, С.К., Бондаренко, В.М. / Журнал микробиологии. 1976. - № 5. – С. 117-121.
16. Русалиев В.С. Фагочувствительность аэробных спорообразующих бактерий. /В.С.Русалиев. Ветеринария. 1990. – №8. – С. 29-30.
17. Тихоненко, А.С. Ультраструктура вирусов бактерий. /А.С.Тихоненко – М.: Наука, 1968. – С. 89.
18. Тугаринов, О.А., Пирожков, М.К., Малахов Ю.А Сборник научных трудов. /О.А. Тугаринов, М.К.Пирожков, Ю.А. Малахов. – М.:ВГНКИ. 2001. –Т.62. – С. 68-75.
19. Чинашвили, Т.Г. К механизму образования фагоустойчивых форм микроорганизмов. /Т.Г.Чинашвили В кн.: Вопросы молекулярной генетики микроорганизмов. –М. 1968. – С. 225.
20. Armstrong, G.L., Hollingsworth, J., Morris, J.G. Persistence of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy cattle and the dairu farm environment. / G.L.Armstrong, J. Hollingsworth, J.G. Morris. Epidemiol. Rev. 1996. –V. 18. –. P.29 – 51.
21. Easton, Louise. *Escherichia coli* O157: Occurrence, transmission and laboratory detection. /Easton, Louise Brit. J. Biomed. Sci. 1997. –V. 54. –№ 1. – P. 57-64.
22. Cantey, J.R.Growth and processing conditions affecting acid tolerance in *Escherichia coli* O157:H7. / Cantey, J.R. Gastroent Clin. N. Amer. 1993. – V. 22. – P. 609-622.
23. Cieslak, Paul, R., Barrett, Timothy, J., Griffin, Patricia, M., Censheimer, Kathleen, F., Beckett, Geoff Buffington Joanna, Smith M. Geoffrey. *Escherichia coli* O157:H7 infection from a manured garden. // Lancet. 1993. – № 8867. – P. 367-368.
24. Murphy, F.A.. Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. / F.A.Murphy, Spingerverlad Wien New York. – P.1995. – 586.

25. Riley, L.W., Remis, R.S., Helgerson, S.D. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* / L.W. Riley, R.S. Remis, S.D. Helgerson. *New Engl. J. Med.* 1983. – V. 308. – P. 681-685.
26. Tuttle, J., Gomez, T., Doyle, M.P., Wells, J.G., Zhao, T., Tauxe, P.V., Griffin, P.M. Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. / J.Tuttle, T.Gomez, M.P.Doyle, J.G.Wells, T. Zhao, P.V.Tauxe, P.M.Griffin,. *Epidemiol.fnd Infec.*, 1999. –V. 122, –№2. –P.185-192.

ПОЖАРНИКОВА Е.Н.

2.8. ВЫДЕЛЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ ОСНОВНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БАКТЕРИОФАГОВ ENTEROBACTER

POZHARNIKOVA E.N. ISOLATION AND STUDY OF THE MAIN QUALITIES
OF ENTEROBACTER PHAGES

Бактерии рода *Enterobacter* выделяют от больных животных и людей при острых желудочно-кишечных заболеваниях, инфекциях желчных и мочевыводящих путей, гнойных поражениях кожи, мозговых оболочек при сепсисе, внутрибольничных инфекциях. Эти микроорганизмы вызывают 5 - 10 % госпитальных бактериемий (Покровский, Дунаевский, 2001). Имеются данные о выделении патогенных штаммов *Enterobacter* из отдельных хозяйств при массовых диарейных заболеваниях телят и поросят (Воронин, Дервишов, 1989; Каврук, 1994; Золотухин, 1996; 2004).

Бактерии *Enterobacter* выделены неоднократно у больных с невыясненной этиологией острых кишечных заболеваний при различных диагнозах (кишечная дизентерия, простая или токсическая диспепсия, энтерит, гастроэнтерит), а также у больных с травмой черепа и развитием менингита. Нередко эти микроорганизмы выделяли из крови больных с клиникой сепсиса (Покровский, Дунаевский, 2001).

Исследователи, работающие в области лабораторной диагностики энтеробактериозов, подчеркивают трудность выделения бактерий рода *Enterobacter* из организма и различных субстратов. Возникает необходимость разработки более эффективных и менее трудоемких методов идентификации бактерий рода *Enterobacter*.

Об успешном использовании бактериофагов для лабораторной диагностики некоторых инфекционных заболеваний и индикации возбудителя в объектах внешней среды сообщают многие

исследователи (Золотухин с соавт., 2005; Перелыгин с соавт., 2005; Натидзе с соавт., 2005; Каллавей с соавт., 2005).

Проблеме выделения и изучения бактериофагов посвящено большое число работ, однако недостаточно изучены бактериофаги бактерий рода *Enterobacter*, которые имеют этиологическое значение в патологии животных и человека.

В настоящее время лабораторная диагностика заболеваний, вызванных бактериями рода *Enterobacter*, основана на выделении чистой культуры микроорганизмов и их идентификации по биохимическим свойствам (Покровский, Поздеев, 1999). Этот метод трудоемок, требует выделения чистой культуры, затрат времени, питательных сред и реактивов. Использование метода фагодиагностики позволяет сократить время постановки диагноза с нескольких суток до 19 – 40 часов (Земцова, 1965; Тимаков, Гольдфарб, 1956, 1962). Что говорит об актуальности исследований бактериофагов бактерий рода *Enterobacter* и изучения возможности их применения в диагностических целях.

Целью исследований являлась разработка параметров и технологических приемов по индикации и идентификации бактерий рода *Enterobacter* в объектах внешней среды с помощью специфических бактериофагов.

Материалы и методы

Штаммы: В работе использованы 21 штамм бактерий рода *Enterobacter*, 114 штаммов гетерологичных родов *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Escherichia*, *Proteus*, *Yersinia*, *Salmonella*, *Morganella*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, полученные из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии, Всероссийского государственного центра качества и стандартизации лекарственных препаратов для животных и кормов (ВГНКИ), выделенные из объектов окружающей среды и патологического материала. 21 изолят бактериофагов бактерий рода *Enterobacter*, выделенные из объектов окружающей среды.

Методы. В исследованиях для выделения бактерий рода *Enterobacter* мы использовали методы, приведенные в «Методических указаниях по бактериологической диагностике смешанной кишечной инфекции молодняка животных, вызываемой па-

тогенными энтеробактериями», утвержденными Департаментом ветеринарии МСХ и П 11 октября 1999 года.

Выделение бактериофагов проводили по методам, предложенным Л.И. Адельсон (1957; 1962), С. Лурия, Д. Дарнел (1970), И.П. Ревенко (1978), В. Я. Ганюшкин (1988), С.В. Ленев (1991). Изучали биологические свойства фагов по методам, предложенным М. Адамс (1961), Д.М. Гольдфарб (1961), А.С. Тихоненко (1968), И.М. Габрилович (1992), В.Я. Ганюшкин (1988), Н.-W.Ackermann (1997). Селекцию бактериофагов и повышение их литической активности проводили по методике, описанной и использованной И.М. Габриловичем (1992), С.Н. Золотухиным (1994). Обнаружение бактерий рода *Enterobacter* в объектах окружающей среды проводили с помощью РНФ. Реакцию нарастания титра фага ставили по методике В.Д. Тимакова и Д.М. Гольдфарба (1961), В.Я. Ганюшкин (1988).

Статистическую обработку результатов исследований проводили общеприняты статистическими методами (Ашмарин, Воробьев, 1962; Бейли 1962).

Поиск и селекция бактериофагов

Для выполнения исследований необходимо выделить и изучить бактериофаги, активные в отношении бактерий рода *Enterobacter*.

Первоначально мы исследовали имеющиеся штаммы *Enterobacter* на наличие профага. В первой серии опытов мы использовали методику, предложенную Д.М. Гольдфарбом (1961), для выделения бактериофагов без воздействия индуцирующего фактора. Результаты исследований свидетельствуют, что культуры *Enterobacter* в опытах по выделению фагов без воздействия на них индуцирующего фактора не проявили лизогенных свойств. Во второй серии опытов на культуры *Enterobacter* воздействовали индуцирующим фактором (Лурия, Дарнелл, 1970). В качестве индуцирующего фактора применяли воздействие на бактерии ультрафиолетовыми лучами и хлороформом. Облучение суточных культур проводили в течение 10, 20, 30 и 40 минут при помощи прибора «Изольда» с ртутной лампой ДРБ8, 18 % мощности которой приходится на область 254 нм. Параллельно культуры обрабатывали суспензией хлороформом из расчета 10:1. В наших исследованиях имеющиеся штаммы рода *Enterobacter* по-

сле воздействия ультрафиолетового облучения и хлороформа не проявили лизогенных свойств. Резюмируя полученные данные, можно утверждать, что мы не обнаружили явления лизогении у исследуемых культур.

Следующим этапом наших исследований стало выделение бактериофагов *Enterobacter* из объектов внешней среды (Гольдфарб, Тимаков, 1961). Материалом для выделения являлись сточные воды и фекалии животных свиноводческих и молочно-товарных ферм, частных хозяйств Ульяновской и Самарской областей. В результате исследований сточных вод удалось по указанной схеме выявить 21 изолят фагов. Селекцию бактериофагов и повышение их литической активности проводили пассированием фага на индикаторной культуре с периодической отбивкой типичных негативных колоний по методике, описанной и использованной И.М. Габриловичем (1992), С.Н. Золотухиным (1994). В результате проведенных опытов, нами было выделены и отсеlectionированы 21 штамм фагов бактерий рода *Enterobacter*.

Характеристика фагов *Enterobacter*

а) Морфология негативной колонии. Для определения морфологии негативной колонии мы высевали фаг в разведении 10^{-7} – 10^{-9} степени на чашки методом агаровых слоев. Для формирования газона на поверхности агара использовали штамм *Enterobacter*, на которые фаг был выделен. Посевы культивировали в термостате при температуре 37°C. Изучение морфологии негативных колоний проводили через 24 часа.

Негативные колонии разделили на два типа. К первому относятся негативные колонии круглые прозрачные диаметром более 3 мм с зоной неполного лизиса по периферии шириной 0,5 – 4 мм. Негативные колонии первого типа формируют фаги En-1 УГСХА, En-2 УГСХА, En-3 УГСХА, En-4 УГСХА, En-5 УГСХА, En-6 УГСХА, En-7 УГСХА, En-8 УГСХА, En-10 УГСХА, En-14 УГСХА, En-19 УГСХА. Колонии второго типа круглые прозрачные с ровными краями имеют диаметр до 3 мм, отличаются отсутствием зоны неполного лизиса. Колонии второго типа образуются фагами En-9 УГСХА, En-11 УГСХА, En-12 УГСХА, En-13 УГСХА, En-15 УГСХА, En-16 УГСХА, En-17 УГСХА, En-18 УГСХА, En-20 УГСХА, En-21 УГСХА.

б) Литическая активность. Литическая активность бактериофага оценивают по его способности вызывать лизис бактериальной культуры и выражают это тем максимальным разведением, в котором испытуемый фаг проявил свое литическое действие. Более точным методом оценки активности бактериофага является определение количества активных корпускул фага в единице объема. Активность исследуемых бактериофагов варьировала от 2×10^5 до $1,6 \times 10^{10}$ корпускул в 1 мл.

По исследованным параметрам принято решение для конструирования диагностического набора фагов отобрать наиболее активные из них: En - 1 УГСХА, En - 2 УГСХА, En - 3 УГСХА, En - 5 УГСХА, En - 6 УГСХА, En - 7 УГСХА, En - 13 УГСХА.

в) Спектр литической активности бактериофагов Enterobacter. К основным биологическим свойствам бактериофага, имеющим важное практическое и теоретическое значение, относится диапазон литической активности – это спектр лизиса гомологичных фагу бактерий по серологической группе. Определение спектра литической активности проводили методом нанесения капель бактериофага на газон изучаемой культуры (В.Я. Ганюшкин, 1988).

Табл. 1. Литическая активность фагов бактерий рода Enterobacter

№ п.п.	Фаг	Индикаторная культура	Активность по Аппельмана, степень разведения	Активность по Грациа, корпускул в 1 мл
1	En-1 УГСХА	<i>E. cloacae</i> № 10005	10^{10}	9×10^5
2	En-2 УГСХА	<i>E. cloacae</i> № 10005	10^9	$1,2 \times 10^9$
3	En-3 УГСХА	<i>E. cloacae</i> № 10005	10^8	$1,6 \times 10^9$
4	En-4 УГСХА	<i>E. cloacae</i> № 10005	10^8	3×10^7
5	En-5 УГСХА	<i>E. cloacae</i> № 10005	10^9	3×10^5
6	En-6 УГСХА	<i>E. cloacae</i> № 10005	10^8	3×10^5
7	En-7 УГСХА	<i>E. cloacae</i> № 10005	10^7	1×10^9
8	En-8 УГСХА	<i>E. cloacae</i> № 10005	10^5	1×10^5
9	En-9 УГСХА	<i>E. cloacae</i> № 10005	10^8	2×10^7
10	En-10 УГСХА	<i>E. cloacae</i> № 10005	10^4	4×10^5
11	En-11 УГСХА	<i>E. aerogenes</i> № 2601	10^5	3×10^5
12	En-12 УГСХА	<i>E. aerogenes</i> № 2601	10^7	2×10^5
13	En-13 УГСХА	<i>E. aerogenes</i> № 2601	10^8	$1,6 \times 10^{10}$
14	En-14 УГСХА	<i>E. aerogenes</i> № 2601	10^5	$1,9 \times 10^8$
15	En-15 УГСХА	<i>E. aerogenes</i> № 2601	10^5	4×10^7
16	En-16 УГСХА	<i>E. dissolvens</i> № 802	10^5	1×10^5
17	En-17 УГСХА	<i>E. cloacae</i> № 1487	10^7	5×10^5
18	En-18 УГСХА	<i>E. cloacae</i> № 1487	10^4	2×10^5
19	En-19 УГСХА	<i>E. cloacae</i> № 1487	10^4	4×10^5
20	En-20 УГСХА	<i>E. cloacae</i> № 1487	10^5	3×10^5
21	En-21 УГСХА	<i>E. cloacae</i> № 1487	10^5	2×10^5

Табл. 2. Спектр литической активности бактериофагов Enterobacter

Фар	Культура Enterobacter										Количество штаммов, чувствительных к фалу	% лизируемых штаммов
	<i>E. cloacae</i> №10005	<i>E. cloacae</i> №1487	<i>E. aerogenes</i> №2601	<i>E. dissolvens</i> №802	<i>E. aerogenes</i> №1906	<i>E. dissolvens</i> 212	<i>E. dissolvens</i> №505	<i>E. amnigenus</i> №402	<i>E. dissolvens</i> №420	<i>E. dissolvens</i> №520		
En-1 УГСХА	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	6	60
En-2 УГСХА	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	7	70
En-3 УГСХА	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	6	60
En-4 УГСХА	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	2	20
En-5 УГСХА	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	5	50
En-6 УГСХА	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	2	20
En-7 УГСХА	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	3	30
En-8 УГСХА	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	5	50
En-9 УГСХА	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	3	30
En-10 УГСХА	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	4	40
En-11 УГСХА	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1	10
En-12 УГСХА	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1	10
En-13 УГСХА	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	6	60
En-14 УГСХА	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	7	70
En-15 УГСХА	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	3	30
En-16 УГСХА	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	6	60
En-17 УГСХА	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	2	20
En-18 УГСХА	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	3	30
En-19 УГСХА	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	4	40
En-20 УГСХА	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	4	40
En-21 УГСХА	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	3	30

Табл. 3. Специфичность бактериофагов En - 2 УГСХА и En - 13 УГСХА

№ п.п.	Род	Количество исследуемых штаммов	Фар En - 2 УГСХА	Фар En - 13 УГСХА	Контроль (МПБ)
1	<i>Klebsiella</i>	10	-	-	-
2	<i>Citrobacter</i>	10	-	-	-
3	<i>Escherichia</i>	10	-	-	-
4	<i>Proteus</i>	10	-	-	-
5	<i>Yersinia</i>	10	-	-	-
6	<i>Salmonella</i>	6	-	-	-
7	<i>Morganella</i>	6	-	-	-
8	<i>Pseudomonas</i>	4	-	-	-
9	<i>Bacillus</i>	3	-	-	-
10	<i>Staphylococcus</i>	4	-	-	-
11	<i>Streptococcus</i>	2	-	-	-
12	<i>Enterobacter</i>	10	+	+	-

По сочетанию показателей двух проведенных тестов нами для дальнейших исследований отобрано 2 бактериофага, оказывающих литическое действие в сумме на все имеющиеся культуры и обладающие высокой активностью. Бактериофагами, соответ-

ствующими перечисленным требованиям, являются En-2 УГСХА и En-13 УГСХА.

г) Специфичность действия исследуемых бактериофагов бактерий рода *Enterobacter*. Необходимым условием для применения фагов в диагностических целях является отсутствие литического действия в отношении гетерологичных бактерий (специфичность). В качестве гетерологичных культур использовали бактерии родов *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Escherichia*, *Proteus*, *Yersinia*, *Salmonella*, *Morganella*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*.

Определение видовой специфичности селекционированных бактериофагов проводили нанесением капли на газон культуры. Установлено, что данные фаги не вызывали лизис ни одной из испытываемых культур других видов бактерий.

На основании полученных результатов (табл. 3) можно сделать вывод, о том, что фаги являются специфичными по отношению к бактериям рода *Enterobacter* и не активны к представителям других видов бактерий.

д) Температурная устойчивость выделенных фагов бактерий рода *Enterobacter*. В результате исследований температурной устойчивости фагов En – 2 УГСХА и En – 13 УГСХА было установлено (табл. 4), что прогревание фагов при температуре 60 – 63 °С не оказало влияния на активность фагов. Дальнейшее повышение температуры приводило к потере активности фагов.

Воздействие температуры выше 81 °С полностью инактивируют бактериофаг En - 2 УГСХА, бактериофаг En - 13 УГСХА инактивируется при температуре 87 °С.

Табл. 4. Температурная устойчивость бактериофагов бактерий рода *Enterobacter*

Температурный режим, °С	Активность фагов, подвергнутых температурной обработке, количество активных корпускул в 1 мл	
	Фаг En – 2 УГСХА	Фаг En – 13 УГСХА
60 – 63	8×10^9	1×10^{10}
64 – 67	1×10^9	8×10^8
68 – 70	$1,6 \times 10^9$	2×10^5
71 – 73	$1,7 \times 10^4$	7×10^5
74 – 76	$1,5 \times 10^3$	1×10^5
77 – 79	3×10^2	1×10^4
80 – 82	1×10^1	$2,9 \times 10^3$
83 – 85	-	$2,5 \times 10^3$
86 – 88	-	2×10^2
89 – 91	-	-
92 – 94	-	-
Контроль активности фага	$1,4 \times 10^9$	$1,6 \times 10^{10}$

е) Устойчивость бактериофагов к воздействию хлороформа. Обработывали фаголизат хлороформом в соотношении 1:10 при постоянном перемешивании в течение 10 – 40 минут. После чего определяли активность фаголизата исследуемого фага методом агаровых слоев.

Бактериофаги Еп – 2 УГСХА и Еп – 13 УГСХА проявили выраженную устойчивость к воздействию хлороформа в течение 40 минут. Данные параметры использовали для освобождения фаголизата от жизнеспособных бактерий.

ж) Морфология фаговых корпускул. Подготовку препаратов для электронной микроскопии проводили осаждением вирусных частиц в режиме низкоскоростного центрифугирования (Пономарев, Андреева, Артамонова, 2002). Исследования проводили на электронном микроскопе JEM -100В в лаборатории электронной микроскопии во Всероссийского научно-исследовательского института защиты животных.

Вирусные частицы фага Еп – 2 УГСХА имеют следующий размер: длина отростка – 115 нм, диаметр головки – 74 нм, высота – 80 нм, отношение высоты головки к ее диаметру равно 1,05. Чехол отростка на всем протяжении имеет изогнутую в виде кольца форму (рис.1).

Вирусные частицы фага Еп – 13 УГСХА имеют следующий размер: длина отростка – 125 нм, диаметр головки – 90 нм, отношение высоты головки к ее диаметру равно 1,15, что говорит о растянутости многогранника. Чехол отростка на всем протяжении прямой имеет цилиндрическую форму (рис. 2).

Бактериофаги Еп – 2 УГСХА и Еп – 13 УГСХА проявили выраженную устойчивость к воздействию хлороформа в течение 40 минут. Данные параметры использовали для освобождения фаголизата от жизнеспособных бактерий.

ж) Морфология фаговых корпускул. Подготовку препаратов для электронной микроскопии проводили осаждением вирусных частиц в режиме низкоскоростного центрифугирования (Пономарев, Андреева, Артамонова, 2002). Исследования проводили

Табл. 5. Устойчивость бактериофагов бактерий рода *Enterobacter* к воздействию хлороформа

№ п.п.	Фаги	Активность бактериофага после обработки хлороформом, количество активных корпускул в 1 мл				Контроль активности
		10 мин	20 мин	30 мин	40 мин	
1	Еп – 2 УГСХА	1×10^9	7×10^9	$1,2 \times 10^9$	2×10^9	$1,4 \times 10^9$
2	Еп – 13 УГСХА	1×10^{10}	$1,5 \times 10^{10}$	$1,7 \times 10^{10}$	8×10^9	$1,6 \times 10^{10}$

на электронном микроскопе JEM -100В в лаборатории электронной микроскопии во Всероссийского научно-исследовательского института защиты животных.

Вирусные частицы фага Еп – 2 УГСХА имеют следующий размер: длина отростка – 115 нм, диаметр головки – 74 нм, высота – 80 нм, отношение высоты головки к ее диаметру равно 1,05. Чехол отростка на всем протяжении имеет изогнутую в виде кольца форму (рис.1).

Вирусные частицы фага Еп – 13 УГСХА имеют следующий размер: длина отростка – 125 нм, диаметр головки – 90 нм, отношение высоты головки к ее диаметру равно 1,15, что говорит о растянутости многогранника. Чехол отростка на всем протяжении прямой имеет цилиндрическую форму (рис. 2)

В соответствии с морфологическими параметрами, бактериофаг Еп - 2 УГСХА согласно Международной классификации и номенклатуре вирусов относятся к семейству *Siphoviridae*, по классификации А.С. Тихоненко (1968) – к IV морфологической группе: «Фаги с длинным несокращающимся отростком», а фаг Еп - 13 УГСХА к семейству *Myoviridae* и V морфологической группе: «Фаги с отростком сложного строения, чехол которого способен к сокращению».

Разработка технологических параметров изготовления и контроля индикаторных энтеробактерных бактериофагов. Опытным путем установлено, что оптимальное проведения пассажей при температуре 37 °С для фагов Еп - 2 УГСХА и Еп - 13 УГСХА составляет 6 часов, множественность инфекции фага Еп - 2 УГСХА для установления высокого титра фага составляет 0,3 корпускул

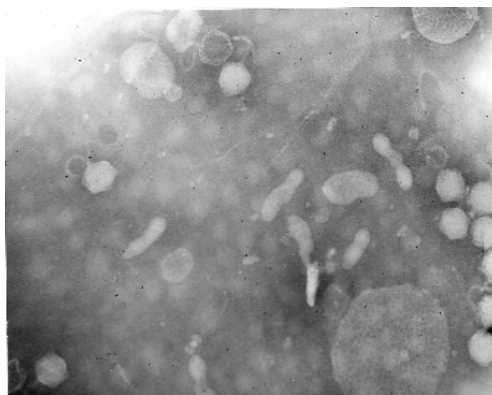


Рис.1. Морфология вирионов бактериофага Еп – 2 УГСХА (увеличение x98000)

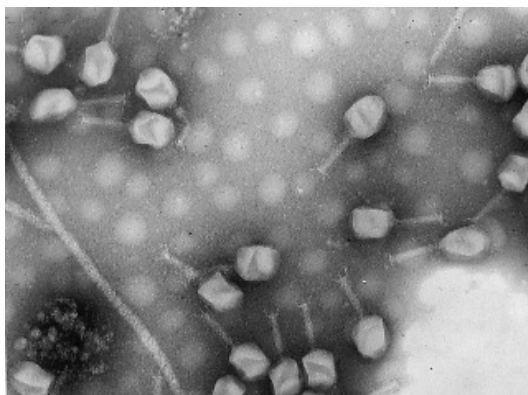


Рис.2. Морфология вириона бактериофага Еп – 13 УГСХА (увеличение x98000)

фага на 1 бактериальную клетку, фага En - 13 УГСХА – 4,5 : 1. Схема пассажей для приготовления индикаторного фага, с учетом оптимальной множественности инфекции, параметры контроля: определение чистоты, литической активности, спектра лизиса, специфичности, степень нарастания тира фага описаны во временной инструкции по изготовлению и контролю лабораторной серии индикаторных бактериофагов бактерий рода *Enterobacter* En – 2 УГСХА и En – 13 УГСХА.

Разработка схемы ускоренной фагоидентификации бактерий рода *Enterobacter*. Используя строгую специфичность индикаторных бактериофагов En - 2 УГСХА и En - 13 УГСХА, мы разработали схему ускоренной идентификации этих микроорганизмов (рис. 3). В исследованиях использовали воду, комбикорм, фекалии и мясо, загрязненные бактериями рода *Enterobacter* в концентрации 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 м.к. в 1 мл. Первичные посевы и выделение чистых культур *Enterobacter* проводили в соответствии с правилами, указанными в «Методических указаниях по бактериологической диагностике смешанной кишечной инфекции молодняка животных, вызываемой патогенными энтеробактериями». В бактериологическом методе культуру идентифицировали по биохимическим свойствам, при фагоидентификации принадлежность культуры роду *Enterobacter* устанавливали по феномену лизиса индикаторными фагами En - 2 УГСХА и En - 13 УГСХА.

Табл. 6. Чувствительность РНФ в зависимости от времени подращивания исследуемого материала, загрязненного бактериями рода *Enterobacter*

№ п.п.	Длительность подращивания исследуемого материала, ч	Бактериофаг En - 2 УГСХА	Бактериофаг En - 13 УГСХА	Время, затраченное на проведение исследований, ч
1	5	10^3	10^3	22
2	16	10^2	10^2	33
3	24	10^2	10^2	41

Табл. 6. Чувствительность РНФ в зависимости от времени инкубирования исследуемого материала, загрязненного бактериями рода *Enterobacter*

№ п.п.	Длительность инкубирования исследуемого материала с фагом, ч	Фаг En - 2 УГСХА	Фаг En - 13 УГСХА	Время, затраченное на проведение исследований РНФ, ч
1	5	10^4	10^3	17
2	7	10^3	10^3	19
3	10	10^2	10^2	22
4	16	10^2	10^2	28
5	24	10^2	10^2	36

Исследования подтверждают возможность идентификации бактерий рода *Enterobacter* индикаторными фагами En - 2 УГСХА и En - 13 УГСХА, срок исследования при этом сокращается с 7 до 2 суток при меньшем расходе сред и лабораторной посуды.

Разработка технологических параметров постановки реакции нарастания титра фага. Следующая поставленная задача заключалась в разработке оптимальных условий постановки РНФ для обнаружения бактерий рода *Enterobacter* в различных субстратах.

Определение количественного показателя РНФ, имеющего диагностическое значение. В первую очередь для постановки РНФ опытным путем установили показатели нарастания титра фагов, имеющие диагностическое значение. В своих исследованиях мы оценивали РНФ как положительную в случае, если увеличение

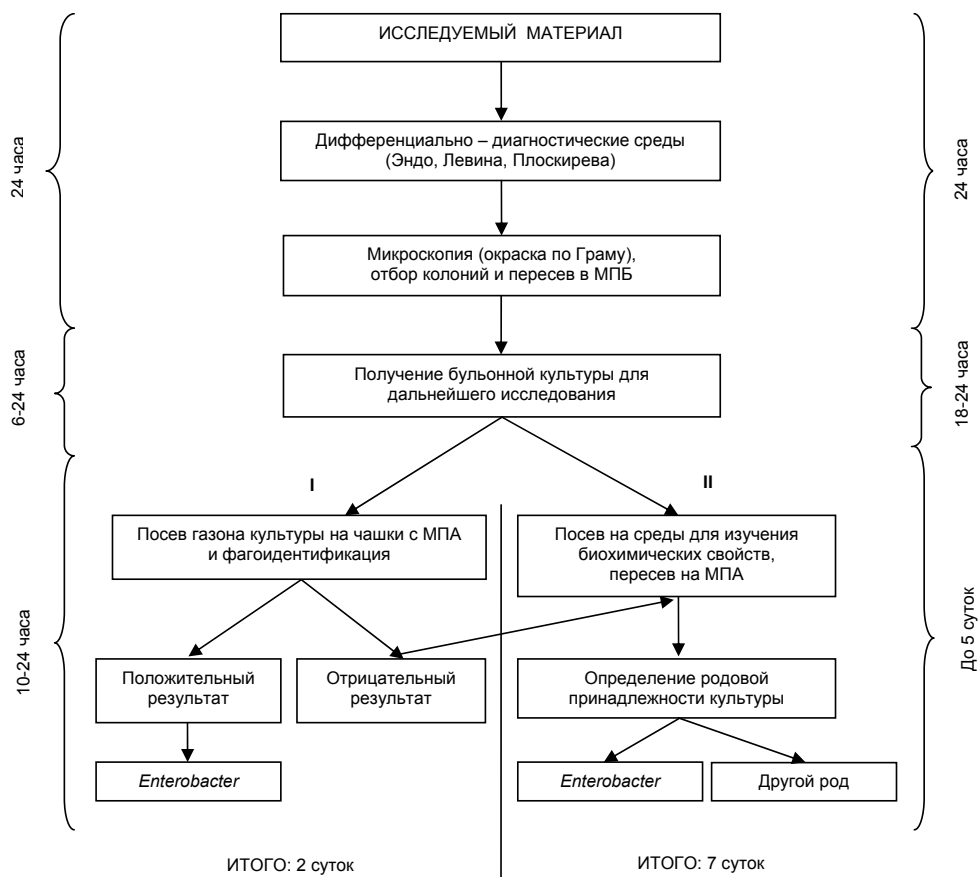


Рис. 3. Выделение и ускоренная идентификация бактерий рода *Enterobacter* с помощью бактериофагов (I) в сравнении с традиционной схемой, изложенной в «Методических указаниях по бактериологической диагностике смешанной кишечной инфекции молодняка животных, вызываемой патогенными энтеробактериями» (II).

титра фагов произошло в 5 и более раз. Выбранный критерий гарантировал достоверность результатов, поскольку он позволял исключить технические погрешности при титровании.

Установление оптимального времени, обеспечивающего наиболее полноценное взаимодействие фага с бактериями. Для решения указанной задачи провели эксперименты на тест-объекте по выявлению наиболее эффективного временного показателя взаимодействия фага и индикаторной культуры при сохранении остальных параметров (температурный режим, концентрация бактериальной культуры и фаговых корпускул в 1 мл) постановки РНФ. Оптимальное время экспозиции выбирали из следующих параметров: предварительном подрачивании исследуемого материала в течение 5, 16, 24 часов при температуре 37 °С, после добавления фагов смесь выдерживали в течение 5 часов при температуре 37 °С; увеличении времени контакта исследуемого материала с фагом до 7, 10, 16, 24 часов при температуре 37 °С.

Установлено, что подрачивание материала в течение 5-ти часов позволяет обнаружить бактерии рода *Enterobacter* в концентрации 10^3 с помощью РНФ с фагами En - 2 УГСХА и En - 13 УГСХА. При увеличении времени подрачивания материала до 16 часов, чувствительность реакции повышается и позволяет обнаружить бактерии в количестве 10^2 м.к./мл. На проведение затрачивается 32 часа.

Во втором варианте опыта мясопептонный бульон, загрязненный бактериями рода *Enterobacter* в концентрации от 10^1 до 1×10^5 м.к./мл не подрачивали, а сразу же вносили в пробирки. По сравнению с 5-ти часовой инкубацией, которая позволяет обнаруживать бактерии *E.coli* № 10005 в концентрации 10^4 м.к./мл, увеличение времени культивирования до 7 часов повышает чувствительность реакции с фагом En - 2 УГСХА до 10^3 , а 10 часовая инкубация – до 10^2 м.к./мл.

На основании проведенных исследований пришли к выводу, что наиболее оптимальным из опробованных является режим реакции нарастания титра фага при 7 часовой инкубации исследуемого материала с фагом, когда удастся провести индикацию бактерий в концентрации 10^3 микробных клеток в 1 мл исследуемого субстрата и общее время составляет 19 часов. При параллельном исследовании исходного материала бактериологи-

ческим методом удалось обнаружить бактерии рода *Enterobacter* в концентрации минимум 10^4 м.к./мл, при этом на исследование затрачивалось 96 часов, увеличение времени опыта на результат влияния не оказало.

Разработка схемы постановки РНФ с индикаторными бактериофагами Еп – 2 УГСХА и Еп – 13 УГСХА для исследования объектов ветеринарного надзора. Мы провели исследования по выяснению возможности использования РНФ для обнаружения бактерий рода *Enterobacter* в объектах ветеринарного надзора (вода, комбикорм, фекалии и мясо). Параллельно исследования велись бактериологическим методом.

По результатам проведенных исследований проб водопроводной воды, комбикорма и мяса установлено, что увеличение титра фагов Е – 2 УГСХА и Е – 13 УГСХА более чем в 5 раз произошло при концентрации бактерии *Enterobacter* 10^3 м.к./г при наличии посторонней микрофлоры.

При исследовании проб фекалий нарастание титра фага более, чем в 5 раз произошло при концентрации *Enterobacter* 10^4 м.к./г. При увеличении времени инкубации фага с материалом до 16 часов удалось индигировать искомые бактерии в концентрации 10^3 м.к./г. за 28 часов.

При исследовании воды, комбикорма, фекалий и мяса нами было обнаружено явное преимущество РНФ перед бактериологическим методом исследования. С помощью РНФ за 19 - 28 часов исследования можно обнаружить бактерий рода *Enterobacter* в исследуемых объектах в количестве 10^3 м.к./г. Бактериологическим методом удавалось обнаружить бактерии рода *Enterobacter* в минимальной концентрации 10^4 , но при этом затрачивается 96 часов.

Производственные испытания. Для оценки эффективности реакции нарастания титра фага в условиях производства нами были проведены исследования по фагодиагностике кишечной инфекции поросят, протекающей с участием бактерий рода *Enterobacter*. Поросята принадлежали ЗАО «СВ-Поволжское» Самарской области. В качестве исследуемого материала использовали 11 проб фекалий от больных диареей поросят в возрасте до двух недель. Одновременно обнаружение бактерий рода *Enterobacter* проводили бактериологическим методом.

При исследовании материала методом реакции нарастания титра фага с использованием диагностического набора бактериофагов бактерии рода *Enterobacter* были обнаружены в трех пробах. Время исследования составило 28 часов. При исследовании 11 проб фекалий от больных диареей поросят, с помощью РНФ бактерии рода *Enterobacter* были обнаружены в 27 % случаях, бактериологическим методом – в 9 %.

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о более высокой чувствительности реакции нарастания титра фага при обнаружении бактерий рода *Enterobacter* в сравнении с бактериологическим методом исследования при меньшей затрате времени и реактивов.

Изучение эффективности сконструированного фагового биопрепарата. Для усовершенствования предложенного метода нами изучалась возможность использования не отдельных монофагов, а их смеси. Определив литическую активность монофагов En – 2 УГСХА и En – 13 УГСХА отдельно и их смеси, мы получили аналогичные результаты. Антагонистический эффект взаимодействия фагов отсутствует. Установлена возможность конструирования биопрепарата, состоящего из двух бактериофагов En – 2 УГСХА и En – 13 УГСХА.

Таким образом, в результате проведенных исследований, предложен биопрепарат-диагностикум, состоящий из фагов En-2 УГСХА и En-13 УГСХА, для идентификации и индикации с помощью реакции нарастания титра фага бактерий рода *Enterobacter* в объектах ветеринарного надзора. Определены оптимальные технологические параметры постановки РНФ, позволяющие повысить эффективность обнаружения бактерий рода *Enterobacter*.

Выводы

Таким образом, в результате исследований, из объектов внешней среды выделен и селекционирован 21 изолят бактериофагов, активных по отношению к бактериям рода *Enterobacter*, изучены их биологические свойства: литическая активность составила от 10^{-4} до 10^{-10} по методу Аппельмана и от 2×10^5 до $1,6 \times 10^{10}$ по методу Грациа, бактериофаги обладали выраженной специфичностью к бактериям рода *Enterobacter* и проявили себя не активными в отношении бактерий гетерологичных родов. Установлено, что два селекционированных бактериофага En - 2 УГСХА и

En - 13 УГСХА имеют совместный спектр активности равен 95 % по отношению к имеющимся штаммам *Enterobacter*, обладают высокой литической активностью по методу Аппельмана 10^{-9} и методу Грация от 2×10^9 до $1,6 \times 10^{10}$, соответственно, а также высокой температурной устойчивостью до 73 °С и устойчивостью к воздействию хлороформом в течение 40 минут. Определена принадлежность фага En - 2 УГСХА семейству *Sihpoviridae* согласно Международной классификации и номенклатуре вирусов, по классификации А.С. Тихоненко (1968) к IV морфологической группе: «Фаги с длинным несокращающимся отростком», фага En - 13 УГСХА – семейству *Myoviridia* и V группе: «Фаги с отростком сложного строения, чехол которого способен к сокращению».

Разработана схема фагоидентификации бактерий рода *Enterobacter* с помощью индикаторных бактериофагов En - 2 УГСХА и En - 13 УГСХА, которая позволяет идентифицировать гомологичные бактерии за 48 часов, что значительно меньше по сравнению с существующими бактериологическими методами (7 суток) при меньшем расходе сред и лабораторной посуды.

Разработаны технологические параметры схемы постановки реакции нарастания титра фага для ускоренной индикации бактерий рода *Enterobacter* в объектах ветеринарного надзора с использованием фагов En - 2 УГСХА и En - 13 УГСХА. Схема позволяет обнаружить в исследуемом материале указанные бактерии в концентрации от 1000 и более микробных клеток в 1 г за 19 – 28 часов.

По итогам работы составлены и утверждены ученым советом и ректоратом УГСХА 17.01.2006 следующие нормативно-технические документы: «Методические рекомендации по выделению и фаготипированию бактерий рода *Enterobacter* из патологического материала, пищевых продуктов, кормов и объектов внешней среды с применением диагностических бактериофагов *Enterobacter* En – 2 УГСХА, En – 13 УГСХА», «Методические рекомендации по ускоренной индикации методом РНФ бактерий рода *Enterobacter* в патологическом материале, пищевых продуктах и объектах внешней среды», «Временная инструкция по изготовлению и контролю лабораторной серии бактериофагов *Enterobacter* En – 2 УГСХА и En – 13 УГСХА».

Два штамма бактериофагов En – 2 УГСХА и En – 13 УГСХА депонированы во «Всероссийском государственном центр каче-

ства и стандартизации лекарственных препаратов для животных и кормов (ВГНКИ)» ветеринарных препаратов и признаны перспективными для конструирования диагностических и лечебно-профилактических препаратов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бактериофаги в ветеринарии: реальность и перспективы / Л. Натидзе [и др.] // Перспективы использования препаратов бактериофагов для превенции и лечения инфекций, вызываемых патогенными и условно-патогенными микроорганизмами: материалы Международного семинара, 10 – 11 ноября 2005. – Тбилиси, 2005. – С. 21.
2. Воронин, Е.С. Этиология и профилактика желудочно-кишечных заболеваний телят / Е.С. Воронин, Д.А. Дервишов // Вестник сельскохозяйственной науки. - 1989. - № 9. - С. 105 - 110.
3. Ганюшкин, В.Я. Бактериофаги сальмонелл и их применение в ветеринарии / В.Я. Ганюшкин. – Ульяновск, 1988. – 45 с.
4. Земцова, И.Н. Применение реакции нарастания титра специфического бактериофага для индикации спор сибиреязвенных бактерий в почве / И.Н. Земцова // В кн.: Вопросы микробиологии и лабораторной диагностики особо опасных инфекций. – Саратов, 1965. – С. 171 – 175.
5. Золотухин, С.Н. Малоизученные энтеробактерии и их роль в патологии животных / С.Н. Золотухин. – Ульяновск, 2004. – С. 64 – 75.
6. Каврук, Л.С. Тесты, критерии и методы ускоренной санитарно-бактериологической оценки репродуктивных помещений животноводческих ферм и пути оптимизации в них микробиоциноза / Л.С. Каврук // Дисс. в форме науч. докл. на соиск. уч. степ. докт. вет. наук. - М., 1994. - 61 с.
7. Медицинская микробиология / главные редакторы акад. РАМН В.И. Покровский, проф. О.К. Поздеев. – М.: ГЭОТАР Медицина, 1999. – 162 с.
8. Пожарникова, Е.Н. Определение устойчивости бактериофагов Еп - 2 УГСХА и Еп - 13 УГСХА к воздействию температуры и хлороформу / Е.Н. Пожарникова, С.Н. Золотухин, Д.А. Васильев // Матер. Междунар. научно-практ. конф. - Ч. 1. - Ульяновск, 2006. - С. 392 - 394.
9. Покровский, В.И. Современные принципы и методы диагностики инфекционных болезней / В.И. Покровский, О.А. Дунаевский // Эпидемиология и инфекционные болезни. - 2001. - № 4. - С. 5 - 7.
10. Чувствительность патогенных энтеробактерий, выделенных при диареях молодняка животных к антибиотикам и специфическим бактериофагам / С.Н. Золотухин, А.С. Мелехин, Д.А. Васильев [и др.] // Профилактика, диагностика и лечение инфекционных болезней, общих для людей и животных: матер. междунар. научн. конф. – Ульяновск, 2006. – С. 233 – 236.

ПУЛЬЧЕРОВСКАЯ Л.П.

2.9. ВЫДЕЛЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ ОСНОВНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БАКТЕРИОФАГОВ БАКТЕРИЙ РОДА CITROBACTER

**PULTCHEROVSKAYA L.P. ISOLATION AND STUDY OF THE MAIN QUALITIES
OF CITROBACTER GENUS PHAGES**

В последние годы, благодаря работам отечественных и зарубежных исследователей, расширилось представление о роли энтеробактерий рода *Citrobacter* в патологии животных и человека. Представители данного рода широко распространены в природе, их выделяют из воды, почвы, фекалий животных и человека. Некоторые штаммы входят в состав нормальной микрофлоры ки-

шечника (Adeniiyi, Ocholi, Enurah, Chima, Ekhonu, 1991; Mullner, Keller, 1992; Семёнова с соавт., 1993). Но в то же время представители этого рода способны вызывать вспышки гастроэнтеритов и токсикоинфекций, внутрибольничные инфекции, менингиты, абсцессы мозга, урологические заболевания, гнойные инфекции и даже сепсис у детей и взрослых людей (Алешукина с соавт., 1991; Корольков, 1992; Torres Alvarez de Arcaya et al., 1993; Pettis et al., 1994; Ventura et al., 1995; Ishii Yukiko, et al., 1996; Кебу, 1998; Gordon David., Fitz Gibbon Frances, 1999), а также самостоятельно или в ассоциации с другими микроорганизмами вызывать заболевания у домашних и диких животных (Мнацаканов, 1986; Воронин с соавт., 1989; Adeniiyi, 1991; Karunasagar et al., 1992; Ставцева, Дервишев, 1993; Каврук, 1994; Золотухин с соавт., 1999).

В настоящее время лабораторная диагностика заболеваний, вызываемых цитробактерами, основана на выделении чистой культуры микроорганизмов и их идентификации по общепринятым тестам. Этот метод трудоемок, недостаточно чувствителен и требует затрат времени, питательных сред и реактивов. В ветеринарной практике для ускоренного обнаружения некоторых микроорганизмов в патологическом материале и объектах внешней среды предложены индикаторные бактериофаги с использованием реакции нарастания титра фага РНФ (Гольдфарб, 1961; Капырина, Бакулов, 1972; Ганюшкин, 1988; Русалиев, 1990; Кольпикова, Бакулов, Котляров, 1990, 1992). Методы индикации и идентификации микроорганизмов с помощью бактериофагов специфичны, не требуют больших затрат времени, материалов и общедоступны.

Следовательно, разработка параметров и технологических приёмов по индикации и идентификации бактерий рода *Citrobacter* с помощью специфических бактериофагов отвечала требованиям времени и была актуальной темой для проведения исследований.

В работе были использованы 13 штаммов бактерий рода *Citrobacter*, полученные из НИИВС (Москва), из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ УГСХА и выделены нами из объектов окружающей среды и патологического материала. 97 штаммов бактерий гетерологичных родов и семейств: *Escherichia*, *Proteus*, *Enterobacter*, *Morganella*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Yersinia*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*,

Pseudomonas получены из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ УГСХА.

В качестве объектов исследования использовали интактные: водопроводную воду, сточные воды животноводческих ферм и общественных туалетов, фекалии животных и комбикорм, патологический материал от больных и павших животных, контаминированное бактериями рода *Citrobacter* мясо.

В работе использовались методы для выделения бактерий рода *Citrobacter*, приведённые в «Методических указаниях по бактериологической диагностике смешанной кишечной инфекции молодняка животных, вызываемой патогенными энтеробактериями», утверждёнными Департаментом ветеринарии МСХиП 11 октября 1999 года. Из культур выделяли бактериофаги методами, предложенными С. Лурия, Д. Дарнел (1970), И.П. Ревенко (1978), Ганюшкин В.Я. (1988). Фаги выделяли из объектов окружающей среды методом, предложенным Адельсон (1962), Ганюшкин В.Я. (1988). Изучение биологических свойств фагов проводили по методам, предложенным М. Adams (1961), Д.М. Гольдфарбом (1961), А.С. Тихоненко (1968), Т.Г. Чинашвили (1968), И.М. Габрилович (1973), В.Я. Ганюшкин (1988). Селекцию бактериофагов и повышение их литической активности проводили по методике, описанной и использованной И.М. Габриловичем (1992), С.Н. Золотухиным (1994). Обнаружение бактерий рода *Citrobacter* в объектах окружающей среды, кормах и пищевых продуктах проводили с помощью реакции нарастания титра фага. Реакцию нарастания титра фага ставили по методике В.Д. Тимакова и Д.М. Гольдфарба (1962), В.Я. Ганюшкина (1988). Подготовку препаратов для электронной микроскопии проводили осаждением вирусных частиц в режиме низкоскоростного центрифугирования (Пономорёв, Андреева, Артамонова, 2002).

Бактерии рода *Citrobacter* выделяли на протяжении всего периода проводимых исследований т.е. с 1998 по 2003 год. Всего было исследовано 89 проб полученных из Ульяновской, Самарской областей и республики Татарстан. Первичные посевы и выделение чистых культур *Citrobacter* выполняли в соответствии с правилами, указанными выше.

Видовую принадлежность микроорганизмов устанавливали на основе определения морфологических и культурально-биохимических свойств. Ферментативные свойства изучали с

использованием набора сред Гиса с углеводами и индикаторами Андреде и ВР, куда входят среды с глюкозой, лактозой, сахарозой, маннитом, мальтозой, а также на средах с мочевиной, сернокислым железом (определение сероводорода), агаре Симмонса, в бульоне Хоттингера (определение индола), МПЖ, среде с фенилаланином. В качестве дополнительных тестов ставили реакции с метилротом и Фогес-Проскауэра, а также определяли подвижность микроорганизмов.

Патогенные свойства выделенных культур бактерий рода *Citrobacter* определяли в биопrobe на белых мышах методом внутрибрюшинного введения 0,5 млрд. микробных клеток. Для этого использовали агаровые культуры бактерий, выделенные из двух органов и тканей погибших или фекалий больных животных. Взвесьями каждого вида бактерий заражали по три белых мыши. Культуру признавали патогенной в случае гибели двух или более мышей в течение трёх суток после заражения и относили её к возбудителям болезни.

В результате проведенных исследований было выделено 11 штаммов бактерий рода *Citrobacter*.

Далее мы приступили к серии опытов по выделению бактериофагов бактерий рода *Citrobacter*. Первым этапом работы по выделению бактериофагов - была попытка выделить бактериофаги *Citrobacter* из имеющихся у нас штаммов бактерий названного рода, надеясь обнаружить лизогенные культуры, так как бактериофаги, выделенные из таких культур, обладают более выраженной специфичностью (Жугова, 1985).

В первой серии опытов использовали методику, предложенную С. Лурия, Д. Дарнелл (1970), для выделения бактериофагов энтеробактерий без воздействия на них индуцирующего фактора. Проведя эти исследования, нам не удалось выделить бактериофаги *Citrobacter* из имеющихся у нас штаммов бактерий рода *Citrobacter*.

Во второй серии опытов на культуры, исследуемые как «лизогенные», воздействовали индуцирующим фактором, затем фильтровали через бактериальные свечи Шамберлана L-3 (Ревенко, 1978). В качестве индуцирующего фактора применяли воздействие на бактерии ультрафиолетовыми лучами, в течение 30 секунд при помощи прибора «Изоolda» с ртутной лампой ДРБ8,

18,0%, мощность которой приходится на область 254 нм. Полученный фильтрат исследовали на наличие фага на имеющихся культурах *Citrobacter* методом агаровых слоев. В наших исследованиях индукция не приводила к появлению свободного фага.

Резюмируя полученные данные, можно утверждать, что мы не обнаружили явления перехода профага в свободный фаг у имеющихся штаммов бактерий.

Следующий этап работы был посвящен выделению бактериофагов *Citrobacter* из объектов внешней среды (Адельсон, 1962). Для этого мы использовали сточные воды свиноводческих хозяйств и молочно-товарных ферм из разных хозяйств Ульяновской и Самарской областей. При исследовании 8 проб сточных вод, удалось выявить присутствие искомых фагов по наличию на газоне индикаторной культуры *Citrobacter* негативных колоний или зон лизиса.

Для получения чистой линии фага проводили до пяти пассажей из изолированных негативных колоний по методике, описанной Dulbeio, Vogt (1954), И.М. Габриловичем (1973), С.Н. Золотухиным (1994).

В результате проведенных опытов нами были выделены и изолированы 23 изолята фагов *Citrobacter*. Из выделенных штаммов фагов было отобрано 3 изолята фагов, которые лизировали в сумме все имеющиеся у нас бактерии рода *Citrobacter*.

Характеристика выделенных фагов *Citrobacter*

Морфологию негативных колоний изучали при посевах фагов методом агаровых слоёв по Грация на МПА. Учёт производили через 18-20 часов инкубации при температуре 37 °С. Негативные колонии, образуемые изучаемыми бактериофагами, разделены нами на четыре типа.

1 тип : прозрачные негативные колонии округлой формы с ровными краями, 0,5-1,5 мм в диаметре – 8 фагов.

2 тип: прозрачные негативные колонии округлой формы, 2,0-3,0 мм в диаметре – 13 фагов.

3 тип: округлые колонии с ровными краями, в диаметре 2,0-2,5 мм, прозрачные, без вторичного роста, с зоной неполного лизиса по периферии, ширина зоны 0,5 мм,– 1 фаг.

4 тип: прозрачные негативные колонии 6,0-7,0 мм в диаметре, округлой формы с ровными краями и зоной неполного лизиса по периферии 0,5-1,0 мм,– 1 фаг.

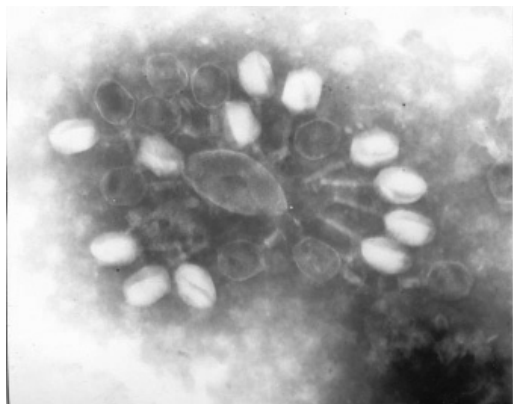


Рис. 1. Электронная микрофотография. Морфология бактериофага С-52 УГСХА (увл. 167 000).

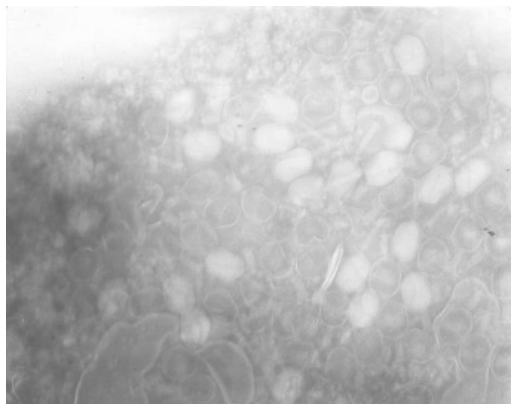


Рис. 2. Электронная микрофотография. Морфология бактериофага С-61 УГСХА x 167 000.

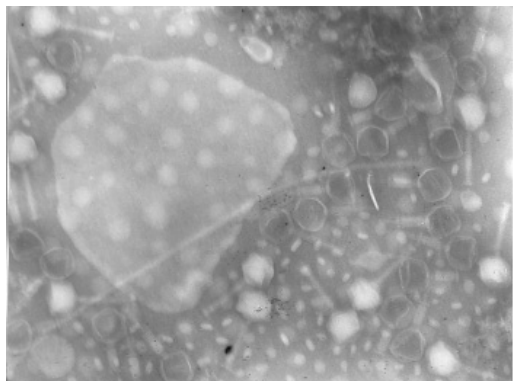


Рис. 3. Электронная микрофотография. Морфология бактериофага С-66 УГСХА x 167 000.

Морфологию фаговых корпускул изучали по методике, предложенной А.П. Пономаревым, О.Г. Андреевой, Т.Н. Артамоновой (2002), для этого проводили электронно-микроскопические исследования лизатов бульонных культур: с бактериофагами С-52 УГСХА, С-61 УГСХА, С-66 УГСХА в титре от $3,0 \times 10^9$ до $4,0 \times 10^9$ фаговых корпускул в

1 мл (по Грация). В результате проведенных исследований было установлено, что вирионы фага имеют структуры, состоящие из головки в форме растянутого многогранника с отростком. У основной массы вирионов чехол находится в растянутом состоянии, что характерно для интактных частиц. Чехол отростка на всем протяжении прямой и имеет цилиндрическую форму. Концевая структура отростка ограничивается базальной мембраной, от которой отходят короткие нити. Единичные вирионы имеют отросток в сокращенном состоянии, то есть чехол отростка укорачивается и расширяется. При этом просматривается внутренний стержень отростка. Вирусные частицы фагов С-61 УГСХА и С-66 УГСХА имеют следующие размеры: диаметр головки: 100 нм и длина отростка – 135 нм. Отношение высоты головки к её диаметру у фагов равно 1,28, что позволяет заключить о растянутости многогранника частиц данного фага. (Рис. 1, 2, 3). Кор-

пускулы фага С-52 УГСХА имеют более симметричную головку. Её длина равна 74 нм, диаметр 68 нм. Отношение высоты головки к её диаметру равна 1,08. Длина отростка 115 нм и длина сокращенного чехла отростка 60 нм.

Таким образом, в соответствии с морфологическими параметрами изучаемый нами фаги согласно Международной классификации и номенклатуре вирусов относятся к семейству *Myoviridae* (F.A. Murphy и др., 1995), а по классификации А.С. Тихоненко - к V морфологической группе: «Фаги с отростком сложного строения, чехол которого способен к сокращению» (Тихоненко, 1968).

Литическую активность селекционированных бактериофагов проводили по методу Аппельмана и Грация (Д.М. Гольдфарб, 1961, Ревенко, 1978).

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 своё литическое действие. Более точным методом оценки литической активности бактериофага является определение количества активных корпускул фага в единице объёма. 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, её химического состава, окружающей температуры и так далее. Поэтому активность фага всегда определяется в конкретных, стандартных условиях.

Культуры бактерий рода *Citrobacter*, для определения литической активности бактериофагов, выращивали на стандартном мясопептонном бульоне в течение 18-20 часов.

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что выделенные цитробактерные бактериофаги обладали различной литической активностью, которая колебались по Аппельману от 10^{-4} до 10^{-8} , по Грация от $2,1 \times 10^6$ до $4,0 \times 10^9$. Наиболее высокой литической активностью обладали фаги С-52 УГСХА, С-61 УГСХА и С-66 УГСХА: титр по Аппельману 10^{-7} у трех фагов, по Грация $3,0 \times 10^9$ у С-52 УГСХА и С-66 УГСХА, у С-61 УГСХА $4,0 \times 10^9$. Для конструирования биопрепарата было отобрано три фага: С-52 УГСХА, С-66 УГСХА и С-61 УГСХА, которые об-

ладали наиболее высокими титрами по Грациа и Аппельману и широким спектром литического действия.

Биологические свойства фагов бактерий Citrobacter C-52, C-61 и C-66 серии УГСХА

Спектр литической активности является характерной особенностью фага, и им пользуются для его идентификации (Адамс, 1961; Ганюшкин, 1988). Для изучения спектра литической активности бактериофагов C-52 УГСХА, C-66 УГСХА и C-61 УГСХА мы использовали 12 полевых и 1 референс штаммов цитробактерий.

На поверхность МПА в чашках Петри пастеровской пипеткой наносили 3-4 капли 18-ти часовой бульонной культуры исследуемых микроорганизмов. Затем равномерно распределяли по поверхности среды стерильным шпателем. Чашки ставили в термостат для подсушивания на 15-20 минут. На поверхность засеянной среды пастеровской пипеткой легким прикосновением капли наносили фаг и наклоняли, чтобы капли стекли, а затем инкубировали при температуре 37 °С, оценку результатов проводили через 18-20 часов. Нужно отметить, что бактериофагов, лизирующих только один штамм, обнаружено не было. Опыты показали, что изученные фаги характеризуются различным спектром литической активности. Наиболее широким спектром литической активности по отношению к изучаемым культурам обладает штамм фага C-61 УГСХА, который лизировал 7 из имеющихся у нас 13 штаммов бактерий рода *Citrobacter*. Фаги C-52 УГСХА и C-66 УГСХА проявили одинаковый спектр литической активности и лизировали по 6 разных штаммов бактерий *Citrobacter*. Из 13 штаммов бактерий *Citrobacter* фаги C-52, C-61 и C-66 серии УГСХА лизировали все имеющиеся у нас штаммы, что составляет 100%. Результаты представлены в таблице 1.

Специфичность действия бактериофагов определяется, прежде всего, родством их к фаговым рецепторам лизируемых бактерий и используется в практике для дифференциации бактерий.

Табл. 1. Спектр литической активности производственных штаммов фагов.

№	Фаги	Количество испытанных штаммов	Из них чувствительных к фагу	Лизируемые штаммы	% лизируемых штаммов
1	C-52 УГСХА	13	6	16,11,8, 101/57,12,7	46,1%
2	C-61 УГСХА	13	7	1,4,16,6, 101/57,11,12	53,8%
3	C-66 УГСХА	13	7	1,2,9,16,7, 12,13	53,8%

Изучение специфичности трех бактериофагов Citrobacter (С-52 УГСХА, С-61 УГСХА, С-66 УГСХА) проводили по отношению к представителям других семейств и родов с использованием штаммов: *E.coli*-46 штаммов, *Proteus* spp.-6 штаммов, *Morganella* spp.-6 штаммов, *Klebsiella* spp.-4 штамма, *Salmonella* spp.-6 штаммов, *Enterobacter* spp.-4 штамма, *Y.enterocolitica*-12 штаммов, *Staphylococcus* spp.-3 штамма, *Streptococcus* spp.-2 штамма, *Pseudomonas aureginisa*-4 штамма, *Bacillus cereus*-3 штамма. Установлено, что фаги неактивны к представителям бактерий гетерологичных родов и семейств. Таким образом, селекционированные нами фаги являются специфичными для рода *Citrobacter*.

Степень устойчивости бактериофагов и их хозяев к инактивирующим температурным факторам имеет теоретическое и практическое значение. Полученные данные свидетельствуют об одинаковой устойчивости фагов к воздействию температуры в 71-73 °С. Фаги начинают терять физиологическую активность при температуре выше 73 °С и инактивируются при температуре выше 88 °С в течение 30 минут. В то время как бактериальные клетки цитробактерий погибают при 60 °С за 7 минут.

Бактериофаги обычно устойчивее к хлороформу, чем клетки микроорганизмов, поэтому данный химический агент является хорошим средством для освобождения фаголизата от жизнеспособных бактерий. Определение чувствительности бактериофагов и бактерий проводили путем обработки фаговой суспензии и бульонных культур цитробактеров хлороформом в соотношении 1:10 при постоянном встряхивании. Бактериофаги С-66 УГСХА и С-61 УГСХА проявили выраженную устойчивость к воздействию хлороформа в течение 40 минут. В то время как фаг С-52 УГСХА значительно терял свою активность в течение 15 минут, и существенно уменьшалось количество фаговых корпускул (до 40%). Форма негативных колоний менялась. Бактериофаги, клонированные из них, отмечались низкой литической активностью, которая восстанавливалась только на 3-й пассаж фага. При действии хлороформа на фаг С-52 УГСХА в течение 40 минут происходила полная его инактивация. Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что селекционированные бактериофаги С-66 УГСХА и С-61 УГСХА проявили выраженную устойчивость к воздействию хлороформа. При воздействии

хлороформа на фаголизаты в течение 40 минут существенного уменьшения фаговых корпускул в 1 мл не наблюдалось. В то время как бактериофаг С-52 УГСХА терял свою активность.

Для разработки технологических параметров изготовления биопрепарата на основе фагов С-52 УГСХА, С-61 УГСХА, С-66 УГСХА необходимо было установить изменение литической активности указанных штаммов при хранении в условиях холодильника (2-4 °С). Полученные результаты свидетельствуют о том, что селекционированные цитробактерные бактериофаги при хранении в условиях 2-4 °С в течение 12 месяцев незначительно снижали литическую активность до 10^7 - 10^8 фаговых корпускул в 1 см³.

Для изготовления биопрепарата использовали штаммы фагов С-52 УГСХА, С-61 УГСХА, С-66 УГСХА и штаммы бактерий *C.freundii* № 9, *C.freundii* № 16, *C.amalonaticus* № 11. Индикаторные культуры хранили на полужидком МПА (рН 7,2-7,4) с содержанием 0,3 % бактериологического агара при температуре 2-4 °С, которые пересевали каждые 2-3 месяца. Биопрепарат готовили на коммерческом мясопептонном бульоне. Установлено, что температурным оптимумом для культивирования биопрепарата на основе фагов С-52 УГСХА, С-61 УГСХА, С-66 УГСХА с индикаторными культурами была температура 37 °С. Определено оптимальное соотношение бактериофага С-66 УГСХА и штамма *C.freundii* № 9 – 1:1, т.е. 0,2 мл фага на 0,2 мл индикаторной культуры, время пассажа составляет 4-6 часов (параметры культивирования бактериофагов С-52 УГСХА, С-61 УГСХА с культурами *C.freundii* № 16, *C.amalonaticus* № 11 аналогичны).

Очистка фагов от бактериальных клеток осуществлялась методом прогревания при температуре 58-60 °С в течение 30 минут. Разлитый во флаконы фаг контролируется на чистоту и стерильность, обязательно определяется его титр. Биопрепарат на основе фагов представляет собой 3 флакона с прозрачной жидкостью желтоватого цвета (цвет засеянной среды) без посторонних примесей, осадка. Титр не ниже 10^8 . Дату изготовления серии исчисляют со дня закупорки флаконов. Срок годности бактериофагов при температуре 2-6 °С 12 месяцев.

Используя строгую специфичность селекционированных нами бактериофагов по отношению к бактериям рода *Citrobacter* мы

разработали схему ускоренной идентификации этих микроорганизмов. Предлагаемая нами схема позволяет идентифицировать цитробактерии за 48 часов (2 суток). Срок бактериологического исследования по схеме изложенной в «Методических указаниях по бактериологической диагностике смешанной кишечной инфекции молодняка животных, вызываемой патогенными энтеробактериями» составил 92 часа (4 суток) при большей затрате посуды и реактивов.

Определение параметров постановки РНФ и разработку количественного показателя реакции, имеющего диагностическое значение, проводили по методике, предложенной В.Д. Тимаковым и Д.М. Гольдфарбом (1962). Проведены эксперименты с использованием МПБ, контаминированного 18 часовыми индикаторными культурами *S.freundii* №16 (для фага С-61 УГСХА), *S.freundii* № 9 (для фага С-66 УГСХА) и *S.amalonicus* № 11 (для фага С-52 УГСХА) от 10^1 до 10^5 м.к./мл. В качестве контроля использован интактный МПБ. Учет результатов проводили через 12-16 часов инкубирования. С этой целью подсчитывали число негативных колоний фага, образовавшихся на плотной питательной среде в опытной пробе и в контроле (контроль титра фага). Оценку РНФ проводили согласно оценке, предложенной В.Я. Ганюшкиным (1988) - таблица 2.

В случае наличия в исследуемом материале свободного фага число корпускул фага на чашке подсчитывали и вычитали из числа корпускул индикаторного фага в опытных чашках. Разницу сравнивали с контролем. При высоком титре свободного фага (сплошной лизис индикаторной культуры) реакция не учитывалась. РНФ, оцененная как сомнительная, не имела диагностического значения.

По результатам проведенных опытов установлено, что количество фаговых частиц более чем в 5 раз превышает количество фаговых частиц в контрольных пробах при контаминации цитробактериями МПБ в концентрации 10^3 м.к/мл.

Табл. 2. Показатели увеличения титра фага в РНФ

Увеличение количества частиц бактериофага в опытной пробе по отношению к контролю	Оценка результатов
Увеличение до 2,5 раз	Отрицательная
Увеличение от 3 до 5 раз	Слабо положительная
Увеличение свыше 5 раз	Положительная
Увеличение более 10 раз	Резко положительная

Для решения указанной задачи необходимо было провести эксперименты на тест- объекте по выявлению наиболее эффективного временного показателя взаимодействия фага и индикаторной культуры при сохранении остальных параметров (температурный режим, концентрация бактериальной культуры и фаговых корпускул в 1 мл) постановки РНФ. В качестве тест-объекта использовали МПБ, контаминированный бактериями рода *Citrobacter*, оптимальное время экспозиции выбирали из шести следующих параметров:

– в предварительном подрачивании исследуемого материала в течение 5, 16, 24 часов при температуре 37 °С, после добавления фагов смесь выдерживали в течение 5 часов при температуре 37 °С;

– в увеличении времени контакта исследуемого материала с фагом до 10, 16 и 24 часов при температуре 37 °С.

Для изучения чувствительности РНФ в зависимости от времени подрачивания, МПБ контаминировали бактериями рода *Citrobacter* в концентрации от 10^1 до 1×10^5 м.к./мл и инкубировали в термостате при температуре 37 °С в течение 5, 16, 24 часов. Результаты исследования представлены в таблице 3.

Установлено, что при подрачивании материала в течение 5-ти часов позволяет обнаружить цитробактеры с помощью РНФ в концентрации 10^3 м.к./мл для фагов С-52 УГСХА и С-66 УГСХА, а для фага С-61 УГСХА 10^4 м.к./мл. При подрачивании исследуемого материала в течение 16 часов чувствительность реакции повышается и позволяет обнаружить бактерии в количестве 10^2 и

Табл. 3. Чувствительность РНФ в зависимости от времени подрачивания исследуемого материала, контаминированного бактериями рода *Citrobacter*

Фаги	№ п.п.	Варианты исследований	Минимальное количество цитробактерий, обнаруживаемое с помощью		Время, затраченное на проведение исследований (в часах)	
		Длительность подрачивания исследуемого материала	РНФ	бактериологический метод	РНФ	бактериологический метод
		часы				
С-52 УГСХА	1	5	10^3	10^4	22	96
	2	16	10^2	н.о	32	н.о
	3	24	10^2	н.о	40	н.о
С-61 УГСХА	1	5	10^4	10^4	22	96
	2	16	10^3	н.о.	32	н.о.
	3	24	10^3	н.о.	40	н.о.
С-66 УГСХА	1	5	10^3	10^4	22	96
	2	16	10^2	н.о	32	н.о
	3	24	10^2	н.о	40	н.о

10^3 м.к./мл соответственно. На проведение исследования затрачивается 32 часа. Бактериологическим методом это же количество цитробактеров обнаружить не удавалось. При подращивании исследуемого материала в течение 24 часов чувствительность реакции не увеличивается, также позволяет обнаружить бактерии в количестве 10^2 и 10^3 м.к./мл. На проведение этого варианта реакции необходимо 40 часов.

Во втором варианте опыта МПБ, контаминированный бактериями рода *Citrobacter* от 10^1 до 1×10^5 м.к./мл, не подращивали, а увеличивали время контакта с фагом до 5, 10, 16, 24 часов. Результаты представлены в таблице 4.

По результатам изучения чувствительности РНФ в зависимости от времени инкубирования исследуемого материала с фагом установлено, что увеличение времени до 10-ти часов позволяет обнаружить цитробактеры с помощью РНФ в концентрации 10^3 м.к./мл для фагов С-52 УГСХА и С-66 УГСХА, для фага С-61 УГСХА – 10^4 м.к./мл.. При инкубировании исследуемого материала с фагом в течение 16 часов чувствительность реакции повышается, что позволяет обнаружить бактерии в количестве 10^2 и 10^3 м.к./мл соответственно. На проведение исследования затрачивается 32 часа. Бактериологическим методом это же количество цитробактеров обнаружить не удавалось. При инкубировании с фагом исследуемого материала в течение 24 часов чувствительность реакции не увеличивается и позволяет обнаружить бакте-

Табл. 4. Чувствительность РНФ в зависимости от времени инкубирования исследуемого материала с фагами

Фаги	№ п.п.	Варианты исследований	Минимальное количество цитробактерий, обнаруживаемое с помощью		Время, затраченное на проведение исследований (в часах)	
		Время контакта исследуемого материала с фагом	РНФ	бактериологический метод	РНФ	бактериологический метод
		часы				
С-52 УГСХА	1	5	10^3	10^4	22	96
	2	10	10^3	10^4	22	96
	3	16	10^2	н.о	32	н.о
	4	24	10^2	н.о	40	н.о
С-61 УГСХА	1	5	10^4	10^4	22	96
	2	10	10^4	10^4	22	96
	3	16	10^3	н.о	32	н.о.
	4	24	10^3	н.о	40	н.о.
С-66 УГСХА	1	10	10^3	10^4	22	96
	2	10	10^3	10^4	22	96
	3	16	10^2	н.о	32	н.о
	4	24	10^2	н.о	40	н.о

Примечание: н.о. – не обнаружено.

рии в количестве 10^2 и 10^3 м.к./мл соответственно. На проведение этого варианта реакции необходимо 40 часов. Бактериологическим методом цитробактерии удавалось обнаружить в концентрации 104 м.к./мл на проведение данного метода затрачивается 96 часов.

На основании наших данных, считаем, что наиболее оптимальным являются режимы РНФ при 5 часовой экспозиции исследуемого материала с фагом, когда удастся провести индикацию бактерий в количестве 10^3 и 10^4 м.к. в миллилитре исследуемого субстрата, на исследование которого затрачивается 16-18 часов. Поэтому данный режим используем в дальнейших исследованиях, хотя наиболее эффективным по чувствительности является инкубирование исследуемого материала с фагом в течение 16 часов, на которое затрачивается до 32 часов.

Для определения возможности использования РНФ для обнаружения бактерий рода *Citrobacter* в объектах внешней среды исследовали образцы воды, комбикорма и фекалий.

Пробы водопроводной воды в объеме 10 мл вносили в колбы и контаминировали *C.freundii* №9, *C.freundii* №16, *C.amalonaticus* №11 в концентрации 10^5 ; 10^4 ; 10^3 ; 10^2 ; 10^1 м.к./мл, заливали МПБ из расчета 10 мл бульона на 1 мл воды. Для контроля использовали колбу с пробой воды, не контаминированной названными бактериями. По результатам проведенных опытов установлено, что увеличение титра фагов С-52 УГСХА и С-66 УГСХА более чем в 5 раз произошло уже при концентрации 10^3 микробных клеток цитробактеров в 1 мл водопроводной воды, фага С-61 УГСХА 10^4 м.к. в 1 мл водопроводной воды.

Комбикорм массой 5-10 г растирали в стерильной фарфоровой ступке, контаминировали *C.freundii* №9, *C.freundii* №16, *C.amalonaticus* №11 в концентрации 10^5 ; 10^4 ; 10^3 ; 10^2 ; 10^1 м.к./мл и вносили в стерильные колбы объемом 100 мл, заливали МПБ из расчета 10 мл бульона на 1 г. Брали колбу с пробой комбикорма не контаминированного цитробактерами. Дальнейшие исследования проводили по вышеизложенной методике. По результатам проведенных опытов установлено, что увеличение титра фагов С-52 УГСХА и С-66 УГСХА более чем в 5 раза произошло уже при концентрации 10^3 микробных клеток цитробактеров в 1 г комбикорма, а фага С-61 УГСХА 10^4 м.к. в 1 г комбикорма.

Фекалии массой 5-10 г вносили в МПБ из расчета 10 мл бульона на 1 г и контаминировали их *C.freundii* № 9, *C.freundii* № 16, *C.amalonaticus* № 11 в концентрации от 10^5 ; 10^4 ; 10^3 ; 10^2 ; 10^1 м.к. Брали колбу с пробой фекалий не контаминированной бактериями вышеназванными бактериями. Исследования проводили по вышеизложенной методике. По результатам проведенных опытов установлено, что увеличение титра фагов С-52 УГСХА и С-66 УГСХА более чем в 5 раза произошло уже при концентрации 10^4 микробных клеток цитробактеров в 1 г фекалий, а фага С-61 УГСХА при концентрации 10^5 м.к. в 1 г фекалий.

Нами установлено, что увеличение титра фагов С-52 УГСХА и С-66 УГСХА более чем в 5 раза произошло уже при концентрации 10^3 микробных клеток, а фага С-61 УГСХА при концентрации 10^4 м.к. цитробактеров в 1 мл взвеси водопроводной воды и комбикорма. При исследовании фекалий увеличение титра фагов С-52 УГСХА и С-66 УГСХА более чем в 5 раз произошло при концентрации 10^4 м.к., а фага С-61 УГСХА 10^5 м.к. в 1г фекалий.

Кусочки свинины массой 5-10 г растирали в стерильной фарфоровой ступке, контаминировали *C.freundii* №9, *C.freundii* № 16, *C.amalonaticus* №11 в концентрации 10^5 ; 10^4 ; 10^3 ; 10^2 ; 10^1 м.к./г и вносили в колбы объемом 100 мл, заливали МПБ из расчета 10 мл бульона на 1 г. Для контроля использовали пробу мяса, не контаминированного вышеназванными бактериями.

По результатам проведенных опытов установлено, что увеличение титра фагов С-52 УГСХА, С-61 УГСХА и С-66 УГСХА более чем в 5 раза произошло уже при концентрации 10^3 микробных клеток цитробактеров в 1 г мяса.

Для оценки эффективности реакции нарастания титра фага в условиях производства, нами были проведены исследования по фагодиагностики кишечной инфекции поросят и телят, протекающей с участием бактерий рода *Citrobacter*. Обнаружение цитробактерий проводили бактериологическим методом и с помощью реакции нарастания титра фага.

Результаты исследований отражены в таблице 5, из которой видно, что при исследовании 10 проб фекалий от больных диареей поросят, бактериологическим методом выделено бактерий рода *Citrobacter* из 20% проб, а в РНФ - 60%; из 8 проб от телят – бактериологическим методом удалось выделить цитробактерий

Табл. 5. Результаты исследования проб фекалий от больных диареей телят и поросят

Всего проб	Результаты исследований			
	Бак.метод		РНФ	
От поросят	количество проб	%	количество проб	%
10	2	20	6	60
От телят				
8	3	37,5	5	62,5

в 37,5% случаев, а в РНФ - 62,5%.

В результате проведенных исследований из объектов внешней среды было выделено 23 изолята фагов, активных по отношению к бактериям рода *Citrobacter*. Изучены основные биологические свойства выделенных бактериофагов.

Впервые разработаны биотехнологические параметры фагоиндикации и фагоидентификации бактерий рода *Citrobacter* в объектах ветеринарного надзора. Доказана эффективность использования селекционированных бактериофагов с диагностической целью. Выделены и селекционированы специфичные бактериофаги, которые используются для изготовления диагностических препаратов. Разработаны технологические параметры по получению диагностического биопрепарата из выделенных фагов и схемы фагодиагностики.

Для конструирования биопрепарата были отобраны три фага, активных по отношению к представителям бактерий рода *Citrobacter*, обладающие строгой специфичностью, широким спектром литической активности. Фаги депонированы в ВГНКИ ветеринарных препаратов (справка о депонировании фага С-52 УГСХА – Phagum *Citrobacter* 52-УГСХА– ДЕП от 23.04.04, С-61 УГСХА – Phagum *Citrobacter* 61-УГСХА-ДЕП от 23.04.04 и С-66 УГСХА- Phagum *Citrobacter* 66-УГСХА – ДЕП от 23.04.04) и признаны перспективными для конструирования диагностических и лечебно-профилактических препаратов

Разработана “Временная инструкция по изготовлению и контролю лабораторной серии бактериофагов *Citrobacter*, С-52 УГСХА, С-61 УГСХА и С-66 УГСХА», одобренная ученым советом и ректором УГСХА 16.02.2004.

Для врачей-бактериологов предложены «Методические рекомендации по индикации и идентификации энтеробактерий рода *Citrobacter* в патологическом материале, кормах, пищевом сырье и объектах внешней среды с применением специфических бак-

териофагов.» утвержденные Отделением ветеринарной медицины Российской академии сельскохозяйственных наук (РАСХН) 4 октября 2004 года.

Результаты изучения биологических свойств бактериофагов С-52 УГСХА, С-61 УГСХА и С-66 УГСХА и индикации бактерий рода *Citrobacter* в объектах ветеринарного надзора методом РНФ актами производственных испытаний, проведенных в Чердаклинской районной лаборатории Ульяновской области (от 24.08.04) и в Сергиевской районной лаборатории Самарской области (от 30.08.04). актами комиссионных испытаний в Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии (от 05.06.2003), актами комиссионных испытаний в Всероссийском государственном центре качества и стандартизации лекарственных препаратов для животных и кормов (ВГНКИ) (от 23.04.2004).

ЛИТЕРАТУРА

1. Адельсон Л.И. Бактериофаги, активные по отношению к энтеропатогенным кишечным палочкам // Л.И. Адельсон // Вопросы микробиологической диагностики и бактериофагии. - 1962. - С. 184-194.
2. Алешукина А. В. Роль условно-патогенных энтеробактерий в этиологии острых кишечных инфекций у детей раннего возраста/ А.В. Алешукина, Л.Д. Мартыненко, Р.Г. Ловердо, Л.Ф. Бовтало, Э.Н. Симованьян // Тез. докл. 6 Всерос. съезда микробиологов, эпидемиологов и паразитологов, - Нижний Новгород, -1991. - Т. 1 - М., -1991. - С. 57- 58.
3. Корольков В. Ф. . Анализ причин заболеваемости кишечными инфекциями личного состава / В. Ф. Колков, В. С. Герепелкин, В. А. Мандрик // Воен.-мед. ж. -1992. - № 6. -С. 54 -57, 79.
4. Воронин Е.С.. Этиология и профилактика желудочно-кишечных заболеваний телят/ Е.С. Воронин, Д.А. Дервишов и др. // Вестник сельскохозяйственной науки. - 1989. - №9. - С.105-110.
5. Габрилович И.М.Общая характеристика бактериофагов/ И.М. Габрилович // Основы бактериофагии. - Минск.-1973. -С.5-24.
6. Габрилович, И.М. Биологические свойства бактериофагов *Serratia marcescens* / И.М. Габрилович // ЖМЭИ. - 1992. - №6. - С.10-12.
7. Ганюшкин В.Я. Бактериофаги сальмонелл и их применение в ветеринарии/ В.Я. Ганюшкин // Учебное пособие. - Ульяновск. - 1988. - С.45.
8. Гольдфарб Д.М. Бактериофагия/ Д.М. Гольдфарб // М.: Медгиз. - 1961. - С. 297.
9. Золотухин С.Н. Бактериофаги *M.typhimurium* и их применение при желудочно-кишечных заболеваниях поросят // Автореферат дис. канд. вет. наук. - Ульяновск, 1994.
10. Каврук Л.С. Тесты, критерии и методы ускоренной санитарно-бактериологической оценки репродуктивных помещений животноводческих ферм и пути оптимизации в них микробиоциноза // Дисс. в форме науч. докл. на соиск. уч. степ. докт. вет. наук. - М., - 1994.
11. Капырина Н.А. Идентификация возбудителя листериоза с помощью бактериофага./ Н.А. Капырина, И.А. Бакулов // Симпозиум "Профилактика и меры борьбы с лептоспирозом и листериозом с/х животных". Новочеркасск. - 1972. - С. 76-78.
12. Кебу Т.И. Условно-патогенные энтеробактерии у здоровых и больных острыми кишечными инфекциями обезьян / Т.И. Кебу, З.К.Стасюлевич, Э.К. Джикидзе, Р.И. Крылова // Balt. J. Lab. Anim. Sci. - 1998. - 8, - № 3. - С. 177 -182.
13. Колпикова Т.И. Перспективы практического применения листериозных бактериофагов/ Т.И. Колпикова, И.А. Бакулов, В.М. Котляров // Вопросы ветеринарной вирусологии, микробиологии и эпизоотологии. // Материалы научной конференции ВНИИВиМ. - Покров. - 1992. Часть 11. - С.211-212.
14. Колпикова Т.И. Фаготипирование листерий/ Т.И. Колпикова, И.А. Бакулов, В.М. Котляров // Ветеринария. - 1990. - №6. - С.31-32.

15. Мнацаканов С.Т. Выделение энтеропатогенных энтеробактерий на свиноводческих комплексах/ С.Т. Мнацаканов //Эпизоотология, эпидемиология, средства диагностики, терапии и специфической профилактики инфекционных болезней, общих для человека и животных. Материалы Всесоюзной конференции. – Львов. – 1988. – С.300-301.
16. Пономарев А.П. Электронно-микроскопическое выявление вирусов животных в некоцентрированных вируссодержащих суспензиях / А.П. Пономарев, О.Г. Андреева, Т.Н.Артамонова // Вестник РАСХН. – 2002. – №2. – С. 74-77.
17. Лурия С. Общая вирусология/ С. Лурия, Д. Дарнелл // - М., "Мир", - 1970.
18. Ревенко И.П. Бактериофаги и их использование в ветеринарной практике/ И.П. Ревенко // – Киев: Урожай, - 1978. – С. 88.
19. Семенова Е.А. Изучение факторов патогенности у различных представителей рода *Citrobacter* / Е.А Семенова, Е.И.Белькова, В.Н.Пищик, Н.Р Вассер // Микробиол. Ж. - 1993 . - 55, - № 4. - С. 75 – 81.
20. Тимаков В.Д. Реакция нарастания титра фага (РНФ)/ В.Д.Тимаков, Д.М.Гольдфарб // М., 1962.
21. Тихоненко А.С. Ультраструктура вирусов бактерий/ А.С. Тихоненко //М.: Наука, 1968. – С. 89 .
22. K.O.Adeniyi Notes on causes of mortality at the tos Zoo, Nigeria from 1977-1987/ R.A. Ocholi, L.U.Enurah, J.C.Chima, M.C.Ekhonu //Himalayan J. Environ and Zool. - 1991. - 5, - № 1. - P. 1- 4.
23. Avril I.L. Place et sensibilite aux antibiotiques des Enterobacteriaceae Responsables d'infections urinaires/ I.L.Avril, R.Mesnard, G.Roche, P.Pouedras // Sem. hop. Paris. - 1993. – 69. - № 4. - P. 81-86 .
24. Gordon David M. The distribution of enteric bacteria from Australian mammals: Host and geographical effects/ David M.Gordon, Gibbon Frances Fitz // Microbiology. -1999. – 145. - № 10. - P. 663-671.
25. Yukiko Ishii Deguchi Koichi./ Ishii Yukiko, Suzuki Yumiko, Ishihara Rika, Nakazawa Arisa // Jap. J. Antibiot. - 1996. – 49. - №12. - P. 25-36.
26. Karunasagar I. Systemis *Citrobacter freundii* infection in common carp, *Cyprinus carpio* L., fingerlings/ I. Karunasagar, I.Karunasagar, R.Pai. // J. Fish Diseases. – 1992. - 15. - № 1. - P. 95-98.
27. Mullner G.F. Spondylitis durch *Citrobacter diversus*. Fallbeschreibung und Übersicht uber *Citrobacter-diversus*-Infektionen/ G.F.Mullner, H.Keller // Schweiz. med. Wochenschr. - 1992. - 122. - № 31-32. - P. 1173-1177.
28. Murphy F.A. Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses/ F.A. Murphy // Spingerverlad Wien New York. – 1995. – P. 586.
29. Pettis A.M. Polymicrobial gram negative bacteremia associated with saline flush used with a needle-free intravenous system/ A.M.Pettis, A.Chodoff, O.Schoonmaker, M. Shelly // Amer. J. Infec. Contr. - 1994. – 22. - № 2. - P. 103.
30. Ventura G. Gram-negative bacillary meningitis in adults: (Pap.) 9th Mediterr. Congr. Chemother. Я. Adv. Antimicrob. Chemother., Milan, 1994/ G.Ventura, M.Tumbarello, E.Tacconelli., R.Cauda, M.B.Lucia // J. Chemother. - 1995. - 7. - №4. Suppl. - P. 177 - 179.

ФЕОКТИСТОВА Н.А.

2.10. ВЫДЕЛЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ ОСНОВНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БАКТЕРИОФАГОВ БАКТЕРИЙ РОДА *PROTEUS*

FEOKTISTOVA N.A. ISOLATION AND STUDY OF THE MAIN QUALITIES
OF *PROTEUS* GENUS PHAGES

В последние годы, благодаря работам отечественных и зарубежных исследователей, расширилось представление о роли энтеробактерий рода *Proteus* в патологии животных и человека (Золотухин, 2005). Представители данного рода широко распространены в природе, их выделяют из воды, почвы, фекалий животных и человека. Некоторые штаммы входят в состав нормальной микрофлоры кишечника. В то же время представители этого рода являются возбудителями внутрибольничных инфекций, энтеритов у детей и взрослых людей, способны вызывать вос-

палительные процессы мочевыводящих путей, быть причиной послеоперационных и ожоговых осложнений, сепсиса, дисбактериоза, токсикоинфекций и др. (Заркуа, Мечурчлишвили, Гадуа, 2005; Чанишвили с соавт., 2005).

Также имеется множество экспериментальных данных о патогенности названных микроорганизмов для животных. Протеи выделяются при маститах, эндометритах, раневых инфекциях и других воспалительных процессах у различных видов животных. Особое внимание заслуживают работы по изучению этиологической роли протея в возникновении желудочно-кишечных заболеваний новорожденных животных (Парайко, Парайко, 1990; Мищенко с соавт., 1999; Золотухин, Каврук, Васильев, 2005).

В настоящее время лабораторная диагностика заболеваний, вызываемых протеем, основана на выделении чистой культуры микроорганизмов и их идентификации по общепринятым тестам. Этот метод трудоемок и требует затрат времени, питательных сред и реактивов. Поэтому перед исследователями стоит задача изыскания более простого и доступного для лабораторий любого уровня метода индикации и идентификации названных микроорганизмов. В ветеринарной практике для ускоренного обнаружения некоторых родов микроорганизмов в патологическом материале и объектах внешней среды предложены индикаторные бактериофаги с использованием реакции нарастания титра фага РНФ (Гольдфарб, 1961; Ганюшкин, 1988; Русалеев, 1990; Кольпинова, Бакулов, Котляров, 1992; Натидзе с соавт., 2005). Методы индикации и идентификации микроорганизмов с помощью бактериофагов специфичны, не требуют больших затрат времени, материалов и общедоступны.

Таким образом, разработка технологических параметров по индикации и идентификации бактерий рода *Proteus* с помощью специфических бактериофагов была актуальной и своевременной темой для исследований.

В работе были использованы 40 штаммов бактерий рода *Proteus*: 14 штаммов были получены из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ ФБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА»; 14 штаммов получены из музея лаборатории санитарной микробиологии ВНИИВСГиЭ; 12 штаммов было выделено из объектов ветеринарного-санитарного надзора. Ис-

пользовали также 97 штаммов бактерий гетерологичных родов и семейств: *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Morganella*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Yersinia*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, полученных из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ ФГОУ ВПО «Ульяновская ГСХА».

В качестве объектов исследований использовали интактные: водопроводную воду, сточные воды животноводческих ферм и общественных туалетов, фекалии животных и комбикорм, патологический материал от больных и павших животных, загрязненное бактериями рода *Proteus* мясо.

Для выделения бактерий рода *Proteus* использовали схему, изложенную в «Методических указаниях по бактериологической диагностике смешанной кишечной инфекции молодняка животных, вызываемой патогенными энтеробактериями», утвержденных Департаментом ветеринарии МСХ и П РФ 11.10.1999. Выделение и изучение биологических свойств бактериофагов проводили методами, предложенными Д.М. Гольдфарбом (1961), С. Лурия, Д. Дарнелом (1970), А.С. Тихоненко (1968), И.М. Габриловичем (1973), И.П. Ревенко (1978), В.Я. Ганюшкиным (1988). Селекцию бактериофагов и повышение их литической активности проводили по методике, описанной и использованной И.М. Габриловичем (1992), С.Н. Золотухиным (1994). Обнаружение бактерий рода *Proteus* в объектах окружающей среды, кормах и пищевых продуктах проводили с помощью реакции нарастания титра фага. Реакцию нарастания титра фага ставили по методикам В.Д. Тимакова и Д.М. Гольдфарба (1962), В.Я. Ганюшкина (1988).

Статистическую обработку результатов исследований проводили общепринятыми статистическими методами (Ашмарин, Васильев, Амбросимов, 1974; Урбах, 1975). Расчет результатов осуществляли с применением пакета прикладных программ Statistica 6.0. (for Windows; «Stat Soft Ins.», США), Microsoft Excel 2003 (for Windows XP).

Первоочередной задачей наших исследований стало выделение бактерий рода *Proteus* из объектов ветеринарного надзора. В период с 2003 по 2006 год было исследовано на наличие бактерий рода *Proteus* 64 пробы фекалий, сточных вод, патологического

материала от больных и павших животных, взятые в 10 хозяйствах Ульяновской и Самарской областей.

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, куда входят среды с глюкозой, лактозой, сахарозой, маннитом, мальтозой, а также на среде с мочевиной, среде Клиглера, агаре Симонса, МПЖ, среде с фенилаланином, использовали реактив Эрлиха (для обнаружения индола). В качестве дополнительных тестов ставили реакции с метилротом и Фогес-Проскауэра, а также определяли подвижность микроорганизмов. Посевы инкубировали при температуре 37-38 °С в течение 24-48 часов.

Патогенные свойства выделенных культур бактерий рода *Proteus* определяли в биопrobe на белых мышах методом внутрибрюшинного введения 0,5 млрд. микробных клеток. Для этого использовали суточные бульонные культуры бактерий, выделенные из двух органов и тканей погибших или фекалий больных животных. Взвесьями каждого вида бактерий заражали по три белых мыши. Культуру признавали патогенной в случае гибели двух или более мышей в течение трех суток после заражения и относили ее к возбудителям болезни.

В результате проведенных исследований было выделено 12 штаммов бактерий рода *Proteus* (рис. 1) из проб, взятых в 7 хозяйствах, что составило 70 %.

Вторым этапом наших исследований было изучение спектра литического действия коммерческого колипротейного бактериофага на 14 музейных штаммах бактерий рода *Proteus* и 12 штаммах бактерий рода *Proteus*, выделенных нами больных от животных. Определение спектра литической активности проводили методом нанесения бактериофага на газон бактериальной культуры. В наших исследованиях изучаемый поливалентный бактериофаг проявил активность в отношении 11 культур, процент лизиса был равен 42,3 %.

Следующим этапом работы была попытка выделить бактериофаги *Proteus* из имеющихся штаммов бактерий рода *Proteus*. Мы предполагали возможное наличие лизогенных культур, так как

бактериофаги, выделенные из них, обладают более выраженной специфичностью (Жугова, 1985). В первой серии опытов использовали методику выделения бактериофагов энтеробактерий без воздействия на них индуцирующего фактора. Во второй серии опытов на культуры, исследуемые как «лизогенные», воздействовали индуцирующим фактором, затем фильтровали через бактериальные свечи Шамберлана L-3. В качестве индуцирующего фактора применяли воздействие на бактерии ультрафиолетовых лучей в течение 30 секунд при помощи прибора «Изоolda» с ртутной лампой ДРБ 8, 18,0 % мощности которой приходилось на область 254 нм.

Полученный фильтрат исследовали на наличие фага на имеющихся культурах *Proteus* методом агаровых слоев. В наших исследованиях нам не удалось выделить фаги бактерий рода *Proteus*. Поэтому мы обратились к методике выделения бактериофагов из объектов внешней среды, предложенной Гольдфарбом (1961). При исследовании 20 проб сточных вод и 12 проб фекалий, удалось выявить присутствие 22 изолятов (рис. 2) фагов по наличию на газоне индикаторной культуры *Proteus* негативных колоний или зон лизиса. Для получения чистой линии фага проводили до десяти пассажей из изолированных негативных колоний по методикам, описанным И.М. Габриловичем (1992), С.Н. Золотухиным (1994).

*Характеристика выделенных фагов *Proteus**

Морфологию негативных колоний изучали при посевах фагов методом агаровых слоев. Негативные колонии, образуемые выде-

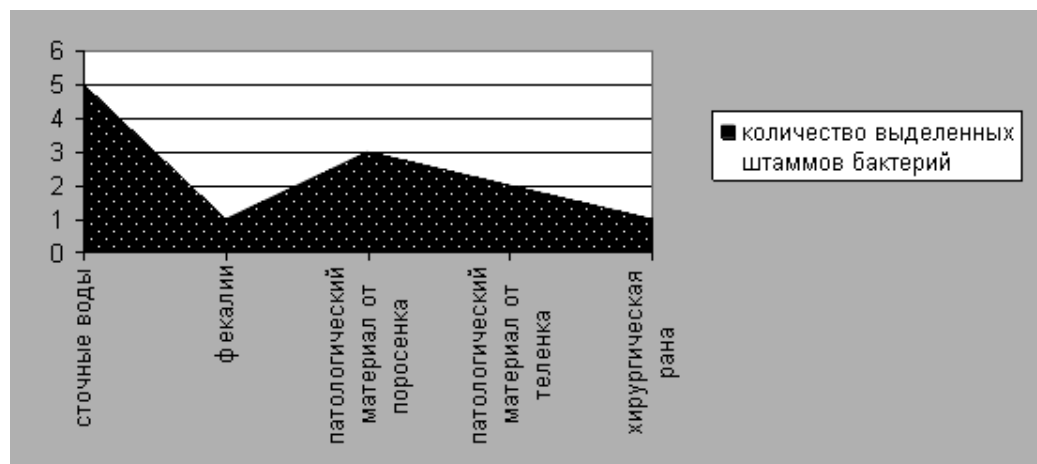


Рис. 1. Выделенные культуры бактерий рода *Proteus*

ленными бактериофагами, были разделены нами на пять типов.

1 тип: прозрачные негативные колонии округлой формы, $1,0\pm0,5$ – $1,5\pm0,5$ мм в диаметре – 7 фагов.

2 тип: прозрачные негативные колонии округлой формы, $2,0\pm0,5$ – $4,0\pm0,5$ мм в диаметре – 4 фага.

3 тип: мутные негативные колонии округлой формы, $1,0\pm0,5$ – $2,5\pm0,5$ мм в диаметре – 6 фагов.

4 тип: менее мутные негативные колонии округлой формы с выраженным вторичным ростом бактерий в центре и ореолом по периферии, $6,0\pm0,5$ – $8,0\pm0,5$ мм в диаметре – 1 фаг.

5 тип: прозрачные негативные колонии округлой формы с ровными краями и ореолом по периферии, $2,0\pm0,5$ – $3,0\pm0,5$ мм в диаметре – 2 фага.

Для изучения морфологии фаговых корпускул проводили электронно-микроскопические исследования лизатов бульонных культур: *P. vulgaris* 261 и *P. vulgaris* 3 с бактериофагами П-16 и П-261 серии УГСХА в титре от $1,8\times10^9 \pm 0,5\times10^9$ до $2,0\times10^9 \pm 0,6\times10^9$ фаговых корпускул в 1 мл (по Грация). В результате проведенных исследований было установлено, что вирионы фага П-16 УГСХА имеют структуры, состоящие из головки гексагональной формы размером 25 нм (± 4) и аналога отростка длиной 1,2 нм ($\pm 0,2$). Вирионы бактериофага П-261 УГСХА имеют сходные с фагом П-16 УГСХА структуры: головку гексагональной формы размером 22,5 нм ($\pm 0,2$) и аналог отростка длиной 0,6 нм ($\pm 0,1$). В соответствии с Международной номенклатурой вирусов по морфологическим

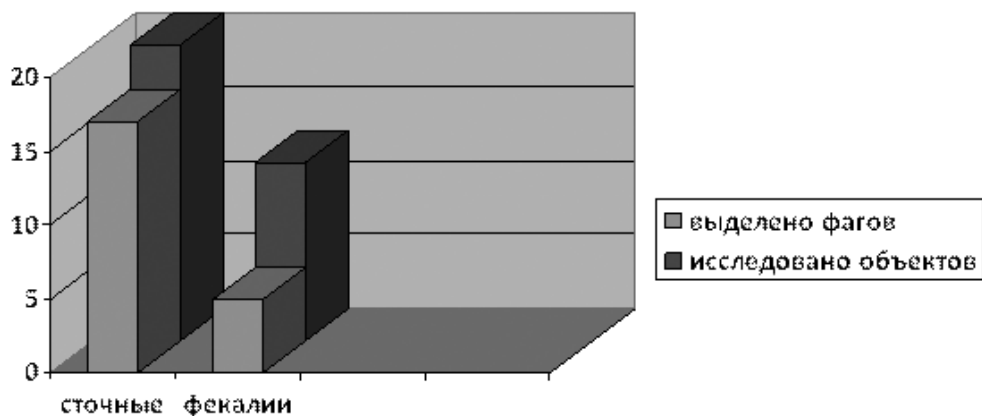


Рис. 2. Характеристика источников выделения фагов

параметрам оба фага, П-16 УГСХА и П-261 УГСХА, были отнесены к семейству Podoviridae (Murphy, 1995), по классификации А.С. Тихоненко (1968) – ко II морфологической группе: «Фаги с аналогами отростка».

Для изучения спектра литической активности селекционированных фагов использовали 26 штаммов бактерий рода *Proteus*, проводили его методом нанесения фага на газон бактериальной культуры. Наиболее широким спектром литической активности по отношению к изучаемым культурам обладали штаммы фагов П-16 УГСХА и П-261 УГСХА, которые лизировали 24 штамма протеев из 26 изученных, независимо от вида, что составляет 86,5 %.

Литическую активность выделенных бактериофагов определяли методами Аппельмана и Грациа (Ревенко, 1978). Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что выделенные протейные бактериофаги обладали различной литической активностью, показатели которой колебались по Аппельману от 10^{-5} до 10^{-8} , по Грациа от $2,1 \times 10^6 \pm 0,2 \times 10^6$ до $2,0 \times 10^9 \pm 0,6 \times 10^9$. Наиболее высокой литической активностью обладали фаги П-16 УГСХА и П-261 УГСХА: титр по Аппельману 10^{-8} у обоих фагов, по Грациа $2,0 \times 10^9 \pm 0,6 \times 10^9$ и $1,8 \times 10^9 \pm 0,5 \times 10^9$, соответственно. Для конструирования биопрепарата было отобрано два фага: П-16 УГСХА и П-261 УГСХА, которые обладали наиболее высокими титрами по Грациа и Аппельману и широким спектром литического действия.

Биологические свойства фагов П-16 и П-261 серии УГСХА

Для изучения спектра литической активности бактериофагов П-16 и П-261 серии УГСХА мы использовали дополнительно 14 штаммов бактерий рода *Proteus* из музея ВНИИВСГиЭ. Результаты опыта представлены в таблице 1.

Таким образом, совместный процент лизиса бактериофагов П-16 и П-261 серии УГСХА на 40 штаммах бактерий рода *Proteus* составил 95,0 %.

Изучение специфичности двух бактериофагов *Proteus* (П-16 УГСХА, П-261 УГСХА) проводили по отношению к предста-

Табл. 1. Спектр литического действия бактериофагов П-16 и П-261

Название бактериофага	Количество исследуемых культур	Из них чувствительны к фагу	Процент лизируемых культур
П-16 УГСХА	40	22	55,0
П-261 УГСХА	40	27	67,5
Процент лизиса			95,0

вителям других семейств и родов с использованием штаммов: *E.coli* - 46 штаммов, *Citrobacter* spp – 6 штаммов, *Morganella* spp. – 6 штаммов, *Klebsiella* spp. – 4 штамма, *Salmonella* spp. – 6 штаммов, *Enterobacter* spp. – 4 штамма, *Y.enterocolitica* – 12 штаммов, *Staphylococcus* spp. – 3 штамма, *Streptococcus* spp. – 2 штамма, *Pseudomonas aureginosa* – 4 штамма, *Bacillus cereus* – 3 штамма. Полученные результаты позволяют сделать вывод, что фаги неактивны к представителям бактерий гетерологичных родов и семейств. Таким образом, селекционированные нами фаги являются специфичными для рода *Proteus*.

Результаты проведенных исследований по изучению температурной устойчивости бактериофагов П-16 УГСХА и П-261 УГСХА серии УГСХА позволяют применять прогревание как метод инактивации микрофлоры при работе с протейными бактериофагами, так как воздействие температуры в диапазоне 60-73 °С не понижало литическую активность бактериофагов, в то время как бактериальные клетки протеев в наших исследованиях погибали при в течение 30 минут температуре 62 °С.

Бактериофаги обычно устойчивее к хлороформу, чем клетки микроорганизмов, поэтому данный химический агент является хорошим средством для освобождения фаголизата от жизнеспособных бактерий (Ревенко, 1978). Определение чувствительности бактериофагов и бактерий проводили методом обработки фаговой суспензии и бульонных культур протеев хлороформом в соотношении 1:10 при постоянном встряхивании. Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что селекционированный нами бактериофаг П-16 УГСХА проявил выраженную устойчивость к воздействию хлороформа. В то время как бактериофаг П-261 УГСХА уже через 15 минут обработки хлороформом значительно терял свою активность. Обработка бактерий индикаторных штаммов *P.vulgaris* 261 и *P.vulgaris* 3 в течение 15 минут хлороформом приводила к их полной гибели.

Для разработки технологических параметров изготовления биопрепарата на основе фагов П-16 и П-261 серии УГСХА необходимо было установить изменение литической активности указанных штаммов при хранении в условиях 2-4 °С. Полученные результаты свидетельствуют о том, что селекционированные протейные бактериофаги при хранении в условиях 2-4 °С в течение

ние 12 месяцев незначительно снижали литическую активность до 10^7 - 10^8 фаговых корпускул в 1 см³.

Для изготовления биопрепарата использовали штаммы фагов П-16 и П-261 серии УГСХА и штаммы бактерий *P.vulgaris* 3 и *P.vulgaris* 261. Индикаторные культуры хранятся на полужидком МПА (рН 7,2-7,4) с содержанием 0,3% бактериологического агара при температуре 2-4 °С, которые пересеваются каждые 2-3 месяца. Биопрепарат готовится на коммерческом мясо-пептонном бульоне. Установлено, что температурным оптимумом для культивирования биопрепарата на основе фагов П-16 и П-261 серии УГСХА с индикаторными культурами была температура 37 °С. Определено оптимальное соотношение бактериофага П-16 УГСХА и штамма *P.vulgaris* 3 – 1:1, т.е. 0,2 мл фага на 0,2 мл индикаторной культуры, время пассажа составляет 3 часа (параметры культивирования бактериофага П-261 УГСХА с культурой *P.vulgaris* 261 аналогичны).

Очистка фагов от бактериальных клеток осуществлялась методом прогревания при температуре 62 °С в течение 30 минут. Разлитый во флаконы фаг контролируется на чистоту и стерильность, обязательно определяется его титр. Биопрепарат на основе фагов представляет собой 2 флакона с прозрачной жидкостью желтоватого цвета (цвет засеянной среды) без посторонних примесей, осадка. Титр не ниже 10⁸. Дату изготовления серии исчисляют со дня закупки флаконов. Срок годности бактериофагов при температуре 2-4 °С 12 месяцев.

Используя строгую специфичность селекционированных нами бактериофагов по отношению к бактериям рода *Proteus*, нами была разработана схема ускоренной идентификации этих микроорганизмов по показателям лизиса культур на плотной питательной среде. Предлагаемая нами схема позволяет идентифицировать бактерии рода *Proteus* за 48 часов (2 суток). Срок бактериологического исследования по схеме, изложенной в «Методических указаниях по бактериологической диагностике смешанной кишечной инфекции молодняка животных, вызываемой патогенными энтеробактериями», составил 96 часов (4 суток) при больших затратах посуды и реактивов.

Определение параметров постановки РНФ и разработку количественного показателя реакции, имеющего диагностическое значе-

ние, проводили по методике, предложенной В.Д. Тимаковым и Д.М. Гольдфарбом (1962). Проведены эксперименты с использованием МПБ, контаминированного 18 часовыми индикаторными культурами *P. vulgaris* 261 (для фага П-261 УГСХА) и *P. vulgaris* 3 (для фага П-16 УГСХА) от 10^1 до 10^5 м.к./мл. В качестве контроля был использован интактный МПБ. Учет результатов проводили через 12-16 часов инкубирования. С этой целью подсчитывали число негативных колоний фага, образовавшихся на плотной питательной среде в опытной пробе и в контроле (контроль титра фага). Учет результатов РНФ проводили согласно оценке, предложенной В.Я. Ганюшкиным (1988): при увеличении количества частиц от 3 до 5 раз бактериофага в опытной пробе по отношению к контролю результат считался слабо положительным, при увеличении свыше 5 раз – положительным, при увеличении в 10 и более раз – резко положительным.

По результатам проведенных опытов установлено, что количество фаговых частиц более чем в 5 раз превышает количество фаговых частиц в контрольных пробах при контаминации протеом МПБ в концентрации 10^2 м.к./мл.

Для решения указанной задачи необходимо было провести эксперименты на тест-объекте по выявлению наиболее эффективного временного показателя взаимодействия фага и индикаторной культуры при сохранении остальных параметров (температурный режим, концентрация бактериальной культуры и фаговых корпускул в 1 мл) постановки РНФ. В качестве тест-объекта использовали МПБ, контаминированный бактериями рода *Proteus*, оптимальное время экспозиции устанавливали из шести следующих параметров:

- при предварительном подращивании исследуемого материала в течение 5, 16, 24 часов при температуре 37 °С, после добавления фагов смесь выдерживали в течение 5 часов при температуре 37 °С;

- при увеличении времени контакта исследуемого материала с фагом до 10, 16 и 24 часов при температуре 37 °С.

Для изучения чувствительности РНФ, в зависимости от времени подращивания, МПБ контаминировали бактериями рода *Proteus* в концентрации от 10^1 до 10^5 м.к./мл и инкубировали в термостате при температуре 37 °С в течение 5, 16, 24 часов. Результаты исследования представлены в таблице 2.

Установлено, что подращивание материала в течение 5 часов позволяет обнаружить протей с помощью РНФ в концентрации 10^2 м.к./мл для фагов П-261 УГСХА и П-16 УГСХА. При подращивании исследуемого материала в течение 16 часов чувствительность реакции не повышается и позволяет обнаружить бактерии фагами П-261 УГСХА и П-16 УГСХА в количестве 10^2 и 10^2 м.к./мл, соответственно. На проведение исследования затрачивается 32 часа. Бактериологическим методом это же количество протеев обнаружить удалось через 88 часов. При подращивании исследуемого материала в течение 24 часов чувствительность реакции не увеличивается, также позволяет обнаружить бактерии в количестве 10^2 и 10^2 м.к./мл. На проведение этого варианта реакции необходимо 40 часов. Во втором варианте опыта МПБ, контаминированный бактериями рода *Proteus* в концентрации от 10^1 до 10^5 м.к./мл, не подращивали, а увеличивали время контакта с фагом до 5, 10, 16, 24 часов. Результаты представлены в таблице 3.

По результатам изучения чувствительности РНФ в зависимости от времени инкубирования исследуемого материала с фагом установлено, что увеличение времени до 5 часов позволяет обнаружить протеев с помощью РНФ в концентрации 10^2 м.к./мл для фагов П-16 УГСХА и П-261 УГСХА.

При инкубировании исследуемого материала с фагом в течение 10-16 часов чувствительность реакции не повышается, что позволяет обнаружить бактерии в количестве 10^2 и 10^2 м.к./мл, соответственно. Бактериологическим методом это же количество протеев удалось обнаружить через 88 часов. При инкубировании с фагом исследуемого материала в течение 24 часов чувствительность реакции также не увеличивается и позволяет обнаружить бактерии в количестве 10^2 и 10^2 м.к./мл соответственно. Бактери-

Табл. 2. Чувствительность РНФ в зависимости от времени подращивания.

Фаги	№	Варианты исследований	Минимальное количество протеев, обнаруживаемое с помощью		Время, затраченное на проведение исследований, (в часах)	
		Длительность подращивания исследуемого материала	РНФ	Бактериологический Метод	РНФ	Бактериологический метод
		Часы				
П-16 УГСХА	1	5	10^2	10^4	22	79
	2	16	10^2	10^2	32	88
	3	24	10^2	10^2	40	96
П-261 УГСХА	1	5	10^2	10^4	22	79
	2	16	10^2	10^2	32	88
	3	24	10^2	10^2	40	96

ологическим методом протеев удавалось обнаружить в концентрации 10^2 м.к./мл, но на обнаружение затрачивается 88 часов. На основании наших данных, считаем, что наиболее оптимальным являются режимы РНФ при 5 часовой экспозиции исследуемого материала с фагом, когда удастся провести индикацию бактерий в количестве 10^2 и 10^2 м.к. в миллилитре исследуемого субстрата, на исследование которого затрачивается 18 часов.

Пробы образцов объектов ветеринарного надзора (водопроводная вода, комбикорм, фекалии, мясо) в объеме 10 г (мл) вносили в колбы и контаминировали *P. vulgaris* 261 и *P. vulgaris* 3 в концентрации 10^1 - 10^5 м.к./мл, заливали МПБ из расчета 10 мл бульона на 1 г (мл) пробы. Пробы мяса (кусочки свинины) растирали в фарфоровой ступке. Для контроля использовали колбы с пробами, не контаминированными бактериями *Proteus*.

По результатам проведенных опытов установлено, что увеличение титра фагов П-16 и П-261 серии УГСХА в 5 раз произошло при концентрации: 10^2 м.к. протеев в 1 мл водопроводной воды, 10^3 м.к. протеев в 1 г комбикорма, 10^3 м.к. протеев в 1 г фекалий, 10^3 м.к. протеев в 1 г мяса.

Для оценки эффективности реакции нарастания титра фага в условиях производства нами были проведены исследования по фагодиагностике кишечной инфекции поросят, протекающей с

Табл. 3. Чувствительность РНФ в зависимости от времени инкубирования исследуемого материала с фагами.

Фаги	№	Варианты исследований	Минимальное количество протеев, обнаруживаемое с помощью		Время, затраченное на проведение исследований, (в часах)	
		Время контакта исследуемого материала с фагом	РНФ	Бактериологический метод	РНФ	Бактериологический метод
		часы				
П-16 УГСХА	1	5	10^2	10^4	18	79
	2	10	10^2	10^3	23	82
	3	16	10^2	10^2	29	88
	4	24	10^2	10^2	41	96
П-261 УГСХА	1	5	10^2	10^4	18	79
	2	10	10^2	10^3	23	82
	3	16	10^2	10^2	29	88
	4	24	10^2	10^2	41	96

Табл. 4. Литическая активность протейных монофагов и их смесей

Название фага	Титр фага в моноварианта	Титр смеси фагов
П-16 УГСХА	$2,0 \times 10^9 \pm 1,0 \times 10^9$	$1,0 \times 10^9 \pm 0,4 \times 10^9$
П-261 УГСХА	$1,8 \times 10^9 \pm 0,7 \times 10^9$	$1,0 \times 10^9 \pm 0,2 \times 10^9$

участием протеев. Обнаружение проводили бактериологическим методом и с помощью РНФ.

При исследовании 11 проб фекалий от больных диареей поросят, бактериологическим методом выделено бактерий рода *Proteus* из 36 % проб, а в РНФ - 55 % проб. Результаты 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.

В таблице 4 приведены результаты предварительного титрования фагов и их смеси на индикаторных штаммах протеев.

Так как исходное число фаговых корпускул в смеси у каждого фага было практически в два раза меньше, то и результаты титрования смеси показали по каждой культуре двукратное уменьшение титра фага (по Грациа), что составило $1,0 \times 10^9$ для обоих фагов соответственно. В абсолютных числах этот показатель являлся диагностическим – $1,0 \times 10^9$ корпускул при исходной концентрации обоих фагов 10^4 . Таким образом, на индикаторных культурах была установлена возможность использования смеси протейных фагов с целью индикации.

В результате проведенных исследований были получены новые штаммы бактериофагов, активные в отношении штаммов бактерий рода *Proteus*, выделенных из объектов ветеринарного надзора. Изучены основные биологические свойства выделенных фагов. Впервые разработаны биотехнологические параметры фагоиндикации и фагоидентификации бактерий рода *Proteus* в объектах ветеринарного надзора. Доказана эффективность использования селекционированных бактериофагов с диагностической целью. Выделены и селекционированы специфичные бактериофаги, которые используются для изготовления диагностических препаратов. Разработаны технологические параметры по получению диагностического биопрепарата из выделенных фагов и схемы фагодиагностики.

Для конструирования биопрепарата были отобраны два фага, которые депонированы в государственной коллекции Всероссийского государственного центра качества и стандартизации лекарственных препаратов для животных и кормов ФГУ «ВГНКИ»

(Справка о депонировании штамма бактериофага П-16 УГСХА от 21.02.2006 № 263-3/19; Справка о депонировании штамма бактериофага П-261 УГСХА от 21.02.2006 № 263-4/19) для получения патентов.

Разработана «Временная инструкция по изготовлению и контролю лабораторной серии индикаторных протейных бактериофагов П-16 УГСХА, П-261 УГСХА», одобренная Ученым Советом Ульяновской ГСХА и утвержденная ректором академии 17.01.2006.

Для врачей-бактериологов предложены «Методические рекомендации по ускоренной индикации и идентификации энтеробактерий рода *Proteus* в патологическом материале, кормах, пищевом сырье и объектах внешней среды с применением специфических бактериофагов», утвержденные Отделением ветеринарной медицины Российской академии сельскохозяйственных наук (РАСХН) (26.06.2006).

Результаты изучения биологических свойств бактериофагов П-16 УГСХА и П-261 УГСХА и индикации бактерий рода *Proteus* в объектах ветеринарного надзора методом РНФ подтверждена актом производственных испытаний (от 10.01.2006), актами комиссионных испытаний в Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии (от 30.01.2006), актами комиссионных испытаний в Всероссийском государственном центре качества и стандартизации лекарственных препаратов для животных и кормов (ВГНКИ) (от 17.02.2006).

ЛИТЕРАТУРА

1. Ашмарин, И.П. Быстрые методы обработки и планирование эксперимента / И.П. Ашмарин, Н.И. Васильев, В.А. Амбросов – М.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1974. – С. 16.
2. Габрилович, И.М. Общая характеристика бактериофагов / И.М. Габрилович // Основы бактериофагии. – Минск, 1973. – С.5-24.
3. Габрилович, И.М. Биологические свойства бактериофагов *Serratia marcescens* / И.М. Габрилович // ЖМЭИ. – 1992. – №6. – С.10-12.
4. Ганюшкин В.Я. Бактериофаги сальмонелл и их применение в ветеринарии. – Ульяновск. – 1988. – С.45.
5. Гольдфарб, Д.М. Бактериофагия / Д.М. Гольдфарб – М.: Медгиз, 1961. – С. 6-184.
6. Заркуа, З.П. Мечурчлишвили Н.М., Гадуа И.М. Особенности микрофлоры гнойно-воспалительных осложнений у больных раком желудка / З.П. Заркуа, Н.М. Мечурчлишвили, И.М. Гадуа // Перспективы использования препаратов бактериофага для превенции и лечения инфекций, вызванных патогенными и условно-патогенными микроорганизмами: Мат. Межд. семинара, 10-11 ноября 2005 года, Грузия. – Тбилиси, 2005. – С.24.
7. Золотухин, С.Н. Бактериофаги *M.organii* и их применение при желудочно-кишечных заболеваниях поросят // Автореф. дис. ... канд. вет. наук. – М, 1994. – С. 14.
8. Золотухин, С.Н. Смешанная кишечная инфекция телят и поросят, вызываемая патогенными энтеробактериями / С.Н. Золотухин, Л.С. Каврук, Д.А. Васильев. – Ульяновск: УГСХА, 2005. – С.20-25.

9. Колпикова, Т.И. Перспективы практического применения листериозных бактериофагов / Т.И. Колпикова, И.А. Бакулов, В.М. Котляров // Вопросы ветеринарной вирусологии, микробиологии и эпизоотологии: Материалы научной конференции ВНИИВиМ. Часть 11. – Покров, 1992. — С.211-212.
10. Лурия, С. Общая вирусология / Лурия С., Дарнелл Д. – М.: «Мир», 1970. – С.36-47.
11. Мищенко, В.А. Некоторые аспекты патогенеза диареи новорожденных телят / В.А. Мищенко // Ветеринария. – 1999. – №9. – С.20-23.
12. Натидзе, Л. Бактериофаги в ветеринарии: реальность и перспективы / Л. Натидзе, С. Ригвава, М. Натидзе [и др]. // Мат. Межд. семинара «Перспективы использования препаратов бактериофага для превенции и лечения инфекций, вызванных патогенными и условно-патогенными микроорганизмами» 10-11 ноября 2005 года, Грузия. – Тбилиси, 2005. – С.15.
13. Парайко, Е.Т. Серологические варианты и группы протей у поросят при желудочно-кишечных болезнях / Е.Т. Парайко, И.Н. Парайко // Биопрепараты, методы их стандартиз. и контроля: Всерос. гос. науч.- контр. ин-т вет. препаратов. – М., 1990. – С.157-160.
14. Ревенко, И.П. Бактериофаги и их использование в ветеринарной практике / И.П. Ревенко. – Киев: «Урожай», 1978. – С. 41-88.
15. Тихоненко, А.С. Ультраструктура вирусов бактерий / А.С. Тихоненко. – М.: «Наука», 1968. – С. 89.
16. Урбах, В.Ю. Статистический анализ в биологических исследованиях / В.Ю. Урбах. – М.: «Медицина», 1975. – С. 46.
17. Чанишвили, Л. Оценка эффективности концепции фаговой терапии с использованием модели маститных коров как альтернативы антибиотикотерапии / Л. Чанишвили, М. Надирадзе, Т. Каландаришвили [и др]. // Перспективы использования препаратов бактериофага для превенции и лечения инфекций, вызванных патогенными и условно-патогенными микроорганизмами: Мат. Межд. семинара 10-11 ноября 2005 года, Грузия. – Тбилиси, 2005. – С.19.

ГЛАВА 3 БАКТЕРИОФАГИ БАКТЕРИЙ РОДА *BACILLUS*

CHAPTER 3. BACTERIOPHAGES OF THE *BACILLUS* GENUS

ФЕОКТИСТОВА Н.А.

3.1. ВЫДЕЛЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ ОСНОВНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БАКТЕРИОФАГОВ БАКТЕРИЙ *BACILLUS SUBTILIS*

FEOKTOSTOVA N.A. ISOLATION AND STUDY OF THE MAIN QUALITIES
OF *BACILLUS SUBTILIS* PHAGES

Контаминация пищевого сырья и продуктов питания бактериями *Bacillus subtilis* на всех этапах технологического процесса – это серьезная проблема перерабатывающей промышленности. Эти почвенные сапрофиты встречаются повсеместно, отличаются высокой температурной устойчивостью, солетолерантны и способны продуцировать токсины. При контаминации бациллами пищевое сырье и выработанные из него продукты питания зачастую не изменяют свои органолептические свойства, поэтому определить их присутствие в пище невозможно до тех пор, пока у потребителя не появятся симптомы интоксикации (Мустафин, 2011; Калдыркаев, 2011). Пищевые токсикозы, вызванные бактериями *B. subtilis*, характеризуются острым течением болезни и могут вызвать летальный исход (Пучкова, 2005, Медведев, 2010).

Учитывая сложность лабораторной диагностики, остается актуальной проблема унифицированной схемы бактериологического исследования, повышается значимость бактериофагов как высоко специфичного инструмента для индикации микроорганизмов, позволяющего точно идентифицировать пищевые контаминанты, а также осуществлять более детальную дифференциацию отдельных биотипов и фаговаров внутри вида. Возможность фагоидентификации вытекает из специфичности дей-

ствия бактериофагов, которая может быть настолько выражена, что позволяет дифференцировать не только отдельные виды, но и серологически неотличимые штаммы в пределах одного вида (Камбаров, 1963; Коритняк, 2005). Поэтому все большее число исследователей предпочитают использовать фаговые тесты, как высокоспецифичный метод, способный дифференцировать близкородственные штаммы (Золотухин, 2005; Мустафин, 2011).

Типовые высокоспецифичные бактериофаги – это биоиндикаторы, благодаря которым можно проводить определение бактерий отдельных видов, иметь возможность установить источник и путь передачи инфекционного заболевания, т.е. провести его эпидемиологический анализ. Так в Канаде в промежуток с 1986 по 1993 было отобрано 146 изолятов *Bacillus cereus*, причастных к 18 вспышкам пищевого отравления. Из них 142 штамма было разделено на 17 типов фагов (Ahmed, 1995).

В настоящий момент в Российской Федерации не разработаны методики фагоиндикации и фагоидентификации бактерий *B. subtilis* в объектах санитарного надзора. Использование подобных методик позволит в сжатые сроки типировать бактерии вида *B. subtilis*, используя минимальное количество расходных материалов и трудозатрат в течение 25 часов.

Целью нашей работы была разработка биотехнологических параметров изготовления фагового препарата для индикации и идентификации бактерий *B. subtilis* в пищевом сырье и продуктах питания.

Объекты исследований в данной работе были: 40 штаммов бактерий *B. subtilis*, из них 5 музейных штаммов из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы Ульяновской ГСХА; 5 музейных штаммов из лаборатории санитарной микробиологии ВНИИВСГиЭ; 30 штаммов выделены из проб пищевых продуктов и объектов санитарного надзора. Штаммы бактерий: *Morganella*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Y. enterocolitica*, *B. cereus*, *B. mycoides*, *B. megaterium*, *B. mesentericus*, *B. thuringiensis* полученные из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина». Штаммы бактериофагов – 22 изолята бактериофагов *B. subtilis*, выделенные из объек-

тов санитарного надзора Ульяновской и Самарской областей.

В качестве объектов исследований для выделения культур *B. subtilis* и специфичных для них фагов, а также для отработки реакции нарастания титра фага (РНФ) использовали пищевые продукты, купленные на продовольственных рынках г. Ульяновска, г. Самары, г. Геленджика, г. Сочи и г. Сengiлея, комбикорм, пробы почвы и сточных вод.

Для выделения бактерий *B. subtilis* использовали общепринятые схемы (Затула, 1973; Смирнов, 1982). Выделение и изучение биологических свойств бактериофагов проводили методами, предложенными Д.М. Гольдфарбом (1961), С. Лурия, Д. Дарнелом (1970), А.С. Тихоненко (1968), Т.Г. Чинашвили (1968), И.М. Габриловичем (1973), И.П. Ревенко (1978), В.Я. Ганюшкиным (1988). Селекцию бактериофагов и повышение их литической активности проводили по методике, описанной И.М. Габриловичем (1992), С.Н. Золотухиным (1994). Обнаружение бактерий *B. subtilis* в водопроводной воде, кормах и пищевых продуктах проводили с помощью реакции нарастания титра фага. Реакцию нарастания титра фага ставили по методикам В.Д. Тимакова и Д.М. Гольдфарба (1962), В.Я. Ганюшкина (1988).

Статистическую обработку результатов исследований проводили общепринятыми статистическими методами (Ашмарин, Васильев, Амбросимов, 1974; Урбах, 1975). Расчет результатов осуществляли с применением пакета прикладных программ Statistica 6.0. (for Windows; «Stat Soft Ins.», США), Microsoft Excel 2003 (for Windows XP).

Первоочередной задачей наших исследований стало выделение бактерий *B. subtilis* из объектов санитарного надзора. В период с 2008 по 2010 год было исследовано на наличие бактерий *B. subtilis* 74 пробы пищевых продуктов, приобретенных в Ульяновской, Самарской областях и Краснодарском крае, уровень контаминации исследованных пищевых продуктов бактериями *B. subtilis* составил 41 %. В результате проведенных исследований было выделено 30 культур бактерий, которые мы классифицировали по ферментативным свойствам (на основании тестов, описанных в литературных источниках и результатах изучения биохимических свойств штаммов бактерий вида *B. subtilis*, полученных из музея кафедры МВЭ и ВСЭ УГСХА) и отнесли к *B. subtilis*. Все вы-

деленные бактерии имели форму палочки размером 3-5x0,6 мкм, споры имели овальную форму не превышающие размер клетки. Грамположительные, подвижные, колонии сухие, мелкоморщинистые, бархатистые, в основном бесцветные. Положительно реагировали на глюкозу, сахарозу, сорбит, маннозу, арабинозу, маннит, с ферментацией сахара и образованием кислоты, газа.

Следующим этапом работы было выделение фагов бактерий *B. subtilis* из имеющихся штаммов бактерий *B. subtilis*. Мы предполагали возможное наличие лизогенных культур, так как бактериофаги, выделенные из них, обладают более выраженной специфичностью. В первой серии опытов использовали методику выделения бактериофагов бацилл без воздействия на них индуцирующего фактора. Во второй серии опытов на культуры, исследуемые как «лизогенные», воздействовали индуцирующим фактором (применялось воздействие на бактерии ультрафиолетовых лучей в течение 5-20 минут при помощи бактерицидной лампы, 80 % энергии которой приходится на длину волны 2537 Å, на расстоянии 50 см между лампой и объектом). Полученный фильтрат исследовали на наличие фага на имеющихся культурах *B. subtilis* методом агаровых слоев. В наших исследованиях нам не удалось выделить фаги бактерий *B. subtilis*.

Дальнейшая наша работа была посвящена выделению бактериофагов из объектов внешней среды (Адамс, 1962). При исследовании 10 проб сточных вод, 32 проб почвы и 40 проб пищевых продуктов удалось выделить 22 изолята фагов бактерий *B. subtilis*. Для получения чистой линии фага проводили до десяти пассажей из изолированных негативных колоний (Габрилович, 1992, Золотухин, 1994).

Характеристика выделенных фагов бактерий B. subtilis

Морфология негативных колоний. Морфологию негативных колоний изучали при посевах фагов методом агаровых слоев (Грациа, 1936). Негативные колонии, образуемые выделенными бактериофагами, были разделены нами на два типа. 1 тип: прозрачные негативные колонии округлой формы, 1,0±0,5 – 2,5±0,5 мм в диаметре; 2 тип: прозрачные негативные колонии округлой формы, 2,6±0,5 – 4,0±0,5 мм в диаметре.

Спектр литического действия. Для изучения спектра литического действия селекционированных фагов использовали 35

штаммов бактерий *B. subtilis*, исследования проводили методом нанесения фага на газон бактериальной культуры (Ганюшкин, 1988). Наиболее широким спектром литической активности по отношению к изучаемым культурам обладают штаммы фагов Bs-13 УГСХА и Bs-16 УГСХА, которые лизировали 32 штамма *B. subtilis* из 35 изученных штаммов, что составляет 91,5 % (табл. 1)

Литическая активность. Литическую активность выделенных бактериофагов определяли методом агаровых слоев (Грация, 1936; Ревенко, 1978). Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что выделенные бактериофаги обладали различной литической активностью, показатели которой колебались от $1,7 \times 10^6 \pm 0,3 \times 10^6$ до $8,0 \times 10^9 \pm 0,5 \times 10^9$ корпускул в 1 мл фага (табл. 1). Наиболее высокой литической активностью обладали фаги Bs-13 УГСХА и Bs-16 УГСХА: титр по Грация $2,8 \times 10^9 \pm 0,8 \times 10^9$ и $8,0 \times 10^9 \pm 0,5 \times 10^9$, соответственно.

Для дальнейших исследований по конструированию биопрепарата было отобрано два фага Bs-13 УГСХА и Bs-16 УГСХА, которые обладали наиболее высокими титрами литической активности и широким спектром литического действия.

Биопрепарат на основе бактериофагов должен быть высоко-специфичным, термоустойчивым, сохранять свою литическую активность при хранении в течение 12 месяцев. Результаты определения оптимальных температурных показателей культивирования свидетельствуют о том, что оптимальной является температура культивирования биопрепарата на основе фагов – 37 °С. Нами решено инкубировать систему специфических бактериофагов Bs – 13 УГСХА и Bs – 16 УГСХА с клетками *B. subtilis* при температуре 37 °С. Установлено оптимальное соотношение бактериофага Bs – 13 УГСХА и культуры *B. subtilis* 26 – 1 : 5, т.е. 0,2 мл фагах 1 мл индикаторной культуры, оптимальное время пассажа при температуре 37 °С составляет 6 часов (параметры культивирования бактериофага Bs – 16 УГСХА с культурой *B. subtilis* 4 аналогичны). За это время происходил лизис индикаторной культуры (растворение характерной пленки на поверхности МПА по сравнению с контролем). Очистка фагов от бактериальных клеток осуществлялась нами методом фильтрации с использованием мембранных фильтров фирмы Millipore (filter type: 0,22 μm GV).

Табл.1. Характеристика выделенных фагов бактерий *B. subtilis*

№	Бактериальная культура <i>B. subtilis</i> / название фага	Хар-ка негативных колоний, мм в диаметре	Спектр литического действия на 35 штаммах, %	Количество корпускул в 1 мл фага (Грациа, 1936)
1.	<i>Bacillus subtilis</i> 61 / Bs – 1 УГСХА	2,5±0,5 – 3,0±0,5	48,6	3,5x10 ⁷ ± 0,5x10 ⁷
2.	<i>Bacillus subtilis</i> 3/ / Bs – 2 УГСХА	3,0±0,5 – 4,0±0,5	42,9	1,0x10 ⁸ ± 0,3x10 ⁸
3.	<i>Bacillus subtilis</i> 3П / Bs – 3 УГСХА	1,0±0,5	71,4	2,2x10 ⁷ ± 1,2x10 ⁷
4.	<i>Bacillus subtilis</i> 98 / Bs – 4 УГСХА	1,0±0,5 – 1,5±0,5	51,4	2,4x10 ⁸ ± 1,6x10 ⁸
5.	<i>Bacillus subtilis</i> 8 / Bs – 5 УГСХА	0,5±0,5 – 1,0±0,5	37,1	2,0x10 ⁷ ± 0,9x10 ⁷
6.	<i>Bacillus subtilis</i> 21 / Bs – 6 УГСХА	1,0±0,5 – 1,3±0,5	34,2	6,0x10 ⁸ ± 3,4x10 ⁸
7.	<i>Bacillus subtilis</i> 17 / Bs – 7 УГСХА	1,0±0,5 – 1,5±0,5	20,0	4,0x10 ⁷ ± 2,9x10 ⁷
8.	<i>Bacillus subtilis</i> 5 / Bs – 8 УГСХА	1,0±0,5 – 1,5±0,5	28,6	1,7x10 ⁸ ± 0,3x10 ⁸
9.	<i>Bacillus subtilis</i> 16 / Bs – 9 УГСХА	1,0±0,5	22,9	2,4x10 ⁷ ± 1,1x10 ⁷
10.	<i>Bacillus subtilis</i> 32 / Bs – 10 УГСХА	1,0±0,5 – 1,5±0,5	25,7	3,0x10 ⁸ ± 1,5x10 ⁸
11.	<i>Bacillus subtilis</i> 10 / Bs – 11 УГСХА	2,6±0,5 – 3,0±0,5	31,4	1,0x10 ⁸ ± 0,3x10 ⁸
12.	<i>Bacillus subtilis</i> 12 / Bs – 12 УГСХА	1,0±0,5 – 1,5±0,5	34,3	4,0x10 ⁷ ± 0,5x10 ⁷
13.	<i>Bacillus subtilis</i> 26 / Bs – 13 УГСХА	6,0±0,5 – 8,0±0,5	80,0	2,8x10 ⁸ ± 0,8x10 ⁸
14.	<i>Bacillus subtilis</i> 23 / Bs – 14 УГСХА	1,0±0,5	22,9	2,4x10 ⁷ ± 1,3x10 ⁷
15.	<i>Bacillus subtilis</i> 12 / Bs – 15 УГСХА	1,5±0,5	28,6	4,0x10 ⁷ ± 2,1x10 ⁷
16.	<i>Bacillus subtilis</i> 4 / Bs – 16 УГСХА	2,5±0,5 – 3,0±0,5	88,6	8,0x10 ⁸ ± 0,5x10 ⁸
17.	<i>Bacillus subtilis</i> 19 / Bs – 17 УГСХА	1,5±0,5	17,1	1,5x10 ⁷ ± 0,7x10 ⁷
18.	<i>Bacillus subtilis</i> 4 / Bs – 18 УГСХА	1,0±0,5 – 1,5±0,5	54,3	5,1x10 ⁸ ± 2,4x10 ⁸
19.	<i>Bacillus subtilis</i> 31 / Bs – 9 УГСХА	1,0±0,5 – 1,5±0,5	37,2	3,0x10 ⁷ ± 1,6x10 ⁷
20.	<i>Bacillus subtilis</i> 25 / Bs – 20 УГСХА	3,0±0,5 – 3,5±0,5	20,0	1,2x10 ⁷ ± 0,4x10 ⁷
21.	<i>Bacillus subtilis</i> 27 / Bs – 21 УГСХА	2,6±0,5 – 3,0±0,5	51,4	2,0x10 ⁷ ± 1,7x10 ⁷
22.	<i>Bacillus subtilis</i> 14 / Bs – 22 УГСХА	2,0±0,5 – 2,5±0,5	28,6	3,4x10 ⁸ ± 1,9x10 ⁸

Табл. 2. Спектр литического действия биопрепарата на основе фагов.

Название бактериофага	Количество исследуемых культур	Из них чувствительны к фагу	Процент лизируемых культур
Bs – 13 УГСХА	40	31	77,5
Bs – 16 УГСХА	40	34	85,0
Процент лизиса исследуемых культур бактериофагами Bs – 13 УГСХА; Bs – 16 УГСХА			95,0

Для изучения спектра литического действия биопрепарата на основе бактериофагов Bs – 13 УГСХА и Bs – 16 УГСХА мы использовали дополнительно 5 штаммов бактерий *B. subtilis* из музея ВНИИВСГиЭ. Результаты опыта представлены в таблице 2. Совокупный процент лизиса биопрепаратом на 40 штаммах бактерий *B. subtilis* составил 95,0 % (табл. 2).

Изучение специфичности двух бактериофагов *B. subtilis* (Bs – 13 УГСХА, Bs – 16 УГСХА) проводили по отношению к представителям гетерологичных семейств и родов с использованием штаммов: spp. *Morganella* – 6 штаммов, spp. *Klebsiella* – 6 штаммов, spp. *Salmonella* – 6 штаммов, spp. *Staphylococcus* – 4 штамма, spp. *Streptococcus* – 2 штамма, spp. *Pseudomonas* – 4 штамма, *Y. enterocolitica* – 12 штаммов; и гомологичного рода: *B. cereus* – 25 штаммов, *B. mycoides* – 15 штаммов, *B. megaterium* – 14 штаммов, *B. mesentericus* – 18 штаммов, *B. thuringiensis* – 4 штамма.

Полученные результаты позволяют сделать вывод, что биопрепарат неактивен к представителям бактерий гетерологичных видов, родов и семейств. Были проведены исследования по изучению температурной устойчивости биопрепарата и его устойчивости к воздействию хлороформа. Установлено, что бактериофаги *B. subtilis* (Bs – 13 УГСХА, Bs – 16 УГСХА) при воздействии температуры в диапазоне 64 – 76 °С не понижали своей литической активности. Результаты проведенных исследований свидетельствуют о выраженной устойчивости биопрепарата к воздействию хлороформа.

Используя строгую специфичность биопрепарата, нами была разработана схема ускоренной идентификации бактерии *B. subtilis* по показателям лизиса культур на плотной питательной среде («метод стекающей капли»). Разработанная нами схема (рис. 1) позволяет идентифицировать бактерии *B. subtilis* за 48 часов (2 суток). Срок бактериологического исследования по традиционной схеме выделения и дифференциации бацилл первой морфологической группы (Gordon, 1973), составил 96 часов (4 суток) при больших затратах посуды и реактивов.

Для разработки технологических параметров изготовления биопрепарата из фагов Bs – 13 УГСХА и Bs – 16 УГСХА необходимо было установить изменение литической активности указанных штаммов при хранении в условиях 2 – 4 °С. Полученные результаты свидетельствуют о том, что селекционированные бактериофаги *B. subtilis* при хранении в условиях 2 – 4 °С в течение 12 месяцев незначительно снижали литическую активность до 10^8 фаговых корпускул в 1 см³.

Определение параметров постановки реакции нарастания титра и разработку количественного показателя реакции, имеюще-

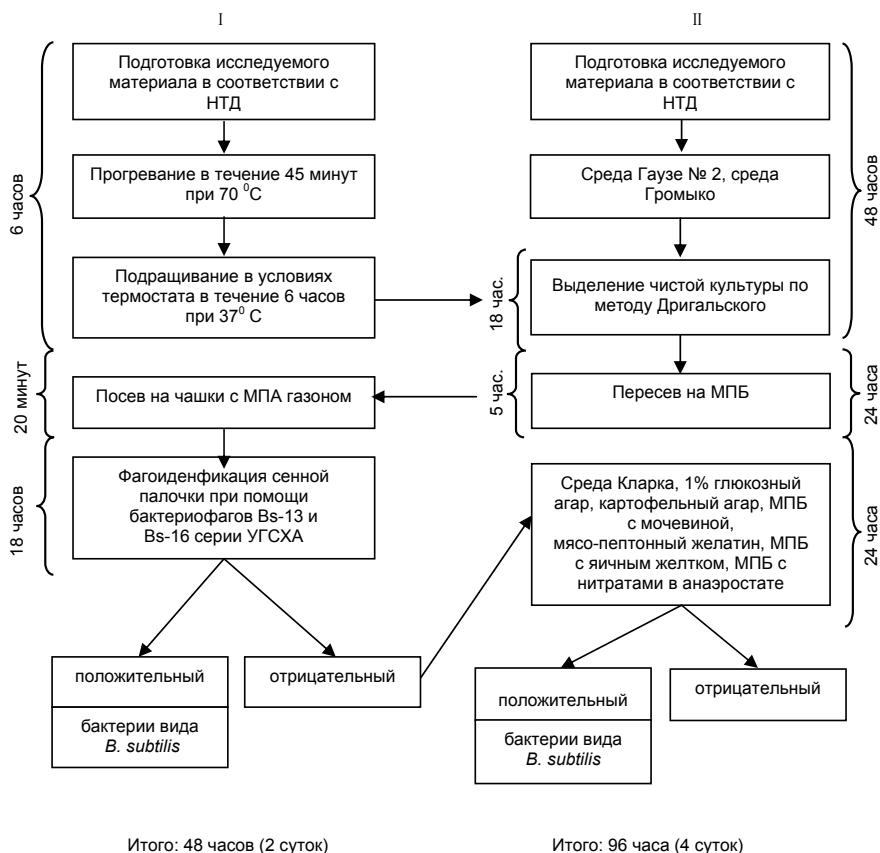


Рис. 1. Схема ускоренной идентификации бактерий *B. subtilis* с помощью селекционированных нами бактериофагов (I) в сравнении со схемой выделения и дифференциации бацилл первой морфологической группы (II)

го диагностическое значение, проводили по методике, предложенной В.Д. Тимаковым и Д.М. Гольдфарбом (1962). Проведены эксперименты с использованием МПБ, контаминированного 18 часовыми индикаторными культурами *B. subtilis* 26 (для фага Bs – 13 УГСХА) и *B. subtilis* 4 (для фага Bs – 16 УГСХА) от 10^1 до 10^5 м.к./мл. В качестве контроля был использован интактный МПБ. Учет результатов проводили через 18 часов инкубирования, согласно оценке, предложенной В.Я. Ганюшкиным (1988). Установлено, что количество фаговых частиц более чем в 5 раз превышает количество фаговых частиц в контрольных пробах при контаминации бактериями *B. subtilis* МПБ в концентрации 10^2 м.к./мл.

Для определения оптимального времени, обеспечивающего наиболее полное взаимодействие фага с бактериями необходимо было провести эксперименты на тест-объекте по выявлению

наиболее эффективного временного показателя взаимодействия фага и индикаторной культуры при сохранении остальных параметров (температурный режим, концентрация бактериальной культуры и фаговых корпускул в 1 мл) постановки РНФ. В качестве тест – объекта использовали МПБ, контаминированный бактериями *B. subtilis*.

Полученные экспериментальные данные позволяют считать наиболее оптимальным временной режим реакции нарастания титра фага (РНФ) при 6 часовой экспозиции исследуемого материала с фагом без дополнительного подрачивания, когда удастся провести индикацию бактерий бактерии *B. subtilis* в количестве 10^2 м.к. в миллилитре исследуемого субстрата. На исследование затрачивается 25 часов (0,5 часа – подготовка реакции + 6 часов – время экспозиции субстрата с фагом + 0,5 часа – постановка реакции + 18 часов – время термостатирования). Увеличение времени инкубирования до 10 – 24 часов не повышает чувствительность метода. Схема постановки РНФ с применением биопрепарата (рис. 2).

Реакция считается положительной, если количество негативных колоний, образовавшихся на чашке Петри № 1 превышает количество негативных колоний, образовавшихся на чашке Петри № 3 в 5 и более раз (Ганюшкин, 1988)

Пробы образцов объектов санитарного надзора (водопроводная вода, комбикорм, специи, мясо) в объеме 10 г (мл) вносили

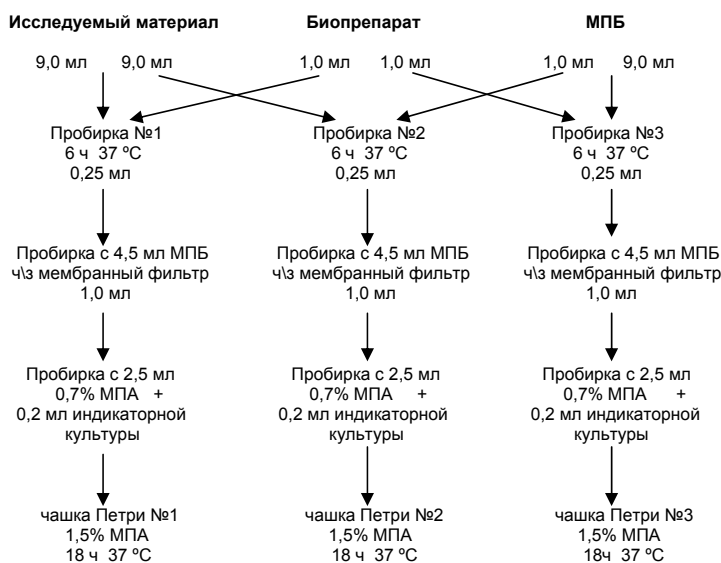


Рис. 2. Схема постановки реакции нарастания титра фага с использованием биопрепарата

в колбы и контаминировали штаммами *B. subtilis* 26 и *B. subtilis* 4 в концентрации $10^1 - 10^5$ м.к./мл, заливали. При исследовании 11 проб молока бактериологическим методом бактерии вида *B. subtilis* выделялись в концентрации $10^4 - 10^5$ м.к./мл, а в РНФ – 10^3 м.к./мл. Результаты исследований свидетельствуют о более высокой чувствительности РНФ при обнаружении бактерий *B. subtilis* в пробах молока в сравнении с бактериологическим методом исследования при меньшей затрате времени (96 часов), реактивов и посуды.

МПБ из расчета 10 мл бульона на 1 г (мл) пробы. Пробы мяса (кусочки свинины) растирали в фарфоровой ступке. Для контроля использовали колбы с пробами, неконтаминированными бактериями *B. subtilis* 26 и *B. subtilis* 4 (рис. 2).

По результатам проведенных опытов установлено, что увеличение титра фагов Bs-13 и Bs-16 серии УГСХА в 5 раз произошло при концентрации 10^2 м.к. бактерий *B. subtilis* в 1 мл водопроводной воды и 10^3 м.к. бактерий *B. subtilis* – в 1 г комбикорма, специй и мяса.

Для оценки эффективности реакции нарастания титра фага в условиях производства нами были проведены исследования по фагоиндикации бактерий *B. subtilis* в пробах молока. Обнаружение проводили бактериологическим методом и с помощью РНФ.

В результате проведенных исследований нами были выделены из объектов санитарного надзора и изучены по заданным биологическим свойствам бактериофаги *B. subtilis*, из них отобраны наиболее оптимальные специфические бактериофаги Bs-13 УГСХА и Bs-16 УГСХА для создания биопрепарата. Разработаны биотехнологические параметры изготовления биопрепарата и усовершенствована схема фагоиндикации *B. subtilis* в объектах внешней среды, пищевого сырья и пищевых продуктов с применением созданного биопрепарата. Усовершенствована схема выделения и идентификации бактерий вида *B. subtilis* в объектах санитарного надзора с помощью созданного фагового биопрепарата. Разработанная схема фагоидентификации и дифференциации позволяет выделять и типировать штаммы бактерий *B. subtilis* из объектов внешней среды, пищевого сырья и пищевых продуктов. Сконструирован диагностический биопрепарат на основе специфичных бактериофагов и усовершенствована схема

индикации бактерий *B. subtilis* методом реакции нарастания титра фага (РНФ) в течение 25 часов.

По материалам проведенных исследований разработаны и утверждены ректором УГСХА (от 10 февраля 2010 г.) «Временная инструкция по изготовлению и контролю лабораторной серии фагов Bs-13 УГСХА и Bs-16 УГСХА для индикации и идентификации бактерий *B. subtilis*», «Методические рекомендации по ускоренной индикации и идентификации бактерий *B. subtilis* в объектах санитарного надзора с применением специфичных бактериофагов», для сотрудников медико-биологических научных учреждений и специалистов бактериологических лабораторий. Материалы проведенных исследований используются в учебном процессе при чтении лекций, на кафедре микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ ФГБОУ ВПО «Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии им. П.А. Столыпина».

ЛИТЕРАТУРА

1. Ашмарин, И.П. Быстрые методы обработки и планирование эксперимента / И.П. Ашмарин, Н.И. Васильев, В.А. Амбросов – М.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1974. – С. 16.
2. Габрилович, И.М. Общая характеристика бактериофагов / И.М. Габрилович // Основы бактериофагии. – Минск, 1973. – С.5-24.
3. Габрилович, И.М. Биологические свойства бактериофагов *Serratia marcescens* / И.М. Габрилович // ЖМЭИ. – 1992. – №6. – С.10-12.
4. Ганюшкин В.Я. Бактериофаги сальмонелл и их применение в ветеринарии. – Ульяновск. – 1988. – С.45.
5. Гольдфарб, Д.М. Бактериофагия / Д.М. Гольдфарб. – М.: Медгиз, 1961. – С. 6-184.
6. Затула, Д.Г. Влияние метаболитов споровых сапрофитных бактерий на организм человека и животных / Д.Г. Затула, С.Р. Резник. - Киев: Изд. «Наукова Думка», 1973. – С.75-98.
7. Золотухин С.Н. Смешанная кишечная инфекция телят и поросят, вызываемая патогенными энтеробактериями / С.Н. Золотухин, Л.С. Каврук, Д.А. Васильев. – Ульяновск: УГСХА, 2005. – С.20-25.
8. Калдыркаев, А.И. Разработка фаговых препаратов индикации и идентификации бактерий рода *Bacillus* в пищевом сырье и продуктах питания / А.И. Калдыркаев, Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев [и др.] // Материалы Всероссийского симпозиума с международным участием «Биологически активные вещества микроорганизмов прошлое, настоящее, будущее», посвященного 90-летию Заслуженного профессора Московского университета Н.С. Егорова 27–29 января 2011 года. – Москва, 2011. – С. 86.
9. Камбаров, П.И. Значение РНФ при распознавании сальмонеллеза / П.И. Камбаров // ЖМЭИ. – 1963. – № 6. – С. 15.
10. Коритняк, Б.М. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов *Yersinia enterocolitica* и их применение в диагностике / Б.М. Коритняк // Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Саратов, 2005. – С. 4.
11. Лурия, С. Общая вирусология / Лурия С., Дарнелл Д. – М.: «Мир», 1970. – С.36-47.
12. Медведев, П.В. Оценка уровня зараженности зерна пшеницы различных природно-географических зон Оренбургской области возбудителями картофельной болезни хлеба / П.В. Медведев, А.С. Степанов, В.А. Федотов // Вестник ОГУ, № 2 (108) – Оренбург, 2010. – С. 114-118.
13. Мустафин, А.Х. Диагностика картофельной болезни хлеба, вызываемой бактериями видов *Bacillus subtilis* и *Bacillus mesentericus* / А.Х. Мустафин, Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев [и др.] // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. 2011. №1 (13). С. 61–67.
14. Мустафин, А.Х. Разработка схемы исследования материала с целью выделения и ускоренной идентификации бактерий видов *Bacillus cereus* и *Bacillus subtilis* / А.Х. Мустафин, Н.А. Феоктистова, А.И. Калдыркаев // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. 2011. №4 (32). С. 288–291.

15. Пучкова, Л.И. Технология хлеба / Л.И. Пучкова, Р.Д. Поландова, И.В. Матвеева. - СПб.: ГИОРД, 2005. – С. 45.
16. Ревенко, И.П. Бактериофаги и их использование в ветеринарной практике / И.П. Ревенко. – Киев: «Урожай», 1978. – С. 41-88.
17. Смирнов В.В. Спорообразующие аэробные бактерии – продуценты биологически активных веществ / В.В. Смирнов, С.Р. Резник, И.А. Василевская // Киев: «Наукова Думка», 1982. – С.117-120.
18. Тихоненко, А.С. Ультраструктура вирусов бактерий / А.С. Тихоненко. – М.: «Наука», 1968. – С. 89.
19. Урбах, В.Ю. Статистический анализ в биологических исследованиях / В.Ю. Урбах. – М.: «Медицина», 1975. – С. 46.
20. Чанишвили, Л. Оценка эффективности концепции фаговой терапии с использованием модели маститных коров как альтернативы антибиотикотерапии / Л. Чанишвили, М. Надирадзе, Т. Каландаришвили [и др]. // Перспективы использования препаратов бактериофага для превенции и лечения инфекций, вызванных патогенными и условно-патогенными микроорганизмами: Мат. Межд. семинара 10-11 ноября 2005 года, Грузия. – Тбилиси, 2005. – С.19.
21. Ahmed R. Bacillus cereus Phage Typing as an Epidemiological Tool in Outbreaks of Food Poisoning / R. Ahmed, P. Sankar-mistry, S. Jackson, H. Ackermann and S. Kasatiya // Journal of clinical microbiology, Mar. 1995. – С. 636–640.
22. Gordon, R. The genus Bacillus / R. Gordon // In Handb. Microbiol. Cleveland (Ohio). – 1973. – V.1. – P.71–88.

ЮДИНА М.А., ФЕОКТИСТОВА Н.А., ЮДИНА М.А.

3.2. ВЫДЕЛЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ ОСНОВНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БАКТЕРИОФАГОВ БАКТЕРИЙ ВИДА BACILLUS MESENTERICUS

YUDINA M.A., FEOKTOSTOVA N.A. ISOLATION AND STUDY
OF THE MAIN QUALITIES OF BACILLUS MESENTERICUS SP. PHAGES

Бактерии *Bacillus mesentericus* - фитопатогенные бактерии, поражающие лен, тыкву, кукурузу, свеклу, плоды апельсина, абрикоса, кабачков и других растений, клубни картофеля, семенники капусты, коробочки хлопчатника и т.п., и тем самым наносящие значительный экономический ущерб сельскохозяйственным и перерабатывающим предприятиям (Аскалонов, 1962; Медведев, 2010). Бактерии *Bacillus mesentericus* в ассоциации с *Bacillus subtilis* являются возбудителями картофельной болезни хлеба. Разрушение структуры хлеба и разложение содержащихся в нем веществ, связано с продуцированием этими видами бактерий активных протеолитических и амилалитических ферментов. Спороносным бактериям *Bacillus mesentericus*, особенно их термофильным формам, отводится значительная роль в процессах самосогревания зерна (Пельц, 2003; Пучкова, 2005; Мустафин, 2011).

Бактерии *Bacillus mesentericus* являются возбудителями порчи пищевого сырья и продуктов питания, вызывают отравления, характеризующиеся острым течением болезни по типу отравлений, вызываемых *Bacillus cereus* (Калдыркаев, 2011).

В настоящее время в бактериологических лабораториях идентификация бактерий *Bacillus mesentericus*, основана на вы-

делении чистой культуры микроорганизмов и изучении их биохимических свойств. Этот метод трудоемок и не достаточно эффективен из-за выраженного полиморфизма ферментативных свойств бактерий *Bacillus mesentericus*. Поэтому перед исследователями стоит задача разработки достоверного и метода индикации и идентификации названных микроорганизмов. Классическая схема идентификации бактерий рода *Bacillus* первой морфологической группы по Gordon (1973) чрезвычайно материалозатратная и трудоемкая. На сегодня вопрос о разработке ускоренной схемы идентификации *Bacillus mesentericus* остается открытым.

Патентный поиск и анализ литературных данных свидетельствует, что в настоящий момент в Российской Федерации не разработаны методики индикации и идентификации бактерий *Bacillus mesentericus* с помощью бактериофагов в объектах санитарного надзора. Применение этих методик позволит в сжатые сроки найти и идентифицировать бактерии вида *Bacillus mesentericus*, в течение 25 часов, используя минимальное количество расходных материалов.

Цель наших исследований - разработка биотехнологических параметров изготовления фагового препарата для индикации и идентификации бактерий *Bacillus mesentericus* в пищевом сырье и продуктах питания.

Объекты исследований в данной работе были 22 штамма бактерий *Bacillus mesentericus*, из них 2 музейных штамма из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы 20 штаммов выделены из проб также пищевых продуктов и объектов санитарного надзора. Штаммы бактерий *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus thuringiensis*, полученные из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина». Штаммы бактериофагов – 22 изолята бактериофагов *Bacillus mesentericus*, выделенные из проб почвы Ульяновской и Самарской областей.

В качестве объектов исследований для постановки реакции нарастания титра фага использовали пищевые продукты, купленные на продовольственных рынках г. Ульяновска, г. Самары.

Для выделения бактерий *Bacillus mesentericus* использовали схему дифференциации бактерий рода *Bacillus* (Gordon, 1973, Затула, 1973; Смирнов, 1982). Изучение морфологических, культуральных, биохимических свойств выделенных бактерий проводили по методам, рекомендованным А.С. Лабинской, Л.П. Блиновой, А.С. Ещиной (2004). Выделение и изучение биологических свойств бактериофагов проводили методами, предложенными Д.М. Гольдфарбом (1961), С. Лурия, Д. Дарнелом (1970), И.П. Ревенко (1978), В.Я. Ганюшкиным (1988), С.Н. Золотухиным (2007), А.Г. Шестаковым (2010), А.И. Калдыркаевым (2011). Селекцию бактериофагов и повышение их литической активности проводили по методике, описанной С.Н. Золотухиным (2007). Обнаружение бактерий *Bacillus mesentericus* в пищевом сырье и продуктах питания проводили с помощью реакции нарастания титра фага. Реакцию нарастания титра фага ставили по методикам В.Я. Ганюшкина (1988), С.Н. Золотухина (2007). Статистическую обработку результатов исследований проводили общепринятыми статистическими методами (Ашмарин, Васильев, Амбросимов, 1974; Урбах, 1975). Расчет результатов осуществляли с применением пакета прикладных программ Statistica 6.0. (for Windows; «Stat Soft Ins.», США), Microsoft Excel 2003 (for Windows XP).

Первоочередной задачей наших исследований стало выделение бактерий *Bacillus mesentericus* из объектов санитарного надзора. В период с 2010 по 2012 год было исследовано на наличие бактерий *Bacillus mesentericus* 65 проб пищевых продуктов: 15 проб хлеба из муки пшеничной высшего и первого сортов, 20 проб муки пшеничной высшего и первого сортов, 15 проб специй, приобретенных в Ульяновской и Самарской областях, 15 проб почвы различного хозяйственного значения. В результате проведенных исследований нами было выделено 20 культур бактерий, которые мы классифицировали по биохимическим свойствам, согласно схеме идентификации бактерий рода *Bacillus* первой морфологической группы по R. Gordon (1973) и отнесли к виду *Bacillus mesentericus* (табл. 1). Уровень контаминации всех исследованных проб бактериями *Bacillus mesentericus* составил 31 % (рис. 1).

Все выделенные бактерии палочкообразной формы, споробразующие, капсул не образуют. На мясо-пептонном агаре вырастают в виде сочных, с морщинистой поверхностью, слизи-

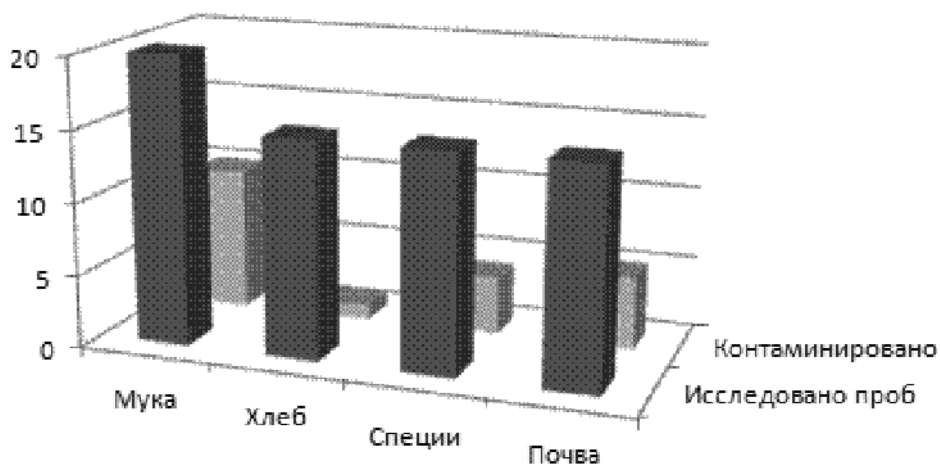


Рис. 1. Уровень контаминации исследованных проб бактериями *B. mesentericus*

Табл. 1. Выделенные штаммы бактерий *Bacillus mesentericus*

№ п.п.	Номер штамма и присвоенное название	Объект выделения штамма	Место получения пробы
1.	№1 – <i>Bacillus mesentericus</i> 1	Хлеб из муки высшего сорта, пшеничной	Прод. рынок г. Ульяновска
2.	№2 – <i>Bacillus mesentericus</i> 2	Мука пшеничная, высший сорт	Прод. рынок г. Самары
3.	№3 – <i>Bacillus mesentericus</i> 3	Мука пшеничная, высший сорт	Прод. рынок г. Димитровграда
4.	№4 – <i>Bacillus mesentericus</i> 4	Хлеб из муки первого сорта, пшеничной	Прод. рынок г. Ульяновска
5.	№5 – <i>Bacillus mesentericus</i> 5	Мука пшеничная, первый сорт	Прод. рынок г. Самары
6.	№6 – <i>Bacillus mesentericus</i> 6	Мука пшеничная, первый сорт	Прод. рынок г. Ульяновска
7.	№7 – <i>Bacillus mesentericus</i> 7	Мука пшеничная, высший сорт	Прод. рынок г. Самары
8.	№8 – <i>Bacillus mesentericus</i> 8	Мука пшеничная, первый сорт	Прод. рынок г. Сенгилей
9.	№9 – <i>Bacillus mesentericus</i> 9	Мука пшеничная, высший сорт	Прод. рынок г. Кинеля
10.	№10 – <i>Bacillus mesentericus</i> 10	Мука пшеничная, первый сорт	Прод. рынок г. Самары
11.	№11 – <i>Bacillus mesentericus</i> 11	Почва	р.п. Кузоватово, Ульяновской области
12.	№12 – <i>Bacillus mesentericus</i> 12	Почва	г. Инза, Ульяновской области
13.	№ 13 – <i>Bacillus mesentericus</i> 13	Почва	п. Енганаево, Чердаклинский район, Ульяновской области
14.	№ 14 – <i>Bacillus mesentericus</i> 14	Почва	п. Октябрьский, Чердаклинский район, Ульяновской области
15.	№15 – <i>Bacillus mesentericus</i> 15	Почва	с. Троицкое, Инзенского района, Ульяновской области
16.	№16 – <i>Bacillus mesentericus</i> 16	Приправа для плова	Прод. рынок г. Самары
17.	№ 17 – <i>Bacillus mesentericus</i> 17	Цикорий	Прод. рынок г. Ульяновск
18.	№ 18 – <i>Bacillus mesentericus</i> 18	Петрушка сухая	Прод. рынок г. Самары
19.	№19 – <i>Bacillus mesentericus</i> 19	Корица	Прод. рынок г. Димитровград
20.	№20 – <i>Bacillus mesentericus</i> 20	Имбирь молотый	Прод. рынок г. Ульяновска

стых матовых колоний серо-белого цвета с волнистым краем; 3 выделенных штамма *Bacillus mesentericus* образуют серо-бурые колонии, т.е. продуцируют пигмент коричневого цвета. Все штаммы *Bacillus mesentericus* вызывают слабое помутнение мясо-пептонного бульона и образуют пленку на поверхности среды; гемолитическая активность не выявлена.

Установлено, что оптимальная кислотность среды рН 6,5-7,5, рН 5,0 обладает бактериостатическим действием. Оптимальная температура роста 37 °С. Все выделенные штаммы *Bacillus mesentericus* разжижают желатин, свертывают и пептонизируют молоко, продуцируют ацетилметилкарбинол. При разложении белков выделяют много сероводорода. Индол не образуют. Вызывают гидролиз крахмала. Не ферментируют глюкозу и лактозу. Растут в присутствии 7 % NaCl.

Вторым этапом работы было выделение фагов бактерий *Bacillus mesentericus*. Первоначально, мы исследовали штаммы *Bacillus mesentericus* как потенциально лизогенные. Поиск умеренных фагов проводили по методике С. Лурия и Д. Дарнелла (1970) в модификации А.Г. Шестакова (2010). В первой серии экспериментов мы использовали методику выделения бактериофагов бацилл без воздействия на них индуцирующего фактора. Во второй серии экспериментов на культуры *Bacillus mesentericus*, исследуемые как «лизогенные», воздействовали индуцирующим фактором (воздействие на бактерии ультрафиолетовых лучей в течение 5-20 минут при помощи бактерицидной лампы, 80 % энергии которой приходится на длину волны 2537 Å, на расстоянии 50 см между лампой и объектом) по методике Дж. Мейнелла (1965) в модификации А.И. Калдыркаева (2012). Полученный фильтрат исследовали на наличие фага на имеющихся культурах *Bacillus mesentericus* методом агаровых слоев. В исследованиях не наблюдалось естественной и искусственной лизогенности исследуемых штаммов *Bacillus mesentericus*, т.е. профаги, интегрированные с хромосомой микробной клетки, выявлены не были. Цель третьей серии экспериментов - выделение бактериофагов из объектов внешней среды по методике Д.М. Гольдфарба (1961) в оригинальной модификации И.П. Ревенко (1978). По литературным данным, наиболее эффективно в качестве источника выделения бактерий рода *Bacillus* использовать пробы почвы, так

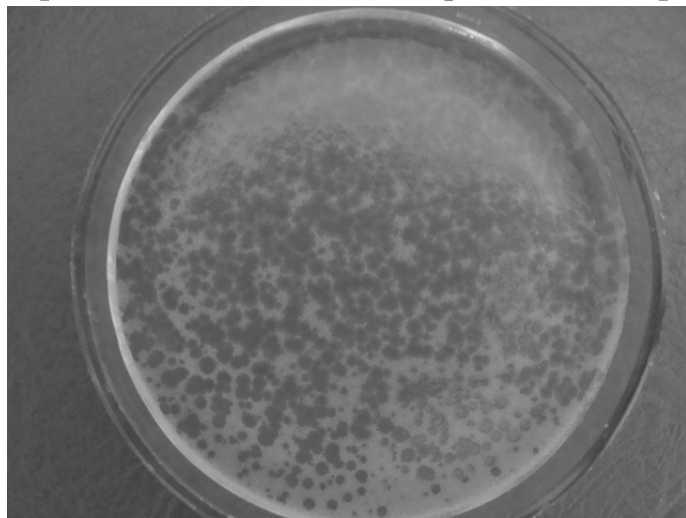
как они являются почвенными сапрофитами. При исследовании 88 проб почвы различного хозяйственного назначения двух областей Приволжского федерального округа, нам удалось выделить 22 изолята фагов бактерий *Bacillus mesentericus*.

Селекцию фагов проводили десятикратным пассированием изолированных негативных колоний на мясо-пептонном агаре с перевиванием на мясо-пептонный бульон (Золотухин, 2007). Очистка фагов от бактериальных клеток осуществлялась методом фильтрации с использованием мембранных фильтров фирмы Millipore (filter type: 0,22 μm GV). Фаголизаты укупоривали в стерильные флаконы и хранили при низкой температуре (4-6 °C) без использования консервантов.

Характеристика выделенных бактериофагов Bacillus mesentericus

Морфология негативных колоний. Морфологию негативных колоний изучали на плотных питательных средах для дифференциации их на умеренные и вирулентные, согласно классификации И.П. Ревенко (1978). Негативные колонии, образуемые 22 изолятами фагов *Bacillus mesentericus*, были однотипными - это прозрачные негативные колонии округлой формы, 1,0 – 4,0 мм в диаметре (рис. 2). Данная характеристика подтверждает их вирулентность, так как лизогенизированных фаги бактериальных клеток на дне фага отмечено не было.

Специфичность. Важнейшей характеристикой фага, входящего в состав биопрепарата для индикации и идентификации бактерий, является его специфичность в пределах вида. Изучение



специфичности 22 выделенных изолятов бактериофагов *Bacillus mesentericus* мы проводили на культурах гомологичного рода: *Bacillus subtilis* – 35 штаммов, *Bacillus mycoides* – 15 штаммов, *Bacillus*

Рис. 2. Морфология негативных колоний фага Bm-3 УГСХА

megaterium – 14 штаммов, *Bacillus cereus* – 25 штаммов, *Bacillus thuringiensis* – 4 штамма. Эксперимент ставили, используя методику А.И. Калдыркаева (2011). Полученные результаты свидетельствуют, что выделенные и селекционированные нами бактериофаги, строго специфичны в пределах вида.

Литическая активность. Литическую активность выделенных бактериофагов оценивали по их способности вызывать лизис бактериальной культуры на плотной питательной среде методом агаровых слоев (Гольдфарб, 1961). Для статистической обработки каждый эксперимент проводили троекратно. Эталонные культуры выращивали на мясо-пептонном бульоне в течение 18 часов. Учет результатов проводили через 18 часов инкубирования посево в термостате при 37 °С, используя формулу:

$$X = Y \times N,$$

где:

Y – количество негативных колоний фага, выросших на чашке Петри,

N – фактор разведения.

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что выделенные бактериофаги *Bacillus mesentericus* обладали различной активностью. Ее показатели были выявлены в диапазоне от $1,0 \times 10^6 \pm 0,1 \times 10^6$ до $4,0 \times 10^9 \pm 0,3 \times 10^9$ корпускул в 1 мл фага (табл. 2). Наиболее высокой активностью обладали фаги Bm–3 УГСХА и Bm–8 УГСХА - $1,5 \times 10^9 \pm 0,1 \times 10^9$ и $4,0 \times 10^9 \pm 0,3 \times 10^9$ корпускул в 1 мл фаголизата, соответственно.

Спектр литического действия. Важной характеристикой выделенных фагов является диапазон их действия на штаммы бактерий в пределах вида. Для изучения спектра литического действия селекционированных фагов использовали 20 штаммов бактерий *Bacillus mesentericus*, выделенных нами их проб пищевого сырья и продуктов питания и 2 штамма, полученных из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина». Исследования проводили методом нанесения фага на газон бактериальной культуры методом «стекающая капля». Экспериментальным путем установлено, что изучаемые специфичные бактериофаги имеют различный диапазон действия по отношению к 22 изучаемым штаммам *Bacillus mesentericus* (рис. 3).

Опыты демонстрируют, что наиболее широким спектром литического действия по отношению к изучаемым культурам обла- дают штаммы фагов Vm-3 УГСХА и Vm-8 УГСХА, совокупный процент лизиса составил 91,0 % (табл. 2).

Для конструирования биопрепарата было отобрано два фага Vm-3 и Vm-8 серии УГСХА, которые характеризовались высо- кими показателями литической активности и максимально ши- роким совместным спектром литического действия.

Последующие эксперименты были направлены на изучение из- менения литической активности укупоренных во флаконы бак- териофагов Vm-3 и Vm-8 серии УГСХА, хранящихся в условиях холодильника в течение 12 месяцев.

Установлено, что в течение 3 месяцев показатели литической активности исследуемых бактериофагов Vm-3 УГСХА и Vm-8 УГ- СХА оставались без изменений, $1,5 \times 10^9 \pm 0,1 \times 10^9$ и $4,0 \times 10^9 \pm 0,3 \times 10^9$ корпускул в 1 мл фаголизата, соответственно. Через 6 месяцев ли- тическая активность снижалась и составила у фага Vm-3 УГСХА $4,7 \times 10^8 \pm 0,2 \times 10^8$ корпускул в 1 мл фаголизата и у Vm-8 УГСХА - $1,3 \times 10^8 \pm 0,4 \times 10^8$, через 9 месяцев – $1,8 \times 10^7 \pm 0,1 \times 10^7$ и $0,9 \times 10^8 \pm 0,2 \times 10^8$ корпускул в 1 мл фаголизата, через 12 месяцев – $0,6 \times 10^7 \pm 0,3 \times 10^7$ и $1,1 \times 10^7 \pm 0,2 \times 10^7$ корпускул в 1 мл фаголизата, соответственно.

Опытным путем установлено, что пассирование бактериофа- гов на исходном штамме бактерий *Bacillus mesentericus* в течение

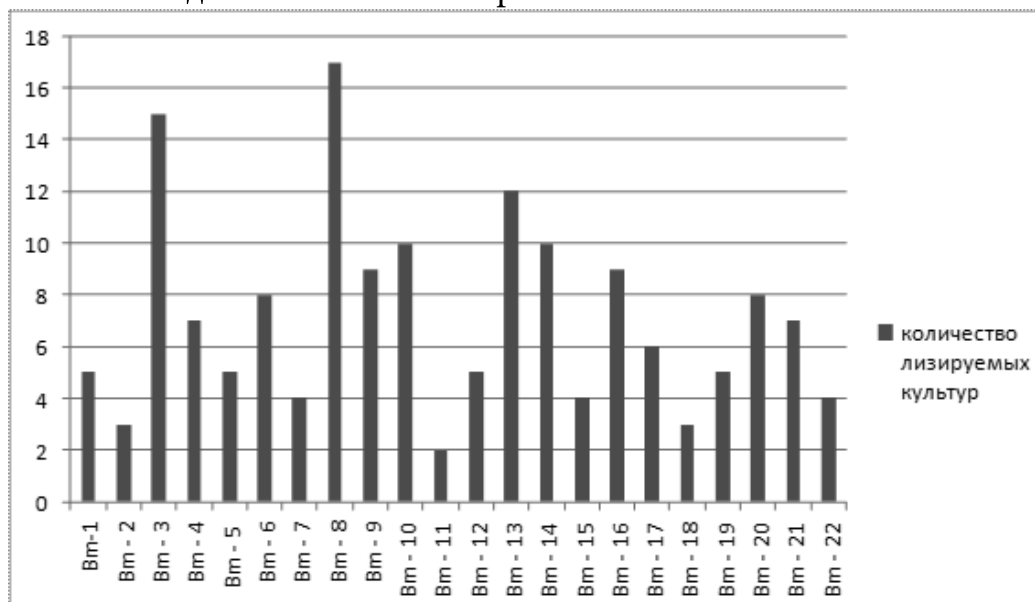


Рис. 3. – Спектр литического действия выделенных бактериофагов

Табл. 2. – Характеристика выделенных фагов бактерий *B. mesentericus*

№ п.п.	Бактериальная культура <i>B. mesentericus</i> / название фага	Хар-ка негативных колоний, мм в диаметре	Спектр литического действия на 22 штаммах, %	Литическая активность, количество корпускул в 1 мл фага
1.	<i>Bacillus mesentericus</i> 1/ Bm – 1 УГСХА	1,0±0,2	22,7	$1,8 \times 10^5 \pm 0,2 \times 10^5$
2.	<i>Bacillus mesentericus</i> 6/ Bm – 2 УГСХА	2,0±0,2	13,6	$2,6 \times 10^7 \pm 1,1 \times 10^7$
3.	<i>Bacillus mesentericus</i> 66/ Bm – 3 УГСХА	2,5±0,3	68,2	$1,5 \times 10^5 \pm 0,1 \times 10^5$
4.	<i>Bacillus mesentericus</i> 66/ Bm – 4 УГСХА	1,4±0,1	31,8	$1,0 \times 10^6 \pm 0,4 \times 10^6$
5.	<i>Bacillus mesentericus</i> 5/ Bm – 5 УГСХА	2,4±0,3	22,7	$3,2 \times 10^5 \pm 1,2 \times 10^5$
6.	<i>Bacillus mesentericus</i> 44/ Bm – 6 УГСХА	0,8±0,2	36,4	$4,9 \times 10^7 \pm 0,3 \times 10^8$
7.	<i>Bacillus mesentericus</i> 7/ Bm – 7 УГСХА	1,4±0,4	18,2	$8,1 \times 10^5 \pm 0,7 \times 10^5$
8.	<i>Bacillus mesentericus</i> 2/ Bm – 8 УГСХА	2,2±0,2	77,3	$4,0 \times 10^5 \pm 0,3 \times 10^5$
9.	<i>Bacillus mesentericus</i> 9/ Bm – 9 УГСХА	1,8±0,4	40,9	$6,8 \times 10^5 \pm 0,5 \times 10^5$
10.	<i>Bacillus mesentericus</i> 66/ Bm – 10 УГСХА	1,0±0,4	45,5	$9,0 \times 10^7 \pm 1,5 \times 10^7$
11.	<i>Bacillus mesentericus</i> 44/ Bm – 11 УГСХА	1,6±0,3	9,1	$4,6 \times 10^5 \pm 1,0 \times 10^5$
12.	<i>Bacillus mesentericus</i> 12/ Bm – 12 УГСХА	2,0±0,4	22,7	$3,5 \times 10^5 \pm 0,9 \times 10^5$
13.	<i>Bacillus mesentericus</i> 13/ Bm – 13 УГСХА	1,8±0,2	54,5	$4,2 \times 10^7 \pm 1,1 \times 10^8$
14.	<i>Bacillus mesentericus</i> 3/ Bm – 14 УГСХА	2,4±0,3	45,5	$9,4 \times 10^5 \pm 0,5 \times 10^5$
15.	<i>Bacillus mesentericus</i> 15/ Bm – 15 УГСХА	1,7±0,5	18,2	$5,3 \times 10^5 \pm 0,6 \times 10^5$
16.	<i>Bacillus mesentericus</i> 6/ Bm – 16 УГСХА	2,6±0,2	36,4	$3,2 \times 10^7 \pm 0,8 \times 10^7$
17.	<i>Bacillus mesentericus</i> 17/ Bm – 17 УГСХА	1,7±0,4	27,3	$1,2 \times 10^5 \pm 0,1 \times 10^5$
18.	<i>Bacillus mesentericus</i> 4/ Bm – 18 УГСХА	1,8±0,2	13,6	$7,5 \times 10^7 \pm 0,7 \times 10^7$
19.	<i>Bacillus mesentericus</i> 9/ Bm – 19 УГСХА	1,0±0,3	22,7	$4,2 \times 10^5 \pm 1,3 \times 10^5$
20.	<i>Bacillus mesentericus</i> 20/ Bm – 20 УГСХА	2,0±0,2	36,4	$5,4 \times 10^5 \pm 1,1 \times 10^5$
21.	<i>Bacillus mesentericus</i> 66/ Bm – 66 УГСХА	1,7±0,3	31,8	$3,2 \times 10^5 \pm 0,5 \times 10^5$
22.	<i>Bacillus mesentericus</i> 44 / Bm – 44 УГСХА	2,3±0,2	18,2	$2,8 \times 10^5 \pm 0,2 \times 10^5$

7 пассажей методом агаровых слоев восстанавливает литическую активность бактериофагов на 1 порядок.

Для изготовления биопрепарата использовали штаммы фагов Bm-3 УГСХА и Bm-8 УГСХА и штаммы бактерий *Bacillus mesentericus* 2 и *Bacillus mesentericus* 66. Индикаторные культуры хранятся на полужидком МПА (рН 7,2 – 7,4) с содержанием 0,3 % бактериологического агара при температуре 2-4 °С, которые пересеваются каждые 2-3 месяца. Биопрепарат готовится на коммерческом мясо-пептонном бульоне. Опытным путем установлено, что температурным оптимумом для культивирования биопрепарата на основе фагов Bm-3 УГСХА и Bm-8 УГСХА с индикаторными культурами была температура 37 °С. Определено оптимальное соотношение бактериофага Bm-3 УГСХА и штамма *Bacillus mesentericus* 66 – 1:1, т.е. 0,2 мл фага на 0,2 мл индикаторной культуры, время пассажа составляет 6 часов (параметры

культивирования бактериофага Bm-8 УГСХА с культурой *Bacillus mesentericus* 2 аналогичны). Очистка фагов от бактериальных клеток осуществлялась методом фильтрации с использованием мембранных фильтров фирмы Millipore (filter type: 0,22 μm GV). Разлитый во флаконы фаг контролируется на чистоту и стерильность, обязательно определяется его титр. Биопрепарат на основе фагов представляет собой 2 флакона с прозрачной жидкостью желтоватого цвета (цвет засеянной среды) без посторонних примесей, осадка. Титр не ниже 108. Дату изготовления серии исчисляют со дня закупки флаконов. Срок годности бактериофагов при температуре 2-4 °С 12 месяцев.

Используя строгую специфичность биопрепарата, нами был разработан экспресс-метод идентификации бактерии *Bacillus mesentericus* по показателям лизиса культур на плотной питательной среде («метод стекающей капли»).

Подготовку и посев пищевых продуктов, подлежащих исследованию, проводили в соответствии ГОСТ 26669 – 85 «Продукты пищевые и вкусовые. Подготовка проб для микробиологических анализов». Разработанная нами схема (рис. 4) позволяет идентифицировать бактерии *Bacillus mesentericus* за 32 часа. Срок бактериологического исследования по традиционной схеме выделения и дифференциации бацилл первой морфологической группы (Gordon, 1973), составил 107 часов при значительных экономических затратах.

Для разработки схемы индикации бактерий использовали метод реакции нарастания титра фага по В.Я. Ганюшкину (1988) в модификации С.Н. Золотухина (2007). Первоначально определяли параметров постановки реакции. Были проведены эксперименты на модели – искусственно контаминированном бактериями *Bacillus mesentericus* масопептонного бульона в концентрации от 10^1 до 10^5 м.к./мл. В качестве контроля был использован интактный МПБ. Учет результатов проводили через 18 часов инкубирования, согласно оценке, предложенной В.Я. Ганюшкиным (1988). Реакция считалась положительной, если количество негативных колоний фага, образовавшихся в контроле превышало количество негативных колоний фага, образовавшихся в эксперименте в 5 и более раз. Доказано, что количество негативных колоний фага в эксперименте, более чем в 5 раз превышает коли-

чество негативных колоний фага в контроле при контаминации МПБ бактериями *Bacillus mesentericus* в концентрации 10^2 м.к./мл.

Необходимо было также определить наиболее эффективный временной показатель взаимодействия фага и индикаторной культуры при сохранении остальных параметров реакции нарастания титра фага (температурный режим, концентрация бактериальной культуры и фаговых корпускул в 1 мл).

Установлено, что при 6 часовой экспозиции индикаторной культуры с фагом без дополнительного ее подрачивания, удается провести индикацию бактерий *Bacillus mesentericus* в концентрации 10^2 м.к./мл МПБ. На исследование затрачивается 25 часов (0,5 часа – подготовка реакции + 6 часов – время экспозиции субстрата с фагом + 0,5 часа – постановка реакции + 18 часов – время термостатирования).

Увеличение времени инкубирования до 10 – 24 часов не повышает чувствительность метода. Схема постановки реакции нарастания титра фага с применением биопрепарата (рис. 5).

Для ускоренной индикации бактерий вида *Bacillus mesentericus* в пищевом сырье и продуктах питания без выделения чистой культуры, нами была разработана модель постановки реакции нарастания титра фага на пищевом сырье и продуктах питания, максимально подверженных контаминации вышеуказанными бактериями. Использовали муку пшеничную высшего и первого сортов, персики, перец черный молотый, мясо – свинину. Подготовку и посев проб пищевых продуктов, подлежащих исследованию, проводили в соответствии ГОСТ 26669 – 85 «Продукты пищевые и вкусовые. Подготовка проб для микробиологических анализов». Пробы растирали в фарфоровой ступке до получения однородной массы. Затем объекты исследований в количестве 10 г вносили в колбы с МПБ в соотношении 1:10 и искусственно контаминировали штаммами *Bacillus mesentericus* 66 и *Bacillus mesentericus* 2 в концентрации 10^1 – 10^5 м.к./мл. В качестве контроля использовали колбы МПБ с пробами, неконтаминированными бактериями *Bacillus mesentericus* 66 и *Bacillus mesentericus* 2.

Доказано, что увеличение титра фагов Bm-3 и Bm-8 серии УГСХА в 5 раз произошло при концентрации 10^3 м.к. бактерий *Bacillus mesentericus* в 1 г объектов исследований. Данная кон-

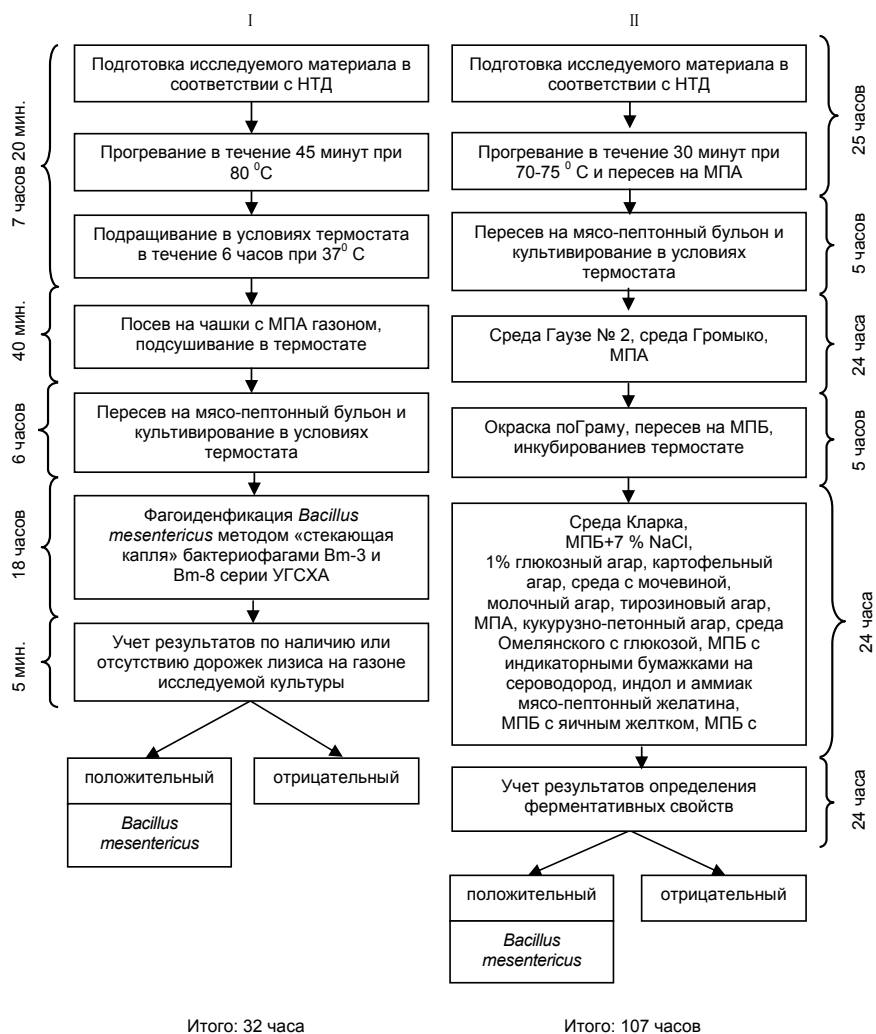


Рис. 4. Схема ускоренной идентификации бактерий *Bacillus mesentericus* с помощью селекционированных нами бактериофагов (I) в сравнении со схемой выделения и дифференциации бацилл первой морфологической группы (II)

центрация бактерий в пищевом сырье и продуктах питания считается пороговой для их отбраковки или вторичной переработки с использованием соответствующих технологий.

В результате проведенных исследований впервые выделены из проб почвы и изучены по основным биологическим свойствам специфичные бактериофаги *Bacillus mesentericus*, из них для конструирования биопрепарата отобраны фаги Вм-3 УГСХА и Вм-8 УГСХА, имеющие наиболее широкий спектр литического действия и высокие показатели литической активности, незначительно изменяющиеся при хранении в течение 12 меся-

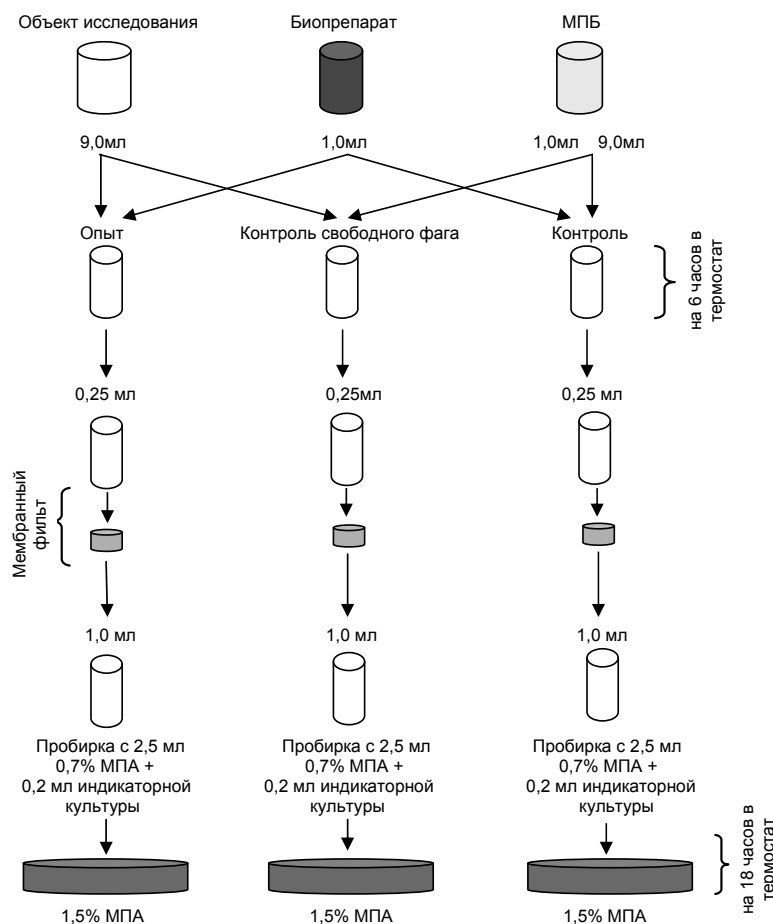


Рис. 5. Схема постановки реакции нарастания титра фага с использованием биопрепарата

цев. Разработаны биотехнологические параметры изготовления лабораторной серии биопрепарата для индикации и идентификации *Bacillus mesentericus* в пищевом сырье и продуктах питания. Доказана возможность применения схемы фагоиндикации *Bacillus mesentericus* в объектах внешней среды, пищевого сырья и пищевых продуктов с применением созданного биопрепарата. Предложен экспресс-метод выделения и идентификации бактерий вида *Bacillus mesentericus* в объектах санитарного надзора с помощью созданного фагового биопрепарата.

Разработана схема фагоидентификации бактерий *Bacillus mesentericus* из объектов внешней среды, пищевого сырья и пищевых продуктов.

Полученные данные позволяют утверждать, что сконструированный биопрепарат на основе специфичных бактериофагов, можно использовать для индикации бактерий *Bacillus*

mesentericus методом реакции нарастания титра фага (РНФ) в течение 25 часов.

По материалам диссертационных исследований разработана нормативно-техническая документация: «Временная инструкция по изготовлению и контролю лабораторной серии фагов Vm-3 УГ-СХА и Vm-8 УГСХА для индикации и идентификации бактерий *Bacillus mesentericus*» и «Методические рекомендации по ускоренной индикации и идентификации бактерий *Bacillus mesentericus* в объектах санитарного надзора с применением специфичных бактериофагов», рассмотренная на научно-техническом совете и утвержденная первым проректором – проректором по научной работе ФГБОУ ВПО «Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия им. П.А. Столыпина» (16.10.2012).

ЛИТЕРАТУРА

1. Асколонов, С.П. Пищевые заболевания, вызываемые спорообразующими бактериями *Bacillus subtilis* и *Bacillus mesentericus* / С.П. Асколонов, А.И. Ильченко // Вопросы питания. – Киев: Госмедиздат УССР, 1962 – С.226–229.
2. Ашмарин, И.П. Быстрые методы обработки и планирование эксперимента / И.П. Ашмарин, Н.И. Васильев, В.А. Амбросов – М.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1974. – С. 16.
3. Ганюшкин В.Я. Бактериофаги сальмонелл и их применение в ветеринарии. – Ульяновск. – 1988. – С.45.
4. Гольдфарб, Д.М. Бактериофагия / Д.М. Гольдфарб. – М.: Медгиз, 1961. – С. 6-184.
5. Затула, Д.Г. Влияние метаболитов споровых сапрофитных бактерий на организм человека и животных / Д.Г. Затула, С.Р. Резник. - Киев: Изд. «Наукова Думка», 1973. – С.75-98.
6. Золотухин, С.Н. Создание и разработка схем применения диагностических биопрепаратов на основе выделенных и изученных бактериофагов энтеробактерий: автореф. дис. ...докт. биол. наук: 03.00.07, 03.00.23 / Золотухин Сергей Николаевич. – Ульяновск, 2007. – С.32.
7. Калдыркаев, А.И. Разработка фаговых препаратов индикации и идентификации бактерий рода *Bacillus* в пищевом сырье и продуктах питания / А.И. Калдыркаев, Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев [и др.] // Материалы Всероссийского симпозиума с международным участием «Биологически активные вещества микроорганизмов прошлое, настоящее, будущее», посвященного 90-летию Заслуженного профессора Московского университета Н.С. Егорова 27–29 января 2011 года. – Москва, 2011. – С. 86.
8. Калдыркаев, А.И. Модификация методики выделения фагов бактерий вида *Bacillus cereus* / А.И. Калдыркаев, Д.А. Васильев, Н.А. Феоктистова // Актуальные проблемы инфекционной патологии в ветеринарной медицине: материалы II-й конференции молодых ученых. – Покров: ВНИИВВиМ, 2012. – С.112–117.
9. Лабинская, А.С. Общая и санитарная микробиология с техникой микробиологического исследования / А.С. Лабинская, Л.П. Блинкова, Л.П. Ещина. – М.: Медицина, 2004. – С. 34–37.
10. Лурия, С. Общая вирусология / Лурия С., Дарнелл Д. – М.: «Мир», 1970. – С.36-47.
11. Медведев, П.В. Оценка уровня зараженности зерна пшеницы различных природно-географических зон Оренбургской области возбудителями картофельной болезни хлеба / П.В. Медведев, А.С. Степанов, В.А. Федотов // Вестник ОГУ, № 2 (108) – Оренбург, 2010. – С. 114-118.
12. Мустафин, А.Х. Разработка схемы исследования материала с целью выделения и ускоренной идентификации бактерий видов *Bacillus cereus* и *Bacillus subtilis* / А.Х. Мустафин, Н.А. Феоктистова, А.И. Калдыркаев // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. 2011. №4 (32). С. 288–291.
13. Пельц, О.В. Гигиеническая оценка контаминации муки возбудителями картофельной болезни / О.В. Пельц, Е.Я. Долгушина, Н.Н. Аксенова, [и др.] // Медицина в Кузбассе, спецвыпуск. 2003, №5. С.74–75.
14. Пучкова, Л.И. Технология хлеба / Л.И. Пучкова, Р.Д. Поландова, И.В. Матвеева. - СПб.: ГИОРД, 2005. – С. 45.
15. Ревенко, И.П. Бактериофаги и их использование в ветеринарной практике / И.П. Ревенко. – Киев: «Урожай», 1978. – С. 41-88.
16. Смирнов В.В. Спорообразующие аэробные бактерии – продуценты биологически активных веществ / В.В. Смирнов, С.Р. Резник, И.А. Василевская // Киев: «Наукова Думка», 1982. – С.117-120.

17. Шестаков, А.Г. Схема выделения и идентификации бактерий *Pseudomonas aeruginosa* / А.Г. Шестаков, И.И. Богданов, Д.А. Васильев // Естественные и технические науки. – 2009. – №6(44). – С. 118-120.
18. Урбах, В.Ю. Статистический анализ в биологических исследованиях / В.Ю. Урбах. – М.: «Медицина», 1975. – С. 46.
19. Gordon, R. The genus *Bacillus* / R. Gordon // In Handb. Microbiol. Cleveland (Ohio). – 1973. – V.1. – P.71–88.

КАЛДЫРКАЕВ А.И. ФЕОКТИСТОВА Н.А. АЛЕШКИН А.В.

3.3. РАЗРАБОТКА СИСТЕМЫ ФАГОВАРОВ БАКТЕРИЙ *BACILLUS CEREUS* ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ И МОНИТОРИНГА ДАННОГО МИКРООРГАНИЗМА

KALDYRKAEV A.I., FEOKTISTOVA N.A., ALYOSHKIN A.V. WORKING OUT OF
BACILLUS CEREUS PHAGE VAR SYSTEM FOR THE IDENTIFICATION
AND MONITORING OF THE MICROORGANISM

Бактерии *Bacillus cereus* относятся к грамположительным факультативно-анаэробным, подвижным, спорообразующим, палочковидным бактериям, широко распространенным в окружающей среде (почве, пресной и морской воде, кишечнике беспозвоночных, на растениях и т.д.) и имеющим фенотипические и генетические (16S рРНК) признаки, сходные с рядом других видов бактерий рода *Bacillus*: *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. thuringiensis* и *B. anthracis* (Rasko et al., 2005; Han et al., 2006; Auger et al., 2009;). Бактерии *B. cereus* способны при определенных условиях вызывать у человека широкий спектр заболеваний, включающих пищевые токсикоинфекции, системные и местные гнойные инфекции, в т.ч. молниеносный сепсис, менингит, абсцесс мозга, эндофтальмит, пневмонию, эндокардит, остеомиелит, кожную инфекцию по типу газовой гангрены и т.д., а у животных – мастит крупного рогатого скота (Darbar et al., 2005; Avashia et al., 2007). Основные факторы патогенности *B. cereus* связаны с выделением разрушающих ткани реактивных экзоферментов: гемолизинов, фосфолипаз, токсина вызывающего рвоту и порообразующих энтеротоксинов (HBL, NHE, и цитотоксина K) (Edward, 2010).

Пищевую токсикоинфекцию с преобладающим диарейным синдромом вызывает употребление в пищу термически не обработанных мясных и рыбных блюд, невымытых овощей, непастеризованного молока, в то время как контаминированный бактериями *B. cereus* (10^5 - 10^8 КОЕ/г) рис и другие крахмал содержащие продукты, а также сыр вызывают гастроэнтерит с ведущим рвотным

синдромом (Wijnands. 2006). По данным Центра по контролю и профилактике заболеваний (CDC Foodborne Outbreak Online Database) в США ежегодно регистрируется более 60 000 случаев заболеваний, вызванных *B. cereus*. При этом отмечается, что некоторым пациентам с рвотной симптоматикой при бациллярной пищевой инфекции ошибочно диагностируют интоксикационный синдром, вызванный *Staphylococcus aureus*, в то время как ложным возбудителем диарейного типа этой токсикоинфекции считают *Clostridium perfringens* (Scallan et al., 2011). В связи с этим контроль *B. cereus* в ряде продуктов является обязательным санитарно-эпидемиологическим показателем, утвержденным в СанПиН 2.3.2.1078-01.

Для подтверждения наличия *B. cereus* в пищевых продуктах и клинических образцах зарубежом пытаются использовать серологические (ИФА) и молекулярно-генетические (ПЦР) методы (Jung et al., 2011; Tallent et al., 2012). Наиболее распространенный (классический) метод идентификации этого вида бацилл основан на выделении чистой культуры на МYP среде Мозеля – желточный агар с маннитом, полимиксином и феноловым красным, и ее последующем биохимическом тестировании (Rhodehamel, Harmon, 2001). Однако нестабильность ферментативных реакций *B. cereus* затрудняют межвидовую дифференциацию бактерий первой морфологической группы рода *Bacillus* и, кроме того, требуют серьезных временных затрат (Ефимочкина, 2010; Муштафин, 2011). В связи с этим, вопрос о разработке ускоренного достоверного метода идентификации бактерий *B. cereus* все еще остается актуальным.

Начиная с 2006 года сначала в США, а потом и в Европе все более широкое распространение получает теория использования бактериофаг-опосредованного биоконтроля в сфере санитарно-эпидемиологических мероприятий, проводимых в сельском хозяйстве, пищевой промышленности, пунктах общественного питания, ЛПУ и организованных коллективах (Алешкин и др. 2012) продемонстрировали возможность включения специфических бактериофагов, литически активных в отношении бактерий *B. cereus*, в процедуры по деконтаминации продуктов питания. В Российской Федерации на сегодняшний день отсутствуют данные о созданных фаговых биопрепаратах, в том числе диагности-

ческих, специфичных в отношении бактерий *B. cereus*. Разработка бактериофаговой тест-системы позволит не только ускорить процедуру по идентификации бактерий *B. cereus* в продуктах питания и клинических образцах, но и даст возможность дифференцировать бациллы внутри данного вида на фаговары и фаготипы.

Цель нашего исследования – разработка системы фаговаров бактерий *B. cereus* для идентификации и мониторинга бактерий *B. cereus* в объектах санитарного надзора.

Объектами исследований были штаммы бактерий. 105 штамма бактерий *B. cereus*, из них 3 референс-штамма *Bacillus cereus* № 8035, № 96, № 2527. Штаммы бактерий рода *Bacillus*: *B. subtilis* - 8 штаммов из них 2 референс-штамма № 6633 и L2; *B. mycoides* - 8 штаммов из них 2 референс-штамма № 537 и H; *B. thuringiensis* - 3 штамма из них 1 референс-штамм *B. thuringiensis* var. *kurstaki*; вид *B. mesentericus* - 8 штаммов из них 1 референс-штамм № 66; *B. megaterium* - 8 штаммов из них 1 референс-штамм № 182; *B. pseudoanthracis* - 3 штамма из них 1 референс-штамм. Референс-штаммы получены из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина». Штаммы бактериофагов – 57 изоляты бактериофагов *B. cereus*, выделенные из проб почвы различного хозяйственного назначения Приволжского федерального округа, Южного федерального округа, Центрального федерального округа.

Для выделения бактерий *B. cereus* использовали схемы дифференциации бактерий рода *Bacillus*: В.А. Полховского (1970); R.F. Gordon (1973); J.R. Norris et al., (1981); В.В. Смирнова с соавт., (1983); М.А. Сидорова (1995). Изучение морфологических, культуральных, биохимических свойств выделенных бактерий проводили по методам, рекомендованным А.С. Лабинской с соавт. (2004). Выделение и изучение биологических свойств бактериофагов проводили методами, предложенными Д.М. Гольдфарбом (1961), С. Лурия, Д. Дарнелом (1970), И.П. Ревенко (1978), В.Я. Ганюшкиным (1988), С.Н. Золотухиным (2007). Селекцию бактериофагов и повышение их литической активности проводили по методике, описанной С.Н. Золотухиным (2007).

Статистическую обработку результатов исследований проводили с помощью пакета приклад-

ных программ Statistica 6.0. (for Windows; «Stat Soft Ins.», США), Microsoft Excel 2003 (for Windows XP).

Первоочередной задачей наших исследований стало выделение бактерий *B. cereus* из объектов санитарного надзора, оптимизация и усовершенствование схемы выделения бактерий. В настоящее время определение бактерий вида *Bacillus cereus* производится по ГОСТ 1044.8-88 «Продукты пищевые. Методы определения *Bacillus cereus*», а также по схеме, предложенной Gordon (1973). Анализируя вышеуказанные методики, можно сказать, что по просту на диагностических средах *B. cereus*, *B. anthracis*, *B. mesenteris*, *B. megaterium*, *B. subtilis*, *B. thuringiensis* морфологически очень схожи.

Используя систему биохимических тестов предложенных в ГОСТ 1044.8-88 и Gordon (1973), мы сталкивались с рядом недостатков:

- проблемой вариабельности биохимических признаков и соответственно с высокой вероятностью недостоверного результата;
- малое количество тестов (анализы по предложенным тестам дают картину, при которой большинство биологических свойств попросту слиты и не дают равнозначного результата);
- диагностируя бактерии по данным схемам и свойствам, возникает ряд трудностей: во-первых, это длительность исследования по причине исследования биохимическими методами и второе, используемые здесь тесты дают спорный результат, так как схожие свойства имеют близкородственные виды.

На основании проведенных собственных исследований по методикам, предложенным в ГОСТ 1044.8-88 и в схеме, предложенной Gordon (1973), нам удалось типировать бактерии до рода, а видовая идентификация в виду скудности тестов оказалась недостаточно надежна.

Изучив свойства имеющихся референс-штаммов *Bacillus cereus* с помощью множества биохимических тестов, нами была разработана новая схема (рис. 1) выделения, делящая объекты исследования на 2 группы в зависимости от формы, в которой находится возбудитель (вегетативной или споровой). В данную процедуру дополнительно включены ряд биологических тестов (табл. 1) в соответствии с результатами полученными в ходе собственных экспериментов.

На основании составленного идентификационного алгоритма (рис. 1), тестирующего бактерии по 30 культуральным признакам, нами в период с 2007 по 2011 год проанализировано 536 проб, отобранных в хозяйствах Ульяновской, Самарской и других областях РФ. В результате исследований было выделено 398 штаммов рода *Bacillus*: 210 – из почвы; 67 – из воды рек, озер, сточных вод; 46 – из сена и остатков растительного происхождения; 90 – с пряностей и приправ; 67 – из молочной и 56 – мясной продукция. 102 из них идентифицированы как *B. cereus*. Общий уровень контаминации исследуемого пищевого сырья и готовых продуктов бактериями *B. cereus* составил 31 %.

Таким образом, разработанная схема позволяет типировать бактерии *B. cereus* с высокой достоверностью в срок не превышающий установленный ГОСТом 1044.8-88.

Второй этап исследования был посвящен выделению фагов бактерий *B. cereus*. В первой серии опытов мы исследовали штаммы *B. cereus* на содержание профага без индуцирующего фактора по методике, предложенной С. Лурия и Д. Дарнелла (1970) в модификации А.Г. Шестакова (2010).

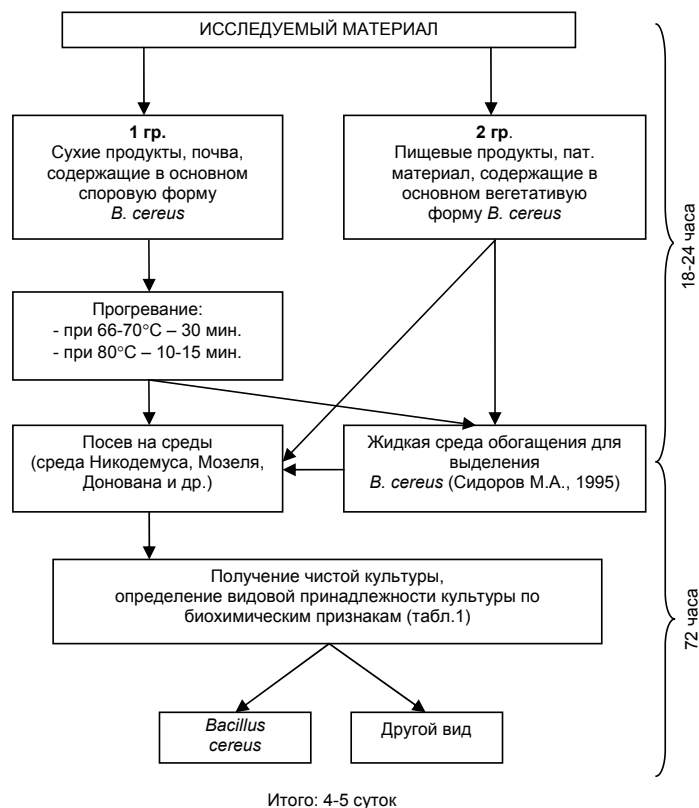


Рис. 1. Модифицированная схема выделения бактерий *B. cereus*

Во второй серии экспериментов на культуры *B. cereus* воздействовали индуцирующим фактором – ультрафиолетовыми лучами, по методике Дж. Мейнелла (1965). В результате проведенного комплекса исследований лизогенных штаммов *B. cereus* среди тестируемых культур не обнаружено.

В третьей серии экспериментов проводили выделение бактериофагов из объектов окружающей среды по методике Д.М. Гольдфарба (1961) в оригинальной модификации И.П. Ревенко (1978). По литературным данным, наиболее эффективно в качестве источника выделения бактерий рода *Bacillus* ис-

Табл. 1. Идентификационная таблица бактерий рода *Bacillus*

Признаки	Вид						
	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Bacillus mesentericus</i>	<i>Bacillus mycoides</i>	<i>Bacillus anthracis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
Рост в присутствии лизоцима	+	-	-	+	+	±	+
Анаэробный рост	+	-	-	+	+	-	+
Каталаза	+	+	+	+	+	+	+
Фосфатаза	+	±	±	-	-	+	+
Тест Фогес-Проскауера	+	-	-	±	+	+	+
Внутриклеточные кристаллы	-	-	-	-	-	-	+
Подвижность	+	±	+	-	-	+	+
Рост при тем. 45 С°	+	+	+	-	-	+	+
Капсулообразование в атмосфере с повышенным содержанием СО ₂	±	±	-	-	±	-	±
Гемолиз	+	-	±	+	-	-	+
Лецитиназа	+	±	-	-	-	-	±
Редукция нитратов до нитритов	+	±	-	+	±	+	+
Утилизация цитрата	+	+	+	±	±	+	+
Расщепление тирозина	+	±	-	±	+	-	±
Казеина	±	-	+	-	+	+	+
Крахмал	+	+	-	+	+	+	+
Мочевина	±	-	-	-	-	+	±
Сероводород	-	-	+	-	-	+	-
Арабиноза	-	+	+	+	-	+	±
Галактоза	-	+	-	-	±	-	-
Мальтоза	+	+	±	+	+	-	+
Маннит	-	+	+	-	-	+	-
Раффиноза	-	+	-	-	-	-	-
Ксилоза	-	±	+	-	-	+	-
Галактоза	-	+	-	-	±	-	-
Эскулин	±	-	±	-	-	+	±
Саллицин	+	-	-	+	±	+	+

Примечания: «+» - положительный; «-» - отрицательный; «±» - вариабельный признак.

пользовать пробы почвы, так как они являются почвенными сапрофитами.

В результате исследования 388 проб почвы различного хозяйственного назначения Приволжского федерального округа, Южного федерального округа, Центрального федерального округа, нам удалось выделить 57 изолятов бактериофагов бактерий *B. cereus*.

Четвертым этапом наших исследований было изучение основных биологических свойств (морфологии негативных колоний; специфичности действия; литической активности и ее изменения при хранении; спектра литического действия) выделенных бактериофагов *B. cereus*.

Экспериментальным путем было установлено, что негативные колонии, образуемые 57 изолятами фагов *B. cereus*, имели различный тип колоний. Согласно данным Ревенко И.П. (1978) морфология негативных колоний – это важный признак дифференциации фагов на умеренные и вирулентные. В нашем случае было выявлено 4 типа негативных колоний различающихся по размеру, форме и прозрачности.

Литическая активность выделенных фагов составила от 10^{-5} до 10^{-10} по методу Аппельмана и от $1,8 \times 10^7 \pm 0,4 \times 10^7$ до $4 \times 10^{12} \pm 1,8 \times 10^{12}$ по методу Грация.

Для изучения спектра литического действия отобранных фагов использовали 102 штамма бактерий *Bacillus cereus*, выделенных из пищевых продуктов и объектов ветеринарного надзора и 3 референс-штамма, полученных из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина». Определение спектра литической активности проводили методом нанесения фага на газон бактериальной культуры (Адамс, 1961; Ганюшкин, 1988). Установлено, что спектр литической активности фаготипов бактериофагов *B. cereus* находился в интервале от 0,9 до 12,4 % от всего количества изучаемых бактериальных штаммов. Причем, наиболее широким спектром литического действия по отношению к изучаемым культурам обладали штаммы бактериофагов: FBc-1 – 9,5 %, FBc-4 – 11,4 %, FBc-7 – 12,4 %, FBc-28 – 12,4 %. Кроме того имелись «нетипирующиеся» штаммы бактерий *B. cereus* № 3, № 10, № 24, № 34, № 40, № 44, № 58, № 63, № 73, № 86, № 96, которые не лизировались ни одним из имеющихся бактериофагов.

Важнейшей характеристикой фага, входящего в состав биопрепарата для индикации и идентификации бактерий, является его специфичность в пределах вида (Золотухин, 2007). Изучение специфичности 57 выделенных изолятов бактериофагов *B. cereus* проводили на культурах гомологичного рода: *B. mesentericus*, *B. subtilis*, *B. mycoides*, *B. megaterium*, *B. mesentericus*, *B. thuringiensis*, *B. pseudoanthracis*. Самой важной характеристикой выделенных фагов была специфичность по отношению к штаммам *B. cereus* и отсутствие способности лизировать культуры *B. mycoides* и *B. thuringiensis*, которые по биохимическим свойствам сходны с исследуемыми культурами. В результате исследований установлено, что бактериофаги обладают выраженной специфичностью только по отношению к бактериям *B. cereus*.

В результате проведенных исследований, была выявлена особенность селекционированных бактериофагов, связанная с избирательным лизисом тестируемых штаммов бацилл, позволявшая объединить бактериофаги и бактерии во взаимосвязанные группы. Таким образом, отобранные фаги были разделены на 18 групп (табл. 2). В последующем на их основе предложили схему фаготипирования, позволяющую идентифицировать *B. cereus* на 18 фаговаров (табл. 3).

Алгоритм фаготипирования может быть представлен следующим образом: чашку Петри делят бактериологическим карандашом на сектора, предварительно нумеруя группы бактериофага наносимого на газон. На поверхность МПА засеянного газонем исследуемой культуры пипеткой в намеченный сектор наносят каплю фага, дав ей впитаться в поверхность газона. В каждой чашке обязательно оставляют сектор, на который аналогичным образом наносится МПБ (для контроля). Результат учитывают по лизису исследуемой культуры. Лизируемые культуры сравниваются со схемой фаготипирования (табл. 3) и тестируемому штамму бацилл присваивается название группы фага, которой он лизируется (например, фаговар 1-Тип Вс - № штамма). Из отобранных группы фагов было принято решение изготовить комплексный биопрепарат со 18 наборов диагностических фаговых биопрепаратов. Для этого нами разработаны технологические параметры изготовления и контроля индикаторных бактериофагов *B. cereus*.

Для конструирования опытных образцов фаговых биопрепаратов было отобран 31 бактериофаг *B. cereus*: FBc – 1, FBc – 3, FBc – 6, FBc – 7, FBc – 9, FBc – 14, FBc – 15, FBc – 17, FBc – 18, FBc – 19, FBc – 20, FBc – 21, FBc – 23, FBc – 27, FBc – 28, FBc – 30, FBc – 33, FBc – 34, FBc – 37, FBc – 38, FBc – 41, FBc – 43, FBc – 44, FBc – 46, FBc – 47, FBc – 49, FBc – 50, FBc – 51, FBc – 52, FBc – 55, FBc – 56 серии УГСХА. Основными критериями отбора служили: спектр литической активности, специфичность и морфология негативных колоний. Перечисленные бактериофаги согласно предложенной выше схеме фаготипирования были разделены на 18 групп, от 1 до 3 фагов серии УГСХА в каждой (табл. 2). Как было показано выше изоляты бактериофагов образуют не однородные негативные колонии, всего выделено 4 типа колоний диаметром 0,5

Табл. 2. Характеристика фагов *B. cereus*

Фаговары <i>B. cereus</i>	Название бактериофагов УГСХА	Морфология фага	Название лизируемых штаммов <i>B. cereus</i>
1-Фаг Bc	FBc – 7 УГСХА	2 тип	№ 8035, № 96, 4, 8, 18, 12, 17, 18, 20, 37, 42, 49, 50, 54
	FBc – 28 УГСХА	4 тип	1, 2, 4, 8, 18, 12, 17, 18, 20, 21, 37, 42, 49, 50
2-Фаг Bc	FBc – 3 УГСХА	2 тип	5, 6, 16, 25, 29, 30, 31, 33
	FBc – 6 УГСХА	1 тип	16, 31, 33
	FBc – 56 УГСХА	4 тип	13, 25, 26, 29, 30
3- Фаг Bc	FBc – 1 УГСХА	2 тип	№ 2527, 53, 64, 82, 85, 87, 90, 95, 98, 100
	FBc – 17 УГСХА	4 тип	38, 65, 82, 101
4- Фаг Bc	FBc – 50 УГСХА	3 тип	22, 76, 83
5- Фаг Bc	FBc – 43 УГСХА	4 тип	56
	FBc – 44 УГСХА	2 тип	102
6- Фаг Bc	FBc – 30 УГСХА	2 тип	9, 27, 55, 77
	FBc – 47 УГСХА	4 тип	9, 72
7- Фаг Bc	FBc – 33 УГСХА	2 тип	19, 28, 32, 36, 57, 68, 71, 80
8- Фаг Bc	FBc – 14 УГСХА	2 тип	7, 15, 39, 41, 74, 89
	FBc – 38 УГСХА	4 тип	14, 52
9- Фаг Bc	FBc – 21 УГСХА	1 тип	75
	FBc – 55 УГСХА	3 тип	75
10-Фаг Bc	FBc – 9 УГСХА	1 тип	23
	FBc – 15 УГСХА	3 тип	23
11- Фаг Bc	FBc – 18 УГСХА	2 тип	92
	FBc – 49 УГСХА	1 тип	92
12- Фаг Bc	FBc – 41 УГСХА	1 тип	46, 51
	FBc – 46 УГСХА	2 тип	51, 94
13- Фаг Bc	FBc – 23 УГСХА	2 тип	84
	FBc – 37 УГСХА	1 тип	84
14- Фаг Bc	FBc – 19 УГСХА	2 тип	45, 59
	FBc – 52 УГСХА	4 тип	45, 62
15- Фаг Bc	FBc – 27 УГСХА	1 тип	60, 70, 88, 91, 97
16- Фаг Bc	FBc – 20 УГСХА	2 тип	66, 78, 79
17- Фаг Bc	FBc – 34 УГСХА	2 тип	43, 81
18- Фаг Bc	FBc – 51 УГСХА	2 тип	35, 47, 48, 61, 67, 93, 99

Табл. 3. Схема фаготипирования

Типы фагов																		
Фаговары (фаготипы) бактерии	1-Тип Vc	2-Тип Vc	3-Тип Vc	4-Тип Vc	5-Тип Vc	6-Тип Vc	7-Тип Vc	8-Тип Vc	9-Тип Vc	10-Тип Vc	11-Тип Vc	12-Тип Vc	13-Тип Vc	14-Тип Vc	15-Тип Vc	16-Тип Vc	17-Тип Vc	18-Тип Vc
1-Тип Vc	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-Тип Vc	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3-Тип Vc	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4-Тип Vc	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5-Тип Vc	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6-Тип Vc	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7-Тип Vc	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8-Тип Vc	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9-Тип Vc	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10-Тип Vc	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
11-Тип Vc	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
12-Тип Vc	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
13-Тип Vc	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
14-Тип Vc	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
15-Тип Vc	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
16-Тип Vc	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
17-Тип Vc	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
18-Тип Vc	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

Примечания - «+» - лизис; «-» - отсутствие лизиса.

– 8,0 мм, литическая активность фагов составляет от 10^{-5} до 10^{-10} по методу Аппельмана и от $1,8 \times 10^7 \pm 0,4 \times 10^7$ до $4 \times 10^{12} \pm 1,8 \times 10^{12}$ по методу Грациа. Фаги являются специфичными для бактерий *V. cereus* и не лизируют бактерии гетерологичных родов и видов. Спектр литической активности выделенных фагов варьировал 0,9 до 12,4 %. В виду вариабельности биологических свойств селектированных бактериофагов было предложено изготавливать каждый из них в отдельности и смешивать перед фасовкой по флаконам.

В результате проведенных исследований была разработана следующая пилотная технология производства биопрепарата:

1. получение биологического сырья для изготовления биопрепарата (подготовка индикаторных культур бактерий *V. cereus* и подготовка специфичных фагов *V. cereus*);

2. определение биологической активности полученного сырья (концентрации бактерий, литической активности и титра бактериофага);

3. расчет оптимальных соотношений индикаторной бактериальной культуры и фага, с учетом температуры и времени культивирования;

4. стерилизующая фильтрация фаголизата, с целью получения отдельных штаммов бактериофагов (31 фаг);

5. составление линейки из 18 наборов диагностических фаговых биопрепаратов – смешивание штаммов с учетом фагогрупп;
6. розлив суспензии фагов во флаконы (ампулы);
7. контроль биопрепаратов (проверка специфичности, спектра литической активности бактериофагов, стерильности и т.д.).

Качество изготовленных биопрепаратов «1-Фаг Вс» – «18-Фаг Вс» определяли по следующим показателям: внешнему виду, микробиологической чистоте, литической активности (титру), спектру литической активности и специфичности. Количество контролируемых образцов зависело от объема партии готовой продукции, но не могло составлять менее 3 штук каждого из 18 биопрепаратов. Соответствие внешнего вида готового продукта определяли визуально. Индикаторный фаг не может содержать посторонних примесей, фаголизат должен быть прозрачным, светло-желтого или желтого цвета. Стерильность каждой партии биопрепаратов подтверждалась отсутствием роста бактериальной микрофлоры (в том числе бацилл), дрожжей и плесневых грибов на селективных питательных средах в течение установленного срока (5 суток). Оценку литической активности 31 штамма фага проводили по методу Грациа, на эталонной культуре соответствующей каждому штамму бактериофага. Препарат считали годным, если содержание фаговых частиц было на уровне не ниже 10^8 в 1 мл. Спектр литического действия и специфичность фаговых биопрепаратов определяли по методике, изложенной выше, и оценивали на соответствие исходным штаммам, составлявшим каждую композицию. Дату изготовления серии исчисляли со дня закупорки флаконов. Срок годности диагностических наборов бактериофагов при температуре 2-4 °С, в течение которого не происходило снижения уровня литической активности биопрепаратов, устанавливали экспериментальным путем. Препарат оставался годным в течение 12 месяцев после фасовки.

С учетом строгой родовой специфичности селекционированных бактериофагов, нами была разработана схема ускоренной идентификации *V. cereus* в пробах пищевых продуктов (рис. 2) с использованием набора специфичных фаговых биопрепаратов. Для оценки эффективности ускоренного диагностического алгоритма в процессе производственных испытаний, проведенных в аккредитованной лаборатории ОГУ «Ульяновская областная

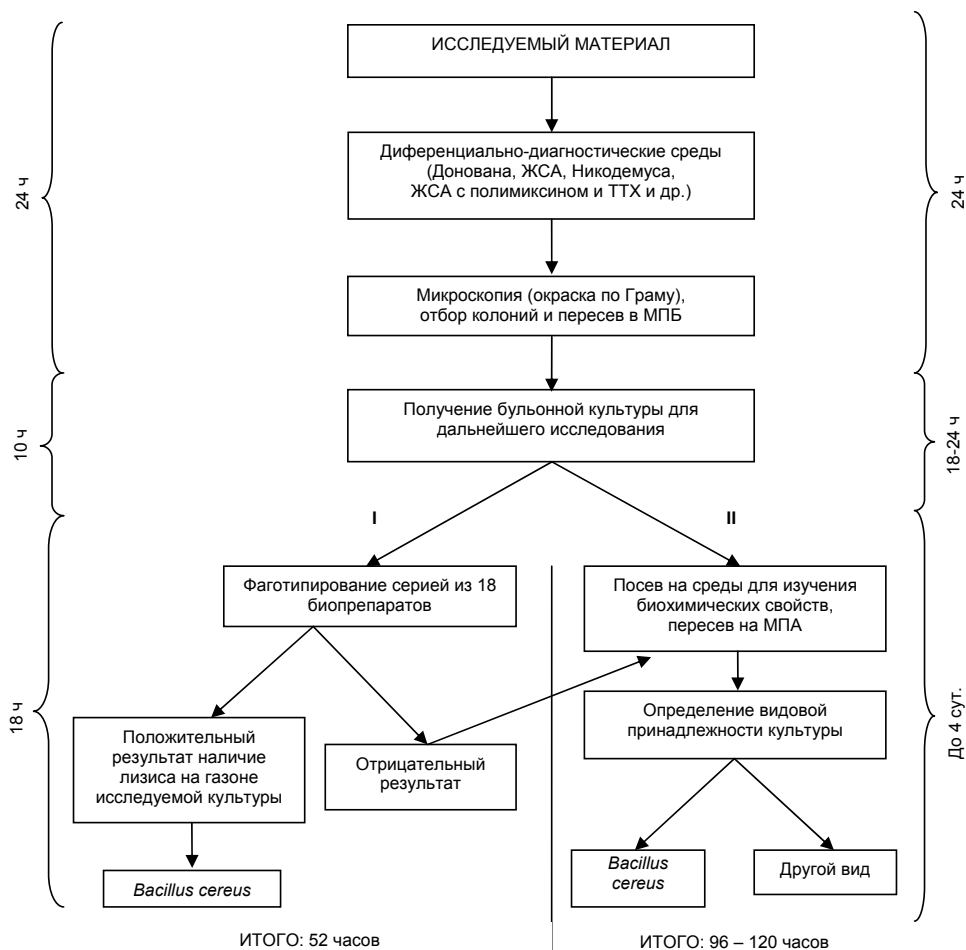


Рис. 2. Схема типирования бактерий *Bacillus cereus* с помощью бактериофагов (I) в сравнении с традиционной схемой бактериологического исследования (II)

ветеринарная лаборатория», параллельно с ним осуществляли идентификацию *B. cereus*, используя традиционную схему по ГОСТ 1044.8-88 «Продукты пищевые. Методы определения *Bacillus cereus*».

Процедуру ускоренной идентификации проводили следующим образом: на поверхность МПА в чашках Петри пастеровской пипеткой наносили 3-4 капли бульонной 18-24 часовой культуры исследуемых микроорганизмов. Нанесённую бактериальную культуру равномерно распределяли по поверхности среды стерильным шпателем. Чашки термостатировали в течение 15-20 минут для подсушивания, а затем, предварительно поделив на 7 секторов, на поверхность засеянной среды пастеровской пипеткой в размеченные сектора вносили поочередно 18 биопрепара-

тов с 1-Фаг ВсУГСХА по 18-Фаг ВсУГСХА. Для исследования 1 бактериальной культуры в опыте использовали 3 чашки Петри с МПА.

По результатам производственных испытаний было установлено, что новый диагностический метод позволяет идентифицировать бактерии *Bacillus cereus* за 52 часа, в то время как по традиционной бактериологической схеме идентификации проводится в течение 96-120 часов. Таким образом, разработанный алгоритм диагностики бактерий *Bacillus cereus* с помощью набора специфичных биопрепаратов бактериофагов, не только существенно сокращает время проведения процедуры идентификации, но и предполагает дополнительное типирование данного вида бацилл на фаговары.

В результате проведенных исследований нами была усовершенствована классическая схема выделения бактерий *B. cereus* и с ее помощью изучены показатели распространённости этого вида бацилл в пищевых продуктах и объектах внешней среды. Разработан способ выделения бактериофагов, позволивший изолировать новые штаммы, активные в отношении бактерий *B. cereus*. Создана система из 18 фаговаров бактерий *B. cereus* для идентификации и мониторинга данных микроорганизмов в объектах санитарного надзора. Отработана пилотная технология получения линейки диагностических биопрепаратов для определения фаговаров *B. cereus*.

Нами была усовершенствованная схема классической идентификации бактерий *B. cereus* позволяет определять возбудителя с высокой достоверностью в срок, не превышающий установленный в ГОСТе 1044.8-88 «Продукты пищевые. Методы определения *Bacillus cereus*». Разработанный алгоритм диагностики бактерий *B. cereus* с помощью набора специфичных биопрепаратов бактериофагов, не только сокращает до 52 часов процедуру идентификации, но и предполагает дополнительное типирование данного вида бацилл на фаговары. Полученные в соответствии с пилотной технологией фаговые биопрепараты прошли производственные испытания в аккредитованной лаборатории ОГУ «Ульяновская областная ветеринарная лаборатория» и получили разрешение на использование в диагностических целях. Алгоритм ускоренной диагностики бактерий *B. cereus* с помощью

специфичных бактериофагов послужил основой для разработки «Методических рекомендаций по ускоренной идентификации бактерий *B. cereus* в объектах санитарного надзора с применением специфических бактериофагов» (14.12.12).

На основании отработанной пилотной технологии получения бактериофаговых биопрепаратов создана «Временная инструкция по изготовлению и контролю лабораторной серии индикаторных бактериофагов *B. cereus*» (14.12.12).

Материалы исследований используются при чтении лекций и проведении лабораторно-практических занятий по биотехнологии, вирусологии, микробиологии для студентов факультета ветеринарной медицины, биотехнологического факультета Ульяновской ГСХА, а также размещены в виде электронного ресурса на сайте научной библиотеки ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина».

ЛИТЕРАТУРА

1. Алешкин, А.В. Бактериофаги как пробиотики и средства деконтаминации пищевых продуктов / А.В. Алешкин, Н.В. Воложанцев, Э.А. Светоч [и др.] // Астраханский мед. журнал. – 2012. – №3 (7), – С.31-39
2. Ашмарин, И.П. Быстрые методы обработки и планирование эксперимента / И.П. Ашмарин, Н.И. Васильев, В.А. Амбросов – М.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1974. – С. 16.
3. Ганюшкин В.Я. Бактериофаги сальмонелл и их применение в ветеринарии. – Ульяновск. – 1988. – С.45.
4. Гольдфарб, Д.М. Бактериофагия / Д.М. Гольдфарб. – М.: «Медгиз», 1961. – С. 6-184.
5. ГОСТ 1044.8-88 «Продукты пищевые. Методы определения *Bacillus cereus*».
6. Ефимочкина, Н.Р. Новые бактериальные патогены в пищевых продуктах: экспериментальное обоснование и разработка системы контроля с применением методов микробиологического и молекулярно-генетического анализа: автореф. дис. ...канд. биол. наук: 14.02.01 / Ефимочкина Наталья Рамозановна. – Москва, 2010. – С.28.
7. Золотухин, С.Н. Создание и разработка схем применения диагностических биопрепаратов на основе выделенных и изученных бактериофагов энтеробактерий: автореф. дис. ...докт. биол. наук: 03.00.07, 03.00.23 / Золотухин Сергей Николаевич. – Ульяновск, 2007. – С.32.
8. Лабинская, А.С. Общая и санитарная микробиология с техникой микробиологического исследования / А.С. Лабинская, Л.П. Блинкова, Л.П. Ещина. – М.: «Медицина», 2004. – С. 34–37.
9. Лурия, С. Общая вирусология / Лурия С., Дарнелл Д. – М.: «Мир», 1970. – С.36-47.
10. Мустафин, А.Х. Разработка схемы исследования материала с целью выделения и ускоренной идентификации бактерий видов *Bacillus cereus* и *Bacillus subtilis* / А.Х. Мустафин, Н.А. Феоктистова, А.И. Калдыркаев // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. 2011. №4 (32). С. 288–291.
11. Полховский, В.А. Биохимические типы *Bacillus cereus*, выделенных из различных природных источников / В.А. Полховский // Журн. микробиол. – 1970. – № 2. – С.82–86.
12. Ревенко, И.П. Бактериофаги и их использование в ветеринарной практике / И.П. Ревенко. – Киев: «Урожай», 1978. – С. 41-88.
13. СанПиН 2.3.4.1078-01 «Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов».
14. Сидоров, М.А. Определитель зоопатогенных микроорганизмов: справочник / М.А. Сидоров. – М.: Колос, 1995. – С.104–112.
15. Смирнов, В.В. Методические рекомендации по выделению и идентификации бактерий рода *Bacillus* из организма человека и животных / В.В. Смирнов, С.Р. Резник, И.Б. Сорокулова. – Киев: «Наукова думка», 1983. – С. 51.
16. Шестаков, А.Г. Схема выделения и идентификации бактерий *Pseudomonas aeruginosa* / А.Г. Шестаков, И.И. Богданов, Д.А. Васильев // Естественные и технические науки. – 2009. – №6(44). – С. 118-120.
17. Урбах, В.Ю. Статистический анализ в биологических исследованиях / В.Ю. Урбах. – М.: «Медицина», 1975. – С. 46.

18. Auger, S. Biofilm formation and cell surface properties among pathogenic and nonpathogenic strains of the *Bacillus cereus* group / S. Auger, N. Ramarao, C. Faille, A. Fouet, S. Aymerich, M. Gohar // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2009. – № 10. – P. 1128.
19. Avashia, S. B. Fatal pneumonia among metalworkers due to inhalation exposure to *Bacillus cereus* containing *Bacillus anthracis* toxin genes / S. B. Avashia, W. S. Wiggins, C. Lindley, A. H. Hoffmaster, R. Drumgoole, T. Nekomoto, P. J. Jackson, K. K. Hill, K. Williams, L. Lehman, M. C. Libal, P. P. Wilkins, J. Alexander, A. Tvaryanas, and T. // *Betz.Clin. Infect.* – 2007. – № 44. – P.414–416.
20. Darbar, A. Necrotizing infection due to *Bacillus cereus* mimicking gas gangrene following penetrating trauma / A. Darbar, I. A. Harris, I. B. Gosbell // *J. Orthop. Trauma.* – 2005. – №19. – P. 353–355.
21. Edward, J. B. *Bacillus cereus*, a Volatile Human Pathogen / J. B. Edward // *Clinical Microbiology.* – 2010. – V. 23– P. 382–398.
22. Gordon, R. The genus *Bacillus* / R. Gordon // In *Handb. Microbiol.* Cleveland (Ohio). – 1973. – V.1. – P.71–88.
23. Han, C. S. Pathogenomic sequence Analysis of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* Isolates Closely Related to *Bacillus anthracis* / C. S. Han, G. Xie, J. F. Challacombe, M. R. Altherr, S. S. Bhotika, N. Brown, D. Bruce, C. S. Campbell, M. L. Campbell, J. Chen, O. Chertkov, C. Cleland // *Journal of Bacteriology.* – 2006. – V. 188(900). – P. 3382–3390.
24. Jung, M.Y. *Bacillus manliponensis* sp. nov., a New Member of the *Bacillus cereus* Group Isolated from Foreshore Tidal Flat Sediment / Min Young Jung, Joong-Su Kim, Woon Kee Paek, Jeongheui Lim, Hansoo Lee, Pyoung Il Kim, Jin Yeul Ma, Wonyong Kim, Young-Hyo Chang // *The Journal of Microbiology.* – 2011. – V. 49, – №. 6. – P. 1027-1032.
25. Norris, J.R. The genera *Bacillus* and *Sporolactobacillus* /J.R. Norris, R.C.W. Berkeley, N.A. Logan, A.G. O'Donnell // *Identification of Bacteria.* 1981. – Vol. 2. – P. 1711-1742.
26. Rasko, D.A. Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms / D.A. Rasko, M.R. Altherr, C.S. Han, J. Ravel // *FEMS Microbiol Rev.* – 2005. – № 29. – P.303–329.
27. Rhodhamel, E. J. In *FDA Bacteriological Analytical Manual* / E.J. Rhodhamel, S.M. Harmon. – International Organization for Standardization. – 2001. – P. 793.
28. Scallan, E. Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens / E. Scallan, R.M. Hoekstra, F.J. Angulo // *Emerg Infect Dis.* – 2011. – №17 (7) –P. 15.
29. Tallent, S. M. Efficient Isolation and Identification of *Bacillus cereus* / S. M. Tallent, K. M. Kotewicz, E. A. Strain, R. W. Bennett, // *Group Journal of AOAC International.* – 2012. – Vol. 95. – №. 2. – P. 446-451.
30. Wijnands, L. Spores from mesophilic *Bacillus cereus* strains germinate better and grow faster in simulated gastrointestinal conditions than spores from psychrotrophic strains / L. M. Wijnands, J. B. Dufrenne, M. H. Zwietering, F. M. Leusden // *International Journal of Food Microbiology.* – 2006. – V. 112. – Issue 2. P. 120-128.

ГЛАВА 4

ВЫДЕЛЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ ОСНОВНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БАКТЕРИОФАГОВ БАКТЕРИЙ ВИДА ENTEROCOCCUS FAECALIS

CHAPTER 4.
KOVALEVA E.N. ISOLATION AND STUDY OF THE MAIN
QUALITIES OF ENTEROCOCCUS FAECALIS SP. PHAGES

Энтерококки входят в состав нормальной микрофлоры ротовой полости, кишечника и мочеполовой системы животных и человека, поэтому их обнаружение в объектах внешней среды свидетельствует о биологической контаминации изучаемого объекта (Еремина, Седов, 1994; Anderson, Turner, Lewis, 1997; Бухарин, 2002).

Кроме того, среди этих микроорганизмов встречаются патогенные варианты, способные вызывать поражения мочеполовой системы, бактериальные эндокардиты и бактериемии у людей. Гемолизирующие энтерококки также способны вызывать пищевые отравления и дисбактериозы кишечника (Cassell, 1997; Смирнов, 2000; Kurup et al. 2001; Макушенко, 2002; Тюрин, 2004).

У животных энтерококки вызывают гастроэнтериты, пневмонии, маститы, эндокардиты, менингиты, септоцемию и другие заболевания (Панин, 1991; Субботин, 2001; Колычев, Петрова, Лазарева, 2006; Иващук, 2006).

Энтерококки в настоящее время являются одними из самых часто встречающихся возбудителей нозокомиальных инфекций. Тем не менее, наибольшую опасность вызывает не столько широкая распространенность этих микроорганизмов, сколько их устойчивость к большому спектру антибактериальных препаратов (Bell, Paton, Turnidge, 1998; Сидоренко, 2003; Hershberger et al.,

2005; Kolar et al., 2005). Поскольку из патологического материала чаще всего выделяют *E.faecalis*, то в большинстве случаев приходится идентифицировать именно этот вид.

Все вышесказанное обуславливает актуальность своевременной индикации и идентификации изучаемых микроорганизмов. При использовании бактериологических методов идентификация занимает длительное время. Хотя современные методы лабораторной диагностики (Braak et al., 2001; Drews et al., 2006) и являются высокоспецифичными и чувствительными, сложность методик, требования к квалификации персонала, высокая стоимость оборудования и реактивов делает их недоступными для многих бактериологических лабораторий на данный момент.

Благодаря специфичности действия бактериофаги используются для определения видовой принадлежности микроорганизмов, индикации бактерий в объектах внешней среды, диагностики инфекционных заболеваний.

Следовательно, разработка технологии изготовления и применения биопрепарата энтерококковых бактериофагов для идентификации и индикации бактерий вида *Enterococcus faecalis* в объектах внешней среды является актуальной задачей.

Для работы использовали 5 референс-штаммов бактерий вида *E.faecalis* Всероссийского государственного центра качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов (№ 189, № 13, № 345, «Константиновский», «Соколово»), используемых для изготовления вакцин против энтерококкозов сельскохозяйственных животных; 40 штаммов бактерий рода *Enterococcus* (33 – *E.faecalis*, 7 – *E.facium*), выделенные нами из патологического материала павших животных, фекалий больных животных, объектов внешней среды; 169 штаммов бактерий рода *Enterococcus* (82 – *E.faecalis*, 76 – *E.facium*, 3 – *E.raffinosis*, 3 – *E.casseliflavus*, 2 – *E.durans*, 1 – *E.avium*, 1 – *E.gallinarum*, 1 – *E.hirae*) любезно предоставленные нам НИИ Антимикробной химиотерапии ГОУ ВПО «Смоленская государственная медицинская академия»; 65 референс-штаммов бактерий других родов из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы Ульяновской ГСХА (*Staphylococcus*: 10 – *S.aureus*; *Streptococcus*: 5 – *S. pneumoniae*; *Escherichia*: 2 – *E.coli*; *Proteus*: 5 – *P.vulgaris*; *Morganella*: 3 – *M.morganii*; *Citrobacter*: 5 –

C.freundii; *Enterobacter*: 5 – *E.cloacae*; *Klebsiella*: 5 – *K.pneumoniae*; *Yersinia*: 5 – *Y.enterocolitica*; *Providencia*: 5 – *P.rettgeri*; *Aeromonas*: 5 – *A.hydrophila*; *Pseudomonas*: 5 – *P.aeruginosa*; *Bacillus*: 5 – *B.cereus*).

В качестве объектов внешней среды использовали пищевое сырье, бытовые сточные воды, вода открытых водоемов, сточные воды ферм, фекалии больных и патологический материал (кровь сердца, печень, селезенка, кишечник) павших животных.

Выделение и идентификацию бактерий рода *Enterococcus* проводили в соответствии с «Методическими указаниями по лабораторной диагностике стрептококкоза животных», утвержденными Департаментом ветеринарии МСХ СССР (1990). При необходимости использовали дополнительные тесты, изложенные в «Определителе бактерий Берджи» (1997), «Методических рекомендациях по лабораторной диагностике энтерококковой инфекции» (Седов, 1983).

Выделение и изучение основных биологических свойств проводили по методам, предложенным М. Адамсом (1961), Д.М. Гольдфарбом (1961), А.С. Тихоненко (1968), И.П. Ревенко (1978), С.Н. Золотухиным (2007). Реакцию нарастания титра фага для индикации бактерий вида *E.faecalis* в объектах внешней среды проводили по методикам, предложенным В.Д. Тимаковым, Д.М. Гольдфарбом (1961), В.Я. Ганюшкиным (1988).

Статистическую обработку результатов исследований проводили общепринятыми методами (Ашмарин, 1962; Бейли, 1970).

Выделение бактериофагов E.faecalis

Первоочередной задачей наших исследований стало выделение бактериофагов *Enterococcus* из объектов внешней среды. Материалом для выделения являлось пищевое сырье, сточные воды и фекалии свиноводческих и молочно-товарных ферм, частных хозяйств Ульяновской и Самарской областей. Всего исследовано 33 пробы.

Исследуемый материал объемом 10 мл засеивали в колбу с мясопептонным бульоном в объеме 50 мл, внося при этом по 1 мл 18-часовых бульонных культур бактерий вида *E.faecalis* № 189, 13, 345, «Соколово», «Константиновский». Посевы инкубировали при температуре 37 °С в течение 18 – 24 часов. После инкубации из колбы брали 10 мл жидкости и помещали в стерильную пробирку. Затем, с целью инактивации посторонней микрофлоры,

материал обрабатывали хлороформом (1:10) и центрифугировали в течение 30 мин при 700 g.

Полученный надосадок исследовали методом агаровых слоев на присутствие бактериофага, гомологичного энтерококкам. Присутствие бактериофага определяли по наличию прозрачных пятен, хорошо видимых на матовом фоне глубинного роста бактерий. Отбор выделенных бактериофагов и повышение их литической активности проводили пассивированием фагов на индикаторных культурах с периодическим пересевом типичных для данного изолята негативных колоний.

В результате проведенных исследований в отношении бактерий вида *E. faecalis* выделено 7 штаммов бактериофагов (табл. 1).

Характеристика биологических свойств выделенных фагов

Морфология негативных колоний

Морфологию негативных колоний фагов изучали при посевах фагов методом агаровых слоев. Негативные колонии, образуемые изучаемыми бактериофагами, имели схожую морфологию: колонии округлой формы с ровными краями, в диаметре от 1 до 4 мм, прозрачные, без вторичного роста и зоны неполного лизиса.

Литическая активность

Литическую активность выделенных бактериофагов определяли методами Аппельмана (метод серийных разведений в жидкой питательной среде) и Грациа (метод агаровых слоев на плотной питательной среде).

Литическая активность составляла 10^{-9} – 10^{-10} по методу Аппельмана и 4×10^9 – 2×10^{10} по методу Грациа. Все изоляты фагов обладали литической активностью, достаточной для использования их в качестве диагностических препаратов (табл. 2).

Диапазон литической активности

Диапазон литической активности изучали методом нанесения бактериофага на газон бактериальных культур бактерий вида *E. faecalis*.

Опыты показали, что спектр лизиса гомологичных микроорганизмов находился в пределах от 48,3 % до 90,2 % из числа изучаемых штаммов. Максимальный спектр совместного литического действия (94 %) был обнаружен у двух бактериофагов – EF – 4 УГСХА и EF – 5 УГСХА (табл. 3).

Специфичность

Табл. 1. Источник выделения бактериофагов *E.faecalis*

Фаги	Индикаторный штамм <i>E.faecalis</i>	Источник	Место и год выделения
EF – 1 УГСХА	<i>E.faecalis</i> БШ № 1	Сточные воды	п. Октябрьский Чердаклинского района, 2006
EF – 2 УГСХА	<i>E.faecalis</i> БШ № 1	Фекалии поросят	Ставропольский район Самарской области, 2006
EF – 3 УГСХА	<i>E.faecalis</i> № 13	Сточные воды	Учебно-опытное хозяйство УГСХА, 2007
EF – 4 УГСХА	<i>E.faecalis</i> № 189	Сточные воды	Птицефабрика «Ульяновская» Чердаклинского района, 2007
EF – 5 УГСХА	<i>E.faecalis</i> № 189	Сточные воды	Подсобное хозяйство ИК № 9 Заволжского района, 2007
EF – 6 УГСХА	<i>E.faecalis</i> № 345	Фекалии телят	п. Первомайский Чердаклинского района, 2007
EF – 7 УГСХА	<i>E.faecalis</i> № 189	Фекалии телят	п. Пятисотенный Чердаклинского района, 2007

Табл. 2. Литическая активность бактериофагов *E.faecalis*

Бактериофаги	Литическая активность	
	по методу Аппельмана (степень разведения)	по методу Грация (количество корпускул в 1 мл)
EF – 1 УГСХА	10 ⁹	4 x 10 ⁹
EF – 2 УГСХА	10 ¹⁰	1 x 10 ¹⁰
EF – 3 УГСХА	10 ¹⁰	2 x 10 ¹⁰
EF – 4 УГСХА	10 ⁹	6 x 10 ⁹
EF – 5 УГСХА	10 ⁹	4 x 10 ⁹
EF – 6 УГСХА	10 ¹⁰	2 x 10 ¹⁰
EF – 7 УГСХА	10 ⁹	8 x 10 ⁹

Табл. 3. Диапазон активности и специфичность бактериофагов *E.faecalis*

Род (вид) бактерий	Количество исследуемых штаммов	Бактериофаги серии УГСХА						
		EF-1	EF-2	EF-3	EF-4	EF-5	EF-6	EF-7
		Процент лизируемых культур						
<i>E.faecalis</i>	120	48,3	58,3	60,8	90,2	86,6	76,7	79,2
<i>E.facium</i>	83	–	–	–	–	–	–	–
<i>E.raffinosis</i>	3	–	–	–	–	–	–	–
<i>E.casseliflavus</i>	3	–	–	–	–	–	–	–
<i>E.durans</i>	2	–	–	–	–	–	–	–
<i>E.avium</i>	1	–	–	–	–	–	–	–
<i>E.gallinarum</i>	1	–	–	–	–	–	–	–
<i>E.hirae</i>	1	–	–	–	–	–	–	–
<i>Streptococcus</i>	5	–	–	–	–	–	–	–
<i>Staphylococcus</i>	10	–	–	–	–	–	–	–
<i>Escherichia</i>	2	–	–	–	–	–	–	–
<i>Proteus</i>	5	–	–	–	–	–	–	–
<i>Morganella</i>	3	–	–	–	–	–	–	–
<i>Citrobacter</i>	5	–	–	–	–	–	–	–
<i>Enterobacter</i>	5	–	–	–	–	–	–	–
<i>Klebsiella</i>	5	–	–	–	–	–	–	–
<i>Yersinia</i>	5	–	–	–	–	–	–	–
<i>Providencia</i>	5	–	–	–	–	–	–	–
<i>Aeromonas</i>	5	–	–	–	–	–	–	–
<i>Pseudomonas</i>	5	–	–	–	–	–	–	–
<i>Bacillus</i>	5	–	–	–	–	–	–	–

Примечание: «–» - отсутствие лизиса.

Специфичность энтерококковых бактериофагов изучали методом нанесения фага на газон бактериальной культуры представителей других видов, родов.

В результате изучения специфичности выделенных бактериофагов по отношению к представителям других видов рода *Enterococcus*, других родов установлено, что данные фаги не лизировали ни одну из испытываемых культур (табл. 3).

Температурная устойчивость

При изучении воздействия высокой температурой на изучаемые фаголизаты было установлено, что температурный диапазон в 60 – 65 °С существенно снижает активность тестируемых фагов (с 10^9 до 10^2), температура выше 67 °С полностью их инактивирует. Используемые температурные режимы (диапазон от 60 °С до 69 °С) не снизили активность культуры индикаторного штамма энтерококков (табл. 4).

Чувствительность бактериофагов к воздействию хлороформа

Результаты исследований устойчивости фагов к воздействию хлороформа показали, что существенных изменений количества активных корпускул фагов в 1 мл при обработке хлороформом не происходит. Воздействие хлороформом на культуру индикаторного штамма энтерококков в течение 15 минут приводило к полной инактивации изучаемых микроорганизмов (табл. 5).

Морфология фаговых корпускул

Для электронно-микроскопических исследований морфологии фаговых корпускул использовали фаголизаты EF – 4 УГСХА

Табл. 4. Температурная устойчивость бактериофагов *E. faecalis*

Температурный режим, °С	Активность штаммов, подвергнутых температурной обработке, количество активных корпускул в 1 мл							
	ИШ*	EF – 1	EF – 2	EF – 3	EF – 4	EF – 5	EF – 6	EF – 7
60 – 62	7×10^9	1×10^9	2×10^9	5×10^9	1×10^9	3×10^9	2×10^9	2×10^9
63 – 64	6×10^9	2×10^2	1×10^2	6×10^2	7×10^2	2×10^2	3×10^2	1×10^2
65 – 66	6×10^9	–	–	4×10^2	1×10^1	7×10^1	–	7×10^1
67 – 69	6×10^9	–	–	–	–	–	–	–
Контроль	7×10^9	5×10^9	2×10^9	7×10^9	1×10^9	5×10^9	2×10^9	3×10^9

Табл. 5. Устойчивость бактериофагов *E. faecalis* к воздействию хлороформа

Время воздействия хлороформа, мин	Активность штаммов, подвергнутых обработке хлороформом, количество активных корпускул в 1 мл							
	ИШ*	EF – 1	EF – 2	EF – 3	EF – 4	EF – 5	EF – 6	EF – 7
15	–	2×10^9	2×10^9	9×10^9	1×10^9	7×10^9	3×10^9	6×10^9
30	–	1×10^9	1×10^9	9×10^9	1×10^9	5×10^9	3×10^9	5×10^9
45	–	1×10^9	1×10^9	6×10^9	1×10^9	5×10^9	1×10^9	5×10^9
Контроль	7×10^9	5×10^9	2×10^9	7×10^9	1×10^9	5×10^9	2×10^9	3×10^9

*Примечание: ИШ – индикаторный штамм культуры бактерий вида *E. faecalis* № 189.

и EF – 5 УГСХА в титре $3 \times 10^9 - 1 \times 10^{10}$ фаговых корпускул в 1 мл.

В результате проведенных исследований было установлено, что вирионы фага EF – 4 УГСХА состоят из головки в виде удлиненного многогранника и длинного несокращающегося отростка. Длина головки составляет – 97,2 0,8 нм, ширина – 41,6 0,2 нм; длина отростка – 125 0,8 нм. Вирионы фага EF – 5 УГСХА также состоят из головки в виде удлиненного многогранника и длинного несокращающегося отростка. На конце отростка имеется базальная пластика. Длина головки – 97,2 0,8 нм, ширина – 50,0 0,2 нм, длина отростка – 138,8 0,8 нм. Морфология бактериофагов EF – 4 УГСХА и EF – 5 УГСХА представлена на рисунках 1, 2.

Таким образом, согласно Международной классификации и таксономии вирусов по морфологии бактериофаги EF – 4 УГСХА и EF – 5 УГСХА относятся к семейству Siphoviridae, по классификации А.С. Тихоненко – к IV морфологической группе: «Фаги с длинным несокращающимся отростком».

На основании изученных биологических свойств были отобраны два изолята энтерококковых фагов EF – 4 УГСХА и EF – 5

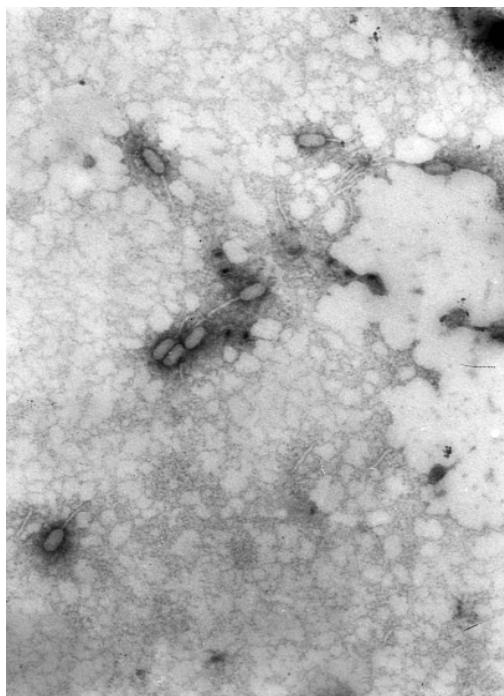


Рис. 1. Морфология бактериофага EF – 4 УГСХА $\times 36000$

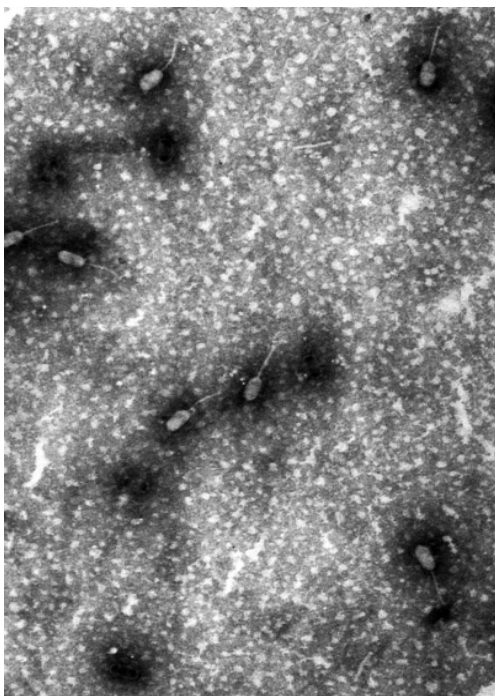


Рис. 2. Морфология бактериофага EF – 5 УГСХА $\times 36000$

УГСХА, рекомендованные для изготовления биопрепарата.

Оптимальными технологическими параметрами для изготовления биопрепарата с высокой литической активностью являются: соотношение количества фаговых корпускул к количеству бактериальных клеток индикаторного штамма бактерий вида *E.faecalis* 1 : 3, время инкубации при температуре 37 °С – 6 часов. Для освобождения фаголизатов от жизнеспособных бактерий необходимо применение хлороформа (соотношение 1 : 10 в течение 30 минут).

Разработка параметров ускоренной идентификации бактерий вида *E.faecalis* с помощью бактериофагов

Используя строгую специфичность бактериофагов EF – 4 УГСХА и EF – 5 УГСХА в отношении бактерий вида *E.faecalis*, были отработаны параметры схемы ускоренной идентификации указанных микроорганизмов (рис. 3). В исследованиях использовали воду, комбикорм, мясо, контаминированные бактериями вида *E.faecalis* в концентрации 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 м.к. в 1 мл.

Посев материала проводили на энтерококкагар, молочно-ингибиторную среду, посевы инкубировали 18 – 24 часа при температуре 37 °С. Бульонные культуры, полученные после пересева колоний, микроскопии (окраска по Граму) и при наличии в мазках грамположительных кокков, идентифицировали бактериологическим методом и с помощью отобранных бактериофагов. Идентификацию бактерий проводили методом нанесения фага на газон культуры. Наличие зоны лизиса на сплошном газоне культуры хотя бы одного из фагов указывало на принадлежность исследуемого штамма к виду *E.faecalis*. Фагоидентификация выделенных штаммов как бактерий вида *E.faecalis* во всех случаях подтверждена результатами биохимических свойств.

Экспериментальные данные определяют возможность идентификации бактерий вида *E.faecalis* фагами EF – 4 УГСХА и EF – 5 УГСХА, срок исследования по сравнению с бактериологическим методом при этом сокращается с 4 до 2 суток при меньшем расходе питательных сред, реактивов, лабораторной посуды.

Разработка оптимальных условий постановки РНФ

Определение количественного показателя РНФ

Для определения уровня нарастания титра, при котором РНФ можно считать положительной, были проведены эксперименты

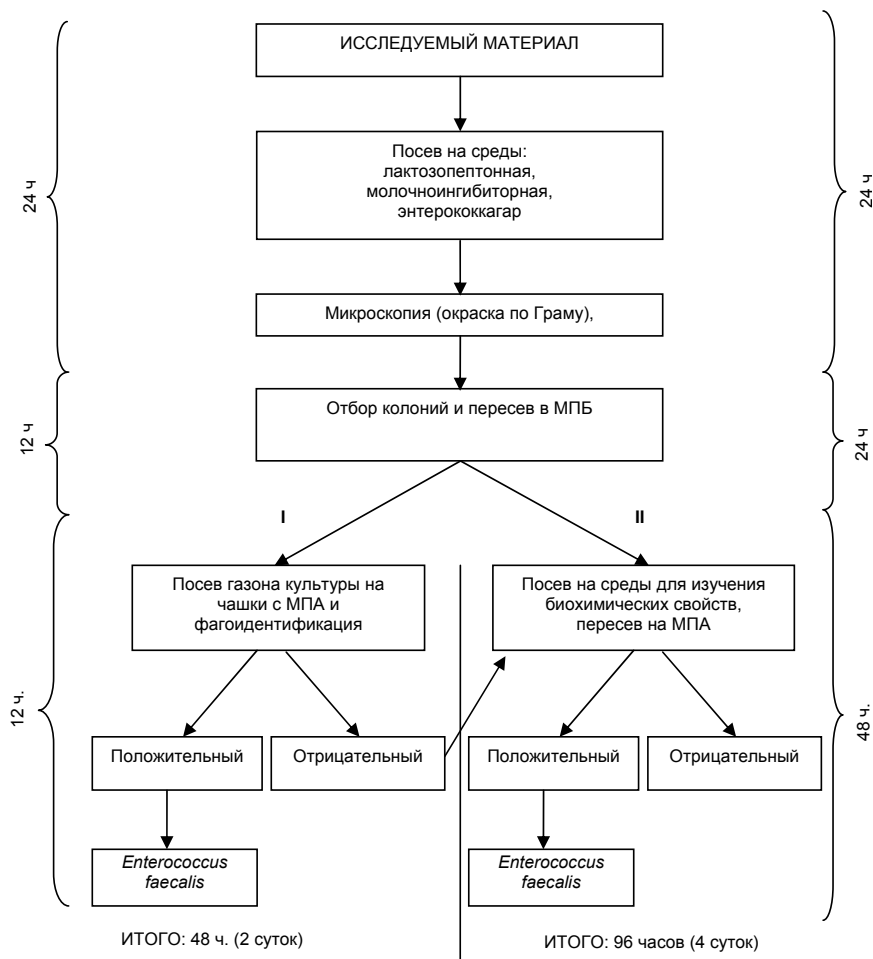


Рис. 3. Выделение бактерий вида *E. faecalis* и ускоренная идентификация с помощью бактериофагов (1) в сравнении с традиционной схемой бактериологического исследования (2)

по обнаружению культур *E. faecalis* разных заражающих концентраций (от 10^5 до 10^1 м.к./мл) в мясопептонном бульоне.

Установлено, что результат реакции является положительным, т.е. увеличение количества корпускул фага EF – 4 УГСХА более чем в 5 раз, в пробах, при контаминации мясопептонного бульона бактериями *E. faecalis* в концентрации 10^3 м.к./мл, для фага EF – 5 УГСХА – при контаминации мясопептонного бульона бактериями *E. faecalis* в концентрации 10^4 м.к./мл.

Установление оптимального времени РНФ

В разработку оптимальных условий постановки реакции входит установление времени, обеспечивающего наиболее полноценное взаимодействие бактериофага с бактериями. Оптимальное время экспозиции выбирали из следующих параметров:

- предварительное подращивание исследуемого материала в течение 5, 16, 24 часов при температуре 37 °С, после добавления фагов смесь выдерживали в течение 5 часов при температуре 37 °С;
- увеличении времени контакта исследуемого материала с фагом до 7, 10, 16, 24 часов при температуре 37 °С.

В результате исследований было установлено, что после предварительного подращивания исследуемого материала в течение 5 часов удалось обнаружить энтерококки, гомологичные фагу EF – 4 УГСХА в концентрации 10^2 м.к./мл, фагу EF – 5 УГСХА – 10^3 м.к./мл (табл. 6, 7).

Увеличение времени предварительной инкубации до 16 часов повысило чувствительность РНФ на один порядок для обоих фагов. Подращивание материала при 24-часовой экспозиции существенно не повлияло на результаты РНФ.

Во второй серии опытов изучали чувствительность РНФ в зависимости от времени инкубирования исследуемого материала с фагами.

В результате проведенных исследований было установлено, что при инкубировании материала в течение 7 часов бактерии были обнаружены с помощью РНФ гомологичными фагами EF – 4 УГСХА и EF – 5 УГСХА в концентрации 10^2 и 10^3 м.к./мл исследуемого материала соответственно. Увеличение времени контакта материала с фагами позволило обнаружить исходные бактерии в концентрации 10^2 всеми фагами. 16 и 24-часовой контакт исследуемого материала с фагами не повлиял на чувствительность РНФ (табл. 8, 9).

Табл. 6. Чувствительность РНФ в зависимости от времени подращивания

Время контакта, часов	Концентрация индикаторной культуры, м.к./мл					Время на исследование, часов
	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	
	Результат РНФ					
5	–	+	+	+	+	22
16	+	+	+	+	+	33
24	+	+	+	+	+	41

Табл. 7. Чувствительность РНФ в зависимости от времени подращивания исследуемого материала с фагом EF – 5 УГСХА

Время контакта, часов	Концентрация индикаторной культуры, м.к./мл					Время на исследование, часов
	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	
	Результат РНФ					
5	–	–	+	+	+	22
16	–	+	+	+	+	33
24	+	+	+	+	+	41

Результаты проведенных исследований показали, что предварительное подращивание материала увеличивает время реакции, но чувствительность метода при этом не меняется в сравнении с исследованиями без подращивания.

Полученные экспериментальные данные позволяют считать, что наиболее оптимальным является режим РНФ при 7 часовой экспозиции исследуемого материала с фагами без подращивания, когда удастся провести индикацию энтерококков в количестве $10^2 - 10^3$ м.к./мл изучаемого субстрата, на исследование которого затрачивается 19 – 24 часа. Поэтому данный режим рекомендован для дальнейших исследований.

Использование РНФ для индикации бактерий вида *E.faecalis* в объектах внешней среды

В настоящее время исследователи уделяют большое внимание разработке простых и надежных методов индикации различных патогенных бактерий в объектах внешней среды. Были проведены исследования по определению возможности использования РНФ для обнаружения бактерий вида *E.faecalis* в объектах внешней среды. Параллельно исследования велись бактериологическими методами.

По результатам исследований проб водопроводной воды, комбикорма, мяса, патологического материала установлено, что увеличение титра фагов EF – 4 УГСХА и EF – 5 УГСХА более чем в 5 раз произошло при концентрации бактерий вида *E.faecalis* 10^3 м.к./г при наличии посторонней микрофлоры.

Табл. 8. Чувствительность РНФ в зависимости от времени инкубирования исследуемого материала с фагом EF – 4 УГСХА

Время контакта, часов	Концентрация индикаторной культуры, м.к./мл					Время на исследование, часов
	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	
	Результат РНФ					
7	–	+	+	+	+	19
10	+	+	+	+	+	22
16	+	+	+	+	+	28
24	+	+	+	+	+	36

Табл. 9. Чувствительность РНФ в зависимости от времени инкубирования исследуемого материала с фагом EF – 5 УГСХА

Время контакта, часов	Концентрация индикаторной культуры, м.к./мл					Время на исследование, часов
	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	
	Результат РНФ					
7	–	–	+	+	+	19
10	–	+	+	+	+	22
16	+	+	+	+	+	28
24	+	+	+	+	+	36

При исследовании объектов внешней среды нами было обнаружено существенное преимущество РНФ перед бактериологическим методом исследования. С помощью РНФ за 19 – 24 часа исследования можно обнаружить бактерии вида *E.faecalis* в изучаемых объектах в количестве 10^3 м.к./г. Бактериологическим методом удавалось обнаружить бактерии вида *E.faecalis* в минимальной концентрации 10^4 м.к./г, но при этом затрачивается не менее 96 часов.

Исследование маститного молока с помощью РНФ на наличие бактерий вида *E.faecalis*

Для оценки эффективности реакции нарастания титра фага в условиях производства были проведены исследования по фагоиндикации бактерий вида *E.faecalis* в маститном молоке. Опыт проводился на базе бактериологического отдела ОГУ «Ульяновская областная ветеринарная лаборатория». В качестве исследуемого материала использовали 10 проб молока от больных маститом коров животноводческого комплекса «Октябрьский» Чердаклинского района Ульяновской области.

При исследовании бактериологическим методом бактерии вида *E.faecalis* были выделены из двух проб (20 %). Время исследования составило около 120 часов. При исследовании материала методом РНФ с использованием специфических энтерококковых бактериофагов EF – 4 и EF – 5 серии УГСХА бактерии вида *E.faecalis* были обнаружены в пяти пробах (50 %). Время исследования составило 24 часа.

Результаты производственного опыта подтверждают более высокую чувствительность реакции нарастания титра фага при обнаружении бактерий вида *E.faecalis* в сравнении с бактериологическим методом исследования при меньшей затрате времени и реактивов.

Изучение эффективности сконструированного биопрепарата энтерококковых бактериофагов

Для усовершенствования предложенного метода изучалась возможность использования не отдельных монофагов, а их смеси. Установлено, что сконструированный биопрепарат, состоящий из двух энтерококковых бактериофагов EF – 4 УГСХА и EF – 5 УГСХА, по параметрам необходимым для проведения идентификации и индикации бактерий вида *E.faecalis* (высокая лити-

ческая активность, широкий диапазон литической активности, выраженная видовая специфичность, более высокий, чем у бактерий порог инактивации) соответствует отдельным монофагам. Антагонистический эффект при взаимодействии фагов EF – 4 УГСХА и EF – 5 УГСХА отсутствует.

Выводы

Таким образом, впервые выделены бактериофаги, активные в отношении штаммов бактерий вида *E.faecalis*, патогенных для животных, изучены основные биологические свойства новых изолятов фагов. На основе специфичности действия бактериофагов разработаны параметры идентификации и индикации бактерий вида *E.faecalis* в объектах внешней среды. Впервые определена технология изготовления биопрепарата энтерококковых бактериофагов и доказана эффективность его использования для индикации и идентификации бактерий вида *E.faecalis* в условиях производства.

По итогам работы разработана «Инструкция по изготовлению и контролю серии бактериофагов *E.faecalis* EF – 4 УГСХА и EF – 5 УГСХА», предложены «Методические рекомендации по выделению и идентификации бактерий вида *E.faecalis* из патологического материала, пищевых продуктов, кормов и объектов внешней среды с применением диагностических бактериофагов EF – 4 УГСХА, EF – 5 УГСХА» и «Методические рекомендации по ускоренной индикации методом реакции нарастания титра фага бактерий вида *E.faecalis* в патологическом материале, пищевых продуктах, кормах и объектах внешней среды», одобренные Научно-техническим советом Ульяновской ГСХА и утвержденные ректором академии (16 июня 2009 года).

Результаты изучения биологических свойств бактериофагов EF – 4 УГСХА, EF – 5 УГСХА и индикации бактерий вида *E.faecalis* в объектах внешней среды методом РНФ подтверждены актами комиссионных испытаний в Ульяновской ГСХА (14 – 16 апреля 2009 года), во Всероссийском государственном центре качества и стандартизации лекарственных препаратов для животных и кормов (22 – 25 апреля 2009 года); актами производственных испытаний на базе бактериологического отдела ОГУ «Ульяновская областная ветеринарная лаборатория» (18 – 22 мая 2009 года).

Выделенные бактериофаги депонированы во Всероссийском государственном центре качества и стандартизации лекарственных препаратов для животных и кормов (№ 801/15 и № 802/15 от 24 апреля 2009 года), признаны перспективными и рекомендованы для изготовления диагностических и лечебно-профилактических препаратов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Адамс, М. Бактериофаги / М. Адамс. – М.: Медгиз, 1961. – 521 с.
2. Ашмарин, И.П. Статистические методы в микробиологических исследованиях / И.П. Ашмарин, А.А. Воробьев. – Л., 1962.
3. Бейли, Н. Математика в биологии и медицине / Н. Бейли. – М.: Мир, 1970. – 326 с.
4. Бухарин, О.В. Механизмы выживания энтерококков в организме хозяина / О.В. Бухарин // ЖМЭИ. – 2002. – № 3. – С. 100 – 106.
5. Ганюшкин, В.Я. Бактериофаги сальмонелл и их применение в ветеринарии / В.Я. Ганюшкин. – Ульяновск, 1988. – 45 с.
6. Гольдфарб, Д.М. Бактериофагия / Д.М. Гольдфарб. – М.: Медгиз, 1961. – 299 с.
7. Еремина, А.К. Биологические свойства подвижных энтерококков / А.К. Еремина, В.И. Седов // ЖМЭИ. – 1994. – № 6. – С. 12 – 13.
8. Золотухин, С.Н. Создание и разработка схем применения диагностических биопрепаратов на основе выделенных и изученных бактериофагов энтеробактерий / С.Н. Золотухин // Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – Ульяновск, 2007. – 39 с.
9. Ивашук, М.А. Усовершенствование лабораторной диагностики энтерококковой инфекции птиц / М.А. Ивашук // Автореф. дис. ... канд. ветеринар. наук. – М., 2006. – 18 с.
10. Ковалева, Е.Н. Биологические свойства бактериофагов *Enterococcus* / Е.Н. Ковалева, С.Н. Золотухин, Д.А. Васильев // Проблемы профилактики и борьбы с особо опасными, экзотическими и малоизученными инфекционными болезнями животных: материалы Международной научно-практической конференции, 13 – 14 ноября, 2008. – Покров, 2008. – Т. I. – С. 219 – 221.
11. Ковалева, Е.Н. Выделение и изучение биологических свойств бактериофагов *Enterococcus* / Е.Н. Ковалева, С.Н. Золотухин // Ломоносов: материалы докладов XV Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых, 8 – 11 апреля, 2008. – М.: Издательство МГУ, 2008. – С. 7.
12. Ковалева, Е.Н. Диапазон литического действия и специфичность бактериофагов *Enterococcus faecalis* / Е.Н. Ковалева, С.Н. Золотухин, Д.А. Васильев // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – Москва, 2009. – Приложение 1. – Т. 11, № 2. – С. 19.
13. Ковалева, Е.Н. Подбор штаммов бактериофагов *Enterococcus* для конструирования диагностического препарата / Е.Н. Ковалева, С.Н. Золотухин, Д.А. Васильев // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – Казань, 2008. – Т. 195. – С. 123 – 128.
14. Колычев, Н.М. Сперма быков как фактор передачи энтерококковой инфекции / Н.М. Колычев, М.И. Петрова, Л.И. Лазарева // Ветеринария. – 2006. – № 11. – С. 23 – 25.
15. Макушенко, А.С. Энтерококки: экологическое и клиническое значение в современных условиях / А.С. Макушенко // Лабораторная диагностика. – 2002. – № 3. – С. 43 – 45.
16. Методические указания по лабораторной диагностике стрептококкоза животных. – МСХ СССР, М., 1990.
17. Определитель бактерий Берджи / под редакцией Дж. Хоулта [и др.]. 9-е издание. Т. 2. Перевод с англ. под редакцией акад. РАН Г.А. Заварзина. – М.: Мир, 1997. – 432 с.
18. Панин, А.Н. К вопросу об энтерококковой инфекции / А.Н. Панин // Ветеринария. – 1991. – № 1. – С. 25 – 26.
19. Ревенко, И.П. Бактериофаги и их использование в ветеринарной практике / И.П. Ревенко. – Киев: Урожай, 1978. – С. 88.
20. Седов, В.И. Лабораторная диагностика энтерококковой инфекции. Методические рекомендации / В.И. Седов. – Иваново, 1983.
21. Сидоренко, С.В. Антибактериальная терапия: кризис жанра или свет в конце тоннеля? / С.В. Сидоренко // Русский медицинский журнал. – 2003. – т. 11 № 6. – С. 7 – 20.
22. Смирнов, И.В. Возбудители бактериальных инфекций человека / И.В. Смирнов // КМАХ. – 2000. – т. 2 № 2. – С. 4 – 11.
23. Субботин, В.В. Профилактика желудочно-кишечных болезней новорожденных животных с симптомокомплексом диареи / В.В. Субботин // Ветеринария. – 2001. – № 4. – С. 3 – 7.
24. Тимаков, В.Д. Реакция нарастания титра фага (РНФ) / В.Д. Тимаков, Д.М. Гольдфарб. – М., 1962. – 32 с.
25. Тихоненко, А.С. Ультраструктура вирусов бактерий / А.С. Тихоненко. – М.: Наука, 1968 – С. 89.

26. Тюрин, В.П. Современные взгляды на лечение энтерококкового эндокардита / В.П. Тюрин, Ю.Г. Тихонов // КМАХ. – 2004. – т. 6 № 4. – С. 360 – 364.
27. A 24-hour screening protocol for identification of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* / S.J. Drews [et al.] // J. of Clinical Microbiol. – 2006. – 44, № 4. – P. 1578 – 1580.
28. Accuracy of the VITEC 2 system to detect glycopeptide resistance in Enterococci / N. Braak [et al.] // J. of Clinical Microbiol. – 2001. – 39, № 1. – P. 351 – 353.
29. Anderson, S.A. Enterococci in the New Zealand environment: Implications for water quality monitoring: Selec. Pap. IAWQ 8th Int. Symp. Health-relat. Water Microbiol., Mallorca, 6 – 10 Oct., 1996 / S.A. Anderson, S.J. Turner, G.D. Lewis // Water Sci. and Technol. – 1997. – 35, № 11 – 12. – P. 325 – 331.
30. Bell, J.M. Emergence of vancomycin-resistant Enterococci in Australia: phenotypic and genotypic characteristics of isolates / J.M. Bell, J.C. Paton, J. Turnidge // J. of Clinical Microbiol. – 1998. – 36, № 8. – P. 2187 – 2190.
31. Cassell, G.H. Emergent antibiotic resistance: Health risks and economic impact / G.H. Cassell // FEMS Immunol. and Med. Microbiol. – 1997. – 18, № 4. – P. 271 – 274.
32. Epidemiology of antimicrobial resistance in enterococci of animal origin / E. Hershberger [et al.] // J. of Antimicrob. Chemother. – 2005. – 55, № 1. – P. 127 – 130.
33. Infection of central nervous system by motile *Enterococcus*: first case report / A. Kurup [et al.] // J. of Clinical Microbiol. – 2001. – 39, № 2. – P. 820 – 822.
34. Occurrence of VRE in humans and animals in the Czech Republic between 2002 and 2004 / M. Kolar [et al.] // J. of Medic. Microbiol. – 2005. – 54. – P. 965 – 967.

ГЛАВА 5 БАКТЕРИОФАГИ БАКТЕРИЙ РОДА *PSEUDOMONAS*

CHAPTER 5. BACTERIOPHAGES OF PSEUDOMONAS GENUS

ВИКТОРОВ Д. А., БОГДАНОВ И.И.

5.1. ВЫДЕЛЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ ОСНОВНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БАКТЕРИОФАГОВ БАКТЕРИЙ ВИДА *PSEUDOMONAS PUTIDA*

VYKTOROV D.A., BOGDANOV I.I. ISOLATION AND STUDY OF THE MAIN
QUALITIES OF PSEUDOMONAS PUTIDA SP. PHAGES

1. Актуальность темы

Pseudomonas putida – часто встречающаяся бактерия, выделяемая как из внешней среды (вода, почва, растения), так и из патологического материала (Красильников, 1974; Смирнов, 1990; Weyant et al., 1996).

В отечественной и зарубежной литературе имеются многочисленные сообщения, в которых освещаются отдельные биологические свойства *P. putida* (Сиволодский, 1990; Волкова, 2006; Blazevic, Koepeke, Matsen, 1973; Harwood, Fosnaugh, Dispensa, 1989; Boopathi, Rao, 1999; Ribera, Monteoliva-Sanchez, Ramos-Cormenzana, 2001; Ward, de Roo, O'Connor, 2005; Bertani et al., 2007).

Данный микроорганизм является возбудителем псевдомоноза у прудовых рыб, сопровождающегося массовой гибелью рыбы (Лобунцов и др., 1971; Мусселиус, 1983; Грищенко, 1984; Вялова, Шкурина, 1995; Юнчис, 2005; Altinok, Kayis, Capkin, 2006). Псевдомонозом болеют карпы, караси, пестрые и белые толстолобики, белые и черные амуры, буффало и другие карповые рыбы, в том числе аквариумные. Заболевают рыбы в возрасте от сеголетков до производителей, но чаще – сеголетки и двухлетки. Источником возбудителей заболевания являются больные рыбы, их тру-

пы, дикие рыбы-бактерионосители, обитающие в водоисточниках. Передаются прямым контактом и опосредованно через воду, инвентарь, при перевозках рыб, а так же эктопаразитами. (Грищенко, Акбаев, Васильков, 1999).

Псевдомонады, гематогенным путем разносимые по органам и тканям, приводят к бактериемии и оказывают токсигенное действие на сосудистую стенку, вызывая эритродиapedез, выпотевание плазмы крови и образование воспалительного отека в разных органах (Грищенко, 1984). Различают острое и подострое течения болезни. Клинически псевдомоноз у разных видов рыб проявляется сходно, но отмечается варьирование признаков в зависимости от патогенности возбудителя и восприимчивости животных. Наиболее тяжелые изменения обнаруживаются у карпов и буффало при септической асцитной форме болезни (Грищенко, 1984; Грищенко, Акбаев, Васильков, 1999). Больные псевдомонозом рыбы становятся вялыми, слабо реагируют на внешние раздражители, хаотично плавают по бассейну в верхних слоях воды.

По мере развития патологического процесса у больных рыб отмечают пучеглазие, ерошение чешуи, увеличение брюшка. На теле отмечают точечные или очаговые кровоизлияния, а также кровоизлияния в белочную оболочку глаза. На коже рыб появляются мелкие язвы, которые могут увеличиваться и, прорываясь, образовывать глубокие кратеры.

В коже и мускулатуре преобладают очаговые покраснения, острый дерматомиозит, эритродиapedез, отек рыхлой клетчатки и распад мышечных пучков. Брюшина и серозные оболочки органов воспалены, влажные, в брюшной полости прозрачный кровянистый экссудат, кишечник вздут.

В брюшной полости при вскрытии обнаруживают большое количество желтовато-зеленой или кровянистой жидкости слизистой консистенции. Печень увеличена, бледная или наоборот темно-красного цвета, дряблая, с участками кровоизлияний, с явлениями зернистой, гидropической дистрофии и фокального некробиоза клеток, иногда имеет зеленоватый оттенок. Почки дряблые, с точечными кровоизлияниями, размягченные, отмечается зернистая и вакуольная дистрофия, некробиоз эпителия, деструкция канальцев и гломерулит. Селезенка сильно увеличена, темно-красного цвета. На внутренней оболочке брюшной

полости отмечают геморрагии. В просвете сосудов резко повышено число лейкоцитов. Слизистая оболочка кишечника гиперемирована, иногда с точечными кровоизлияниями, кишечник катарально воспален, в его просвете желтоватая или кровянистая слизь. Анальное отверстие обычно воспалено и выпячено.

У толстолобиков часто наблюдают кровоизлияния на жаберных крышках, в склере глаз, у основания плавников и на боковых стенках. Жабры анемичные, почти бескровные, серо-белого цвета (Септический псевдомоноз..., 1971).

При летней вспышке псевдомоноза у белых амуров кожный покров темнеет, в области ануса образуется опухолевидное вздутие. У толстолобиков отмечено пятнистое побеление кожи, потеря рыбами равновесия тела. Массовая гибель рыб начинается через 2-3 дня после появления первых признаков.

Развитие характерных поражений на хвосте и плавниках у лососей и карпов проявляется сходно. Сначала на наружном крае плавника появляется белая полоса, расширяющаяся к его основанию. Затем разрушаются межлучевые перепонки плавников (Вялова, 1995).

При более легком течении болезни у карпов, а также у толстолобиков преобладает дерматомиозит; альтеративно-экссудативные изменения во внутренних органах выражены слабее.

В единичных случаях бактерии *P. putida* способны вызывать заболевания у теплокровных животных и человека: абсцессы, бактериемии, раневые инфекции, инфекции мочевыводящих путей, кольпит, приводящий к самопроизвольным выкидышам, абортam (Литвин, 1997; Blazevic, Koepeke, Matsen, 1973; Anaissie et al., 1987; Perz et al., 2005).

Имеются сведения, что *P. putida* вызывает порчу пищевых продуктов (Clive de W. Blackburn, 2008). Кроме того, ряд штаммов данной бактерии проявляет фитопатогенные свойства (Пастушенко, Симонович, 1979; Burkholder, 1950). Другие штаммы, напротив, входят в состав биопрепаратов для стимуляции роста растений (Боронин, Кочетков, 2000; Lopez, Henkels, 1999).

Бактерии *P. putida* широко известны и имеют важное научно-практическое значение благодаря своей способности окислять необычайно большое число различных органических соединений, являются объектом биотехнологических исследований при

конструировании препаратов-деструкторов, в том числе со множественной деструктивной активностью (Волкова, 2006; Muller, 1992). Разработаны методы использования *P. putida* для очистки воды и почвы от нефти и нефтепродуктов (Клюянова, 2006; Kowalski, 2002).

Вышеперечисленное обуславливает научный и практический интерес к бактериям *P. putida*. В значительной степени это связано с недостаточно разработанными методами индикации и идентификации данного микроорганизма при выделении из объектов внешней среды, пищевого сырья и пищевых продуктов (Сиволодский, 1988; Васильев, Золотухин, Никишина, 1998).

С середины прошлого столетия бактериофаги широко используются для диагностики различных бактериальных инфекций (Гольдфарб, 1961). Вместе с тем, использование реакции нарастания титра фага, как быстрого и точного метода индикации бактерий, для *P. putida* ранее не изучалось.

Целью исследований явилась разработка методов фагоидентификации и фагоиндикации бактерий *P. putida* из объектов внешней среды, пищевого сырья и пищевых продуктов.

Задачи исследований:

1. Выделение бактериофагов бактерий *P. putida*, изучение их основных биологических свойств: морфологии негативных колоний, литической активности, спектра литической активности, специфичности действия, устойчивости к физическим и химическим факторам.

2. Селекция наиболее оптимальных штаммов бактериофагов (по критериям литической активности, спектру лизируемых культур и специфичности) для конструирования биопрепарата.

3. Разработка биопрепарата на основе отобранных бактериофагов для индикации и идентификации *P. putida* и разработка технологии его изготовления.

4. Оптимизация схемы индикации бактерий *P. putida* в объектах внешней среды, пищевого сырья и пищевых продуктов с помощью разработанного биопрепарата методом реакции нарастания титра фага.

2. Объект, материалы и методы исследований

Штаммы: Объектом исследования явились 5 референс-штаммов бактерии *P. putida*: №901 IV-89; ATCC 12633 IV-87, B-899, B-550,

В-1292, а также 33 «полевых» штамма, выделенные из объектов окружающей среды. Для определения специфичности выделенных бактериофагов использовали 3 референс-штамма *P. aeruginosa*: №128, №381, №1677, 4 референс-штамма бактерии *P. fluorescens*: 13525 IV-96, В-896, В-970, В-1470, 2 референс-штамма бактерии *P. chlororaphis*: В-1246, В-1249, а также 14 штаммов бактерий других родов: *Aeromonas hydrophila*, *Proteus mirabilis*, *Morganella morganii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp., *Bacillus cereus*, *E. coli*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Yersinia enterocolitica*, *Stenotrophomonas maltophilia*, полученные из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ при ФГБОУ ВПО Ульяновской ГСХА им. П.А. Столыпина. Все штаммы обладали типичными биологическими свойствами.

Методы: Выделение, идентификацию и индикацию бактерий проводили по общепринятым микробиологическим методам (Васильев, Золотухин, Никишина, 1998; Лабинская, 2004). Приготовление и стерилизацию питательных сред проводили согласно ГОСТ Р 51446-99. Приготовление суспензий и разведений проводили по ГОСТ Р 51426-99. Посевы на питательные среды осуществляли согласно ГОСТ Р 26670-91. Отбор и подготовку лабораторных проб проводили по ГОСТ 26668-85, ГОСТ 26669-85, ГОСТ Р 51419-99.

Выделение и изучение биологических свойств фагов проводили по методам Д.М. Гольдфарба (1961), И.П. Ревенко (1978), И.М. Габриловича (1973), С.Н. Золотухина (2007). Литическую активность фагов определяли по Аппельману и Грациа (Гольдфарб, 1961). Реакцию нарастания титра фага для индикации *P. putida* в объектах внешней среды проводили по методам В.Д. Тимакова и Д.М. Гольдфарба (1962), а также В.Я. Ганюшкина (1984). Конструирование биопрепарата проводили по методу С.Н. Золотухина (2007).

3. Результаты исследований и их обсуждение

3.1. Выделение бактериофагов *P. putida*

Материалом для выделения бактериофагов *P. putida* являлись сточные воды и образцы прудовой и речной воды Ульяновской области. Всего исследовано 76 проб, из которых выделено 14 культур бактериофагов.

Исследуемый материал объемом 10 мл засеивали в колбу с МПБ в объеме 50 мл, внося при этом по 1 мл суточных бульонных культур *P. putida* штаммы ATCC 12633, №901, В-899, В-550, В-1292,. Посевы инкубировали при температуре 28 °С в течение 48 часов. После инкубирования из колбы брали 10 мл жидкости и помещали в стерильную пробирку.

Затем, с целью инактивации посторонней микрофлоры, материал обрабатывали хлороформом (1:10) в течение 20 минут и центрифугировали в течение 30 мин при 700 g. Полученную надосадочную жидкость исследовали методом агаровых слоев на присутствие бактериофага, бактерий *P. putida*.

Для этого 1,5% МПА разливали в чашки Петри в количестве 25-30 мл (первый слой). После застывания среды чашки ставили на 24 часа для подсыхания в термостат при температуре 37 °С. В пробирку с 2,5 мл 0,7% расплавленного и остуженного до температуры 45 °С МПА вносили 1 мл исследуемого фильтрата и 0,2 мл суточной бульонной культуры штамма *P. putida* ATCC 12633. Содержимое пробирок быстро перемешивали вращением между ладонями, чтобы не произошло застывания агара, и выливали в ту же чашку вторым слоем. После того, как агар принимал плотную консистенцию, посевы ставили в термостат при 28 °С.

Контролем служила индикаторная культура референс-штамма *P. putida* ATCC 12633, засеянная методом агаровых слоев с 1 мл стерильного МПБ. Посевы культивировали при 28 °С течение 12-18 часов. Присутствие бактериофага определяли по наличию прозрачных пятен, хорошо видимых на матовом фоне глубинного роста бактерий (рис. 1-5).

В случае положительного результата негативные колонии или участок лизиса пересеивали с помощью бактериологической петли в МПБ с индикаторной культурой *P. putida* ATCC 12633. Для этого в две пробирки с 4,5 мл МПБ добавляли стерильной пипеткой 0,2 мл суточной бульонной индикаторной культуры *P. putida* ATCC 12633, в одну из которых пересеивали негативную колонию, вторая пробирка служила контролем. Посевы инкубировали при 28 °С 10-12 часов. Определяющим моментом являлось просветление бульона в опытной пробирке и выраженное помутнение среды в контроле. После чего содержимое опытной пробирки с

целью инактивации микрофлоры обрабатывали хлороформом (1:10) в течение 20 минут. Полученный фаголизат использовали для проведения пассирования фага.

Повышение литической активности фагов проводили пассированием на индикаторных культурах штаммов *P. putida* ATCC 12633, №901 и 003 с периодическим пересевом типичных для данного фага негативных колоний.

Для этого готовили разведение фагов в МПБ с предполагаемым наличием частиц фага в 1 мл от 10^{-1} до 10^{-10} . Фаги засевали по методу агаровых слоев на 3 чашки по 1 мл из разведений 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} для получения изолированных негативных колоний. Одну негативную колонию, расположенную от других колоний на расстоянии не менее 10 мм, отбирали бактериологической петлей и засевали в МПБ с индикаторной культурой *P. putida* ATCC 12633. Параллельно ставился контроль: МПБ, засеянный индикаторной культурой без фага. Посевы инкубировали при температуре 28 °C в течение 6 часов. За этот период времени питательная среда просветлялась, а в контроле оставалась мутной.

Содержимое опытной пробирки обрабатывали хлороформом и полученный фаголизат вновь исследовали методом агаровых слоев, отбирая негативную колонию идентичную исходной, с которой проводили такую же операцию. По этой методике выделенные клоны фага пассировали 7-10 раз до получения популяции фагов с однородными негативными колониями.

В результате проведенных исследований в отношении *P. putida* выделено 14 штаммов бактериофагов.

3.2. Изучение основных биологических свойств выделенных бактериофагов

Дальнейшей целью наших исследований было изучение следующих свойств выделенных нами бактериофагов *P. putida*: морфология негативных колоний; литическая активность; спектр литической активности; специфичность действия; температурная устойчивость; устойчивость к хлороформу.

3.2.1. Морфология негативных колоний выделенных бактериофагов

Морфологию негативных колоний бактериофагов изучали с помощью метода агаровых слоев по Грациа. В пробирку с расплавленным и остуженным до 45 °C 0,7% МПА вносили 1 мл

фага в разведении 10^{-7} (для получения изолированных негативных колоний) и 0,2 мл суточной бульонной культуры референс штамма *P. putida* ATCC 12633. Содержимое пробирки тщательно перемешивали вращением между ладонями и выливали на поверхность 1,5% МПА. После застывания агара чашки помещали в термостат. Учет производился через 18-20 часов инкубации при температуре 28 °С.

Негативные колонии бактериофагов Psp4b-УГСХА, Psp10-УГСХА, Psp43-УГСХА имеют диаметр 1-2 мм, полностью прозрачны, без зоны вторичного лизиса (рис. 1). Негативные колонии бактериофагов Psp2-УГСХА, Psp17-УГСХА, Psp26-УГСХА, Psp41-УГСХА, Psp60-УГСХА имеют диаметр 0,5-1 мм с мутным центром, без зоны вторичного лизиса (рис. 2). Бактериофаги Psp1-УГСХА, Psp56a-УГСХА имеют диаметр колоний 4-5 мм и характеризуются наличием прозрачного центра и мутной зоной вторичного лизиса на периферии (рис. 3). Негативные колонии бактериофагов Psp4a-УГСХА, Psp75-УГСХА имеют диаметр 3-4



Рис. 1. Морфология негативных колоний бактериофага Psp10-УГСХА

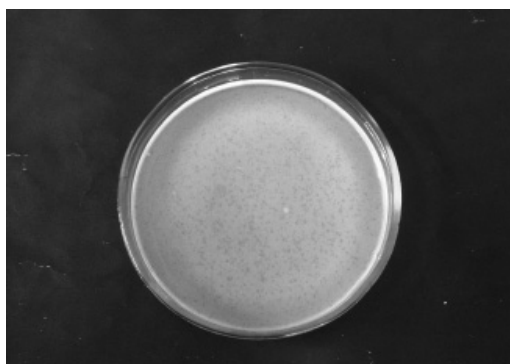


Рис. 2. Морфология негативных колоний бактериофага Psp17-УГСХА



Рис. 3. Морфология негативных колоний бактериофага Psp1-УГСХА

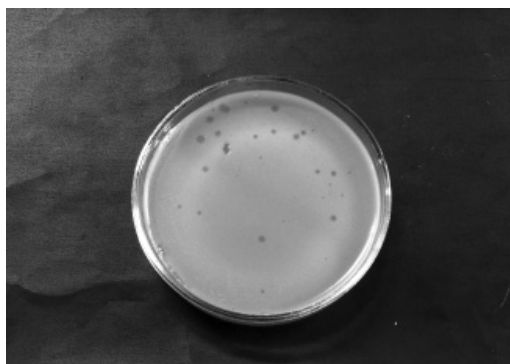


Рис. 4. Морфология негативных колоний бактериофага Psp4a-УГСХА

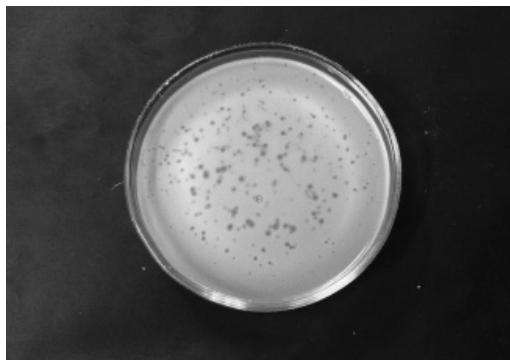


Рис. 5. Морфология негативных колоний бактериофага Psp72-УГСХА

мм, полностью прозрачны, без зоны вторичного лизиса (рис. 4). Негативные колонии бактериофагов Psp6-УГСХА, Psp72-УГСХА имеют диаметр 1-2 мм, с прозрачным центром и мутной периферией (рис. 5).

3.2.2. Литическая активность выделенных бактериофагов

Литическая активность фага оценивается по его способности лизировать бактериальную культуру на жидких или плотных средах, и выражается максимальным разведением, в котором испытуемый бактериофаг проявил своё литическое действие. Более точным методом оценки литической активности является определение количества активных корпускул фага в единице объёма. 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, её химического состава, окружающей температуры и т.д. Поэтому активность фага всегда определяется в конкретных, стандартных условиях.

Культуры *P. putida* ATCC 12633 для определения литической активности бактериофагов, выращивали МПБ в течение 24 часов.

Табл. 1. Литическая активность фагов *P. putida* по Appelmanу

№ п.п.	Название фага	Литическая активность Appelmanу
1	Psp1-УГСХА	10^9
2	Psp2-УГСХА	10^8
3	Psp4a-УГСХА	10^9
4	Psp4b-УГСХА	10^{10}
5	Psp6-УГСХА	10^8
6	Psp10-УГСХА	10^9
7	Psp17-УГСХА	10^8
8	Psp26-УГСХА	10^9
9	Psp41-УГСХА	10^8
10	Psp43-УГСХА	10^7
11	Psp56a-УГСХА	10^9
12	Psp60-УГСХА	10^{10}
13	Psp72-УГСХА	10^8
14	Psp75-УГСХА	10^9

Табл. 2. Литическая активность бактериофагов *P. putida* по Грация.

№ п.п.	Название фага	Литическая активность по Грация
1	<i>Psp1-УГСХА</i>	2×10^{10}
2	<i>Psp2-УГСХА</i>	4×10^9
3	<i>Psp4a-УГСХА</i>	7×10^8
4	<i>Psp4b-УГСХА</i>	2×10^{10}
5	<i>Psp6-УГСХА</i>	3×10^8
6	<i>Psp10-УГСХА</i>	4×10^{10}
7	<i>Psp17-УГСХА</i>	6×10^9
8	<i>Psp26-УГСХА</i>	4×10^9
9	<i>Psp41-УГСХА</i>	8×10^7
10	<i>Psp43-УГСХА</i>	9×10^7
11	<i>Psp56a-УГСХА</i>	2×10^8
12	<i>Psp60-УГСХА</i>	10^8
13	<i>Psp72-УГСХА</i>	6×10^7
14	<i>Psp75-УГСХА</i>	5×10^8

Литическую активность селекционированных бактериофагов определяли по методу Аппельмана и Грация (Гольдфарб, 1961).

Селекционированные бактериофаги проявили разную литическую активность на культуре бактериальных клеток штамма *P. putida* ATCC 12633 как в жидкой среде, так и на плотной среде. Литическая активность выделенных бактериофагов по методу Аппельмана представлена в таблице 1. Результаты титра фагов по Грация представлены в таблице 2.

По результатам полученных данных, нами было решено в дальнейших исследованиях использовать наиболее активные из всех выделенных нами фагов *Psp1-УГСХА*, *Psp4b-УГСХА*, *Psp10-УГСХА* и *Psp17-УГСХА* характеризующиеся максимальным количеством активных карпускул в 1 мл.

3.2.3. Спектр литической активности исследуемых бактериофагов

Спектр литической активности является характерной особенностью штаммов фага, и его используют для их идентификации. Определение спектра литической активности проводили методом нанесения фага на газон бактериальной культуры (Ганюшкин, 1984).

Для изучения спектра литической активности четырёх селекционированных фагов (*Psp1-УГСХА*, *Psp4b-УГСХА*, *Psp10-УГСХА*, *Psp17-УГСХА*) мы использовали 2 референс и 33 полевых штамма *P. putida*.

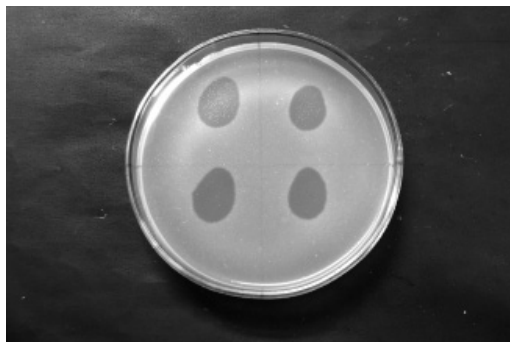


Рис. 6. Зоны лизиса в месте нанесения бактериофагов Psp1-УГСХА, Psp4b-УГСХА, Psp10-УГСХА, Psp17-УГСХА

На поверхность МПА в чашках Петри пастеровской пипеткой наносили 3-4 капли 24-часовой бульонной культуры исследуемых микроорганизмов. Затем равномерно распределяли по поверхности среды стерильным шпателем. Чашки ставили в термостат для подсушивания на 15-20 минут. На поверхность засеянной среды по секторам

пастеровской пипеткой легким прикосновением капли наносили бактериофаг, а затем инкубировали при температуре 28 °С, оценку результатов проводили через 18-24 ч (рис. 6).

Опыты показали, что изученные фаги характеризуются различным спектром литической активности. Наиболее широким спектром литической активности по отношению к изучаемым культурам обладает штамм фага Psp10-УГСХА, который лизировал 30 из имеющихся у нас 35 штаммов *P. putida* (85,7%). Фаги Psp1-УГСХА и Psp17-УГСХА каждый лизировали по 28 из имеющихся у нас 35 штаммов *P. putida* (80%). Фаг Psp4b-УГСХА лизировал 25 из имеющихся у нас 35 штаммов *P. putida* (71,4%). Поэтому фаг Psp10-УГСХА был выбран для конструирования диагностического препарата. Результаты опыта представлены в таблице 3.

3.2.4. Специфичность действия исследуемых бактериофагов *P. putida*

Видовая специфичность фагов используется в практике для дифференциации бактерий. Эта способность фагов определяется, прежде всего, сродством их к рецепторам лизируемых бактерий.

Определение видовой специфичности изучаемых фагов проводили следующим образом: равномерно распределяли по поверхности МПА в чашках Петри 18-часовые бульонные культуры исследуемых бактерий, подсушивали в термостате 15-20 минут. На

Табл. 3. Спектр литической активности фагов по отношению к штаммам *P. putida*.

№ п.п.	Название фага	Количество испытанных штаммов <i>P. putida</i>	Количество лизируемых штаммов <i>P. putida</i>	Процент лизируемых штаммов <i>P. putida</i> , %
1	Psp1-УГСХА	35	28	80
2	Psp4b-УГСХА	35	25	71,4
3	Psp10-УГСХА	35	30	85,7
4	Psp17-УГСХА	35	28	80

поверхность засеянной среды, условно разделённую на сектора, пастеровской пипеткой наносили бактериофаги Psp1-УГСХА, Psp4b-УГСХА, Psp10-УГСХА, Psp17-УГСХА, инкубировали при 37 °С, посевы *P. fluorescens* – при 28 °С оценку результатов проводили через 18-24 часа.

Для определения специфичности отобранных бактериофагов, использовали штаммы бактерий: *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *A. hydrophila*, *P. mirabilis*, *M. morganii*, *K. pneumoniae*, *Salmonella*, *S. aureus*, *Streptococcus*, *B. cereus*, *E.coli*, *E. cloacae*, *C. freundii*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. Enterocolitica*, *S. maltophilia*. Установили, что все четыре бактериофага строго специфичны по отношению к *P. putida* и не лизируют бактерии других видов и родов (табл. 4).

По результатам определения спектра литической активности и изучения специфичности выделенных бактериофагов пришли к выводу, что в дальнейших исследованиях целесообразно использовать бактериофаг Psp10-УГСХА.

3.2.5. Температурная устойчивость выделенного бактериофага Psp10-УГСХА

Степень устойчивости бактериофагов и бактериальных клеток к инактивирующим факторам физического воздействия имеет теоретическое и практическое значение, поэтому при изучении биологических свойств фагов определение их чувствительности к таким агентам является обязательным.

Табл. 4. Специфичность выделенных бактериофагов

№ п.п.	Вид бактерий	Psp1-УГСХА	Psp4b-УГСХА	Psp10-УГСХА	Psp17-УГСХА
1	<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-
2	<i>P. fluorescens</i>	-	-	-	-
3	<i>A. hydrophila</i>	-	-	-	-
4	<i>P. mirabilis</i>	-	-	-	-
5	<i>M. morganii</i>	-	-	-	-
6	<i>K. pneumoniae</i>	-	-	-	-
7	<i>Salmonella</i>	-	-	-	-
8	<i>S. aureus</i>	-	-	-	-
9	<i>Streptococcus</i>	-	-	-	-
10	<i>B. cereus</i>	-	-	-	-
11	<i>E.coli</i>	-	-	-	-
12	<i>E. cloacae</i>	-	-	-	-
13	<i>C. freundii</i>	-	-	-	-
14	<i>Y. pseudotuberculosis</i>	-	-	-	-
15	<i>Y. enterocolitica</i>	-	-	-	-
16	<i>S. maltophilia</i>	-	-	-	-

Примечание: «-» - отсутствие лизиса.

Для определения температурной устойчивости фага пробирки в разведении 1:10 в МПБ прогревали в ультратермостате в течение 30 минут при температуре выше 50 °С с шагом 2 °С. Параллельно ставили контроль. После воздействия температуры активность фагов определяли по методу Грациа.

Установлено, что прогревание фага Psp10-УГСХА при температуре 54 – 58 °С не оказало влияния на содержание активных корпускул фага в 1 мл. Дальнейшее повышение температуры приводило к снижению активности фага. При прогревании фага температурой 60 °С количество негативных колоний насчитывалось 6×10^9 корпускул фага. Прогревание выше 66 °С полностью инактивировали исследуемый бактериофаг. Результаты представлены в таблице 5.

Полученные данные свидетельствуют об устойчивости фага к воздействию температуры до 58 °С. При температуре от 60 °С фаг Psp10-УГСХА терял свою активность и полностью погибал при температуре выше 66 °С (рис. 7).

3.2.6. Устойчивость фага Psp10-УГСХА к воздействию хлороформа

Бактериофаги обычно устойчивее к хлороформу, чем клетки, поэтому хлороформ является хорошим средством для освобождения фаголизата от жизнеспособных бактерий. Определение чувствительности бактериофага и бактерий проводили путем обработки фаговой суспензии хлороформом в соотношении 1:10 при постоянном встряхивании. Контролем служила пробирка

Табл. 5. Изменение титра бактериофага Psp10-УГСХА при увеличении температуры культивирования

Температура, °С	Титр бактериофага Psp10-УГСХА
50	4×10^{10}
52	4×10^{10}
54	4×10^{10}
56	4×10^{10}
58	4×10^{10}
60	6×10^9
62	6×10^8
64	2×10^3
66	5×10^2
68	-
70	-
Контроль фага	4×10^{10}

с бактериофагом, необработанным хлороформом. После воздействия хлороформа активность бактериофага определяли по методу Грациа.

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что бактериофаг

Psp10-УГСХА проявил выраженную устойчивость к воздействию хлороформа. При воздействии хлороформа на фаголизаты в течение 40 минут уменьшения фаговых корпускул в 1 мл не наблюдалось.

Далее мы поставили перед собой задачу проверить устойчивость бактериальных клеток штамма *P. putida* ATCC 12633 к воздействию хлороформа. Для этого суточную бульонную культуру штамма *P. putida* ATCC 12633 обрабатывали хлороформом в соотношении 1:10 в течение 20 минут при постоянном встряхивании. После осаждения хлороформа 0,5 мл надосадочной жидкости засеивали на поверхность чашки Петри с МПА и культивировали при 28 °С, в течение 24 часов. Таким образом, нами было установлено, что обработка хлороформом в соотношении 1:10 в течение 20 минут полностью инактивирует бактерии *P. putida*.

Полученные данные свидетельствуют о высокой активности хлороформа в отношении бактерий *P. putida* и были использованы нами при разработке биопрепарата на основе бактериофага Psp10-УГСХА и в реакции нарастания титра фага.

3.3. Разработка технологических параметров изготовления и контроля индикаторных бактериофагов *Pseudomonas putida*

3.3.1. Температурные показатели культивирования бактериофага Psp10-УГСХА

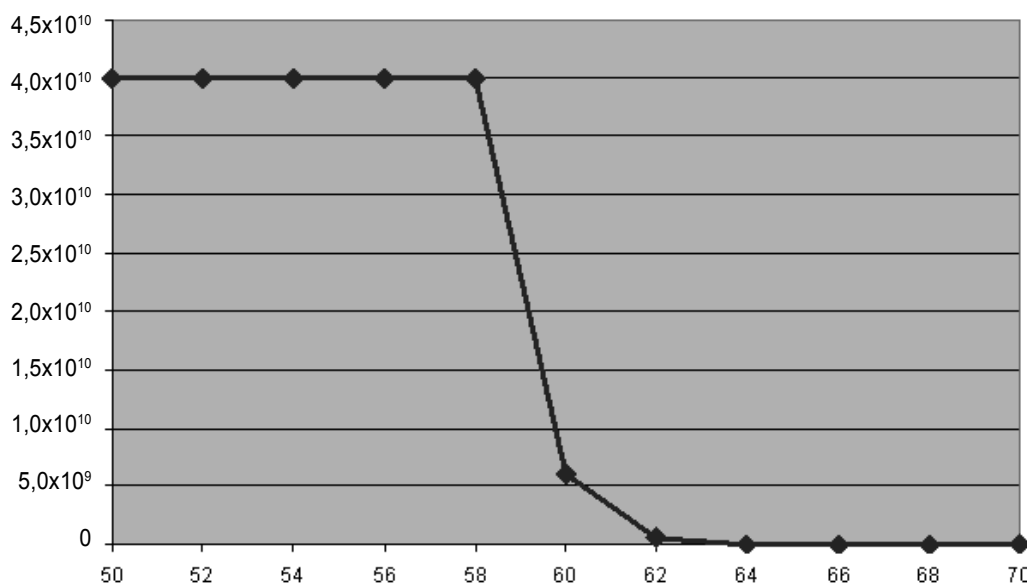


Рис. 7. Снижение активности бактериофага Psp10-УГСХА при повышении температуры воздействия

Табл. 6. Устойчивость фага Psp10-УГСХА к воздействию хлороформа

№ п.п.	Фаг	Количество активных корпускул фага в 1 мл				
		Обработка 10 мин.	Обработка 20 мин.	Обработка 30 мин.	Обработка 40 мин.	Контроль
1	Psp10-УГСХА	4×10^{10}	4×10^{10}	4×10^{10}	4×10^{10}	4×10^{10}

фаг	Температура культивирования фага								
	20 °С	22 °С	24 °С	26 °С	28 °С	30 °С	32 °С	34 °С	36 °С
Psp10-УГСХА	-	-	-	+	+	+	+	-	-

Табл. 7. Температурные показатели культивирования бактериофага Psp10-УГСХА

Примечание: «-» - отсутствие лизиса, «+» - лизис.

В опытную пробирку, содержащую стерильный 1,5% МПБ в объеме 4,5 мл (рН 7,4-7,6) вносили 0,2 мл суточной культуры штамма *R. putida* ATCC 12633 и 0,2 мл бактериофага Psp10-УГСХА. Параллельно ставился контроль. Для чего в пробирки, содержащие стерильный 1,5% МПБ в объеме 4,5 мл (рН 7,4-7,6), вносили суточную культуру штамма *R. putida* ATCC 12633 в количестве 0,2 мл. Пробирки помещали в термостат и культивировали при различных температурных режимах от 20 °С до 36 °С с шагом 2 °С. Помутнение пробирки указывало на отсутствие лизиса, просветление в сравнении с контролем – на наличие лизиса (табл. 7).

Результаты свидетельствуют о том, что диапазон оптимальных температур культивирования фага Psp10-УГСХА составляет 26-32 °С. Нами решено инкубировать систему фага Psp10-УГСХА с *R. putida* при температуре 28 °С.

3.3.2. Количественное соотношение фага и культуры при культивировании

При исследовании условий культивирования выделенного бактериофага Psp10-УГСХА *R. putida* необходимо было выяснить оптимальное количественное соотношение фага и индикаторной культуры *R. putida* для производства диагностического препарата. В опытную пробирку, содержащую стерильный МПБ в объеме 4,5 мл (рН 7,4-7,6), вносили 0,2 мл фага Psp10-УГСХА, затем в пробирку вносили 24-х часовую культуру штамма *R. putida* ATCC 12633 в количестве от 0,2 до 1 мл с шагом 0,2 мл. Параллельно ставился контроль. Для этого в пробирку, содержащую стерильный МПБ в объеме 4,5 мл (рН 7,4-7,6), вносили культуру штамма *R. putida* ATCC 12633 по 0,2 мл. Пробирки помещали в термостат и культивировали при температуре 28 °С. Затем подсчитывали количество активных корпускул фага в 1 мл по методу Грация.

Табл. 8. Зависимость титра бактериофага от соотношения с количеством суточной бактериальной культуры

Объём культуры, мл на 0,2 мл фага	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
Количество активных корпускул фага Psp10-УГСХА в 1 мл	6×10^9	4×10^{10}	3×10^{10}	3×10^{10}	2×10^{10}

Табл. 9. Зависимость титра фага от времени пассажа

Название фага	Вариант эксперимента с фагом	Время пассажа, часы	Литическая активность	
			по методу Аппельмана	по методу Грация
Psp10-УГСХА	1	4	10^9	7×10^8
	2	6	10^9	9×10^8
	3	8	10^{10}	4×10^{10}
	4	10	10^{10}	3×10^{10}
	5	12	10^{10}	3×10^{10}

Результаты исследований приведены в таблице 8.

В результате проведенных исследований было установлено что для бактериофага Psp10-УГСХА оптимальным соотношением бактериофага и культуры является 1:2, т.е. 0,2 мл фага х 0,4 мл индикаторной культуры.

3.3.3. Оптимальное соотношение между временем пассажа и активностью фага

В пробирку с 4,5 мл МПБ добавляли 0,2 мл индикаторной культуры штамма *P. putida* ATCC 12633 и 0,2 мл фага Psp10-УГСХА. Параллельно ставили контроль: МПБ, засеянный индикаторной культурой без фага. Посевы инкубировали при температуре 28 °С в течение 4, 6, 8, 10, 12 часов. После культивирования пробирки с фагом обрабатывали хлороформом в соотношении 1:10. Литическую активность полученных фаголизатов исследовали методами Аппельмана и Грация (табл. 9).

Установлено, что оптимальное время пассажа при температуре 28 °С для фага Psp10-УГСХА составляет 8 часов. Литическая активность фага составляет 10^{10} по методу Аппельмана и 4×10^{10} по методу Грация.

Таким образом были определены технологические параметры изготовления биопрепарата бактериофага Psp10-УГСХА:

- оптимальная температура культивирования фага Psp10-УГСХА – 28 °С,
- оптимальное соотношение бактериофага Psp10-УГСХА и бактериальной культуры – 1:2, т.е. 0,2 мл фага х 0,4 мл индикаторной культуры,
- оптимальное время взаимодействия бактериофага Psp10-

Показатели экспозиции		Время контакта фага с исследуемым материалом, ч				
		5	7	10	16	24
Время предварительного подращивания, ч	0	10 ⁵	10 ⁴	10 ⁴	10 ³	10 ³
		17 ч	19 ч	22 ч	28 ч	36 ч
	5	10 ⁴	10 ³	-	-	-
		22 ч	24 ч			
	10	10 ³	10 ³	-	-	-
		27 ч	29 ч			
	16	10 ³	10 ²	-	-	-
		33 ч	35 ч			
	24	10 ³	10 ²	-	-	-
		41 ч	43 ч			

Табл. 10. Чувствительность РНФ при различных режимах

Примечание:

в числителе – чувствительность РНФ; в знаменателе – общее время, затраченное на реакцию; «-» - исследование не проводилось.

УГСХА с бактериальной суспензией индикаторной культуры *P. putida* при температуре 28 °С составляет 8 часов,

– обработка фаголизата хлороформом в соотношении 1:10 в течение 20 минут,

– хранение биопрепарата в условиях холодильника при температуре 4-6 °С в герметичных флаконах до 1 года без снижения активности (сроки наблюдения).

При контроле биопрепарата бактериофага Psp10-УГСХА на литическую активность учитывали следующие параметры: титр бактериофага Psp10-УГСХА составляет не менее 10⁻¹⁰ по Аппельману и не менее 4x10¹⁰ по Грациа.

3.4. Разработка оптимальных условий постановки реакции нарастания титра фага с применением биопрепарата бактериофага Psp10-УГСХА

При исследовании оптимальных условий постановки РНФ с применением биопрепарата бактериофага Psp10-УГСХА для индикации бактерий *P. putida*, мы установили количественный показатель реакции, имеющий диагностическое значение и оптимальное время РНФ. По результатам проведенных опытов было установлено, что количество фаговых частиц в опытных пробирках более чем в 5 раз превышает количество фаговых частиц в контрольных пробах, при контаминации МПБ клетками *P. putida* в концентрации 10³ м.к/мл.

Обобщённые результаты серии исследований по выявлению наиболее эффективного режима РНФ представлены в таблице 10.

Полученные данные позволяют считать, что наиболее оптимальным является режим РНФ с предварительным подращи-

ванием исследуемого материала в течение 5 часов и 7-часовой экспозицией исследуемого материала с фагом. Схема РНФ представлена на рисунке 27. Такой режим позволяет провести индикацию *P. putida* в количестве 10^3 м.к./мл в течение 24 часов.

Схема постановки РНФ с применением биопрепарата бактериофага Psp10-УГСХА для индикации бактерий *P. putida* представлена на рисунке 8.

Таким образом, на основе детального изучения биологических свойств различных штаммов *P. putida*, была разработана, обоснована и апробирована схема выделения и идентификации *P. putida* из объектов внешней среды, пищевого сырья и пищевых продуктов; создан биопрепарат на основе отобранного бактериофага Psp10-УГСХА, позволяющий в короткие сроки проводить индикацию *P. putida* в объектах внешней среды, пищевом сырье и пищевых продуктах.

Примечание: реакция считается положительной, если количество негативных колоний, образовавшихся на чашке Петри №1 превышает количество негативных колоний, образовавшихся на чашке Петри №3 в 5 и более раз.

Выводы:

1. Выделены и изучены по биологическим свойствам 14 культур бактериофагов бактерий *P. putida*, литическая активность которых варьировала от 10^{-7} до 10^{-10} по методу Аппельмана и от 6×10^7 до 4×10^{10} по методу Грациа, а спектр литической активности составил от 71,4 до 85,7%. Выделенные бактериофаги строго специфичны по отношению к *P. putida* и не лизируют бактерии других видов и родов; проявляют устойчивость к хлороформу в течение 40 минут и инактивируются при температуре 66°C в течение 30 минут.

2. Отобран бактериофаг Psp10-УГСХА, имеющий оптимальные для конструирования биопрепарата свойства: спектр литической активности 85,7%; титр 10^{-10} по методу Аппельмана и 4×10^{10} по методу Грациа.

3. Разработаны параметры постановки реакции нарастания титра фага с использованием биопрепарата на основе бактериофага Psp10-УГСХА для ускоренной индикации бактерий *P. putida*, позволяющие обнаружить в исследуемом материале указанные бактерии в концентрации от 10^3 м.к. в 1 г (1 мл) в течение 24 часов.

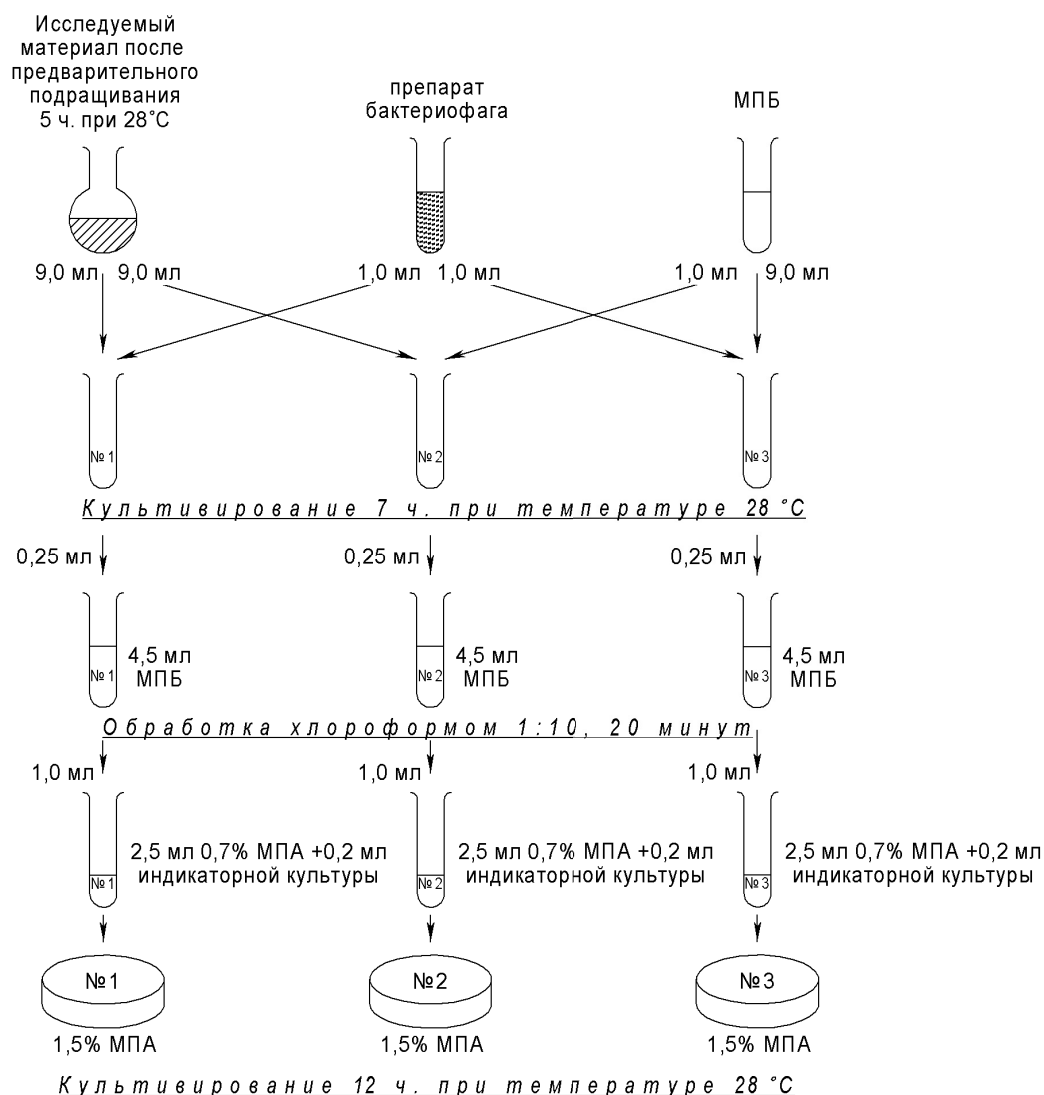


Рис. 8. Схема постановки реакции нарастания титра фага для индикации бактерий *P. putida*

4. Установлены оптимальные технологические показатели для изготовления специфического биопрепарата бактериофага Psp10-УГСХА: соотношение количества фаголизата к количеству взвести бактериальных клеток индикаторного штамма *P. putida* – 1:2, оптимальное время инкубирования при температуре 28 °C – 8 часов, обработка фаголизата хлороформом в соотношении 1:10 в течение 20 минут, хранение биопрепарата в условиях холодильника при температуре 4-6 °C в герметичных флаконах до 1 года без снижения активности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Васильев Д.А. Учебно-методическое пособие по методам общей бактериологии / Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин, Н.М. Никишина – Ульяновск, 1998. – 151 с.
2. Висконти Р. Генетика бактериофага / Р. Висконти // В кн.: Онтогенез вирусов. – М., 1956. – 141 с.
3. Воронцова А.А. Применение метода реакции нарастания титра фага при эпидемиологическом и санитарном обследовании / А.А. Воронцова // Кишечные инфекции: Тез. докл. на межинстит. конф. – М., 1961. – С. 127-128.
4. Выделение и анализ фагоустойчивых мутантов *Pseudomonas putida* с помощью новых бактериофагов / В.Н. Крылов [и др.] // Генетика. – 1981. – Т.17, №2. – С.239-245.
5. Вялова Г.П. Псевдомоноз молоди лососевых на Малкинском рыбо-водном заводе Камчатки / Г.П. Вялова, З.К. Шкурина // Проблемы товар. выращивания лососевых рыб России: Сб. докл. Всерос. совещ. – 1-4 августа 1995 – Мурманск: Изд-во ПИНРО, 1995. – С. 79-84.
6. Вялова Г.П. Методы борьбы и профилактики псевдомоноза молоди горбуши / Г.П. Вялова, А.В. Полтева, З.К. Шкурина // Информ. листок СахЦНТИ. – 1995. – № 38-95. – С. 4.
7. Габрилович И.М. Общая характеристика бактериофагов / И.М. Габрилович // Основы бактериофагии. – Минск. – 1973. – С. 5-24.
8. Ганюшкин В.Я. Бактериофаги сальмонелл и их применение в ветеринарии / В.Я. Ганюшкин – Ульяновск. – 1988. – С.45.
9. Гольдфарб Д.М. Бактериофагия / Д.М. Гольдфарб // М.: Медгиз. – 1961. – 225 с.
10. Грищенко Л.И. Патоморфология и вопросы патогенеза при септическом псевдомонозе рыб / Л.И. Грищенко // Восьмое Всесоюз. совещание по паразитам и болезням рыб. Тезисы докл. – М., 1984. – С. 26-27.
11. Грищенко Л.И. Болезни рыб и основы рыбоводства. Учебник. / Л.И. Грищенко, М.Ш. Акбаев, Г.В. Васильков – М.: Колос, 1999. – С. 10-69; 139-263; 420-448.
12. Золотухин С.Н. Создание и разработка схем применения диагностических биопрепаратов на основе выделенных и изученных бактериофагов энтеробактерий / С.Н. Золотухин // Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – Ульяновск, 2007. – 39 с.
13. Зуева, Л.П. Бактериофаги – факторы эволюции госпитальных штаммов и средства борьбы с инфекциями / Л.П. Зуева, Б.И. Асланов, А.А. Долгий, А.Е. Гончаров, А.И. Архангельский // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. – 2012. - №1. – С. 9-13.
14. Изучение морфологии частиц и структуры геномов бактериофагов *Pseudomonas putida* с целью их классификации / В.Н. Крылов [и др.] // Генетика. – 1989. – Т.25, №9. – С. 1559-1570.
15. Илюхин В.И. Псевдомонадные инфекции в патологии человека / В.И. Илюхин, // ЖМЭИ. – 1985. – №2. – С. 110-114.
16. Инструкция о мероприятиях по профилактике и ликвидации псевдомоноза рыб / Министерство сельского хозяйства и продовольствия Российской Федерации от 18 сентября 1998г.
17. Каттер Э. Бактериофаги : биология и практическое применение / Э. Каттер, А. Сулаквелидзе; пер. с англ.: коллектив пер.; науч. ред. рус. изд. А.В. Летаров. – Москва: Научный мир, 2012. – 636 с.
18. Клив де В. Блекберн. Микробиологическая порча пищевых продуктов: пер. с англ. / ред. Клива де В. Блекберн. – СПб.: Профессия, 2008. – 784 с.
19. Кременчук Г.А. Применение реакции нарастания титра фага для исследования объектов внешней среды / Г.А. Кременчук, М.А. Гицевич, К.П. Бояршинова // ЖМЭИ. – 1961. – № 7. – С. 124.
20. Кульба А.М. Биологические свойства и нуклеотидный состав ДНК бактериофагов *Pseudomonas* / А.М. Кульба, А.С. Горелышев // Микробиология. – 1981. – Т.50. – С. 536-542
21. Мац Л.И. Вопросы санитарной бактериологии и вирусологии / Л.И. Мац – М.: Медицина. – 1965. – С. 44-59.
22. Методические рекомендации по выделению и диагностике псевдомоноза сельскохозяйственных животных / ГУВ МСХ СССР от 15 декабря 1982г.
23. Методические указания по лабораторной диагностике псевдомонозов рыб / Министерство сельского хозяйства и продовольствия Российской Федерации от 22 сентября 1998г.
24. Методические указания по санитарно-бактериологической оценке рыбохозяйственных водоемов от 27.09.99г. №13-4-2/1742.
25. Методы получения, концентрации и очистки бактериофагов, поражающих фитопатогенные бактерии рода *Pseudomonas* / Ж.И. Оемчук [и др.] // Пробл. общ. и молекул. биол. – Киев, 1988. – №7. – С. 97-100.
26. Микробиологическая диагностика бактериальных болезней животных / Д.И. Скородумов [и др.]. – М.: Изд-во ИГиРФИ, 2005. – 656 с.
27. Микробиологические методы идентификации микробов рода *Pseudomonas*. Приказ № 535 от 22.04.85г. "Об унификации микробиологических методов исследования, применяемых в КДЛ лечебно-профилактических учреждениях".
28. Определитель нетривиальных патогенных грамотрицательных бактерий (аэробных и факультативно анаэробных). Пер. с англ. / Р. Вейант [и др.] – М.: Мир, 1999. – С. 506-553.
29. Пастушенко А.Т. Серологические группы фитопатогенных бактерий рода *Pseudomonas* / А.Т. Пастушенко, И.Д. Симонович // Микроб. журн. – 1979. – Т.41. – С. 222-228

30. Покровский В.И. Медицинская микробиология / В.И. Покровский, О.К. Поздеев // М.: Гозэтар Медицина. – 2002. – С. 343-348.
31. Понявин Б.Я. Изучение реакции нарастания титра фага в условиях практической лаборатории / Б.Я. Понявин // ЖМЭИ. – 1960. – № 6. – С. 135.
32. Ревенко И.П. Бактериофаги и их использование в ветеринарной практике. – Киев: Урожай. – 1978. – С. 41-88.
33. Рубашкина Б.К. Применение метода нарастания титра фага для исследования объектов внешней среды / Б.К. Рубашкина, С.Ф. Казакова // ЖМЭИ. – 1959. – №6. – С. 110-112.
34. Самойленко В.И. Современное состояние изученности фагов фитопатогенных бактерий / В.И. Самойленко // Бактериальные болезни растений. – М.: Колос, 1981. – С. 27-42.
35. Септический псевдомоноз карпов и толстолобиков / К.А. Лобунцов [и др.] // Ветеринария. – 1971. – С. 58-59.
36. Сиволодский Е.П. Питательная среда *Pseudomonas* APS для выделения и идентификации *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida* / Е.П. Сиволодский // ЖМЭИ. – 1990. – С. 60-65.
37. Сиволодский Е.П. Тест идентификации бактерий рода *Pseudomonas* / Е.П. Сиволодский // Лаб. дело. – 1988. – №11. – С. 64-66.
38. Смирнов В.В. Бактерии рода *Pseudomonas* / В.В. Смирнов, Е.А. Киприанова // Киев: Наук. Думка. – 1990. – С. 65-69.
39. Стент Г. Молекулярная биология вирусов бактерий / Г. Стент – М.: Мир, 1965. – 452 с.
40. Сидоров М.А. Определитель зоопатогенных микроорганизмов, справочник / М.А. Сидоров, Д.И. Скородумов, В.Ф. Федотов. – М.: Медицина, 1995 – С. 162.
41. Таксономическое изучение *Pseudomonas fragi* / Е.А. Киприанова [и др.] // Микробиология. – 1988. – Т.57, №1. – С. 119-125.
42. Тимаков В.Д. Об условиях взаимодействия фага и бактериальной клетки / В.Д. Тимаков, Д.М. Гольдфарб // Вестник АМН СССР. – 1958. – №2. – С. 37.
43. Тимаков В.Д. Реакция нарастания титра фага (РНФ) / В.Д. Тимаков, Д.М. Гольдфарб – М., 1962. – С. 65-71.
44. Тихоненко А.С. Ультраструктура вирусов бактерий / А.С. Тихоненко – М.: Наука, 1968. – С. 89-168.
45. Хейс У. Генетика бактерий и бактериофагов / У. Хейс – М.: «Мир», 1965. – С. 288-294.
46. Юнчис О.Н. Инфекционные болезни морских аквариумных рыб / О.Н. Юнчис // Проблемы аквакультуры: Межвед. сб. науч. и науч.-метод. тр. Московский зоопарк. – 2005. – С. 115-126.
47. Adams M. H. Bacteriophages / M.H. Adams – Interscience Publishers, Inc., New York, 1959. – 473 p.
48. Altinok I. *Pseudomonas putida* infection in rainbow trout / I. Altinok, S. Kayis, E. Capkin // Aquaculture. – 2006. – V.261. – P. 850-855.
49. Benzene, Toluene and Xylene Biodegradation by *Pseudomonas putida* CCMI 852 / M.H. Otenio [et al.] // Brazilian Journal of Microbiology. – V.36. – P. 258-261.
50. Blazevic D.J. Incidence and identification of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida* in the clinical laboratory / D.J. Blazevic, M.H. Koepke, J.M. Matsen // Appl. Microbiol. – 1973. – P. 107-110.
51. Bonde G. Bacterial Indicator of Water Pollution / G. Bonde // Teknisk Forlag. Copenhagen. – 1963. – P. 164.
52. Boopathi E. A sideophore from *Pseudomonas putida* type A1: structural and biological characterization / E. Boopathi, K.S. Rao // 1999. – V.1435. – P. 30-40.
53. Boyd J. S. K. Bacteriophage and heredity / J. S. K. Boyd // Nature. – 1954. – V.173. – P. 50-51.
54. Bredley D.E. The structure of some Staphylococcus and *Pseudomonas* phages / D.E. Bredley // J. Ultrastruct. Res. – 1963. – N8. – P. 552- 558.
55. Bradley D.E. The fine structure of bacteriophages / D.E. Bradley, D. Kay // J. Gen. Microbiol. – 1960. – V.23. – P. 553-563.
56. Burkholder W. Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs / W. Burkholder // Phytopathology. – 1950. – N1. – P. 115-117.
57. Chakrabarty A.M. Phage initiated polysaccharide depolymerase in *Pseudomonas putida* / A.M. Chakrabarty, J.F. Niblack, I.C. Guansalus // Virology. – 1967. – V.32. – P. 532-534.
58. Doudoroff M. Genus *Pseudomonas* Migula 1894 / M. Doudoroff, N.J. Palleroni // Bergey's Manual of Determinative Bacteriology – 8th ed. – Baltimore : Williams and Wilkins Co, 1974. – P. 217-243.
59. Ednie L.M. Comparative activities of cinafloxacin against gram-positive and -negative bacteria / L.M. Ednie, M.R. Jacobs, P.C. Appelbaum // Antimicrob Agents Chemother. – 1998. – V.42. – P. 269-273.
60. Espinosa-Urgel M. Genetic Analysis of Functions Involved in Adhesion of *Pseudomonas putida* to Seeds / M. Espinosa-Urgel, A. Salido, J. Ramos // Journal of Bacteriology. – 2000. – V.182. – P. 2363-2369.
61. Harwood C.S. Flagellation of *Pseudomonas putida* and analysis of its motile behavior / C.S. Harwood, K. Fosnaugh, M. Dispensa // Journal of Bacteriology. – 1989. – V.171. – P. 4063-4066.
62. Hegeman G.D. Synthesis of the enzymes of the mandelate pathway by *Pseudomonas putida*. I. Synthesis of enzymes by the wild type / G.D. Hegeman // J. Bacteriol. – 1966. – V.91. – P. 1140-1154.
63. Human- and animal-pathogenic members of the genus *Pseudomonas* / T. Bergen [et al.] // The Prokaryotes – A Handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria. Springer-Verlag. – Berlin, 1981.
64. Identification of Unusual Pathogenic Gram-Negative Aerobic and Facultatively Anaerobic bacteria / R.S. Weyant [et al.] // 2nd ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Md. – 1996.

65. Kellin E.A. Isolation and properties of a bacteriophage lytic for a wide range of *Pseudomonas* / E.A. Kellin, R.A. Wren // *Canad. J. Microbiol.* – 1971. – V.17, N5. – P. 677-682.
66. Klinge K. Differential techniques and methods of isolation of *Pseudomonas* / K. Klinge // *Journal of Applied Microbiology.* – 1960. – V.23, N3. – P. 442-462.
67. Lee L. F. Characterization of bacteriophage gh-1 for *Pseudomonas putida* / L.F. Lee, J.A. Boezi // *J. Bacteriol.* – 1966. – V.92. – P. 1821-1827.
68. Lysenko O. *Pseudomonas* – an attempt at a general classification / O. Lysenko // *J. Gen. Microbiol.* – 1961. – V.25, N3. – P. 379-408.
69. Moustafa F.A. A Comparison of some phytopathogenic and nonphytopathogenic *Pseudomonas* / F.A. Moustafa, Whittenbury // *Phytopathol. Z.* – 1970. – V.67, N1. – P. 63.
70. Palleroni N.J. Genus *Pseudomonas* Migula 1894 / N.J. Palleroni // *Bergey's manual of systematic bacteriology* Ed. R. Noel, Krieg J. G. Holf.-Baltimore: London: Williams Wilkins. – 1984. – V.1. – P. 141-198.
71. *Pseudomonas* and *Burkholderia* / M.O. Husson [et al.] // *Clinical precis of bacteriology*, Paris. – 2000. – P. 1259-1285.
72. *Pseudomonas* bacteriophage phiKZ contains an inner body in its capsid / V.N. Krylov [et al.] // *Can. J. Microbiol.* – 1984. – V.30. – P. 758-762.
73. *Pseudomonas putida* newly recognized pathogen in patients with cancer / E. Anaissie [et al.] // *Am. J. Med.* – 1987. – P. 1191-1194.
74. *Pseudomonas putida* Septicemia in a Special Care Nursery Due to Contaminated Flush Solutions Prepared in a Hospital Pharmacy / J. Perz [et al.] // *Journal of Clinical Microbiology.* – 2005. – V.43. – P. 5316-5318.
75. The Effect of Nutrient Limitation of Styrene Metabolism in *Pseudomonas putida* CA-3. / K. O'Connor [et al.] // *Applied and Environmental Microbiology.* – 1996. – V.62. – P. 3594-3599.
76. TSCA Experimental Release Application Approved for *Pseudomonas putida* Strains. United States Environmental Protection Agency. 2007.
77. Vicente M. Glucolysis in *Pseudomonas putida*: Physiological Role of Alternative Routes from the Analysis of Defective Mutants / M. Vicente, J.L. Canovas // *Journal of Bacteriology.* – 1973. – V.116. – P. 908-914.
78. Whitman P.A. Characterisation of two psychrophilic *Pseudomonas* bacteriophages isolated from ground beef / P.A. Whitman, R.T. Marshall // *Appl. Microbiol.* – 1971. – V.22, N3. – P. 463-468.

ШЕСТАКОВ А.Г., БОГДАНОВ И.И.

5.2. ВЫДЕЛЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ ОСНОВНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БАКТЕРИОФАГОВ БАКТЕРИЙ ВИДА *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

SHESTAKOV A.G., BOGDANOV I.I. ISOLATION AND STUDY OF THE MAIN
QUALITIES OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* SP. PHAGES

Бактерии вида *Pseudomonas aeruginosa* вызывают заболевание «псевдомоноз» к которому восприимчивы: крупный рогатый скот, свиньи, овцы, птица, пушные звери, пчёлы, рыбы, из лабораторных животных чувствительны белые мыши, морские свинки и кролики (Lipej et al., 1993; Прунтова и др., 1995; Покровский 2002). Диагноз ставят на основании лабораторных исследований на *P. aeruginosa*. Источник возбудителя, больные животные, выделяющие его с различными выделениями, калом, мочой, молоком, со спермой. Факторы передачи возбудителя – инфицированные корма, пищевое сырьё, вода, почва, окружающая среда (Сидоров, 1995; Красильников, 1999). По существующим данным

в окружающей среде *P. aeruginosa* паразитирует в простейших (Ряпис, 1994; Бухарин, Розенберг, 2007). На особом месте стоит водный ареал распространения *P. aeruginosa* (Смирнов, Киприанова, 1990; Афонин, 1999).

Отмечена высокая резистентность бактерии к антибиотикам и антимикробным веществам (Nikaido, 1978; Илюхин, 1985). *P. aeruginosa* вызывает порчу белковых пищевых продуктов (в первую очередь мясомолочных) (Стефанов, 1997). Сообщается, что *P. aeruginosa* вызывает деструкцию нефтепродуктов и углеродсодержащих веществ (Al-Hadhrami, Lapin-Scott, Ficher, 1995). Несмотря на то, что потребность в диагностике синегнойной инфекции очевидна, существующие бактериологические параметры схем, методов выделения, идентификации и индикации *P. aeruginosa* в объектах внешней среды, пищевом сырье и пищевых продуктах не совершенны. Трудности диагностики *P. aeruginosa* связаны с беспигментными штаммами и ассоциативной микрофлорой (Шуляк, 2003). В связи с этим исследования, посвященные методам быстрого и точного обнаружения *P. aeruginosa* в объектах окружающей среды, пищевом сырье и пищевых продуктах являются актуальными и могут иметь значительный научный интерес и прикладное значение.

Цель работы – совершенствование методов выделения, идентификации и индикации бактерий вида *P. aeruginosa* из объектов внешней среды, пищевого сырья и пищевых продуктов.

В работе было использовано 4 референс-штамма бактерий *P. aeruginosa* 128, 1677, 381, 453, полученные из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ при ФГОУ ВПО Ульяновской ГСХА, а также 35 штаммов, выделенных из объектов внешней среды, пищевого сырья и пищевых продуктов. Кроме того, для определения специфичности сконструированных сред, а также изучения специфичности бактериофагов использовали 16 штаммов бактерий: *Proteus mirabilis*, *Morganella morganii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp., *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Yersinia enterocolitica*, *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Stenotrophomonas maltophilia* из музея вышеназванной кафедры. Все штаммы обладали типичными био-

логическими свойствами. Объектами исследования так же являлись семь штаммов бактериофагов *P. aeruginosa*, выделенных из объектов внешней среды.

В работе использовали общепринятые микробиологические методы выделения, идентификации и индикации бактерий (Васильев и др., 2004; Лабинская, 2004). Основные биохимические свойства штаммов *P. aeruginosa* исследовали экспресс методом с использованием тест системы для ускоренной идентификации микроорганизмов, разработанной в НИИЭМ им. Пастера, г. Санкт-Петербург. Оксидазный тест проводили с применением 1% р-ра N-N-диметилпарафенилендиамина. Тест на каталазную активность проводили с применением 3% р-ра перекиси водорода. Исследования с использованием бактериальных штаммов проводили согласно ГОСТ Р 51446-99, ГОСТ Р 51426-99, ГОСТ Р 26670-91.

Выделение и изучение биологических свойств фагов проводили по методам, предложенным Д.М. Гольдфарбом (1961), И.П. Ревенко (1978), И.М. Габриловичем (1973), С.Н. Золотухиным (2007). Литическую активность фагов определяли по Аппельману и Грациа (Гольдфарб, 1961). Реакцию нарастания титра фага для индикации *P. aeruginosa* в объектах внешней среды проводили по методикам, предложенным В.Д. Тимаковым и Д.М. Гольдфарбом (1962), В.Я. Ганюшкиным (1984).

Статистическую обработку результатов исследований проводили по стандартным методикам (Ашмарин, Воробьев, 1962; Бейли, 1970). Обработку результатов осуществляли с помощью программы SPSS statistics 17.0.

Рост референс-штаммов Pseudomonas aeruginosa на стандартных средах и образование пигментов

Нами исследованы тинкториальные и культуральные свойства 4-х референс-штаммов *P. aeruginosa* для определения стабильности свойств и их обоснованного использования при составлении бактериологической схемы выделения и идентификации *P. aeruginosa* в объектах внешней среды, пищевом сырье и пищевых продуктах.

Все референс-штаммы *P. aeruginosa*, окрашенные по методу Грама, были представлены мелкими грамотрицательными палочками. Подвижность клеток *P. aeruginosa*, отмечали у

всех референс-штаммов. Мы изучили характер роста колоний референс-штаммов *P. aeruginosa* на стандартных средах. Эти бактерии образовывали, в основном, плоские колонии, или мелкие выпуклые в центре, края ровные или бахромчатые, поверхность гладкая, а так же складчатая. Поскольку однотипных колоний не было, то использовать морфологию колоний как дифференциально-диагностический признак, по нашему мнению, не целесообразно. Далее мы провели изучение сравнительной характеристики пигментов у референс-штаммов бактерий *P. aeruginosa*. Образование пигментов бактериями *P. aeruginosa* рассматривается рядом авторов, как ключевой и видообразующий признак при внутривидовой дифференциации. В связи с этим мы попытались охарактеризовать пигменты, продуцируемые референс-штаммами *P. aeruginosa*, и установили вариабельность этого признака при росте *P. aeruginosa* на МПА. Основными пигментами референс-штаммов были пиоцианин и флюоресцеин (от бледно-желтого до зеленого), классического сине-зеленого оттенка не образовывалось. Наиболее интенсивная пигментация у штаммов *P. aeruginosa* проявлялась в течение 3-х суток после культивирования, и особенно сильно при аэрировании среды. В результате исследований мы пришли к выводу, что пигментообразование у *P. aeruginosa* можно рассматривать как дифференциально-диагностический признак, но только как дополнительный, не определяющий. Морфология клеток при окраске по методу Грама и подвижность клеток *P. aeruginosa* были использованы нами в схеме выделения и идентификации псевдомонад в дальнейших исследованиях. Показана возможность усовершенствования или замены существующих стандартных сред в схемах выделения и идентификации бактерий *P. aeruginosa* из объектов внешней среды, пищевого сырья и пищевых продуктов.

*Биохимические свойства и антибиотикочувствительность референс-штаммов *Pseudomonas aeruginosa**

Характеристика биохимических свойств референс-штаммов *P. aeruginosa* и определение их антибиотикочувствительности, позволили нам использовать полученные данные в подборе тестов бактериологической идентификации *P. aeruginosa* из внешней среды, пищевого сырья и пищевых продуктов.

Из полученных данных мы сделали вывод, что окисление глюкозы является характерным признаком для всех штаммов. Следовательно, этот признак можно использовать для дифференциации *P. aeruginosa* от бактерий, защелачивающих глюкозу. Оксидазный и каталазный тесты были также положительны у всех референс-штаммов *P. aeruginosa*. Установлено, что эти штаммы имеют ферменты аргининдегидролазу, нитратредуктазу, способны утилизировать цитрат натрия и ацетат натрия.

Определили антибиотикочувствительность штаммов *P. aeruginosa* к гентамицину, амикацину, ампициллину, цефазолину, эритромицину, доксициклину, левомицитину, тетрациклину, фурадонину и фурагину. Отмечена устойчивость *P. aeruginosa* к нитрофурановым препаратам, что согласуется с данными литературы.

Конструирование накопительной среды для Pseudomonas aeruginosa

На основании анализа данных литературы для клеток *P. aeruginosa* в среде накопления в качестве источника углерода и энергии был выбран сукцинат натрия, а предпочтительным источником азота – L-аргинин (Weyant, 1996; Покровский, 2002).

Соли KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , MgSO_4 , NaCl обеспечивают биохимические процессы и стабилизируют осмотическое давление в клетках *P. aeruginosa*. В качестве ингибитора посторонней микрофлоры в среде накопления, на основании антибиотикочувствительности был выбран фурадонин, в концентрации 150 мг/л. Все компоненты среды, кроме аргинина и фурадонина смешивали в 1л. дистиллированной воды, автоклавировали при 1,1 атм 120 °С в течение 15 мин. Затем в остывшую до 45 °С вносили навески аргинина и фурадонина. Концентрации компонентов среды накопления подбирали экспериментально. Состав среды накопления: вода дистиллированная – 1000мл, сукцинат натрия – 20,0 г, KH_2PO_4 – 0,5 г, K_2HPO_4 – 1,5 г, MgSO_4 – 0,5 г, NaCl – 5,0 г, L-аргинин – 2,0 г, фурадонин – 150 мг. pH готовой среды накопления – 7,0. Для определения чувствительности среды накопления мы засекали штамм *P. aeruginosa* в концентрации 10 м.к./мл. Через 24ч термостатирования при температуре 37 °С мы определяли количество живых клеток *P. aeruginosa* в среде накопления. Количество КОЕ на МПА составило 4196. Результаты свидетельствуют о высокой чувстви-

тельности среды. Фурадонин ингибирует широкий спектр ассоциантов. Рост *P. aeruginosa* происходит по всей высоте среды и характеризуется помутнением поверхностной пленкой, придонным ростом. Выраженность придонного роста зависит от концентрации клеток *P. aeruginosa*. Таким образом, была сконструирована и зарегистрирована среда накопления УГСХА-Р.а.1, для выделения *P. aeruginosa* в концентрации 10 м.к./мл.

Усовершенствование плотной селективной среды с цетримидом

По результатам анализа роста *P. aeruginosa* на плотных средах, из нескольких селективных агентов (ТТХ, ЦПХ, цетримид) наиболее оптимальным компонентом в составе плотной селективной среды, включенной в схему идентификации *P. aeruginosa*, был выбран цетримид. Концентрацию цетримиды подбирали экспериментально. Состав плотной селективной среды: вода дистиллированная – 1000 мл, МПБ – 20 г, агар микробиологический – 15 г, цетримид – 0,3 г. Способ приготовления: Все компоненты смешивали в холодной воде, доводили до кипения и автоклавируют при 121 °С 20 минут. Цвет среды серо-желтый. Колонии штамма №128 *P. aeruginosa* средние, круглые с волнистым краем, гладкие, слабо пигментированы. Пигмент бледно-зеленый. Специфичность селективной среды определялась сравнительным высеваем чистых суточных культур бактерий *P. aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Morganella morganii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp., *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Yersinia enterocolitica*, *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Stenotrophomonas maltophilia* на селективную среду. Культивировали при 37 °С в течение 96 часов. Контролем жизнеспособности являлся посев указанных бактериальных культур на МПА и культивирование при 37 °С в течение 96 часов. Отмечено, что на селективной среде растут *P. aeruginosa*, *Citrobacter freundii*, *Proteus mirabilis*. По результатам наших опытов, более высокие концентрации цетримиды в среде угнетают рост *P. aeruginosa*. Эта модифицированная селективная среда использована как среда второго порядка в схеме выделения и идентификации *P. aeruginosa* и зарегистрирована как селективная среда УГСХА-Р.а.2.

Конструирование и подбор тестов бактериологической дифференциации *Pseudomonas aeruginosa*

Для целей бактериологической дифференциации псевдомонад были сконструированы следующие тесты: тест «А», тест «В», тест «С», тест «Д». Тест «А» – основан на использовании ацетамида в качестве источника углерода в анаэробных условиях. Тест «А» содержит неорганические соли и ацетамид в качестве единственного источника углерода. Ацетамид (амид уксусной кислоты) дезаминируется бактериями, проявляющими ациламидазную активность. *P. aeruginosa* способна к восстановлению нитратов (денитрификация) до свободного азота, что можно использовать как полезный диагностический признак. Мы поставили перед собой задачу установить возможность использования ацетамида бактериями в *P. aeruginosa* в анаэробных условиях в присутствии нитрата калия. Для исследования способности к денитрификации и утилизации ацетамида в анаэробных условиях использовали тест А по прописи: вода дистиллированная – 1000 мл, ацетамид 10 г., KH_2PO_4 – 0,5 г, K_2HPO_4 – 1,5 г, MgSO_4 – 0,5 г, NaCl – 5,0 г, KNO_3 – 2 г., феноловый красный 0,012 г., агар-агар – 15 г. Все компоненты среды смешивали в 1000 мл дистиллированной воды и нагревали до полного растворения компонентов. После стерилизации в автоклаве при 1,1 атм. пробирки подвергали резкому охлаждению под струей холодной воды, с целью уменьшения в среде парциального давления кислорода. Часть исследуемой колонии с селективной среды захватывали бактериологической петлей и уколом вносили в нитратно-ацетамидную среду. Культивирование проводили в термостате при 37 °С 24 ч. Положительной реакцией считали изменение окраски среды с желтой на красную или малиновую, а также образование пузырьков N_2 в толще среды или разрывов среды.

Тест «В» – основан на отсутствии роста *P. aeruginosa* на агаре с 2 г/л хлорида бария. Мы поставили перед собой задачу изучить возможность применения МПА с добавлением хлорида бария, в схеме идентификации бактерий *P. aeruginosa*. Для решения поставленной задачи необходимо было изучить рост штаммов бактерий *P. aeruginosa* на вышеупомянутой среде тест «В». В МПА, добавляли хлорид бария из расчета 2 г/л. Среду стерилизовали

в автоклаве при 1,1 атм 121 °С. Суточную бульонную культуру *P. aeruginosa* штрихом засекали на поверхность скола и помещали в термостат на 24 ч при температуре 37 °С. Через указанное время проводили учет результатов. Рост ингибировался у всех штаммов *P. aeruginosa*.

Тест «С» основан на окислении глюкозы в аэробных условиях с использованием модифицированной нами среды Хью-Лейфсона. Этот тест использован в бактериологической схеме для дифференциации *P. aeruginosa* от бактерий не способных к окислению глюкозы, либо защелачивающих ее (например *Alcaligenes faecalis*). Предложенный нами состав теста «С»: Вода дистиллированная 1000 мл, агар-агар 20 г, D-глюкоза 10 г, пептон 2 г, хлорид натрия 5 г, сульфат магния 0,5 г, гидрофосфат калия 1,39 г, дигидрофосфат калия 0,73 г, бромтимоловый голубой 0,03 г. Все компоненты среды смешивали и нагревали до полного растворения, кроме глюкозы. Глюкозу добавляли в последний момент, среда разливалась по пробиркам и автоклавировалась при 0,5 атм. 20 мин. Пробирки остужали для формирования скола. Посев производят бактериологической петлей на поверхность скола. Положительной реакцией считается изменение цвета индикатора с зеленого на желтый на поверхности скола.

Для целей идентификации *P. aeruginosa* мы включили тест «D», основанный на разжижении желатина. В рамках исследований, связанных с разработкой тестов идентификации бактерий *P. aeruginosa*, мы изучили протеолитическую активность выделенных штаммов бактерий *P. aeruginosa*. Тест «D» содержал МПБ, с добавлением 150 г/л сухого желатина. Расплавленную среду автоклавировали при 0,5 атм., в течение 15 мин и разливали в пробирки по 5 мл. Штаммы бактерий *P. aeruginosa* уколom засекали в столбик желатина и помещали в термостат при 37 °С на 24ч. Параллельно ставили контрольные не засеянные пробирки. После извлечения засеянных пробирок с желатином и контроля из термостата, все пробирки помещали в холодильник с температурой +6 °С на 15 мин. Спустя указанное время проводили учет результатов. Среда с желатином в засеянных пробирках оставалась жидкой, в то время как контрольная не засеянная среда застывала столбиком. Протеолиз желатина наблюдался у всех штаммов бактерий *P. aeruginosa*.

*Усовершенствование бактериологической схемы выделения и идентификации *Pseudomonas aeruginosa* из объектов внешней среды, пищевого сырья и пищевых продуктов*

При усовершенствовании бактериологической схемы нами были выбраны следующие свойства *P. aeruginosa*: отношение *P. aeruginosa* к окраске по Граму, наличие у *P. aeruginosa* ферментов цитохромоксидазы, каталазы, аргининдегидролазы, желатиназы, способность к окислению глюкозы в аэробных условиях, способность к утилизации ацетамида, денитрификация, чувствительность к хлориду бария, чувствительность к специфическому бактериофагу. Усовершенствованная схема выделения и идентификации бактерий *P. aeruginosa* из объектов внешней среды, пищевого сырья и пищевых продуктов представлена на рисунке 1.

Таким образом, предложенная схема выделения и идентификации *P. aeruginosa* в объектах внешней среды, пищевом сырье и пищевых продуктах позволяет выделять и идентифицировать бактерии до вида, исключая возможных ассоциантов.

С использованием разработанной схемы из сточных вод города Ульяновска, проб молочных продуктов, проб мяса с рынков города Ульяновска, без органолептических признаков порчи, нами было выделено 35 штаммов из которых 4 штамма не образовывали пигменты. Беспигментные «полевые» штаммы *P. aeruginosa* №Д888, №17, №91, №5 лизировались диагностическим биопрепаратом специфического бактериофага и давали характерные реакции на разработанных нами тестах.

*Характеристика выделенных фагов *Pseudomonas aeruginosa**

Следующим этапом наших исследований стало выделение бактериофагов *P. aeruginosa* из объектов внешней среды. Материалом для выделения являлись сточные воды и реки Ульяновской области. Всего исследовано 129 проб. Морфологию негативных колоний бактериофагов изучали с помощью метода агаровых слоев по Грациа. Бактериофаг УГСХА - Р.а. №1 и бактериофаг УГСХА - Р.а. №4, имели диаметр 3-4 мм с четким прозрачным центром и мутным ореолом по периферии. Бактериофаги УГСХА - Р.а. №18, УГСХА - Р.а. №35, УГСХА - Р.а. №44 имели диаметр негативных колоний 2мм и были прозрачны. Бактериофаги УГСХА - Р.а. №9 и УГСХА - Р.а. №52 имели диаметр колоний 4мм и характеризовались наличием прозрачного центра с мутной периферией. Даль-

нейшим этапом изучения биологических свойств выделенных бактериофагов было определение их литической активности. Изучили литическую активность 7 выделенных бактериофагов *P. aeruginosa* методами предложенными Аппельманом и Грациа (Гольдфарб, 1961). Определили количество фаговых корпускул в 1 мл, для каждого выделенного бактериофага. По результатам полученных данных, нами было решено в дальнейших исследованиях использовать наиболее активные бактериофаги УГСХА - Р.а. №1 и УГСХА - Р.а. №4, характеризовавшиеся максимальным количеством активных корпускул фага в 1мл. Титр селекционированных бактериофагов УГСХА- Р.а. №1 и УГСХА- Р.а. №4 по Грациа: 2×10^{10} , 4×10^{10} соответственно, фаговых корпускул в 1 мл. Титр бактериофагов УГСХА - Р.а. №1 и УГСХА- Р.а. №4 по Аппельману: 10^{-8} , 10^{-10} соответственно.

Определение спектра литической активности проводили методом нанесения фага на газон бактериальных культур. Установлено, что наиболее широким спектром литической активности по отношению к исследуемым культурам обладал штамм фага УГСХА- Р.а. №4, который лизировал 37 из 39 штаммов *P. aeruginosa* (94.8%). Фаг УГСХА - Р.а. №1 лизировал 30 из имеющихся у нас 39 штаммов *P. aeruginosa* (76.9%). Поэтому фаг УГСХА-Р.а. №4 был выбран для конструирования диагностического препарата. Результаты определения специфичности бактериофага УГСХА-Р.а.№4, показали, что он строго специфичен по отношению к *P. aeruginosa* и не лизировал другие виды и роды бактерий. Определение чувствительности бактериофага УГСХА-Р.а.№4 проводили путем обработки фаговой суспензии хлороформом в соотношении 1:10 при постоянном встряхивании. Бактериофаг УГСХА - Р.а. №4 проявил выраженную устойчивость к воздействию хлороформа в течение 60 минут.

В рамках намеченного исследования также изучили устойчивость бактериофага УГСХА - Р.а. №4 к температуре. Выяснено, что бактериофаг УГСХА - Р.а. №4 инактивировался при температуре 75 °С в течение 30 минут.

Разработка технологических параметров изготовления и контроля биопрепарата для диагностики Pseudomonas aeruginosa

Результаты определения оптимальных температурных показателей культивирования свидетельствуют о том, что оптимальной

является температура культивирования специфического бактериофага УГСХА-Р.а. №4 30 °С – 37 °С. Нами решено инкубировать систему специфического бактериофага УГСХА-Р.а. №4 с клетками *P. aeruginosa* при температуре 37 °С. Установлено оптимальное соотношение специфического бактериофага УГСХА-Р.а. №4 и культуры 1:5, т.е. 0,2 мл фага х 1 мл индикаторной культуры, оптимальное время пассажа при температуре 37 °С для специфического бактериофага УГСХА-Р.а. №4 составляет 6 часов. За это время происходил лизис индикаторной культуры (просветление среды по сравнению с контролем), литическая активность специфического бактериофага УГСХА-Р.а. №4 составляла 10^{-10} по Аппельману и 7×10^{10} по Грациа.

Разработка оптимальных условий постановки реакции нарастания титра фага с применением диагностического биопрепарата

При исследовании оптимальных условий постановки РНФ с применением диагностического биопрепарата специфического бактериофага мы установили количественный показатель реакции, имеющий диагностическое значение и оптимальное время РНФ. По результатам проведенных опытов было установлено, что количество фаговых частиц в опытных пробирках более чем в 5 раз превышает количество фаговых частиц в контрольных пробах, при контаминации МПБ клетками *P. aeruginosa* в концентрации 10^2 м.к./мл. Полученные экспериментальные данные позволяют считать, что наиболее оптимальным является временной режим РНФ при 7 часовой экспозиции исследуемого материала с фагом без подрачивания. Такой режим позволяет провести индикацию бактерий *P. aeruginosa* в количестве 10^2 м.к./мл, в течение 19-20 часов. Однако увеличение времени инкубирования до 16 часов повышает чувствительность метода на порядок и позволяет выявлять бактерии вида *P. aeruginosa* при наличии их в исходном исследуемом материале 10 м.к./мл. Схема постановки РНФ с применением диагностического препарата представлена на рисунке 2.

Таким образом, проведенные нами исследования позволили выявить особенности атипичных и беспигментных штаммов *P. aeruginosa*, выделенных из объектов внешней среды, пищевого сырья и пищевых продуктов; усовершенствована схема выделе-

ния и идентификации *P. aeruginosa* из объектов внешней среды, пищевого сырья и пищевых продуктов; создан диагностический биопрепарат, на основе специфичного бактериофага, позволяющий в короткие сроки проводить индикацию *P. aeruginosa* в объектах внешней среды, пищевом сырье и пищевых продуктах.

В результате проведенных исследований была предложена схема бактериологической идентификации и дифференциации позволяет выделять и типировать атипичные, беспигментные штаммы *P. aeruginosa* из объектов внешней среды, пищевого сырья и пищевых продуктов. Использование сконструированной нами среды накопления, усовершенствованной селективной среды и подобранных тестов бактериологической идентификации, позволяет выделять и типировать бактерии *P. aeruginosa* до вида в течение 75 часов. Сконструирован диагностический биопрепарат на основе специфичного бактериофага и усовершенствована схема индикации бактерий *P. aeruginosa* методом реакции нарастания титра фага (РНФ) в течение 19-20 часов.

Результаты усовершенствования бактериологической схемы выделения и идентификации *Pseudomonas aeruginosa* из объектов внешней среды, пищевого сырья и пищевых продуктов, а также возможность использования диагностического биопрепарата специфичного бактериофага УГСХА-Р.а.4 в схеме реакции нарастания титра фага, подтверждены актами комиссионных испытаний в Ульяновской ГСХА от 22 января 2010 г.

Были разработаны и утверждены ректором УГСХА (от 10 февраля 2010 г.) «Методические рекомендации по ускоренной индикации бактерий *P. aeruginosa* методом реакции нарастания титра фага в объектах санитарного надзора», «Методические рекомендации по изготовлению и контролю бактериофага УГСХА-Р.а. №4», а так же «Методические рекомендации по выделению и идентификации бактерий вида *P. aeruginosa* в объектах санитарного надзора». Методические рекомендации разработаны для сотрудников медико-биологических научных учреждений и специалистов бактериологических лабораторий. Материалы диссертационной работы используются в учебном процессе при чтении лекций, для практических занятий студентов, работы аспирантов на кафедре микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии.

ГЛАВА 6

ВЫДЕЛЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ

БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ

БАКТЕРИОФАГОВ

BORDETELLA BRONCHISEPTICA

CHAPTER 6.
SEMANINA E.N., VASYLYEVA, U.B.
ISOLATION AND STUDY OF THE MAIN QUALITIES OF
BORDETELLA BRONCHISEPTICA 289 PHAGES

В настоящее время исследователи особое внимание уделяют диагностике малоизученных инфекционных заболеваний, характеризующихся тяжелым течением, а нередко и летальным исходом. К их числу относится бордетеллёзная инфекция, возбудитель которой у животных обычно не идентифицируется (Baker, 2003; Gueirard, 1995; Mattoo, 2005; Мاستиленко, 2011).

В настоящее время отечественные и зарубежные исследователи особое внимание уделяют диагностике малоизученных инфекционных заболеваний животных и людей, характеризующихся затяжным течением, а нередко и летальным исходом. К таким инфекциям относится бордетеллёз - коклюшеподобное заболевание собак, кошек и других домашних и сельскохозяйственных животных, возбудитель которого, *Bordetella bronchiseptica*, может вызывать и у людей респираторные заболевания по типу ОРВИ [Bjornstad, 2005; Gueirard, 1995; Mattoo, 2000; Yuk, 2000].

Учёными НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи охарактеризованы бактериофаги микроорганизмов рода *Bordetella*, выделенные из бактерий коллекции ВОЗ и клинических штаммов, бактериофаги BPP-1, BMP-1 и BIP-1 *B.bronchiseptica*. Эти данные использованы для разработки тест-систем для идентификации ДНК возбудителя коклюша и его фазовых вариантов с помощью полимеразной цепной реакции. Метод рекомендуется для диагностики коклюша у детей с симптомами затяжного кашля, а также выявления

атипичных, бессимптомных форм заболевания [Karataev G.I. et al., 1988].

Научно-исследовательской группой НИИМиБ ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА» им. П.А. Столыпина разработаны полимеразно-цепная реакция для идентификации возбудителя бордетеллёза животных и бактериологическая схема выделения *B.bronchiseptica* с применением селективно – диагностической питательной среды УГСХА VBR 57, позволяющая поставить диагноз в течение 96 часов [Васильев Д.А. с соавт., 2010].

Эти современные и эффективные методы диагностики также имеют и ряд недостатков в практическом применении. Для проведения генетической диагностики необходимо наличие специализированной лаборатории с дорогостоящей приборной базой и высококвалифицированными работниками. Микробиологические методы диагностики бордетеллёза достаточно трудоёмки (выделение культуры возбудителя на селективных средах, биохимическая идентификация и т.п.), дорогостоящи и малопродуктивны.

Поэтому остро встает задача создания высокочувствительных и специфичных средств и методов диагностики бордетеллёза не требующих больших затрат времени и труда, а также экономически выгодных.

В отечественной ветеринарной практике фагодиагностика бордетеллёза не изучена и, несомненно, представляет научный и практический интерес.

Необходима разработка методов выделения бактериофагов *B. bronchiseptica* с перспективой создания биопрепарата для диагностики бордетеллёза животных. Данное научное направление, по нашему мнению, весьма актуально, представляет научный и практический интерес.

В связи с этим, целью данного исследования явилось выделение фагов *B. bronchiseptica*, изучение их основных биологических свойств и конструирование диагностического биопрепарата.

Объектами для наших исследований послужили 5 референс-штаммов *B. bronchiseptica* № 1, № 7, № 214, № 22067, № 8344 и штамм *Bordetella parapertussis* № 119; 24 референс-штамма бактерий других родов (*Yersinia pseudotuberculosis* № 0630, *Morganella morganii*, *Staphylococcus aureus* № ATCC 25923, *Escherichia coli* №

4, № ATCC 25922, *Proteus mirabilis* № 1, № 523, № 491, *Salmonella typhimurium* № 82, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* № 189, *Providencia rettgeri* № 104a, № 102д, № 175, *Aeromonas hydrophila* № 01, № 02, *Pseudomonas putida* № 12633, № 901, *Enterobacter cloacae* № 1487, № 10005, *Bacillus cereus* № 2527, *Bacillus subtilis* № 6633), полученные из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы при ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА» им. П.А. Столыпина, которые, в соответствии с паспортными данными, обладали типичными для бактерий этих видов морфологическими, культуральными и биохимическими свойствами; 48 штаммов *B. bronchiseptica*, выделенных от собак и кошек (с клиническими проявлениями респираторных заболеваний); 8 штаммов фагов *B. bronchiseptica*.

Объекты внешней среды: сточные воды, смывы с глотки больных животных, патологический материал от больных и павших животных.

Питательные среды и реактивы: мясопептонный бульон, мясопептонный агар, среда Эндо, казеиново-угольный агар, бордетелл-агар, кровяной агар и среда Борде-Жангу, среды Гисса с глюкозой, лактозой, сахарозой, мальтозой, маннитом, биохимические тест-системы для ускоренной идентификации микроорганизмов, агар-агар, натрий хлорид, мочевины, перекись водорода, желатин, среда УГСХА BBR 57.

В работе использовали общепринятые микробиологические методы выделения и идентификации бактерий (Васильев с соавт., 2004).

Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов проводили с помощью методов, предложенных М. Адамсом (1961), Д.М. Гольдфарбом (1961), И.М. Габриловичем (1973), С.Н. Золотухиным (2006). Постановку РНФ для индикации *B. bronchiseptica* в объектах внешней среды проводили по методикам, предложенным Д.М. Гольдфарбом (1961).

Исследованы морфологические свойства 5 референс-штаммов *B. bronchiseptica*. Все референс-штаммы *B. bronchiseptica* были представлены коккобациллярными палочками, окрашивались по Граму отрицательно. В мазках располагаются одиночно, парами, редко короткими цепочками. При посеве в толщу агара, а также

методом висячей капли определяется подвижность бордетелл. Все референс-штаммы являлись подвижными при постановке тестов.

При исследовании культуральных свойств показано, что на МПА после 24 часов инкубирования посевов референс-штаммы *B. bronchiseptica* образуют выпуклые, гладкие, полупрозрачные мелкие колонии жемчужного цвета. При открытии чашки Петри с засеянными бордетеллами чувствуется специфический заплесневелый запах. При снятии колоний с поверхности агара определяется их слизистая консистенция. Из 5 референс-штаммов *B. bronchiseptica* № 1, № 7, № 22067, № 214 и № 8344, последний образует самые мелкие колонии диаметром 0,2-0,4 мм.

На мясопептонном бульоне в первые 24 часа культивирования референс-штаммы *B. bronchiseptica* вызывают равномерное помутнение среды с последующим образованием осадка и пристеночного кольца.

На бордетелл-агаре (производство Hi Media) при температуре 37 °С в течение 18-24 ч исследуемые референс-штаммы формируют мелкие, блестящие, прозрачные с ртутным или жемчужным отливом, куполообразные колонии, которые имеют гладкую поверхность.

Результат изучения ферментативных свойств для референс-штаммов *B. bronchiseptica*: не гидролизуют желатин, не продуцируют индол, продуцируют оксидазу, каталазу, уреазу. Референс-штаммы не ферментируют углеводы. Восстанавливают нитраты до нитритов.

Нами проведены исследования по выделению бордетелл от домашних животных и из внешней среды. Для этого брали мазки с задней стенки глотки собак и кошек ватными палочками и делали посев на бордетелл-агар с 0,04 % цефазолином или на МПА, с добавлением 0,04 % спиртового раствора генцианвиолета (0,1 мл на каждые 100 мл МПА), методом штриха. Для типирования бордетелл использовали микроскопию с окраской по Граму выросших колоний, культивирование на обычных и селективных средах, тесты на подвижность, оксидазу, индол, ферментацию углеводов. Было исследовано 157 проб, выделено 11 полевых штаммов *B. bronchiseptica*.

Исследование культур *B. bronchiseptica* на наличие бактериофагов без воздействия индуцирующего фактора. Результаты ис-

следований штаммов *B. bronchiseptica* на наличие профага свидетельствуют, что культуры *B. bronchiseptica* без воздействия на них индуцирующего фактора не проявили лизогенных свойств. Проведено 17 опытов, положительных результатов не было.

Выделение фагов *B. bronchiseptica* из объектов внешней среды и от животных. Вторым этапом наших исследований стало выделение бактериофагов *B. bronchiseptica* из объектов внешней среды и от животных. Всего нами исследовано 104 пробы, бактериофаги среди них не обнаружены.

Выделение фагов *B. bronchiseptica* из бактерий при помощи индуцирующего фактора. В третьей серии опытов на культуры *B. bronchiseptica* воздействовали индуцирующим фактором. В качестве индуцирующего фактора применяли воздействие на бактерии ультрафиолетовыми лучами.

Опыты по облучению бактерий УФЛ проводились со всевозможными временными интервалами, а также с различного расстояния от объекта до лампы. Результаты представлены в таблице 1.

1 день: посев газоном суточной культуры *B. bronchiseptica* на мясопептонный агар, подсушивание в термостате 10-15 мин, облучение бактерий УФЛ (длина волны 253 нм) с расстояния 1 м, экспозиция 5-7 мин. Далее инкубирование чашек Петри с обработанными бактериями в термостате при 37 °С в течение суток.

2 день: распределение шпателем выросших колоний бактерий по поверхности агара, облучение бактерий УФЛ (длина волны 253 нм) с расстояния 1 м, экспозиция 7-10 минут. Помещение чашек Петри в термостат (37 °С) на сутки.

3 день: распределение шпателем выросших колоний бактерий по поверхности агара, облучение бактерий УФЛ (длина волны 253 нм) с расстояния 0,5 м, экспозиция 7-10 минут. Помещение чашек Петри в термостат (37 °С) на сутки.

4 день: смыв выросших колоний мясопептонным бульоном с чашек Петри, помещение в пробирку со штаммами бордетелл. Культивирование в термостате в течение суток.

5 день: обработка хлороформом 1 часть хлороформа и 10 частей фаголизата в течение 15 минут, центрифугирование при 3000 об/мин – 15 мин. Снятие надосадочной жидкости в стерильную пробирку.

6 день: учет результатов. Присутствие бактериофага определяли по наличию зон лизиса.

После выделения бактериофаги пассировали для повышения их литической активности и в дальнейшем проводили селекцию по морфологическим признакам.

Селекционированные бактериофаги имели прозрачные негативные колонии с ровными краями диаметром 0,5-4,0 мм. Литическая активность составила более 10^{-6} по Аппельману, и $5,3 \times 10^7$ по Грациа корпускул в 1 мл фаголизата.

Данные нашего эксперимента показывают, что облучение бактерий УФЛ по предложенной схеме способствует выходу профага из клеток *V. bronchiseptica*.

В процессе работы по выделению бактериофагов с применением УФЛ в общей сложности нами было проведено 29 экспериментов. Описанным выше методом нам удалось выделить 8 фагов *V. bronchiseptica* из 14 штаммов бактерий. Выяснилось, что 6 штаммов бактерий *V. bronchiseptica* не проявили лизогенных свойств.

Негативные колонии, образуемые бактериофагами, по наличию зоны неполного лизиса, вторичного роста и величине колоний можно разделить на два типа. К первому типу относятся негативные колонии круглые, прозрачные, диаметром более 3 мм, с зоной неполного лизиса по периферии шириной 0,5 – 4 мм или без неё: *V.br.* – 7 УГСХА, *V.br.* – 22067 УГСХА, *V.br.* – 214 УГСХА.

Колонии второго типа круглые, прозрачные или полупрозрачные, с ровными краями, диаметром до 2 мм: *V.br.* – 1 УГСХА, *V.br.* – 10 УГСХА, *V.br.* – 11 УГСХА, *V.br.* – 13 УГСХА и *V.br.* – 8344 УГСХА.

Литическую активность селекционированных фагов определяли по методам Аппельмана и Грациа (Гольдфарб, 1961).

Активность исследуемых бактериофагов варьировала от $5,3 \times 10^7$ до $4,3 \times 10^9$. По исследованным параметрам для конструирования диагностического набора фагов отобраны наиболее активные из них: *V. bronchiseptica* - 1 УГСХА по Аппельману 10^{-7} , по Грациа $3,1 \times 10^8$ и *V. bronchiseptica* - 7 УГСХА по Аппельману 10^{-8} , по Грациа $4,3 \times 10^9$.

Для изучения спектра литического действия выделенных фагов мы использовали 53 культуры бактерий *V. bronchiseptica*.

По результатам исследований наибольшим совместным спектром литического действия обладали бактериофаги *B. bronchiseptica* - 1 УГСХА и *B. bronchiseptica* - 7 УГСХА. Они лизировали 92,5 % имеющихся штаммов.

Учитывая литическую активность и спектр литического действия бактериофагов *B. bronchiseptica* для дальнейших исследований нами было отобрано 2 фага – *B. bronchiseptica* – 1 УГСХА и *B. bronchiseptica* – 7 УГСХА.

В качестве гетерологичных культур использовали микроорганизмы указанные в материалах и методах.

Бактериофаги *B. br.* - 1 УГСХА и *B. br.* - 7 УГСХА не вызывали лизис ни одной из испытываемых культур других видов бактерий.

В результате исследований температурной устойчивости было установлено, что прогревание фагов *B. br.* – 1 УГСХА и *B. br.* – 7 УГСХА при температуре 60 °С в течении 30 минут не оказало влияния на активность фагов, бактерии погибали при данной температуре. Нагревание бактериофагов свыше 65 °С приводило к потере их активности.

В результате проведенных исследований устойчивости бактериофагов к воздействию хлороформом установлено, что бактерии инактивируются при действии хлороформа при 10 минутной обработке. Бактериофаги *B.br.* – 1 УГСХА и *B.br.* - 7 УГСХА проявили выраженную устойчивость к воздействию хлороформа в течение 30 минут. Наблюдалось снижение активности фагов при обработке хлороформом свыше 30 минут с $2,2 \times 10^8$ до $3,2 \times 10^7$ у *B.br.* – 1 УГСХА и с $2,1 \times 10^9$ до $5,3 \times 10^7$ у *B.br.* - 7 УГСХА по методу Грациа. Активность бактериофагов *B.br.* – 1 УГСХА и *B.br.* – 7 УГСХА восстанавливалась после одного пассажа.

Используя строгую специфичность селекционированных бактериофагов по отношению к штаммам *B. bronchiseptica*, мы разработали схему ускоренной идентификации этих микроорганизмов (рис. 1).

При наличии в мазках грамтрицательных палочек, располагающихся одиночно или короткими цепочками, проводили типирование бактерий бактериологическим методом и с помощью бактериофагов *B.br.* – 1 УГСХА и *B.br.* – 7 УГСХА.

Результаты проведенных опытов демонстрируют возможность идентификации *B. bronchiseptica* с помощью фагов *B.br.* – 1 УГ-

СХА и V.br. – 7 УГСХА, срок исследования по сравнению с бактериологическим методом при этом сокращается со 96 до 66 часов при меньшем расходе лабораторной посуды, питательных сред, реактивов.

Далее приступили к разработке технологических параметров изготовления и контроля диагностического фагового био-препарата. Бордетеллёзные индикаторные бактериофаги получали путем культивирования в мясопептонном бульоне с *V. bronchiseptica*. В качестве индикаторной культуры использовали штамм *V. bronchiseptica* № 8344, обладающий характерными для своего вида морфологическими, биохимическими и культуральными свойствами.

Для повышения активности бактериофагов проводили пассажи. Опытным путем определяли оптимальное соотношение времени пассажа по литической активности фагов.

Установлено, что оптимальное время контакта культуры с фагами *V.br.* – 1 УГСХА и *V.br.* – 7 УГСХА составляет 7 часов. Этот режим мы использовали в дальнейших исследованиях.

Далее определили оптимальные количественные параметры соотношения фаговых корпускул и клеток бактерий *V.*

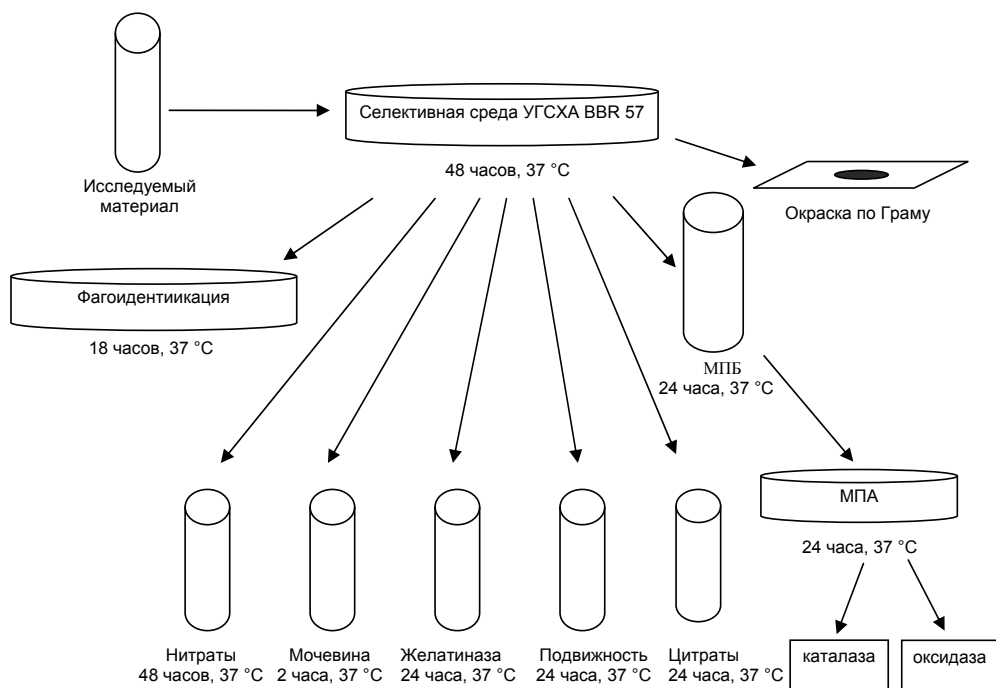


Рис. 1. Выделение бактерий *V. bronchiseptica* и ускоренная идентификация с помощью бактериофагов в сравнении со схемой бактериологического исследования

Bronchiseptica. Результаты проведенных исследований показали, что литическая активность бордетеллёзных фагов при разных соотношениях индикаторной культуры и фага была одинаково высокая и соответствовала $1,3 \times 10^7 - 3,1 \times 10^8$ фаговых корпускул в $1,0 \text{ см}^3$. Оптимальное соотношение количества фагов B.br. – 7 УГСХА, B.br. – 1 УГСХА и культуры составляет 1:2, литическая активность фагов при этом составляет $2,1 \times 10^8, 4,3 \times 10^9$ активных корпускул в 1 мл соответственно.

Затем выбрали оптимальный температурный режим культивирования бактериофагов B. Bronchiseptica. Литическая активность фага B.br. – 1 УГСХА по методу Аппельмана при температуре 25 °С, 37 °С и 42 °С составила $10^{-6}, 10^{-7}$ и 10^{-6} ; по методу Грация – $1,3 \times 10^7, 3,1 \times 10^8$ и $1,1 \times 10^7$, соответственно. Титр фага B.br. – 7 УГСХА составил по методу Аппельмана $10^{-7}, 10^{-8}$ и 10^{-7} – при 25 °С, 37 °С и 42 °С; по методу Грация $1,4 \times 10^8, 4,3 \times 10^9$ и $2,6 \times 10^8$ активных корпускул в 1 мл соответственно.

На основании полученных данных можно сделать вывод: оптимальным для культивирования фагов B. bronchiseptica является температура 37 °С.

Мы также изучили вопрос изменения литической активности бактериофагов с истечением времени для изыскания оптимальных условий хранения и кратности пересева производственных штаммов, установления срока годности фаговых препаратов. Селекционированные бактериофаги B.br. – 1 УГСХА и B.br. – 7 УГСХА хранились во флаконах, при температуре 4 °С в виде лизатов бульонных культур, без консерванта. Литическую активность определяли по истечении 3, 6, 9 и 12 месяцев. Анализируя результаты проведенных исследований, можно сделать вывод, что по истечении 12 месяцев бактериофаги B.br. – 1 УГСХА и B.br. – 7 УГСХА не изменили своей литической активности и могут использоваться в качестве диагностического биопрепарата в течении данного срока.

Мы провели контроль бактериофагов. Из полученного объема отбирали пробу каждого фага по 50 мл для определения чистоты физических свойств, титра фага по отношению к индикаторной культуре, спектра литической активности и специфичности.

Индикаторные фаги B.br. – 1 УГСХА и B.br. – 7 УГСХА не содержали посторонних примесей, фаголизаты были прозрачными, светло-желтого цвета, на питательных средах с посевами рост

бактериальной микрофлоры и грибов отсутствовал, литическую активность индикаторных бактериофагов V.br. – 7 УГСХА и V.br. – 1 УГСХА определяли методами Аппельмана и Грациа (литическая активность индикаторных фагов составила от 10^{-7} по методу Аппельмана и от $3,1 \times 10^8$ до $4,3 \times 10^9$ по Грациа), спектр литического действия фага V.br. – 7 УГСХА составил 81,1%, фага V.br. – 1 УГСХА – 47,2% из числа изучаемых штаммов, совместный спектр лизиса гомологичных бактерий составил 92,5%. По результатам изучения специфичности установлено, что индикаторные бордетеллёзные фаги являются неактивными в отношении штаммов других видов, родов.

Получив положительные результаты контроля, фаголизаты V.br. – 1 УГСХА и V.br. – 7 УГСХА разлили по 5,0 мл в стерильные флаконы и герметично закрыли. На флаконы наклеили этикетки с указанием наименования фага, его литической активности и даты упаковки.

Следующим этапом научной работы явилась разработка оптимальных условий постановки реакции нарастания титра фага. Первоначально мы определили количественный показатель РНФ. Установили, что результат реакции является положительным (увеличение количества корпускул фагов V.br. – 1 УГСХА и V.br. 7 УГСХА более чем в 5 раз) в пробах при контаминации мясопептонного бульона бактериями *V. bronchiseptica* в концентрации 10^3 микробных клеток в 1 мл.

Затем определили оптимальное время постановки РНФ. В исследованиях использовали воду, смывы с глотки, фекалии, контаминированные бактериями *V. bronchiseptica* в концентрации 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 м.к. в 1 мл.

Опыты по изучению чувствительности реакции в зависимости от времени контакта исследуемого материала с фагом показали, что РНФ с 7-часовой экспозицией материала с фагами V.br. – 1 УГСХА и V.br. – 7 УГСХА позволяет провести индикацию бактерий вида *V. bronchiseptica* в концентрации 10^4 м.к./мл за 19 часов.

В результате исследований установлено, что метод РНФ с предварительным подрачиванием исследуемого материала в течение 7 часов позволяет обнаружить бактерии *V. bronchiseptica* в количестве 10^3 м.к./мл, время проведения исследований составляет 26 часов.

Далее изучили возможность использования РНФ для выявления *V. bronchiseptica* у домашних животных и в объектах внешней среды.

Пробы физиологического раствора в объеме 5 мл вносили в колбы, содержащие по 50 мл МПБ, и контаминировали *V. bronchiseptica* в концентрации от 10^1 до 10^5 м.к./мл.

По результатам проведенных исследований нами установлено, что увеличение титра фагов *V.br.* – 1 УГСХА и *V.br.* – 7 УГСХА более чем в 5 раз произошло при концентрации 10^3 микробных клеток бордетелл в 1 мл физиологического раствора. Время исследований составило 26 часов.

У собак и кошек брали смыв физиологическим раствором с глотки, в объеме 5 мл. Вносили в колбы, содержащие по 50 мл МПБ и контаминировали *V. bronchiseptica* в концентрации от 10^1 до 10^5 м.к./мл.

По результатам проведенных исследований установлено, что увеличение титра фагов *V.br.* – 1 УГСХА и *V.br.* – 7 УГСХА более чем в 5 раз произошло при концентрации 10^3 микробных клеток бордетелл в 1 мл исследуемых смывов с глотки собак и кошек. Исследование составило 26 часов.

Пробы фекалий весом 5 г вносили в стерильные колбы, содержащие по 50 мл МПБ и контаминировали *V. bronchiseptica* в концентрации от 10^1 до 10^5 м.к./мл.

По результатам проведенных исследований установлено, что увеличение титра фагов *V.br.* – 1 УГСХА и *V.br.* – 7 УГСХА более чем в 5 раз произошло при концентрации 10^4 микробных клеток бордетелл в 1 г фекалий. Чувствительность реакции снизилась до этого уровня из-за обильного обсеменения фекалий посторонней микрофлорой, что повлияло на условия оптимального взаимодействия фагов *V.br.* – 1 УГСХА и *V.br.* – 7 УГСХА с бактериями *V. bronchiseptica*.

Мы провели повторное исследование исходных проб фекалий с увеличением времени экспозиции материала с фагом до 16 часов, это позволило повысить чувствительность РНФ до 10^3 м.к./мл, без выделения чистой культуры, при наличии посторонней микрофлоры.

Таким образом, мы рекомендуем к применению разработанный нами метод выделения фагов *V. bronchiseptica* путём мно-

гократного воздействия ультрафиолетовыми лучами на бактериальную клетку по схеме: 1 день: $t = 5-7$ мин; $l = 1$ м. 2 день: $t = 7-10$ мин; $l = 1$ м. 3 день: $t = 7-10$ мин; $l = 0,5$ м), где t – экспозиция, l – расстояние от лампы до объекта. По данной схеме нами было выделено 8 штаммов бактериофагов *B. bronchiseptica* со следующими свойствами: литической активностью от 10^{-6} до 10^{-9} по методу Аппельмана и от $5,3 \times 10^7$ до $4,3 \times 10^9$ по методу Грациа, спектром литического действия от 20,8 % до 81,1%. Выделенные бактериофаги были строго специфичны по отношению к *B. Bronchiseptica*, не лизировали бактерии других видов и родов; проявляли устойчивость при обработке хлороформом (1:10) в течение 30 минут и выдерживали 30 минутное нагревание при 60 °С.

Проведённая селекция выделенных фагов позволила отобрать бактериофаги *B.br.* – 1 УГСХА и *B.br.* – 7 УГСХА, лизирующие 92,5% изученных культур, обладающие высокой литической активностью по Аппельману $10^{-7} - 10^{-8}$, по Грациа $3,1 \times 10^8 - 4,3 \times 10^9$ активных корпускул в 1 мл.

Нами разработаны технологические параметры изготовления и контроля диагностического биопрепарата «*B.br.* – 11 УГСХА» на основе выделенных и изученных фагов *B.br.* – 1 УГСХА и *B.br.* – 7 УГСХА и параметры постановки реакции нарастания титра фага для ускоренной индикации *B. bronchiseptica* в объектах внешней среды. Метод РНФ с использованием биопрепарата «*B.br.* – 11 УГСХА» позволяет обнаружить указанные бактерии в концентрациях от 10³ м.к. в 1 мл исследуемого материала за 26 часов.

Результаты исследований биологических свойств бактериофагов *B.br.* – 1 УГСХА и *B.br.* – 7 УГСХА, а также возможность использования бактериофагов *B.br.* – 1 УГСХА и *B.br.* – 7 УГСХА в схеме реакции нарастания титра фага подтверждены актами комиссионных испытаний в ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА» (12 октября 2011 г).

По материалам научной работы разработаны: «Временная инструкция по изготовлению и контролю лабораторной серии бактериофагов *Bordetella bronchiseptica* *B.br.* – 1 УГСХА и *B.br.* – 7 УГСХА», «Методические рекомендации по ускоренной индикации бактерий *Bordetella bronchiseptica* методом реакции нараста-

ния титра фага в объектах санитарного надзора», «Методические рекомендации по изготовлению и контролю бактериофагов B.br. – 7 УГСХА и B.br. – 1 УГСХА», утвержденные ректором ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА» (24 октября 2011 г).

ЛИТЕРАТУРА

1. Адамс М. Бактериофаги / М. Адамс // М.: Медгиз, 1961. – 521 с.
2. Васильев Д.А., Золотухин С.Н., Никишина Н.М. Учебно-методическое пособие по методам общей бактериологии. -Ульяновск, 1998. – 151 с.
3. Габрилович И.М. Общая характеристика бактериофагов / И.М. Габрилович // Основы бактериофагии. – Минск. – 1973. – С. 5-24.
4. Габрилович И.М. Общая характеристика бактериофагов / И.М. Габрилович // Основы бактериофагии. – Минск. – 1973. – С. 5-24.
5. Гольдфарб Д.М. Бактериофагия / Д.М. Гольдфарб // М.: Медгиз. – 1961. – 225 с.
6. Золотухин С.Н. Разработка оптимальных количественных параметров соотношения культуры и фага для получения препаратов с высокой активностью / С.Н. Золотухин, Л.П. Пульчеровская, Д.А. Васильев // Вестник УГСХА. – 2004. – № 12. – С. 50-53.
7. Тимаков В.Д. Реакция нарастания титра фага (РНФ) / В.Д. Тимаков, Д.М. Гольдфарб // М., 1962. – С. 65-71.
8. Baker D.G. Natural pathogens of laboratory animals: their effects on research / D.G. Baker // ASM Press, Washington, D.C. - 2003.
9. Bjornstad O.N. Evolution and emergence of Bordetella in humans / O.N. Bjornstad, E.T. Harvill // Trends Microbiol. – 2005. – N 13. – P. 355-359.
10. Karataev G.I., Lapajeva I.A., Ryabinina O.P., Mebel S. Detection of a new bacteriophage in Bordetella.//FEMS-symposium Pertussis. Berlin, GDR.- 1988.- p.20.
11. Mattoo S. Role of Bordetella bronchiseptica fimbriae in tracheal colonization and development of a humoral immune response / S. Mattoo, J.F. Miller, P.A. Cotter // Infect. Immun. – 2000. – N 68. – P. 2024-2033.
12. Yuk M.H. Modulation of host immune responses, induction of apoptosis and inhibition of NF- κ B activation by the Bordetella type III secretion system / M.H. Yuk, E.T. Harvill, P.A. Cotter, J.F. Miller // Mol. Micmbiol. – 2000. - №35. – P.991-1004.

ГЛАВА 7

ВЫДЕЛЕНИЕ БАКТЕРИОФАГА DESULFOVIBRIO DESULFURICANS И СОЗДАНИЕ НА ЕГО ОСНОВЕ БИОПРЕПАРАТА ПО ПРОФИЛАКТИКЕ КОРРОЗИИ МЕТАЛЛОВ В НЕФТЯНОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

CHAPTER 7.
KARAMYSHEVA N.N. ISOLATION OF DESULFOVIBRIO
DESULFURICANS PHAGE AND WORKING OUT ON THE BASIS
OF THE PHAGE A BIOLOGICAL PREPARATION FOR PREVENTION
METAL CORROSION IN OIL INDUSTRY

Сульфатредуцирующие бактерии, в частности *Desulfovibrio desulfuricans* являются достаточно распространённой физиологической группой, характеризующейся способностью к образованию сероводорода из сульфата. Наиболее значимыми процессами жизнедеятельности рода *Desulfovibrio* являются: биоминерализация, круговорот серы в природе и биокоррозия металлов. Наибольший урон процесс биокоррозии, с участием *Desulfovibrio desulfuricans* наносит нефтедобывающей промышленности. Основная контаминация нефти микроорганизмами происходит в процессе закачки в пласт воды без соответствующей антибактериальной обработки (Каменщиков, 2007).

Активный рост сульфатредуцирующих бактерий приводит к резкому увеличению скорости коррозии (примерно в 24 раза), а наличие застойных зон к добавочному усилению активности сульфатредуцирующих бактерий, то есть увеличению скорости локальной коррозии (Антоновская, 1985). В настоящее время для борьбы с сульфатредуцирующими бактериями в нефтяных пластах используются ингибиторы. В основном это бактерициды, относящиеся к классам неорганических и органических соединений. Однако этот метод оказывает негативное влияние на каче-

ство нефти (Белоглазов, 1987; Смородин, 1983). Поэтому актуальной является задача создания бактериофагового биопрепарата, позволяющего обеспечивать уменьшение численности сульфатредуцирующих бактерий и понижение степени их коррозионного воздействия на металл нефтедобывающего оборудования с одновременным сохранением качества добываемой нефти.

Работа выполнена на кафедре микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ ФГБОУ ВПО «Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия имени П.А. Столыпина».

В работе использованы референс – штаммы бактерий: *Desulfovibrio desulfuricans* subsp. *desulfuricans* (Beijerinck, 1895) Kluver et van Niel 1936 VKM B – 1799, *Desulfovibrio gigas* VKM B – 1759, *Desulfovibrio sulfodismutans* VKM B – 1764, *Desulfovibrio vulgaris* VKM B – 1760, *Desulfovibrio* sp. VKM B – 2200, полученные из музея ИБФМ им. Г.К. Скрыбина РАН (г. Пущино Московская обл.), а также 9 штаммов бактерий (P1, P2, P3, P4, P5, Сж, 31, 32, B1), выделенных из объектов окружающей среды, типирование которых позволило отнести их к роду *Desulfovibrio*. Кроме того, для изучения специфичности бактериофагов использовали 5 штаммов бактерий: *Clostridium perfringens* A – 33, *Fusobacterium nucleatum* Л – 77, *Lactobacillus* spp Ф – 102, *Bacillus cereus* С – 44, полученные из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ при ФГБОУ ВПО Ульяновской ГСХА. Представленные штаммы обладали типичными биологическими свойствами.

Культивирование анаэробных микроорганизмов по Постгейту (1984); окраску микроорганизмов по Граму (1884); определение подвижности микроорганизмов по Пешкову (1972); биохимическую идентификацию по Герхарду (1984) и Widdel (1992); индукцию профага бактерий УФ облучением по И. Беляевой (1978); индукцию профага бактерий рентген-облучением по Adams V. (1973); молекулярно-генетический – ПЦР; электрофоретический метод по Лэммли (1970); определение активности фага по методу Аппельмана; агаровых слоёв по Грация; определение спектра литической активности; определение типоспецифичности литического действия фага по методам, предложенным М. Адамсом (1956), Д.М. Гольдфарбом (1961), И.М. Габриловичем (1973), С.Н. Золотухиным (2007); металлографи-

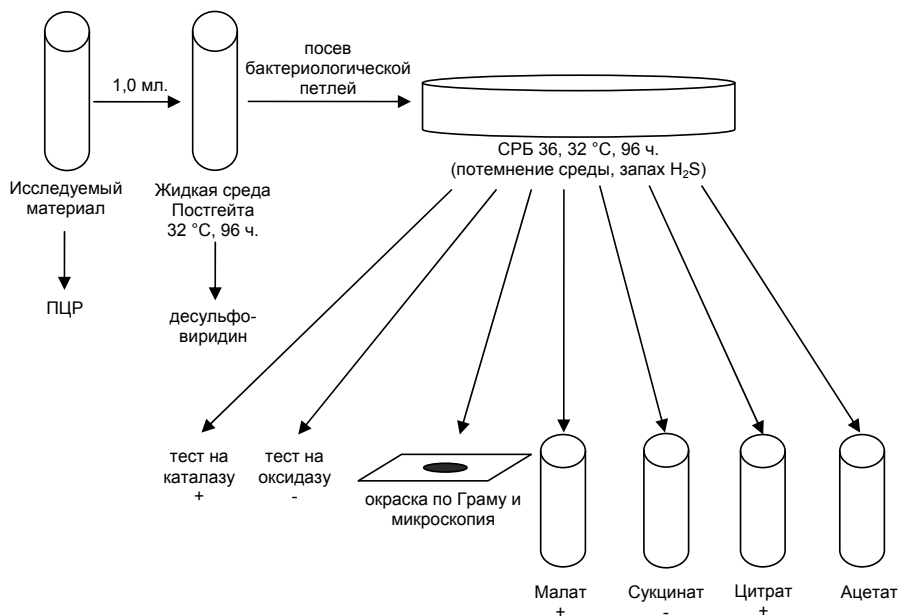


Рис. 1. Схема выделения и идентификации бактерий *D. desulfuricans*

ческую оценка коррозионных поражений; определение показателей коррозионной стойкости: количественные и качественные показатели по ГОСТ 9.506 – 87.

Статистическую обработку результатов исследований проводили общепринятыми методами (Ашмарин, Воробьёв 1962; Бейли, 1962). Обработку результатов осуществляли с помощью программы SPSS statistics 17.0.

Были изучены морфологические и физиолого – биохимические свойства референс – штамма *Desulfovibrio desulfuricans* subsp. *desulfuricans* VKM B-1799. На основании полученных результатов и данных литературных источников была предложена и апробирована схема выделения бактерий вида *Desulfovibrio desulfuricans* состоящая из четырех этапов и семи тестов.

Для выделения и идентификации культур сульфатредуцирующих бактерий нами была предложена схема, показанная на рисунке 1.

Для получения чистой культуры проведены пересевы с жидкой накопительной среды Постгейта «В» на модифицированные твёрдые питательные среды, в том числе авторские СРБ № 32, СРБ № 33, СРБ № 36 модификации НИИЦБиМ, основанные на введении в состав среды дополнительных источников энер-

Табл. 1. Идентификация выделенных штаммов бактерий *D. desulfuricans*

№ п.п.	Название штамма	Объект выделения	Окраска по Граму	Наличие пигмента десульфовиридина	Подвижность	Рост на сукцинате	Рост на цитрате	Рост на малате	Рост на ацетате
1	P ₁	Вода технологическая	–	+	+	–	+	+	–
2	P ₂	Вода технологическая	–	+	+	–	+	+	–
3	P ₃	Вода технологическая	–	+	+	–	+	+	–
4	P ₄	Вода технологическая	–	+	+	–	+	+	–
5	P ₅	Пластовая вода	–	+	+	–	+	+	–
6	C _ж	СОЖ	–	+	+	–	+	+	–
7	З ₁	Колодезный ил	–	+	+	–	+	+	–
8	З ₂	Озерный ил	–	+	+	–	+	+	–
9	B ₁	Образцы глубинной воды пресных водоёмов	–	+	+	–	+	+	–

Примечание – «+» положительный результат; «–» отрицательный результат

гии, задерживающих почернение среды до 48 ч, вместо обычных 24 ч. На всех предложенных средах рост референс – штамма *Desulfovibrio desulfuricans* subsp. *desulfuricans* VKM B – 1799 сульфатредуцирующих бактерий наблюдался уже через 72 ч вместо 96 ч на ранее предлагаемых исследователями питательных средах. По наличию в мазках из культуры грамотрицательных неспорообразующих вибрионов, почернению придонного осадка, положительной реакции на сероводород, наличию пигмента десульфовиридина, выявленной подвижности, роста на лактате, цитрате и малате, отсутствия роста на сукцинате и ацетате, роста серебристо – белых колоний на фоне почернения агаризованной питательных среды в строгих анаэробных условиях выделенная культура сульфатредуцирующих бактерий была отнесена к *D. desulfuricans* subsp. *desulfuricans* (Bergey's Manual of Determinative, 1974) (таблица 1).

Результаты физиолого – биохимических тестов отражены в таблице 2.

На основании проведенных собственных физиолого – биохимических исследований, рекомендованных в оригинальных публикациях и определителях и посвященных идентификации *D. desulfuricans* физиолого – биохимическая идентификация сложна и не надёжна, так как результаты для многих видов бактерий *Desulfovibrio* получаются идентичными. Следовательно, наряду с физиолого – биохимическими методами нужно применять молекулярно – биологические методы, основанные на генетической идентификации *D. desulfuricans*.

Табл. 2. Сравнение биохимических свойств сходных видов бактерий

Свойства	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> VKM B-1799	<i>Desulfovibrio vulgaris</i> VKM B-1760	<i>Desulfovibrio gigas</i> VKM B-1759	<i>Desulfovibrio sp.</i> VKM B-2200	<i>Desulfovibrio sulfodismutans</i> VKM B-1764
дегидрогеназа	+	+	+	+	+
формиат	+	+	+	+	–
фумарат	+	+	+	+	–
сероводород	+	+	+	+	+
цитрат натрия	+	+	+	+	+
гидролиз ДНК	+	+	+	+	+
подвижность	+	+	+	+	+
липаза	+	+	+	+	+
десульфовиридин	+	+	+	+	+
лактат	+	+	+	+	+
малат	+	–	–	–	+

Примечание – «+» – положительный результат; «–» – отрицательный результат

Табл. 3. Праймеры для участка гена липополисахарида

	Последовательность 5'-3'	Длина, пар оснований	Температура плавления, °C	GC состав, %
Прямой праймер – LipF	CCCGTAACGGCCTGCAGGTT	20	59,34	65,00
Обратный праймер – LipR	CAGGGGCATGACCGTACGCG	20	60,18	70,00
Размер продукта амплификации	224 пар оснований			

Молекулярно-генетическая идентификация бактерий

D. desulfuricans с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР)

Для того чтобы разработать оптимальные параметры проведения ПЦР для идентификации *D. desulfuricans* необходимо было: 1) провести подбор праймеров для идентификации *D. desulfuricans*; 2) определить оптимальные концентрации праймеров для проведения ПЦР; 3) оптимизировать протокол проведения ПЦР (температура отжига, количество циклов) при использовании данной системы праймеров.

Для анализа нуклеотидного состава ДНК *D. desulfuricans* были использованы ресурсы базы данных GeneBank. Поиск уникальных последовательностей специфического гена проводили с использованием приложения GeneBank – on-line Blast nucleotides. Подбор праймеров проводили с помощью программы Gene Runner Version 3.05 и Primer Blast (ресурсы GeneBank). Апробацию предложенной методики проводили с использованием штаммов *D. desulfuricans* музея НИИЦМБ Ульяновской УГСХА. После ряда проведённых анализов программами Gene Runner v.3.05 и Primer-Blast (в режиме on-line) были определены праймеры, фланкирующие участок размером 224 пар нуклеотидов (п.н.) (таблица 3).

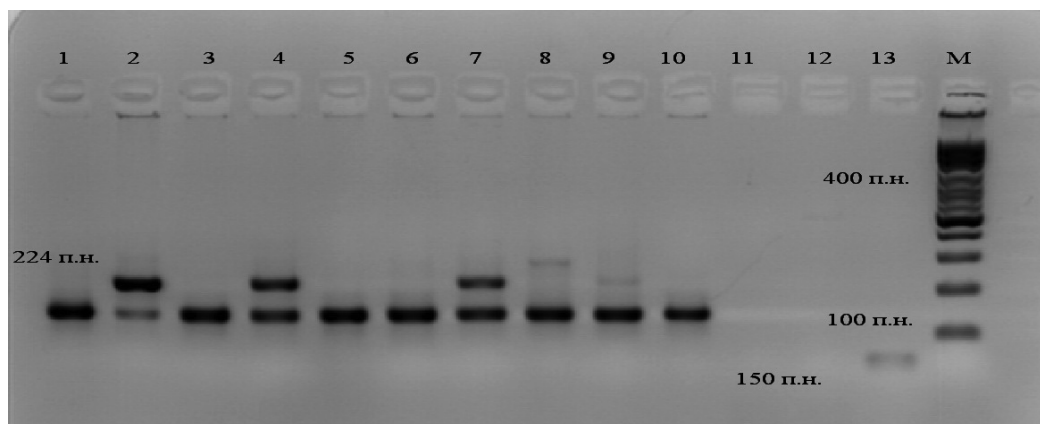


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов амплификации участка гена липополисахарида *D. desulfuricans*

Примечание – М – маркер молекулярного веса (100-1000 п.н.), 1 – *D. desulfuricans* 1a, 2 – *D. desulfuricans* P3, 3 – *D. desulfuricans* 1a, 4 – *D. desulfuricans* Сж, 5 – *D. desulfuricans* 2/P2a, 6 – *D. desulfuricans* P3a, 7 – *D. desulfuricans* P4, 8 – *D. desulfuricans* 1b, 9 – *D. desulfuricans* 3/1b, 10 – *D. desulfuricans* 2/P2b, 11 – *K. pneumoniae*, 12 – *Clostridium* spp., 13 – отрицательный контроль.

После ряда экспериментов по оптимизации температурного режима специфического отжига праймеров (рис. 2) и подбора их концентраций были определены следующие параметры проведения ПЦР:

- концентрация каждого праймера – 5 pmol / реакцию (25 мкл);

- режим ПЦР 1) 95 °С – 5 минут 1 цикл

- 2) 95 °С – 10 сек

- 60 °С – 10 сек

- 3) 95 °С – 5 сек

- 65 °С – 15 сек

Расчётная величина размера ампликона (224 п.н.) наблюдалась только у 9 штаммов *D. desulfuricans*. У остальных штаммов *D. desulfuricans* присутствовали специфические амплификаты размером 150 п.н, что может быть использовано при индикации и идентификации бактерий данного вида, поскольку остальные виды использованных бактериальных культур таких полос не образуют. Вероятно, наличие специфической полосы размером 224 п.н. имеют штаммы, сходные со штаммом *D. desulfuricans* subsp. *desulfuricans* str. ATCC 27774, единственный полный геном которого представлен в базе данных GeneBank.

Выделение бактериофага *D. desulfuricans* методами индукции и изучение его основных биологических свойств

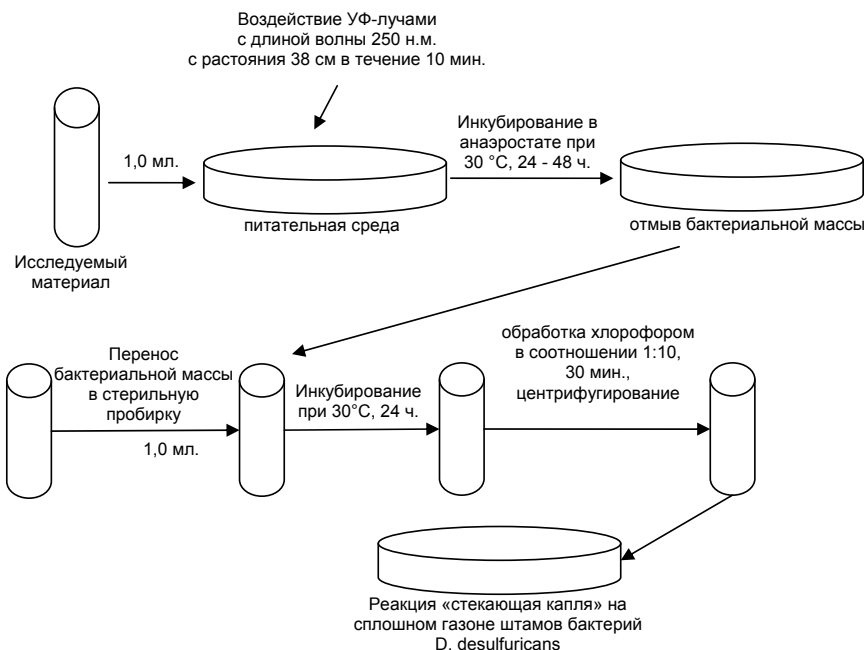


Рис. 3. Схема индукции профага бактерий *D. desulfuricans* УФ-облучением

Метод индукции профага бактерий *D. desulfuricans* УФ облучением

Выделение бактериофага бактерии *D. desulfuricans* проводили по усовершенствованному нами методу И. Беляевой (1978). В опытах была использована модифицированная среда СРБ № 36. Источник УФ – облучения – лампа фирмы «Philips» с длиной волны 250 нм и мощностью излучения 60 Вт. При наличии фага в суспензии спустя 24 часа, на сплошном газоне культуры бактерий можно наблюдать дорожку сплошного лизиса. В контроле наблюдался сплошной газон культуры. Время, необходимое на индукцию профага и визуализацию его наличия в субстрате, составляет 72 ч (3 суток).

Опыт был повторён в трёхкратной последовательности для достоверности полученных результатов. Время индукции, расстояние до облучаемого объекта, длина волны рассчитаны экспериментально. Схема индукции представлена на рисунке 3.

Метод индукции профага бактерий *D. Desulfuricans* рентгеновским облучением

Нами была разработана схема индукции рентгеновским излучением. Дозы облучения бактерий устанавливали экспериментально по расчетной таблице поглощённых доз при рентгеновских исследованиях.

Для получения активной накопительной культуры делали 3 – 4 пересева на жидкую среду Постгейта 4 – 5 суточным посевным материалом. Полученная чистая культура, была подвергнута облучению на рентгеновской установке в «жёстком» режиме, составляющем 0,86 мЗв. Параметры электротехнических показателей: анодное напряжение при всех исследованиях составляло 63 кV (киловольт) сила тока составляла 250 mA (миллиампер), а экспозиционное время изменяли в зависимости от поставленной задачи.

В первой серии опытов проведен один период облучения в течение 1,6 сек., доза облучения составила 2,0 мЗв (миллизиверта) – полученный результат не удовлетворительный, так как на опытных чашках нет зон лизиса и при электрофоретическом исследовании полученного биологического субстрата не выявлено наличие участков нуклеиновых кислот размером около 1000 п.н. Во второй серии опытов время составило два периода каждый по 1,6 сек. (доза 4,0 мЗв) – результат частичное разрушение бактериальных клеток, что подтверждается наличием зон отсутствия роста культуры и на электрофореграмме выявлено наличие участков нуклеиновых кислот размером около 1000 п.н... В третьей серии опытов три периода каждый по 1,6 сек. с перерывом в 1 мин, суммарная доза облучения составила 6,0 мЗв – результат бактериальные клетки погибли, что подтверждается отсутствием роста культуры. Наиболее оптимальным является для получения фагов является режим облучения, использованный во второй серии опытов, что подтверждается электрофореграммами фаговых нуклеиновых кислот.

Электрофорез ДНК фагов, экстрагированных из штаммов бактерий *D. desulfuricans*

После проведения опытов по индукции профага сульфатредуцирующих бактерий необходимо найти методы которые могли бы свидетельствовать о наличии бактериофагов в субстрате. Одним из таких методов является обнаружение индуцированных бактериофагов с помощью электрофореза. Суть метода состоит в детекции фрагментов ДНК размером значительно меньше размеров хромосомной ДНК самой бактерии после экстракции тотальной ДНК бульонной культуры *D. desulfuricans* с культурой бактериофага. В качестве контролей были использованы: 1) культура *D. desulfuricans* без бактериофага (чистая культура); 2) бак-

териофаги коммерческого производства (синегнойный и сальмонеллезный). Учет результатов состоял в следующем: наличие фрагментов ДНК длиной меньше длины хромосомной ДНК самих бактерий в пробах с профагом и отсутствие таковых в пробе с чистой культурой (без воздействия на нее бактериофагов), на наш взгляд, свидетельствует о наличии в исходных пробах бактериофагов.

В качестве подтверждения этого, а также для сопоставления размеров ДНК бактериофагов, были использованы в качестве положительных контролей бактериофаги коммерческого производства (синегнойный и сальмонеллезный) с содержанием бактериофагов 109/мл. Результаты показаны на рисунках 4, 5.

В результате проведенных экспериментов по электрофорезу ДНК бактериофагов, полученных с использованием индукции, а также коммерческих бактериофагов *Pseudomonas aeruginosa* и *Salmonella* spp. мы обнаружили во всех пробах с предположительным бактериофагом

D. desulfuricans фрагменты нуклеиновых кислот размером около 10000 п.н.; ДНК коммерческих синегнойного и сальмонеллезного бактериофагов также имеют длину около 10000 п.н. Таким образом, фрагменты нуклеиновых кислот размером около 10000 п.н. в исходных пробах, на наш взгляд, свидетельствуют о наличии бактериофагов *D. desulfuricans*.

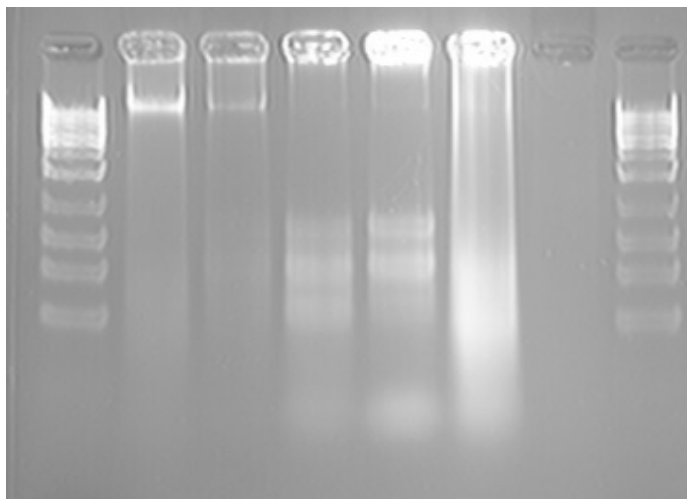


Рис. 4. Электрофореграмма ДНК бактериофагов *D. desulfuricans*.

Примечание – 1,8 – маркер молекулярного веса; 2-6 – ДНК предположительного фага в бактериальной культуре *D. desulfuricans*; 7 – ДНК чистой культуры *D. Desulfuricans*

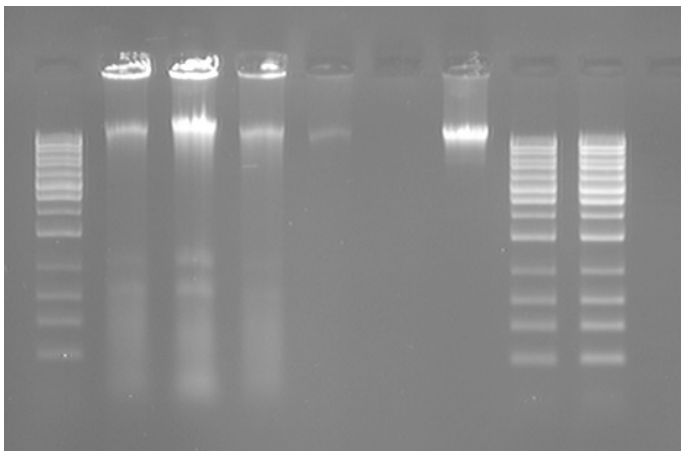


Рис. 5. Электрофореграмма ДНК бактериофагов *D. desulfuricans*, коммерческих синегнойного и сальмонеллезного бактериофагов.

Примечание – 1, 8 – маркер молекулярного веса; 2-4 – ДНК бактериофагов *D. desulfuricans* проба № 2, №3, №4; 5 – синегнойный фаг; 6 – отрицательный контроль; 7 – сальмонеллезный фаг

Отбор бактериофагов с заданными для целей исследования свойствами, необходимыми для создания биопрепарата

Изучение биологических свойств выделенных бактериофагов проводили по методам, предложенным И.М. Габриловичем (1973), Е.П. Розановой (1978), С.Н. Золотухиным (2007).

Определение активности фага по методу Аппельмана – 10^{-9} ; – 10^{-8} .

Негативные колонии бактериофагов характеризовались следующими параметрами: колонии диаметром 6 – 8 мм полностью прозрачны, без зоны вторичного лизиса и с зоной вторичного лизиса на периферии;

Фаги устойчивы к воздействию температуры до 75 °С. При температуре от 76 °С теряют активность и полностью погибают при температуре выше 80 °С. Получены данные об устойчивости бактериофагов к воздействию хлороформа в течение 20 – 30 мин.

Результаты опытов показали, спектр литической активности 60% и 80%.

Опыт по определению специфичности бактериофагов (Ddr 57 – УГСХА, Ddu 48 – УГСХА) показал, что оба бактериофага строго специфичны по отношению к *D. desulfuricans* и не лизируют другие виды и роды бактерий.

Разработка технологических параметров изготовления бактериофагового биопрепарата

Температурные показатели культивирования бактериофагов Ddr 57 – УГСХА и Ddu 48 – УГСХА составляют 30 – 36 °С. Оптимальным соотношением бактериофага и культуры является 1:1, т.е. 0,2 мл фага х 0,2 мл индикаторной культуры. Оптимальное соотношение между временем пассажа и активностью фага при температуре 30оС составляет 24 часа. Литическая активность по Грациа от 7×10^8 до 10^9 .

Определение влияния бактериофагов бактерии *D. desulfuricans* на степень коррозии металла

Образцы стали размером 2х1,5 см вырезали из насосно-компрессорной трубы, отшлифовали и отполировали до 12 класса чистоты. Маркировка образца – по ГОСТ 9.905. В ходе эксперимента в 4 видах коррозионной среды были имитированы приближительные условия эксплуатации нефтепроводов: 1 – в качестве контроля были созданы условия без дополнительных факторов коррозии; 2 – с присутствием активных коррозионных агентов, представленных бактериями вида *D. desulfuricans*; 3 – с присутствием бактерий вида *D. desulfuricans* и с добавлением биопрепарата бактериофага Ddu – 48 УГСХА (титр 10^{-9}); 4 – с присутствием бактерий вида *D. desulfuricans* и с добавлением биопрепарата бактериофага Ddr – 57 УГСХА (титр 10^{-8}). Опыт повторяли в трёхкратной повторности. В ёмкости с коррозионными средами были внесены образцы металла и помещены в термостат на 20 дней при температуре 30 °С. Дальнейшие испытания включали в себя определение и оценку типа коррозии, формы коррозионного поражения и его распределения в металле на металлографическом шлифе под микроскопом при увеличении в 100 раз. Как видно на рисунке

Табл. 4. Результаты испытаний образцов стали

№ п.п.	Коррозионная среда	Время испытаний, t (ч)	Площадь поверхности, S (м ²)	Потери массы образца m ₁ - m ₂ (г)	Скорость коррозии V _к г/м ² ·ч	Эффективность Z (%)
1	№1 нефть – вода (контроль)	240	0,003	0,002 ± 0,0002	0,0103 ± 0,0007	–
2	№ 2 нефть – вода – <i>D. desulfuricans</i>	240	0,003	0,006 ± 0,0002	0,0311 ± 0,0012	–
3	№ 3 нефть – вода - <i>D. desulfuricans</i> – бактериофаг Ddu 48 – УГСХА	240	0,003	0,001 ± 0,0001	0,0050 ± 0,0005	97,4
4	№ 4 нефть – вода - <i>D. desulfuricans</i> - бактериофаг Ddr 57 – УГСХА	240	0,003	0,0011± 0,0001	0,0053 ± 0,0006	98,7

6 на поверхности контрольного образца развивается сплошная (равномерная) коррозия, тогда как в среде № 2 можно наблюдать коррозию пятнами, то есть образуются углубления неправильной формы различного размера (рисунок 7). Коррозионные пятна неравномерно распределены по поверхности металла, их глубина достигает 2 мкм в среднем поражено 57,3% площади поверхности стали. На рисунке 8 представлена поверхность стали в среде № 3 наблюдается равномерная коррозия и незначительные коррозионные пятна – площадь поражения составляет 12,0%. Сходная картина (рисунок 9.) наблюдается в среде № 4, где при незначительной глубине площадь поражения пятнами составляет 10,7%.

Скорость коррозии (V_k) рассчитывают по формуле (Iverson, 1972):

$$V_k = (m_1 - m_2) / S \tau, \text{ где}$$

V_k – показатель коррозии массы, г/ ($\text{м}^{-2} \cdot \text{ч}^{-1}$);

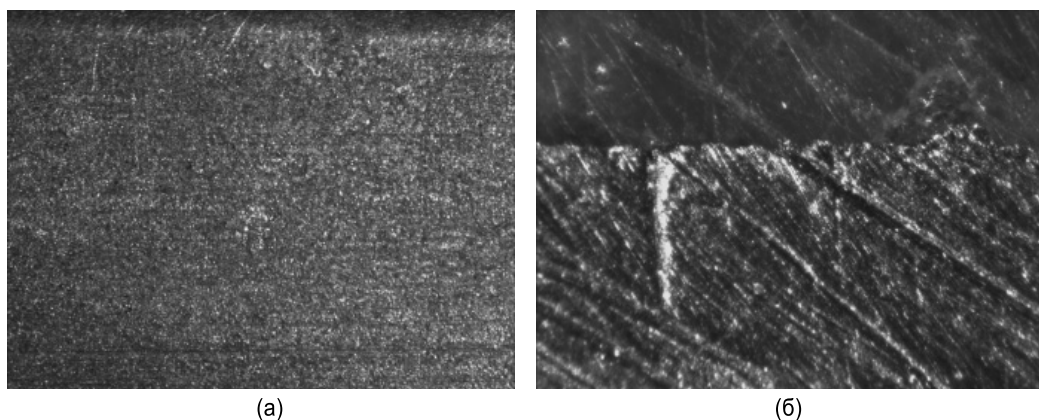


Рис. 6. Поверхность стали (а) и поперечный разрез образца (б) после коррозии в среде: нефть – вода $\times 100$ (контроль)

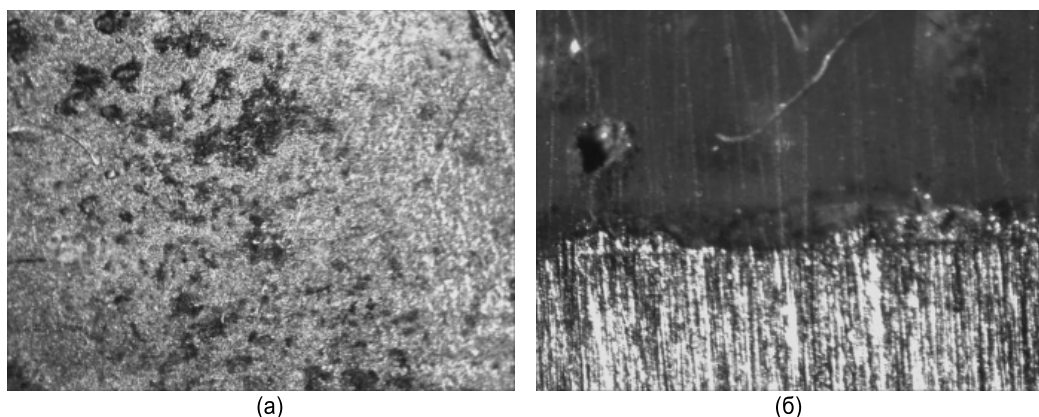


Рис. 7. Поверхность стали (а) и поперечный разрез образца (б) после коррозии в среде: нефть – вода в присутствии бактерий вида *D. desulfuricans* $\times 100$, стрелкой отмечены коррозионные углубления

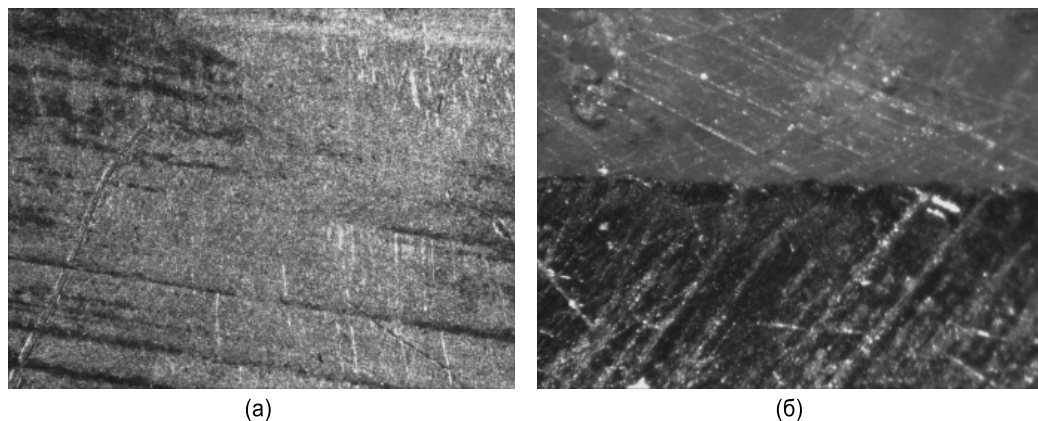


Рис. 8. Поверхность стали (а) и поперечный разрез образца (б) после коррозии в среде: нефть – вода в присутствии бактерий вида *D. desulfuricans* и бактериофага Ddu 48-УГСХА x 100

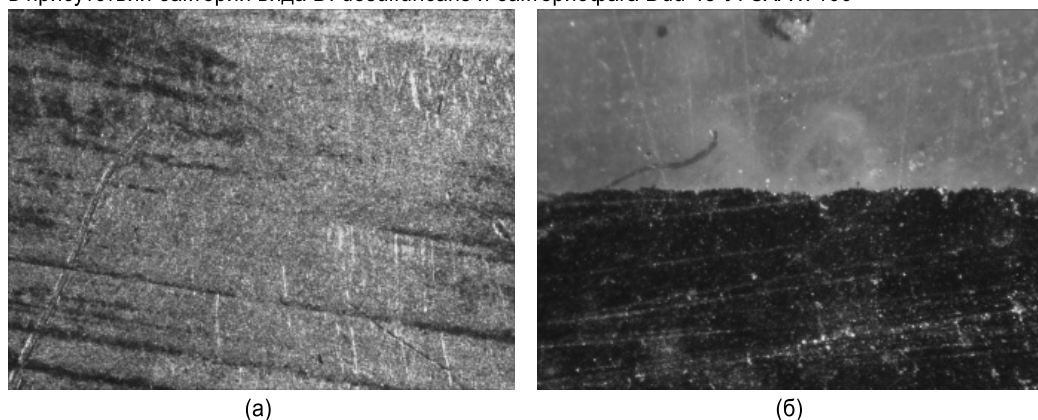


Рис. 9. Поверхность стали (а) и поперечный разрез образца (б) после коррозии в среде: нефть – вода в присутствии бактерий вида *D. desulfuricans* и бактериофага Ddr 57-УГСХА x 100

m_1 – начальная масса образца, г;

m_2 – масса образца после испытаний, г;

S – площадь поверхности образца, m^2 ;

t – время испытаний, ч.

Защитную эффективность биопрепарата от общей коррозии ($Z\%$) определяли, согласно ГОСТ 9.506-87, по скорости коррозии ($г/м^2 \cdot ч^{-1}$) образцов в среде без биопрепарата (V_{ko}) и в той же среде содержащей биопрепарат для защиты от коррозии (V_{ki}) по формуле (Мудрецова-Висс, 1978):

$$Z = V_{ko} - V_{ki} / V_{ko} \cdot 100\%$$

При расчёте скорости коррозии относительная ошибка измерений не превышала 3 %. Данные по результатам измерений отображены в таблице 4.

Согласно ГОСТ 9.506-87 реагенты, показавшие при испытаниях в водно – нефтяной эмульсии защитный эффект, не менее 90%,

при испытаниях в водной части водно – нефтяной среды не менее 80% могут быть рекомендованы к стендовым испытаниям.

В результате проверки бактериофагов Ddu 48 – УГСХА и Ddr 57 – УГСХА на степень защиты металлических поверхностей было выявлено:

- поверхность насосно-компрессорных труб, используемых в нефтедобывающей промышленности, подвергается двум видам коррозии равномерной и неравномерной;

- введение бактериофага Ddu 48 – УГСХА и Ddr 57 – УГСХА в нефтеводную среду, содержащую СРБ, приводит к значительному снижению неравномерной коррозии на 97,4%. и 98,7 % соответственно;

- указанные бактериофаги подавляют активность СРБ вида *D. desulfurican*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Антоновская, Н.С. Распределение сульфатредуцирующих бактерий в грунте вблизи газопровода / М.С. Антоновская, И.А. Козлова, Е.И. Андреюк // Микробиология. – 1985. – Т. 47., №2. – С.93-94.
2. Ашмарин, И.П. Статистические методы в микробиологических исследованиях / И.П. Ашмарин, А.А. Воробьев. – М.: Медгиз, 1962. – 179 с.
3. Белоглазов, С. М. Микробиологическая коррозия стали при участии СРБ и ее подавление ингибиторами биоцидами / С.М. Белоглазов, Т.Б. Постникова // В кн.: Изучение процессов морского биообрастания и разработка методов борьбы с ними. – Л.: Изд. АН СССР, 1987. – С. 36-42.
4. Габрилович, И.М. Общая характеристика бактериофагов: Основы бактериофагии / И.М.Габрилович. – Минск, 1973. – 56 с.
5. Герхарда, Ф. Общая микробиология / Ф. Герхарда. – М.: Мир, 1984. – Т.3. – С. 356-358.
6. Гольдфарб, Д.М. Бактериофагия. / Д.М. Гольдфарб. – М.: Медгиз, 1961. – 297 с.
7. ГОСТ 9.506 – 87. Металлы и сплавы. Методы определения коррозии и коррозионной стойкости
8. Золотухин, С.Н. Иммуногенные свойства и одиночный цикл внутриклеточного развития морганеллезного бактериофага. / Золотухин С.Н. // Вестник РАСХН. – 2006. – № 2. – С.69-70.
9. Каменщиков, Ф.А. Борьба с сульфатовосстанавливающими бактериями на нефтяных месторождениях / Ф.А. Каменщиков, Н.Л. Черных// ИКИ, 2007. – 412 с.
10. МудрецоваВисс, К.А. Микробиология, санитария и гигиена / К.А. МудрецоваВисс – М.: Деловая литература, 2001. – 378 с.
11. Остерман, Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот / Л.А. Остерман. – М.: МЦНМО, 2002. – 248 с.
12. Розанова, Е. П. Успехи микробиологии / Е. П. Розанова. – М.: Наука, 1978. – Т. 13. – С. 164.
13. Студеникина, Ф.Г. Изучение клеток лизогенной структуры *Desulfovibrio desulfuricans* после индукции митомином С / Ф.Г. Студеникина, О.В. Волкова, М.И. Беляева // Микробиология. – 1981. – Т.50., №5. – С. 849-853.
14. Adamse, A.D. Microbial activities in soil near natural gas leaks / A.D. Adamse, J.Hoeks, and J.A.M. de Bont// J.Microbiol.a.Serol. – 1971. – V.37. – P. 251-252.
15. Bergey's Manual of Determinative, Bacteriology / Bergey's Manual of Determinative, Ed. 8. Williams // Wikins Company, Baltimore, 1974.
16. Haud1ey, J. J. Bacteriol / J.Haud1ey, V. Adams, J. M. Akagi. – 1973. – P. 115-120.
17. Iverson, W.P. Biological corrosion. Advances in corrosion science and technology / W.P. Iverson. – NewYork: Fontana M. G. and Stackle, 1972. – P. 342.
18. Laemmli U.K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4 / U.K. Laemmli. – Nature. 1970. –P. 680 - 685.
19. Postgate, J.R., Nitrogen fixation by *Desulfovibrio* Nitrogen and sulfur cycles: 42nd Symp. / J.R. Postgate, M. Kent Helen, L. Robson Robert // Soc. Gen. Microbiol. South Ampton Jan. Cambridge. – 1988. – P.457-471.
20. Widdel, F. Gramnegative mesophilic sulfatereducing bacteria / F. Widdel F. Bak // The Prokaryotes. 2gd edn. – 1992. – Vol.4. – P. 400.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предлагаемый в данной монографии материал по исследованию фагов бактерий различных видов получен в ходе НИР проводимых в лаборатории микробиологии кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ, а так же созданного на её базе научно-исследовательского инновационного центра микробиологии и биотехнологии.

Цели и задачи центра: проведение научно-исследовательских и опытно-конструкторских работ в различных направлениях микробиологии, биотехнологии, молекулярной биологии, медицине, сельском хозяйстве; внедрение разработок в практику и производство для последующей коммерциализации.

Научный коллектив НИИЦМиБ во главе с доктором биологических наук, профессором Васильевым Дмитрием Аркадьевичем включает: 4-х докторов наук и 18 кандидатов наук, а так же преподавателей, научных сотрудников, аспирантов и соискателей, студентов, выполняющих свои диссертационные работы на базе кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы и центра.

Под руководством профессора Васильева Дмитрия Аркадьевича с 2000 года по настоящее время защищены 1 докторская и 28 кандидатских диссертаций по четырём специальностям: 03.02.03 микробиология, 03.01.06 биотехнология, 03.00.06 вирусология, 16.00.03 эпизоотология. В настоящее время ведется работа по подготовке 10 докторских и 19 кандидатских диссертаций.

Состав сотрудников и участников работ:

Доктора наук: д.б.н., профессор Васильев Д.А., д.б.н., профессор Золотухин С.Н., д.м.н., Нафеев А.А., д.б.н., Алешкин А.В.
Кандидаты наук: к.б.н., доцент Ю.Б. Никульшина, к.б.н., доцент

Феоктистова Н.А., к.б.н., доцент Молофеева Н.И., к.б.н., доцент Пульчеровская Л.П., к.б.н., доцент Богданов И.И., к.б.н., доцент Ковалева Е.Н., к.б.н., доцент Мерчина С.В., к.б.н., старший научный сотрудник Викторова Д.А., к.б.н., старший научный сотрудник Шестаков А., к.б.н., старший научный сотрудник Мاستиленко А.В., к.б.н., Сверкалова Д.Г., к.б.н., Семанина Е., к.б.н., Юдина М.А., к.б.н., Карамышева Н.Н., к.б.н., Калдыркаев А.И., к.б.н., Барт Н.Г., к.б.н., Журавская Н.П.

Сотрудники без степени: аспирант Семанин Е., аспирант Макеев В.А., аспирант Романова Н.А., аспирант Климушкин Е.И., соискатель Артамонов А.М., соискатель Гринева Т.А., соискатель Насибуллин И.Р., научный сотрудник Горшков И.Г., научный сотрудник Куклина Н.Г., аспирант Парамонова Н.А., аспирант Сульдина Е., соискатель Пчелинцева Ю.С., аспирант Золотухин Д.С., аспирант Имамов М.

В НИИЦМиБ входят три научно-исследовательские лаборатории:

- лаборатория прикладной микробиологии, в которой проводятся научные исследования в области микробиологии и фагологии, адаптация научных результатов для практики, решаются вопросы помощи животноводческим и растениеводческим хозяйствам региона по внедрению в практику достижений микробиологической науки;

- лаборатория эпизоотологии, в которой проводятся научные исследования по изучению новых инфекционных нозоединиц, создание кадастров зооантропонозных инфекций Ульяновской области, эпизоотология «городских» инфекций;

- лаборатория биотехнологии, в которой проводятся научные исследования по изучению микроорганизмов и вирусов, создание микробных и вирусных биопрепаратов, разработка биотехнологических процессов и методов для их дальнейшего применения в научно-исследовательских работах и практике.

Научно-исследовательский инновационный центр микробиологии и биотехнологии обладает необходимой лабораторной базой для проведения исследовательских и производственных работ в области микробиологии, биотехнологии, фагологии, включающей: 12 современных стационарных боксов, бактериологическую кухню, лабораторию по физико-химическим мето-

дам исследования микроорганизмов, виварий с лабораторными животными (мыши, крысы, кролики, овцы, куры), автоклавную с 5 автоклавами,

Лаборатория НИИЦМиБ оснащена приборами и оборудованием, необходимыми для проведения исследований в области фагологии, микробиологии и биотехнологии: ультразвуковой дезинтегратор MSE; дистилляторы Д 7-4-3 СЗМО; лиофильная сушка LL3000 в комплекте с вакуумным насосом для лиофилизации микроорганизмов, минусовым холодильником для хранения ампул с музейными штаммами; микроскопы: Биомед 6, тринокуляр, МИКМЕД-1 (Биолан р-л), XSZ-104, и другие; система визуализации БВО-2 (USB-окуляр); система визуализации БВО-3 (USB) с программным обеспечением для цифровой обработки, и др.; термостаты ТС-1/80 для культивирования микроорганизмов; химические вытяжные шкафы DWM-1; сушижаровые шкафы; бактерицидные облучатели; холодильники Akai PRE-2241D, Electrolux ERD 32190W, Indesit B 16 и др., для хранения реактивов, питательных сред, культур микроорганизмов, фаголизатов; центрифуги СМ-6М, ЦЛР-1, и др.; наборы для ультрафильтрации бактерий и фагов (Millipore – Millivac); оборудование для электрофореза S-2N (SE-2) с денситометром Doc Print; комплект оборудования для постановки ИФА – Анализатор иммуноферментных реакций АИФР-01 УНИПЛАН; ПЦР – лабораторию полностью укомплектованную для научных и диагностических исследований; дозаторы 1-канальные, 8-канальные; РН-метры HI-8314, и др.; полный комплект лабораторной посуды химического и микробиологического назначения.

Лаборатория кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы имеет лицензию Роспотребнадзора на работу с микроорганизмами 3-4 групп патогенности.

Коллектив центра обладает необходимой базой и квалификацией для выполнения научно-исследовательских работ и решения биотехнологических (производственных) задач, направленных, в частности, на:

а. Производство препаратов на основе бактериофагов, для чего:

1) постоянно пополняются коллекции штаммов бактерий и бактериофагов, как компонентов производимых биопрепаратов за счёт выделения новых изолятов бактериофагов, отвечающих заданным требованиям,

2) изучаются биологические свойства бактериофагов для их дальнейшей селекции и оценки их эффективности как компонентов биопрепаратов; в том числе ведется изучение генома бактериофагов на предмет наличия локусов патогенности, которые могут быть трансдуктированы бактериям,

3) проводится конструирование биопрепаратов на основе бактериофагов для диагностики бактериальных заболеваний, лечебно-профилактических целей

4) разрабатываются схемы применения диагностических биопрепаратов на основе бактериофагов,

5) оптимизируются режимы постановки реакции нарастания титра фага для экспресс-индикации бактерий,

6) оптимизируются режимы культивирования биомассы бактериофагов (оптимальная температура, продолжительность культивирования, состав питательных сред, множественность фаговой инфекции, методика наращивания биомассы бактериофагов и т.д.).

б. Создание диагностикумов на базе иммунологических методов,

в. Создание схем бактериологической дифференциации микроорганизмов по показателям их фенотипических свойств,

г. Создание диагностикумов на базе молекулярно-генетических методов (полимеразная цепная реакция, рестрикционный анализ, сиквинс) по показателям генома бактерий и фагов.

К настоящему времени в центре накоплен опыт работы с более чем с 40 видами бактерий, а также с активными в отношении них бактериофагами, выделенными и селекционированными сотрудниками центра:

Bacillus – 7 видов, в том числе: *Bacillus subtilis*, *Bacillus mesentericus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus coagulans*;

Listeria – 6 видов, в том числе: *Listeria ivanovii*, *Listeria welshimeri*, *Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes*

Pseudomonas – 4 вида: *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas chlororaphis*;

Aeromonas – 5 видов: *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae*, *Aeromonas sobria*, *Aeromonas salmonicida*, *Aeromonas veronii*;
Flavobacterium psychrophilum;
Yersinia – 3 вида: *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Yersinia ruckeri*;
Enterococcus faecalis;
Bordetella – 2 вида: *Bordetella bronchiseptica*, *Bordetella pertussis*;
Desulfovibrio desulfuricans;
Bifidobacterium – 3 вида: *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium thermophilum*, *Lactobacillus acidophilus*;
Бактерии семейства *Enterobacteriaceae*:
Klebsiella pneumoniae;
E. coli;
Proteus – 2 вида: *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*;
Providencia rettgeri;
Morganella morganii;
Enterobacter – 2 вида: *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*;
Citrobacter freundii;
Serratia marcescens;
Hafnia spp.;
Erwinia spp.

Основными направлениям научных исследований центра являются:

Выделение и изучение биологических свойств бактериофагов, разработка схем и параметров их применения.

1. Ветеринарные биопрепараты на основе бактериофагов для лечения и профилактики бактериальных заболеваний сельскохозяйственных животных (в том числе промысловых и аквариумных рыб, птиц, насекомых) (бактериофаг-опосредованный биоконтроль).

2. Препараты для диагностики (индикации и идентификации) бактериальных заболеваний сельскохозяйственных животных (в том числе промысловых рыб, птиц, насекомых) (фагоидентификация потенциально опасных микроорганизмов).

3. Препараты для растениеводства на основе бактериофагов, активных в отношении возбудителей бактериальных поражений растений (бактериофаг-опосредованный биоконтроль).

4. Препараты для диагностики (индикации и идентификации) бактериальных поражений растений (фагоидентификация потенциально опасных микроорганизмов).

5. Биопрепараты на основе бактериофагов для использования в пищевой промышленности на стадии переработки сельскохозяйственной продукции растительного и животного происхождения (фаговый биопроцессинг).

6. Препараты на основе бактериофагов для профилактического приема людьми в качестве пробиотической биологически активной добавки к пище для снижения риска развития sporadic случаев и эпидемических вспышек пищевых инфекций.

7. Препараты, содержащие бактериофаги, используемые в косметических средствах (крема для кожи, дезодоранты, освежители полости рта с бактерицидным эффектом, не затрагивающие нормофлору кожи и слизистых).

8. Препараты на основе бактериофагов, используемые в лечебных целях (для лечения урогенитальных заболеваний бактериальной этиологии, гнойно-воспалительных заболеваний, фурункулов, абсцессов и пр., в том числе в открытых ранах, пищевых токсикоинфекций и пр.).

9. Антифаговые препараты, а так же методы получения фагореzистентных бактериальных штаммов, что актуально в биотехнологической отрасли (молочная промышленность, производство антибиотиков, вакцинных препаратов, целевых органических кислот и пр.).

10. Препараты для фаготипирования бактерий.

11. Биопрепараты на основе бактериофагов для санации производственных, медицинских, бытовых помещений, учреждений общественного питания и пр., а так же оборудования и инвентаря (в том числе животноводческих комплексов, рыбоводческих прудов и пр.).

Разработка методов диагностики пищевых инфекций: бактериологические, РНФ – реакция нарастания титра фага, ПЦР – полимеразная цепная реакция, ИФА – иммуно-ферментный анализ.

Изучение инфекционных нозоединиц (инфекционных болезней): бордетеллёз, аэромоназы, Листерииозы, Псевдомоназы, Флавобактерииозы, Иерсинииозы, Энтерококкозы, Клебсиеллезы, Эшерихииозы.

А так же пищевых инфекций, вызываемых бактериями родов: *Bacillus*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *E.coli*, *Proteus*, *Enterobacter*, и др.

Создание кадастров (список мест, где регистрируются вспышки заболеваний) зооантропонозных (общих для человека и животных) инфекций Ульяновской области: Лептоспирозы – сделано, листериоз – сделано, бешенство – сделано, сибирская язва – делается, и др.

Разработка бактериальных препаратов:

– бактериальные препараты для утилизации нефтяных загрязнений окружающей среды; бактериальные препараты для утилизации органических отходов; бактериальные препараты для защиты и стимуляции роста растений.

Направления тем научно-исследовательских работ, по которым в настоящее время работают сотрудники НИИЦМиБ:

1. «Диагностика и профилактика бордетеллезной инфекции» – тема докторской диссертации доцента Ю.Б. Никульшиной, включает материалы 4-х кандидатских диссертаций:

– «Бактериологические методы выделения и идентификации бактерии *B. Bronchiseptica*» (к.б.н. Сверкалова Д.Г.),

– «Генетическо-молекулярные методы идентификации *B. Bronchiseptica*» (к.б.н. Мاستиленко А.В.),

– «Выделение, изучение биологических свойств, селекция бактериофагов *B. Bronchiseptica* и разработка индикации данного микроорганизма методом реакции нарастания фага» (к.б.н. Семанина Е.),

2. «Разработка методов индикации и идентификации бактерий рода *Bacillus*, вызывающих пищевые отравления и порче пищевых продуктов» – тема докторской диссертации доцента Феоктистовой Н.А., включает материалы 6-ти кандидатских диссертаций:

– «Биотехнологические параметры разработки фагового препарата для индикации и идентификации бактерий *Bacillus subtilis* в пищевом сырье и продуктах питания» (к.б.н. Мустафин А.Х.),

– «Разработка фагового препарата *Bacillus mesentericus* и область его практического применения» (к.б.н. Юдина М.А.),

– «Разработка системы фаговаров бактерий *Bacillus cereus* для идентификации и мониторинга данного микроорганизма» (аспирант Калдыркаев А.И., дата защиты 28 марта 2013 года),

- «Конструирование фагового препарата для индикации и идентификации бактерий *Bacillus mycoides* в пищевом сырье и продуктах питания» (аспирант Макеев В.А.),

- «Фагоиндикация и фагоидентификация бактерий *Bacillus megaterium* в пищевом сырье и продуктах питания» (аспирант Романова Н.А.),

- «Конструирование препарата на основе бактериофагов *Bacillus coagulans* и область его практического применения» (аспирант Климушкин Е.И.).

3. «Диагностика и профилактика псевдомонадных поражений пищевых продуктов и пищевого сырья» – тема докторской диссертации доцента Богданова И.И., включает материалы 3-х кандидатских диссертаций:

- «Разработка бактериологической схемы выделения *Ps. aeruginosa* и выделение, изучение биологических свойств, селекция бактериофагов данного микроорганизма и разработка индикации методом реакции нарастания фага (РНФ)» (к.б.н. Шестаков А.),

- «Усовершенствование методов выделения, идентификации и индикации бактерий *Pseudomonas putida*» (к.б.н. Викторов Д.А.),

- «Разработка методов выделения, фагоидентификации и индикации бактерий *Pseudomonas fluorescens*» (соискатель Артамонов А.М.).

4. «Диагностика и профилактика фитопатогенных Эрвиний» – тема докторской диссертации доцента Молофеевой Н.И., включает материалы кандидатских диссертаций:

- «Разработка бактериологической схемы выделения и идентификации бактерий рода *Erwinia* в объектах внешней среды, растениях, включая фагоиндикацию». (аспирант Черных А.)

5. «Разработка биопрепаратов на основе бактериофагов и схем их применения для диагностики, лечения и профилактики бактериальных болезней рыб» – тема докторской диссертации старшего научного сотрудника Викторова Д.А., включает материалы 9-ти кандидатских диссертаций:

- «Разработка методов выделения, фагоидентификации и индикации бактерий *Pseudomonas fluorescens*» (соискатель Артамонов А.М.),

– Разработка биопрепаратов на основе бактериофагов для идентификации и индикации бактерий *Pseudomonas chlororaphis* (соискатель Гринева Т.А.),

– Биотехнологические аспекты разработки фагового препарата для индикации и идентификации бактерий *Aeromonas hydrophila* (соискатель Насибуллин И.Р.),

– Разработка биопрепаратов на основе бактериофагов для индикации и идентификации бактерий *Aeromonas caviae* (студент Виротников А.),

– Разработка биопрепаратов на основе бактериофагов для индикации и идентификации бактерий *Aeromonas sobria* (научный сотрудник Горшков И.Г.),

– Разработка биопрепаратов на основе бактериофагов для индикации и идентификации бактерий *Aeromonas salmonicida* (научный сотрудник Куклина Н.Г.),

– Разработка биопрепаратов на основе бактериофагов для индикации и идентификации бактерий *Aeromonas veronii* (студент Антошкин П.),

– Разработка биопрепаратов на основе бактериофагов для идентификации и индикации бактерий *Flavobacterium psychrophilum* (аспирант Парамонова Н.А.),

– Разработка биопрепаратов на основе бактериофагов для идентификации и индикации бактерий *Yersinia ruckeri* (студент Логинова Е.).

6. «Разработка методов детекции и идентификации бактерий рода *Listeria*» – тема докторской диссертации Ковалевой Е.Н., включает материалы 3-х кандидатских диссертаций:

– Бактериофаги бактерий видов *Listeria ivanovii*, *Listeria welshimeri*, *Listeria innosua* и перспективы их практического применения (аспирант Сульдина Е.В.),

– Бактериофаги бактерий вида *Listeria monocytogenes* и перспективы их практического применения (аспирант Имамов М.),

– Разработка методов генетической детекции бактерий рода *Listeria* (соискатель Пчелинцева Ю.С.)

7. «Разработка новых методов типирования вирулентных штаммов *Corynebacterium ulcerans* и *Bordetella bronchiseptica*» – тема докторской диссертации Мاستиленко А.В.

8. «Изучение биоплёнок *Pseudomonas aeruginosa* и факторов, предотвращающих их распространение» – тема докторской диссертации Шестакова А.Г.

9. «Изучение биоплёнок бактерий рода *Klebsiella* и факторов, предотвращающих их распространение» – тема докторской диссертации Ляшенко Е.А.

10. «Изучение биоплёнок бактерий рода *Serratia* и факторов, предотвращающих их распространение» - тема докторской диссертации к.б.н., доцента Пульчеровской Л.П., включает материалы кандидатской диссертации:

- «Получение бактериофагов *Serratia marcescens* и создание на их основе биопрепаратов для профилактики данной инфекции» (соискатель Кузнецова О.),

- «Разработка методов, предотвращающих распространение биопленок *Serratia marcescens* (аспирант Ефрейторова Е.О.)

Базовыми целью центра и его коллектива являются следующие позиции:

последовательно изучить биологию бактериофагов, как наиболее представленной форме жизни на Земле – их насчитывается до 1032 частиц. Эта необходимость обусловлена несколькими ключевыми моментами.

Первый – это проблема прямого противодействия патогенным бактериям. Нынешний мир людей очень плотно заселён, что и позволяет инфекционным патогенам распространяться по нему с значительной скоростью. Эффективное использование постоянно обновляющейся антибактериальной терапии (сыворотки, антибиотики и т.п.) с каждым десятилетием становится удорожающим удовольствием и менее доступным значительной части населения Земли. Использование фаговой терапии может быть значительным вкладом в данный аспект борьбы с бактериальными инфекциями.

Второй – это система профилактики бактериальных инфекций с использованием препаратов бактериофагов, которая в свою очередь включает несколько позиций:

- (1) бактериофаг-опосредованный биоконтроль – использование фагов для борьбы с бактериями, поражающими сельскохозяйственные растения и животных на этапе, предшествующем их попаданию на перерабатывающие заводы (овощи, фрукты и т.д.,

до сбора урожая; мясной и молочный скот, домашняя птица и т.д. до забоя);

- (2) фаговый биопроцессинг – применение бактериофагов для деконтаминации овощей, фруктов, мяса, рыбы и т.д. в процессе их заводской переработки перед упаковкой готовой к употреблению продукции;

- (3) профилактический прием бактериофагов животных, птицы, человека в качестве пробиотической биологически активной добавки к кормам для снижения риска развития спорадических случаев и эпизоотических вспышек инфекций;

- (4) фагоидентификация и индикация потенциально опасных микроорганизмов.

Третий ключевой момент включает вопросы общебиологического плана в частности позволит получать значительные массивы данных о последовательностях геномов большого количества организмов. Более чем сто миллионов различных бактериофагов содержат не только невероятное количество совершенно новых и необычных белков, но и являются грандиозным генетическим резервуаром позволяющим заглянуть в вопросы происхождения и эволюционного развития жизни.

И наконец четвертым ключевым моментом является изучения возможности понимания взаимодействия комплексных биологических систем опираясь на упрощенную модель в качестве которой можно использовать бактериофаг. Изучить принципы функционирования клетки как биохимической системы и существование живой системы как элементов жизнедеятельности сети химических реакций и имея в руках бактериофаги которые значительно проще, чем свободноживущие клетки, что и даёт возможность разрабатывать новые типы анализа сложностей биологической системы в вопросах функционирования клетки. Это позволяет подойти к вопросам функционирования самого макроорганизма (человека, животного) и получить ответы по проблеме геронтологии.

У нашего центра и кафедры много заинтересованных друзей и коллег, об этом свидетельствует проходима на базу Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии международная конференция по бактериофагам и мы надеемся на совместную работу в предлагаемой области исследований.

СОДЕРЖАНИЕ

ВМЕСТО ВВЕДЕНИЯ.	7
О СТРУКТУРЕ ДАННОЙ КНИГИ	14

ГЛАВА 1

АЛЕШКИН А.В. Области применения бактериофагов	15
---	----

ГЛАВА 2

Бактериофаги семейства Enterobacteriaceae.	45
2.1. БАРТ Н.Г. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов бактерий рода <i>Providencia</i>	45
2.2. ЛЯШЕНКО Е. А. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов бактерий рода <i>Klebsilla</i>	61
2.3. КОРИТНЯК Б.М. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов бактерий вида <i>Yersinia enterocolitica</i>	74
2.4. ЖУРАВСКАЯ Н.П. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов бактерий вида <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	89
2.5. ЗОЛОТУХИН Д.А. Бактериофаги <i>Hafnia alvei</i> , биологически	100
2.6. ЗОЛОТУХИН С.Н., КУЗНЕЦОВ А.Ю. Бактериофаги бактерий вида <i>morganella morganii</i> и их практическое применение	115
2.7. МОЛОФЕЕВА Н.И. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов <i>Escherichiacoli</i> O157	124
2.8. ПОЖАРНИКОВА Е.Н. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов <i>Enterobacter</i>	139
2.9. ПУЛЬЧЕРОВСКАЯ Л.П. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов бактерий рода <i>Citrobacter</i>	154
2.10. ФЕОКТИСТОВА Н.А. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов бактерий рода <i>Proteus</i>	171

ГЛАВА 3

Бактериофаги бактерий рода <i>Bacillus</i>	186
3.1. ФЕОКТИСТОВА Н.А. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов бактерий <i>Bacillus subtilis</i>	186
3.2. ЮДИНА М.А., ФЕОКТИСТОВА Н.А. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов бактерий вида <i>Bacillus mesentericus</i>	197

3.3. КАЛДЫРКАЕВ А.И., ФЕОКТИСТОВА Н.А., АЛЕШКИН А.В. Разработка системы фаговаров бактерий <i>Bacillus cereus</i> для идентификации и мониторинга данного микроорганизма	211
--	-----

ГЛАВА 4

КОВАЛЕВА Е.Н. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов бактерий вида <i>Enterococcus faecalis</i>	226
---	-----

ГЛАВА 5

Бактериофаги бактерий рода <i>Pseudomonas</i>	241
5.1. ВИКТОРОВ Д.А., БОГДАНОВ И.И. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов бактерий вида <i>Pseudomonas</i>	241
5.2. ШЕСТАКОВ А.Г., БОГДАНОВ И.И. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов бактерий вида <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	262

ГЛАВА 6

СЕМАНИНА Е.Н., ВАСИЛЬЕВА Ю.В. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов <i>Bordetella bronchiseptica</i> . .	274
---	-----

ГЛАВА 7

КАРАМЫШЕВА Н.Н. Выделение бактериофага <i>Desulfovibrio</i> <i>desulfuricans</i> и создание на его основе биопрепарата по профилактике коррозии металлов в нефтяной промышленности. . .	287
---	-----

ЗАКЛЮЧЕНИЕ	301
----------------------	-----

CHAPTER 1

ALYOSHKIN A.V. Application Field of Phages	15
--	----

CHAPTER 2

Bacteriophages of the Enterobacteriaceae Family.	45
2.1. BART N.G. Isolation and Study of the Main Qualities of <i>Providencia</i> Genus Phages	45
2.2. LYASHENKO E.A. Isolation and Study of the Main Qualities of <i>Klebsilla</i> Genus Phages	61
2.3. GHURAVSKAYA N.P. Isolation and Study of the Main Qualities of <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> sp. Phages	74
2.4. ZOLOTUKHIN D.A. Isolation and Study of the Main Qualities of <i>Hafnia alvei</i> sp. Phages	89
2.5. ZOLOTUKHIN S.N., KUZNETSOV A.U. Phages of <i>Morganella morganii</i> sp. and their Application	100
2.6. KORYTNYAK B.M. Isolation and Study of the Main Qualities of <i>Yersinia enterocolitica</i> sp. Phages.	115
2.7. MOLOFEYEVA N.I. Isolation and Study of the Main Qualities of <i>Escherichia coli</i> O157 Phages	124
2.8. POZHARNIKOVA E.N. Isolation and Study of the Main Qualities of <i>Enterobacter</i> Phages.	139
2.9. PULTCHEROVSKAYA L.P. Isolation and Study of the Main Qualities of <i>Citrobacter</i> Genus Phages	154
2.10. FEOKTISTOVA N.A. Isolation and Study of the Main Qualities of <i>Proteus</i> Genus Phages	171

CHAPTER 3

Bacteriophages of the <i>Bacillus</i> Genus	186
3.1. FEOKTOSTOVA N.A. Isolation and Study of the Main Qualities of <i>Bacillus subtilis</i> Phages	186
3.2. YUDINA M.A., FEOKTOSTOVA N.A. Isolation and Study of the Main Qualities of <i>Bacillus mesentericus</i> sp. Phages.	197
3.3. KALDYRKAEV A.I., FEOKTISTOVA N.A., ALYOSHKIN A.V. Working out of <i>Bacillus cereus</i> Phage Var System for the Identification and Monitoring of the Microorganism	211

CHAPTER 4

KOVALEVA E.N. Isolation and Study of the Main Qualities of <i>Enterococcus faecalis</i> sp. Phages.	226
---	-----

CHAPTER 5

Bacteriophages of <i>Pseudomonas</i> Genus	241
5.1. VYKTOROV D.A., BOGDANOV I.I. Isolation and Study of the Main Qualities of <i>Pseudomonas putida</i> sp. Phages	241
5.2. SHESTAKOV A.G., BOGDANOV I.I. Isolation and Study of the Main Qualities of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> sp. Phages	262

CHAPTER 6

SEMANINA E.N., VASYLYEVA U.B. Isolation and Study of the Main Qualities of <i>Bordetella bronchiseptica</i> 289 Phages	274
--	-----

CHAPTER 7

KARAMYSHEVA N.N. Isolation of <i>Desulfovibrio desulfuricans</i> Phage and Working out on the Basis of the Phage a Biological Preparation for Prevention Metal Corrosion in Oil Industry	287
--	-----

БАКТЕРИОФАГИ МИКРООРГАНИЗМОВ ЗНАЧИМЫХ ДЛЯ ЖИВОТНЫХ, РАСТЕНИЙ И ЧЕЛОВЕКА

ПОД РЕДАКЦИЕЙ ВАСИЛЬЕВА Д.А., ЗОЛОТУХИНА С.Н.

Художественное оформление и компьютерное обеспечение Василькиной М.Н.

Отпечатано в типографии ООО "Колор-Принт"
г.Ульяновск, ул. Ленина, д.75
тел.: (8422)42-28-45, т/ф 41-82-23
www.color73.ru