

УДК 578

ВЫДЕЛЕНИЕ БАКТЕРИОФАГОВ АКТИВНЫХ В ОТНОШЕНИИ *YERSINIA ENTEROCOLITICA*

*Родионова А.В., студентка 1 курса магистратуры факультета ветеринарной медицины и биотехнологии
Научный руководитель – Сульдина Е.В., ассистент
ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ*

Ключевые слова: выделение бактериофагов, исследование культур штаммы.

*Данная работа посвящена выделению фагов активных в отношении *Y. enterocolitica*, которые могут быть использованы в перспективе для конструирования терапевтического биопрепарата.*

При работе с индикаторными культурами первым шагом является проверка штаммов их на способность к лизогении, как к спонтанной (без индуцирующего агента) так в присутствии физических и химических индуцирующих факторов.

Для начала использовали методику, для выделения бактериофагов из бактерий вида *Y. Enterocolitica* без воздействия на них индуцирующего фактора. В результате проведенных экспериментов свободного фага из культур бактерий вида *Y. enterocolitica* выявлено не было (табл. 1).

Далее на исследуемые культуры, воздействовали индуцирующим фактором. В качестве индуцирующих агентов использовали ультрафиолетовые лучи (УФ-лучи) и митомицин С.

Источником УФ-лучей служила ртутно-кварцевая лампа, дающая не менее 90 % излучаемой энергии, с длиной волны 254 нм. На суточные культуры *Y. enterocolitica* разведенные в фосфатном буфере в отношении 1:100 воздействовали УФ-лучами от 20 до 50 секунд с интервалами в 10 секунд. Облученные взвеси культур термостатировали, после чего смешивали со индикаторными штаммами в отношении 1:200, выдерживали в термостате в течение 18-20 часов при 28°C, после чего фильтровали через бактериальные фильтры с диаметром пор 0,2 мкм. Полученный фильтрат исследовали на наличие фага культурах *Y. enterocolitica* методом Отто. В наших опытах установлено, что воздействию ультрафиолетовых лучей на бактерии *Y. enterocolitica* не приводило к появлению зон лизиса.

В качестве химического агента воздействия использовали митомицин С в дозе 0,5 мкг/мл. Исследуемые штаммы засеивали в пробирки со стерильным МПБ, с содержанием 0,5 мкг/мл митомицина С. После инкубации пробирок в течение 6 ч при 28 °С содержимое пробирок центрифугировали (5000 об./мин) и фильтровали через бактериальные фильтры с диаметром пор 0,2 мкм. Суспензии индикаторных штаммов *Y. enterocolitica* наносили в объеме 0,5 мл на поверхность питательного агара в чашках Петри и втирали досуха шпателем. Чашки делили на 4 сектора, на которые наносили по 20 мкл содержимого пробирок. После инкубации чашек в течение 24 ч при 28 °С зон лизиса на бактериальном газоне обнаружено нами не было, что свидетельствует об отрицательном результате.

Анализируя полученные данные, можно утверждать, что мы не обнаружили явления выхода свободного фага и перехода профага в свободный фаг у имеющихся штаммов бактерий по данным схемам.

Таблица 1 - Исследование культур *Y. enterocolitica* на наличие профага с использованием индуцирующего фактора и без него

№ пп	Штаммы <i>Y. enterocolitica</i>	Наличие негативных колоний или лизиса					
		Воздействие УФ-лучей				Воздействие митомицином С	Выделение свободного фага
		20 сек	30 сек	40 сек	50 сек		
1	<i>Y. enterocolitica</i> Ye – 1	-	-	-	-	-	-
2	<i>Y. enterocolitica</i> Ye – 2	-	-	-	-	-	-
3	<i>Y. enterocolitica</i> Ye – 3	-	-	-	-	-	-

Далее наши исследования были направлены на выделение бактериофагов *Y. enterocolitica* из объектов внешней среды.

Жидкие пробы (бытовые сточные воды, воду открытых водоемов) фильтровали через бумажный фильтр для освобождения от механических примесей в случае необходимости. В 1,0 литровую колбу, содержащую стерильный, МПБ в количестве 0,5 литра, вносили 50,0 мл фильтрата либо навеску 50,0 г, в случаях исследования фекалий животных и проб почвы с выгульных площадок для животных и по 1,0 мл, индикаторных штаммов

бактерий. Колбу инкубировали в термостате в течении 24 часов при 37°C. После этого содержимое колбы разливали в пробирки, центрифугировали при 3000 об/мин в течении 30 минут, шприцом отбирали надосадочную жидкость и фильтровали с помощью бактериального фильтра в стерильную пробирку. Фильтраты исследовали по методу Отто. Чашки помещали в термостат на 18-20 часов при 37°C. Наличие негативных колоний или зон лизиса на газоне роста индикаторной культуры свидетельствует о присутствии в исследуемом материале бактериофага (рис.1).



Рисунок 1 - Негативные колонии фага в зоне «стекающей капли».

При исследовании 30 проб объектов внешней среды удалось по указанной схеме выделить 5 изолятов фагов *Y. Enterocolitica*.

Библиографический список:

1. Выделение бактериофагов бактерий рода *Listeria* / Д.А. Васильев, Е.Н. Ковалева, Е.В. Сульдина // Инфекция и иммунитет. - 2014. - специальный выпуск - С. 69-70.
2. Золотухин, С.Н. Малоизученные энтеробактерии и их роль в патологии животных / С.Н. Золотухин. - Ульяновск: Копиринг, 2004. - С.67-77.
3. Золотухин, С.Н. Создание и разработка схем применения диагностических биопрепаратов на основе выделенных и изученных бактериофагов энтеробактерий: автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора биологических наук. - Ульяновск, 2007. - С. 5-8.
4. Коритняк, Б.М. Изучение биологических свойств выделенных бактериофагов *Yersinia enterocolitica* и разработка на их основе технологии индикации и идентификации возбудителя кишечного иерсиниоза: автореф. дис. ...канд. биол. наук: 03.00.07, 03.00.23 / Коритняк Богдан Михайлович. - Саратов, 2005. - С.10-14.
5. Методы идентификации *Vacillus coagulans*, включая фагоидентификацию/ Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин, К.В. Белова, К.В. Шокина,

- М.А. Лыдина, А.В. Алешкин, Б.И. Шморгун, И.Б. Павлова, Т.Г. Юдина // Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности: материалы Третьей научно-практической конференции с международным участием. 2016. С. 89-90.
6. Вопросы биоконтроля пищевого листериоза/ Е.Н. Ковалева, Д.А. Васильев, Е.В. Сүльдина, И.Г. Швиденко, Б.И. Шморгун // Материалы VII Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням с международным участием . 2015. С. 157.
 7. Выделение листериозных бактериофагов и изучение их основных биологических свойств/ Е.В.С. ульдина, Е.Н. Ковалева, Б.И. Шморгун, Д.А.Васильев // Аграрный научный журнал. 2015. № 3. С. 37-41.
 8. Выделение и селекция бактериофагов *Bacillus coagulans*/ Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин, К.В. Белова, К.В. Шокина, М.А. Лыдина, К.В. Маслюкова, А.В. Алешкин, Б.И. Шморгун // Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности Материалы Третьей научно-практической конференции с международным участием. 2016. С. 87.
 9. Схема идентификации *Bacillus cereus* и *Bacillus mycoides* в объектах санитарного надзора/ Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин, В.А. Макеев, А.И. Калдыркаев, К.В. Маслюкова, А.В. Алешкин, Б.И. Шморгун // Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности: материалы Третьей научно-практической конференции с международным участием. 2016. С. 88.
 10. Биоиндикация *Bacillus anthracis* в пробах почвы методом постановки реакции нарастания титра фага/ С.Н. Золотухин, Д.А. Васильев, Н.А. Феоктистова, Е.И. Климушкин, К.В. Белова, Б.И. Шморгун, И.Г. Швиденко //Российский журнал Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии. 2016. № 4 (20). С. 55-64.
 11. Апробация схемы выделения возбудителя американского гнильца пчел/ М.А. Лыдина, Е.И. Климушкин, Ю.А. Райчинец, К.В. Кудряшова, Б.И. Шморгун // Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения: материалы VI Международной научно-практической конференции. 2015. С. 102-106.

ISOLATION OF BACTERIOPHAGES ACTIVE IN RELATION OF YERSINIA ENTEROCOLITICA

Rodionova A.V.

Key words: *bacteriophage isolation, culture study strains.*

This work is devoted to the isolation of phages active against Y. enterocolitica, which can be used in the future to construct a therapeutic biological product.