

Литература

1. Каврук Л.С. Методические указания по бактериологической диагностике смешанной кишечной инфекции молодняка животных, вызываемой патогенными энтеробактериями. - М., 1999 .
2. Определитель бактерий Берджи./ред. Дж.Хоулт, И.Крига - М., 1997.
3. Покровский В.И.. Медицинская микробиология. - М., 1995.

УДК 619:578

ВЫДЕЛЕНИЕ БАКТЕРИОФАГОВ БАКТЕРИЙ РОДА *ENTEROBACTER*

Е.Н.Митрохина, С.Н. Золотухин

Бактериофагами называют вирусы бактерий. Начало изучения бактериофага связано с работами Н.Ф. Гамалеи (1889), Ф.Туорта (1915), Ф.Д.Эрелля (1917). Н.Ф. Гамалея в конце XIX века наблюдал лизис бактерий под влиянием специфического агента. Бактериофаг - вирус, способный инфицировать бактериальную клетку, репродуцироваться в ней, образуя многочисленное потомство, и вызывать ее лизис, сопровождающийся выходом фаговых частиц в среду обитания бактерий (Гольдфарб Д.М., 1961).

Перед нами была поставлена задача выделения бактериофагов бактерий рода *Enterobacter* из объектов внешней среды. Считается, что бактериофаги рода *Enterobacter* изучены недостаточно, хотя имеются отдельные работы по данному вопросу (Летиев К.Ю., 1993; Ворошилова Н.Н. с соавт., 1995).

Выделить бактериофаг можно из различных материалов, где могли содержаться или в данный момент находятся бактерии, на которых выделенный фаг размножается. Фаги обнаруживаются в испражнениях от больных и переболевших животных, в навозе, навозной жиже, в сточной воде и почве. Методика выделения бактериофагов описана Д.М. Гольдфарбом (1961).

Выделение проводили следующим образом. Исследуемый материал фильтровали через бумажный фильтр. Полученный фильтрат (20 мл) засеивали вместе с суточной культурой (5 мл) в мясопептонный бульон (50 мл), инкубировали в термостате при температуре 37°C в течение 7 дней, при температуре 25°C - 10 дней. После смесь прогревали на водяной бане при 60°C в течение 30 минут. Фильтровали и центрифугировали 30 минут со скоростью 4000 оборотов в минуту. Стерильной пипеткой отбирали надосадочную жидкость, вновь прогревали на водяной бане и исследовали на наличие бактериофагов методом агаровых слоев.

Метод агаровых слоев. Для обнаружения использовали стерильный 1,5% мясопептонный агар, предварительно разлитый в стерильные чашки Петри, высушенный под бактерицидной лампой в течение 1 часа и в термостате при 37°C в течение 8-12 часов. Это необходимо для абсолютной

сухости чашек. Кроме того, таким образом чашки проверяются на стерильность. Слой агара должен быть достаточно глубоким, для чего в чашку наливали 25-30 мл агара. Для предохранения среды от загрязнения воздушной грамположительной флорой в агар добавляли 0.04% раствор генцианвиолета из расчета 0.01 мл на 1 л среды. Стерильный 0.7% мясопептонный агар, предварительно разлитый в пробирки по 2,5 мл, расплавляли на водяной бане, остужали до 50-55°C. Исследуемую прогретую надосадочную жидкость в количестве 1 мл помещали в 2,5 мл 0,7% МПА, затем добавляли 0,2 мл суточной культуры, все быстро перемешивали и выливали на поверхность 1,5% МПА. Смесь осторожными движениями распределяли по поверхности агара. Для получения четких результатов чашки необходимо ставить на ровную горизонтальную поверхность во избежание стекания агара в сторону. Чашки для затвердевания агара оставляли на столе на 1-1,5 часа, после чего инкубировали в термостате при температуре 37°C. Параллельно ставили контроль чистоты исследуемого материала на бактериальную загрязненность: 2,5 мл МПА+1 мл материала +0,2 мл МПБ (на чашке рост должен отсутствовать). И контроль культуры: 2,5 мл МПА +1 мл МПБ + 0,2 мл культуры (на чашке должен быть ровный газон культуры, отсутствовать посторонняя микрофлора). Наличие негативных колоний на опытных чашках говорит о присутствии бактериофага в исследуемом материале. Результаты учитывали на следующий день. Однако некоторые негативные колонии бактериофагов *Enterobacter* лучше просматривались через 6-7 часов, а после 24 часов становились менее заметными. По характеру негативных колоний определяют количество видов бактериофагов.

Далее мы отвивали бактериологической петлей негативную колонию каждого вида, помещали ее в пробирку со стерильным МПБ, добавляли 0,2 мл суточной культуры и инкубировали при температуре 37°C. Оптимальное время инкубации бактериофагов *Enterobacter* - 6 часов, что связано с характером роста культур. После чего сравнивали мутность опытной пробирки с контролем (МПБ + 0,2 культуры). Просветление опытной пробирки указывало на присутствие фагов. Опытные пробирки прогревали на водяной бане при температуре 60°C в течение 30 минут.

Для повышения активности выделенных фагов мы проводили пассажи: 4,5 мл стерильного мясопептонного бульона + 0,2 мл фаголизата из прогретой опытной пробирки, куда помещали негативную колонию + 0,2 мл суточной культуры. Инкубировали пробирки при температуре 37°C в течение 6 часов. Сравнивали мутность опытной пробирки с контролем, прогревали на водяной бане и делали следующий пассаж. По мере проведения пассажей активность фага повышалась, и уже на 4м - 5м пассаже

опытные пробирки оставались абсолютно прозрачными после инкубации фага с культурой по сравнению с контролем.

Данным методом мы выделили 6 бактериофагов рода *Enterobacter*. 1й бактериофаг *E. agglomerans* M образует ровные, круглые негативные колонии диаметром 1-3 мм. 2й бактериофаг *E. agglomerans* M образует круглые негативные колонии с ореолом по краю, 2 мм в диаметре. 3й фаг *E. agglomerans* M - нечеткая точечная колония, 1 мм. На культуру *E. agglomerans* C выделили два бактериофага, которые различались между собой наличием белой точки в центре негативной колонии. Фаг *E. agglomerans* У образует четкие ровные прозрачные негативные колонии, 1 мм в диаметре.

Литература

1. Ворошилова Н.Н., Афанасьева Э.В., Баснакьян И.А. Закономерности взаимодействия бактериальной и фаговой популяций в биореакторе на примерах *Enterobacter* //Микробиология, 1995, 479-484с.
2. Ганюшкин В.Я. Бактериофаги сальмонелл и их применение в ветеринарии. - Ульяновск, 1988.
3. Гольдфарб Д.М. Бактериофагия. - М., 1961 .
4. Летиев К.Ю. К фаготипированию бактерий рода *Enterobacter*. //Вопросы теоретической и клинической медицины. - Нальчик: 1993, с. 70.

УДК 619:578

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ БАКТЕРИОФАГОВ БАКТЕРИЙ РОДА *ENTEROBACTER*

Е.Н.Митрохина, С.Н. Золотухин

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 фага определяется в конкретных стандартных условиях. Бактериофаг по отношению к одной и той же культуре, но в разных средах, может проявлять разную литическую активность и формировать неодинаковое число колоний на плотной среде.

Мы определяли активность бактериофагов по методу Аппельмана и методу агаровых слоев (по Грация). Метод Аппельмана. В 10 пробирок разливают по 4,5 мл МПБ, стерилизуют. В 1 пробирку вносят 0,5 мл испытуемого фага. Затем делают последовательные разведения, перенося отдельными пипетками из пробирки в пробирку 0,5 мл фага. Из 10 последней пробирки лишние 0,5 мл выливают в дезраствор. Затем во все