

БАКТЕРИОФАГИ ЗООАНТРОПОНОЗНЫХ И ФИТОПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ



Результаты научных исследований сотрудников кафедры микробиологии,
вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы
ФГБОУ ВО Ульяновского государственного аграрного университета
им. П.А. Столыпина
и Научно-исследовательского инновационного центра
микробиологии и биотехнологии.

результаты научных исследований



БАКТЕРИОФАГИ ЗООАНТРОПОНОЗНЫХ И ФИТОПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ

Результаты научных исследований сотрудников кафедры микробиологии,
вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы
ФГБОУ ВО Ульяновского государственного аграрного университета им. П.А. Столыпина
и Научно-исследовательского инновационного центра микробиологии и биотехнологии.

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



Ульяновск
2017

Бактериофаги зооантропонозных и фитопатогенных бактерий / под редакцией: д.б.н., профессора Васильева Д. А., д.б.н., профессора Золотухина С. Н. Насибуллин И. Р., Куклина Н. Г., Горшков И. Г., Феоктистова Н. А., Мустафин А. Х., Лыдина М. А., Макеев В. А., Калдыркаев А. И., Климушкин А. И., Петрукова Н. А., Сульдина Е. В., Семанина Е. Н., Барт Н. Г., Ляшенко Е. А., Садртдинова Г. Р., Коритняк Б. М., Журавская Н. П., Золотухин Д. С., Кузнецов А. Ю., Молофеева Н. И., Пульчеровская Л. П., Пожарникова Е. Н., Шестаков А. Г., Викторов Д. А. – Ульяновск, 2017. – 176 с.

Научное издание.

ISBN 978-5-88504-110-2

Бактериофаги зооантропонозных и фитопатогенных бактерий.

В монографии представлены результаты научных исследований сотрудников кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы ФГБОУ ВО Ульяновского государственного аграрного университета имени П. А. Столыпина и НИИЦМиБ по бактериофагам, проведенным за период с 2000 по 2017 года. 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 для целей индикации микроорганизмов в пат материале и объектах окружающей среды

Научные исследования проводились 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), исследования проводятся при финансовой поддержки РФФИ16 - 44 – 732038 «Геномика и биология кандидатных бактериофагов для терапии энтеробактериальных инфекций в ветеринарной медицине», а так же при финансовой поддержки фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно – технической сфере «Участник молодёжного научно-инновационного конкурса» (УМНИК) – ныне фонд содействия инновациям, по грантам, полученным аспирантами и студентами кафедры за период 2015 – 2017 года исследования проводятся в соответствии с тематическим планом научно-исследовательских работ, выполняемых по заданию МСХ РФ в 2017 году.

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

BACTERIOPHAGES OF ZOOANTROPOZE AND PHYTOPATHOGENIC BACTERIA

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

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



Ulyanovsk
2017

Bacteriophages of zooantropoze and phytopathogenic bacteria

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 scientific research was conducted with the funding from the government by Ministry of Education and Science of the Russian Federation in framework of implementation of Federal Target Program “Scientific and research and educational personnel of innovative Russia” for 2009-2013 (the agreement № 8267dated 10.08.2012), the research are conducted with the funding from Russian Foundation for Basic Research 16-44-732038 “Genomics and biology of candidate bacteriophages for the therapy of enterobacterial infection in veterinary medicine”, and also with the funding from the Foundation for Assistance to Small Innovative Enterprises in Science and Technology “The Participant of Youth Scientific-Innovative competition”, nowadays Innovation Promotion Fund, by grants that were won by the Ph.D. candidates and students of the department over a period of 2015-2017.

ПРЕДИСЛОВИЕ

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

Фаги являются одним из наиболее удобным объектов для изучения ряда вирусологических проблем и, в частности, взаимоотношения вируса с клеткой-хозяином. С сороковых годов прошлого века 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. На данном объекте успешно разрабатывается проблема лизогении, имеющая общебиологическое значение для понимания молекулярных механизмов вирусного канцерогенеза и латентных вирусных инфекций.

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 материала. Именно с бактериофагами связано изучение наследственной изменчивости бактерий - трансдукция, фаговая конверсия. С помощью фагов проводятся широкие радиобиологические исследования, а также первичный отбор химиотерапевтических средств и некоторых антибиотиков против вирусных болезней и злокачественных опухолей.

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.

В течение трех - четырёх последних десятилетий XX века 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 тот период времени продолжали заниматься исследованиями в области бактериофагии. *Добавить из гранта.* Можно очень легко проследить развитие фаговой биологии, начиная с раннего, полного энтузиазма периода, в течение которого притязания были чрезмерными и часто нереальными, и в то время лишь немного понимали вирусную природу фагов и осознавали их сильные стороны и ограничения (с начала

1920-гг по 1930-е гг). Затем время чрезмерных ожиданий сменилось периодом снижения энтузиазма. Разработка фаговой терапии в большей части «Западного мира», с последующим замещением ее применения после Второй Мировой войны антибиотиками, и смещением акцентов к использованию фагов как моделей генетических систем. В то же время развитие фаговой терапии и ее активное применение продолжало расширяться и увеличиваться быстрыми темпами в Советском Союзе вплоть до его распада. На Западе «золотой век» основанного на фагах развития молекулярной биологии включал в себя старательные попытки при помощи всего лишь нескольких фагов инфицировать один авирулентный лабораторный клеточный хозяйский образец (*E. coli* В). Впоследствии фаговая терапия была «вновь открыта» в англо-язычной научной литературе в 1990-е годы. Однако, этот ренессанс западной фаговой терапии набрал обороты только в начале XXI века, и данный рывок произошел в значительной мере благодаря огромному множеству советских научных исследований и советских исследователей уехавших на «Запад». Зародившись в период тех бурных дней «Дикого Запада» в 1990-х и начавшись формироваться приблизительно к 2000 году, это продвижение было связано с бурным ростом геномики и широкомасштабным исследованием фагов с точки зрения экологии, совместного с самым последним периодом изучения как фаговой терапии, так и сфер ее приложения, он продолжается и по сей день. 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 вирусов, отсутствуют стандартные наборы фагов многих прокариот, вызывающих определенный интерес у человека, а также схемы и регламенты их практического применения.

Интерес к фагам у исследователей возродился сравнительно недавно по ряду причин и, прежде всего, прежде всего с возникновением множественно-устойчивых к антибиотикам возбудителей разных болезней. Кроме того, 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.

Кафедра микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы Ульяновского государственного аграрного университета определила как одно из своих 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. Он, будучи ещё аспирантом, под научным руководством доцента А.П. Васильева, с 1964 года проводил исследования по выделению и изучению биологических свойств бактериофагов *S.cholerae-suis*. Полученные материалы им оформлены в виде диссертации на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук, в последствие при дополнительных исследованиях, работа разрослась до объемов докторской. Работу по выделению и изучению бактериофагов патогенных энтеробактерий продолжил его аспирант С.Н. Золотухин. Большую научно-методическую помощь при работе с бактериофагами оказал заведующий лабораторией санитарной микробиологии ВНИИВСГиЭ, д.в.н., профессор Л.С. Каврук.

С появлением на кафедре д.б.н. Д.А. Васильева (1987г) и создание аспирантур по 4 инфекционным специальностям сформировалось одно из направлений исследований кафедры связанных с бактериофагами. В настоящий момент аспиранты и сотрудники кафедры занимаются изучением бактериофагов более чем у 30 видов микроорганизмов. Далеко не случайно первая, после развала СССР, Всероссийская конференция по бактериофагам, по просьбе исследователей вирусов прокариот из различных уголков страны (от Новосибирска до Пущино – на Оке), была проведена в Ульяновске, на базе УлГСХА (2013г). По сути, это была объединительная, знакомящая людей друг с другом конференция. Вторая была в Ленинграде, третья в Москве. Неслучайно и то, что Ульяновская ГСХА вошла в число учредителей «Национального общества исследователей бак-

териофагов» в нашей стране, наряду с такими крупными научно - исследовательскими центрами как ГНЦ ПМБ (Оболensk) и МНИИЭМ им Г.Н. Габричевского (Москва).

В настоящее время научное руководство исследований по изучению бактериофагов на кафедре возглавляют доктора биологических наук, профессора Д.А. Васильев и С.Н. Золотухин. Выбор данного направления обусловлен тем, что в последние годы, расширилось представление об этиологической роли в патологии животных и человека ранее малоизученных бактерий, 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), культуральные свойства, изучение которых не позволяет быстро и определённо идентифицировать искомые бактерии. 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. Эти методы фагодиагностики, разработанные в шестидесятых – семидесятых годах 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 проведения исследований в этой области медицины.

С конца прошлого и начала текущего столетия на базе кафедры ведется большая работа по выделению бактериофагов, активных против многих патогенных бактерий. Нами изучаются биологические свойства выделенных фагов, отбираются изоляты фагов с характерными, заданными для целей использования свойствами. В лабораториях кафедры и центра (НИИЦМБ) 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.*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria spp.*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis et al.*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus mesentericus*, *Bacillus 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 и др.

Целью для постановки задач послужили вопросы связанные с четырьмя сферами использования бактериофагов: 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 людьми в качестве пробиотической биологически активной добавки к пище для снижения риска развития спорадических случаев и эпидемических вспышек пищевых инфекций;

4 - фагоидентификация и индикация потенциально опасных микроорганизмов.

В предлагаемом издании представлены основные результаты научных исследований сотрудников кафедры микробиологии и научно-исследовательского, инновационного центра микробиологии и биотехнологии, по изучению примерно ста бактериофагов 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 шесть нормативных документов федерального уровня (РАСХН).

*Заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ
Ульяновского государственного аграрного университета,
д.б.н., профессор Д. А. Васильев.*

Данное издание предлагаемой книги обусловлено исследовательским материалом полученным коллективом кафедры за последние годы и стремлением представить более полный объём проводимой работы.

Представленные разделы (главы) входящие в предлагаемую научную монографию являются результатом исследований конкретного автора данного раздела и имеет свою собственную нумерацию таблиц и рисунков. Все исследования выполнены на кафедре и в центре (ВНИИЦМиБ). Они размещены в монографии в алфавитном (латинском) порядке.

Данные научные исследования представляют собой материалы диссертационных работ осуществлённых под руководством профессоров - Васильева Д. А, Золотухина С. Н, которые являются соавторами публикаций.

РАЗДЕЛ 1. БАКТЕРИОФАГИ РОДА *AEROMONAS* **CHAPTER 1. BACTERIOPHAGES OF *AEROMONAS* GENUS**

НАСИБУЛЛИН И. Р. **ИДЕНТИФИКАЦИЯ БАКТЕРИЙ *AEROMONAS HYDROPHILA*** **С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ВЫДЕЛЕННЫХ БАКТЕРИОФАГОВ**

NASIBULLIN I. R. **IDENTIFICATION OF *AEROMONAS HYDROPHILA* BACTERIA** **BASED ON THE OBTAINED BACTERIOPHAGES**

ИССЛЕДОВАНИЯ 2008-2013 гг.

История изучения бактерий рода *Aeromonas* насчитывает более ста лет. Долгое время их считали сапрофитами, но исследования последних лет позволяют отнести их к условным патогенам, вызывающим при определенных условиях заболевания людей и животных. Бактерии рода *Aeromonas* широко распространены в окружающей среде, их выделяют из речной воды, сточных вод, почвы, от гидробионтов, растений, теплокровных животных.

Бактериологическая индикация и идентификация аэромонад является трудоемким и длительным процессом. Типирование бактерии до вида *A. hydrophila* требует применения селективных сред и постановки достаточно сложных бактериологических тестов, что повышает процент ошибок и вероятность недостоверности полученных результатов. Это обуславливает необходимость поиска и разработки более специфического, быстрого, чувствительного и дешевого метода индикации и идентификации *A. hydrophila*. Этим требованиям отвечает метод использования специфического бактериофага. Серия бактериофагов к *A. hydrophila* получена в лаборатории кафедры микробиологии УГСХА, там же проведена их селекция по заданным показателям для использования в качестве биопрепарата для постановки РНФ.

Актуальность разработки методов детекции бактерий рода *Aeromonas* и, в частности, *Aeromonas hydrophila* в пищевой продукции из гидробионтов обусловлена тем, что контаминированные аэромонадами рыбное сырьё и продукция представляют собой источник пищевых и кормовых инфекций человека и животных.

Обнаружение и типирование аэромонад является трудоемким и длительным исследованием, затрачивающим до 120 часов [7, 8]. Типирование до рода *Aeromonas* требует применения сложных и дорогостоящих сред и проведения широкого перечня тестов, что формирует значительный процент ошибочных результатов. Внутривидовая идентификация бактерий данного рода из-за незначительных различий между видами сложна и может служить причиной получения ложных результатов анализов.

Перечисленное актуализирует необходимость разработки методов индикации бактерий рода *Aeromonas*, обладающих следующими критериями:

- быстрота исследования,
- простота в применении,
- высокая чувствительность,
- специфичность.

Метод фагодетекции полностью отвечает поставленным задачам. Строгая специфичность бактериофагов позволяет дифференцировать отдельные виды. Согласно литературным данным, наборы тест-систем на основе бактериофагов для диагностики аэромонадных инфекций в насто-

ящее время отсутствуют.

Для реализации названного метода нами был разработан биопрепарат на основе выделенного и изученного бактериофага Ф43-УГСХА и параметры его применения в схеме фагодетекции.

Материалы и методы исследования. Для выделения бактериофагов были исследованы 103 пробы воды из водоемов Ульяновской области. В качестве индикаторной культуры использовали референс-штамм *A. hydrophila* A.h.-43, полученный из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы Ульяновской ГСХА им. П.А. Столыпина. Выделение и изучение биологических свойств фагов проводили по методам, описанным С.Н. Золотухиным (2007), Д.А. Викторовым (2011).

Исследуемый материал предварительно фильтровали через бумажный фильтр для удаления механических примесей. Затем в колбу с концентрированным стерильным мясо-пептонным бульоном вносили пробы материала из расчета, чтобы после смешивания получить среду приемлемой концентрации. Туда же добавляли по 1,0 мл 18-24-часовой бульонной индикаторной культуры *A. hydrophila* A.h.-43. Колбу с содержимым инкубировали в термостате при 35 °С (оптимальные условия для *A. hydrophila*) в течение 24-48 часов. Затем содержимое колбы в количестве 10,0 мл переносили в стерильные пробирки. С целью очистки от бактериальной микрофлоры материал центрифугировали при 3000 об/мин в течение 40 минут. Надосадочную жидкость обрабатывали хлороформом в соотношении 1:10 в течение 10 минут, прогревали в водяной бане при температуре 58-60 °С в течение 30 минут, фильтровали на установке вакуумной фильтрации фирмы «Millipore» через мембранные фильтры с диаметром пор 0,2 мкм. Наличие бактериофагов в полученных субстратах определяли по методу агаровых слоев по Грациа, а также с помощью спот-теста. Наличие зон лизиса или негативных колоний на газоне индикаторной культуры указывало на присутствие бактериофага в исследуемом материале.

Селекцию бактериофагов и повышение их литической активности проводили пассированием фагов на бактериальной культуре штамма *A. hydrophila* A.h.-43 с периодическим пересевом типичных для данного изолята негативных колоний. Основные биологические свойства выделенных бактериофагов изучались по общепринятым методикам. Литическую активность определяли методами Аппельмана и Грациа. Для определения спектра литической активности применяли референс-штамм и выделенные нами ранее 14 полевых штаммов. Для определения специфичности использовали штаммы бактерий гетерологичных родов: *Proteus*, *Morganella*, *Klebsiella*, *Bacillus*, *Citrobacter*, *Yersinia*, *Pseudomonas*, полученные из музея кафедры. Реакцию нарастания титра фага проводили по методам, изложенным в работах Васильева Д.А., Викторова Д.А.

В результате нами было выделено 5 изолятов бактериофагов, активных в отношении бактерий *A. hydrophila*. Выделенные бактериофаги на газоне индикаторной культуры имели округлые прозрачные негативные колонии диаметром 0,5-1,0 мм. Литическая активность селекционированных фагов по методу Аппельмана составила от 10^{-5} до 10^{-8} , по методу Грациа от $3,0(\pm 0,2) \times 10^5$ до $2,0(\pm 0,1) \times 10^8$ БОЕ/мл.

Для изучения спектра литической активности выделенных нами фагов мы использовали 15 имеющихся у нас штаммов бактерий *A. hydrophila*. Для этого исследуемые бактериофаги в концентрации 10^7 - 10^9 БОЕ/мл наносили на газон изучаемой бактериальной культуры. По результатам исследований, спектр литической активности выделенных нами бактериофагов составил от 13,3 до 86,7 % из 15 имеющихся у нас штаммов бактерий вида *Aeromonas hydrophila* (рис. 1).

Для изучения температурной устойчивости выделенных бактериофагов, фаголизаты прогревали в ультратермостате при температуре от 58 °С до 66 °С с интервалом 2 °С в течение 30 минут. По результатам проведенных исследований все изучаемые бактериофаги являлись термолабильными.

Для определения устойчивости выделенных бактериофагов к воздействию хлороформа, разведения фагов обрабатывали хлороформом в соотношении 1:10 в течение 15, 30, 45 минут с обязательной постановкой контроля и определения количества негативных колоний методом агаровых слоев по Грациа.

Исходя из результатов, приведённых в таблице 1, выделенные бактериофаги являются устойчивыми к воздействию хлороформа в соотношении 1:10 до 45 минут (сроки наблюдения).

Для определения специфичности выделенных бактериофагов были использованы гетерологичные штаммы бактерий родов *Yersinia*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Klebsiella*, *Enterococcus*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Bacillus*, а также штаммы бактерий рода *Aeromonas*: *Aeromonas veronii biogroup sobria* ATCC 9071, *Aeromonas caviae* ATCC 15468, *Aeromonas salmonicida* ATCC 33658, полученные из музея кафедры. Специфичность определяли методом нанесения бактериофагов в концентрации 10^8 - 10^9 БОЕ/мл на газон исследуемой культуры. Отсутствие лизиса на газоне бактерий гетерологичных родов и видов свидетельствовало о видовой специфичности выделенных бактериофагов по отношению к *Aeromonas hydrophila*.

По результатам проведённых исследований в целях разработки биопрепарата для детекции *A. hydrophila* наиболее приемлемым явился бактериофаг Ф-43 УГСХА, обладающий всеми необходимыми для проведения РНФ свойствами: титр $2,0 \times 10^8$ (таблица 2), спектр литической активности 86,7 %, строгая специфичность по отношению к бактерии *A. hydrophila*.

Разработка количественного показателя РНФ. Количественный показатель РНФ – это время взаимодействия исследуемого материала с фагом, обеспечивающим гарантированную индикацию и идентификацию 10^3 микробных клеток в 1 мл. изучаемого субстрата. В ходе исследований наш бактериофаг *A. hydrophila* 43-УГСХА использовали в разведении 10^3 корпускул в 1 мл. Индикаторную культуру *A. hydrophila* по 1 мл в концентрации 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 м. к./мл вносили в предварительно приготовленные колбы с 50 мл МПБ. Колбы тщательно перемешивали по 10 минут. Для каждого разведения контроля и культуры приготовили по 3 пробирки. В ходе разведений, проводимых по схеме, получали: - пробирка №1 – опытная, содержит 9 мл исследуемого материала из колбы и 1 мл бактериофага; - пробирка №2 – контроль на присутствие свободного фага, содержит 9 мл из колбы с разведением культуры на 1 мл стерильного МПБ; - пробирка №3 – контроль титра индикаторного фага, содержит 1 мл бактериофага и 9 мл стерильного МПБ. Проводим контроль стерильности сред. Пробирки культивируем в течение 5 часов при температуре 37°C. По окончании инкубирования в пробирки добавляем стерильный МПБ.

Реакцию проводили по схеме, представленной на рисунке 2.

Содержимое пробирок фильтровали через мембранные фильтры на установке вакуумной фильтрации фирмы «Millipore», для удаления бактерий. Для определения числа корпускул бактериофага 43-УГСХА использовали метод агаровых слоев по Грациа. Учет результатов производили подсчитыванием числа негативных колоний, появившихся на чашках Петри после инкубирования их при 37°C в течение 12 часов. Для подсчета титра нарастания фага необходимо сравнить число колоний на чашке №1 (опытная) и чашке №3 (контроль титра фага). При лизисе культуры в чашке №2 реакция не учитывается.

Исследования по выявлению оптимального времени постановки РНФ. Оптимальное время проведения РНФ – это время выдержки исследуемого материала с бактериофагом, позволяющее обеспечить индикацию и идентификацию бактерий в концентрации 10^3 м. к./мл. По выявлению поставленной задачи - определению эффективного параметра взаимодействия бактериофага *A. hydrophila* 43-УГСХА и бактерий *A. hydrophila* эксперименты ставились опыты при сохранении других показателей постановки РНФ. Выбор оптимума времени экспозиции делали из следующих параметров:

- увеличение показателей экспозиции бактериофага и опытного материала до 7, 10, 16, 24 часов при температуре 37°C;
- предварительное подращивание исследуемого материала в течение 5, 16, 24 часов при температуре 37°C, с последующим, после добавления бактериофага, инкубированием смеси в термостате в течение 5 часов при температуре 37°C;

Метод РНФ с предварительным подращиванием материала: колбы с 50 мл стерильного МПБ засевают бактериями *A. hydrophila* в концентрации от 10^1 до 10^5 м. к./мл; перемешивают - 10 минут и инкубируют в 5, 16, 24 часа при температуре 37°C. По окончании инкубации проводится РНФ по схеме (рис. 2). Для каждой опытной пробы по 3 пробирки: - №1 – опытная, - №2 – контроль на свободный фаг, - №3 – контроль титра индикаторного фага.

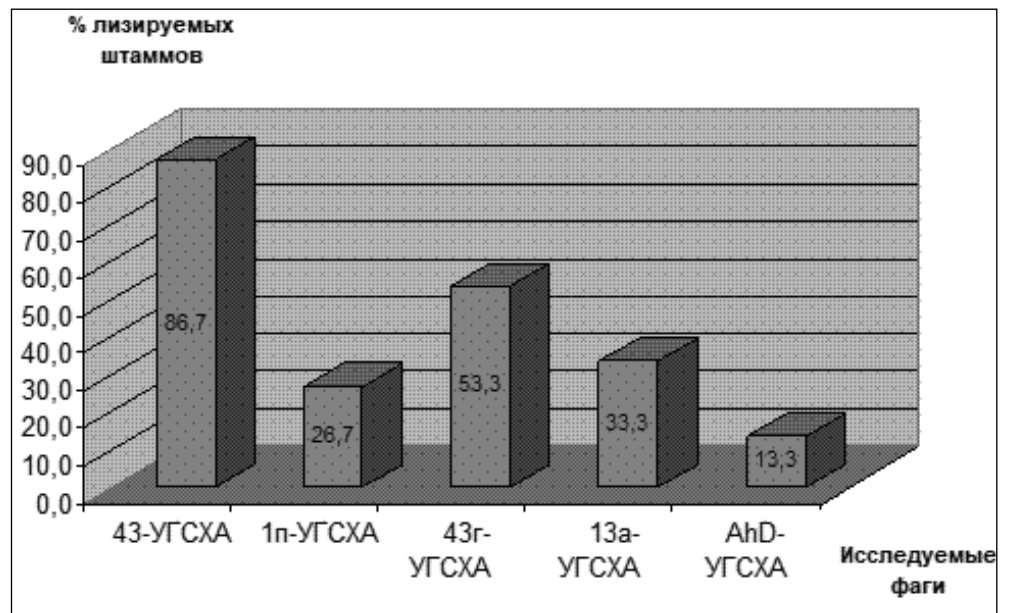


Рисунок 1. Спектр литической активности выделенных бактериофагов.

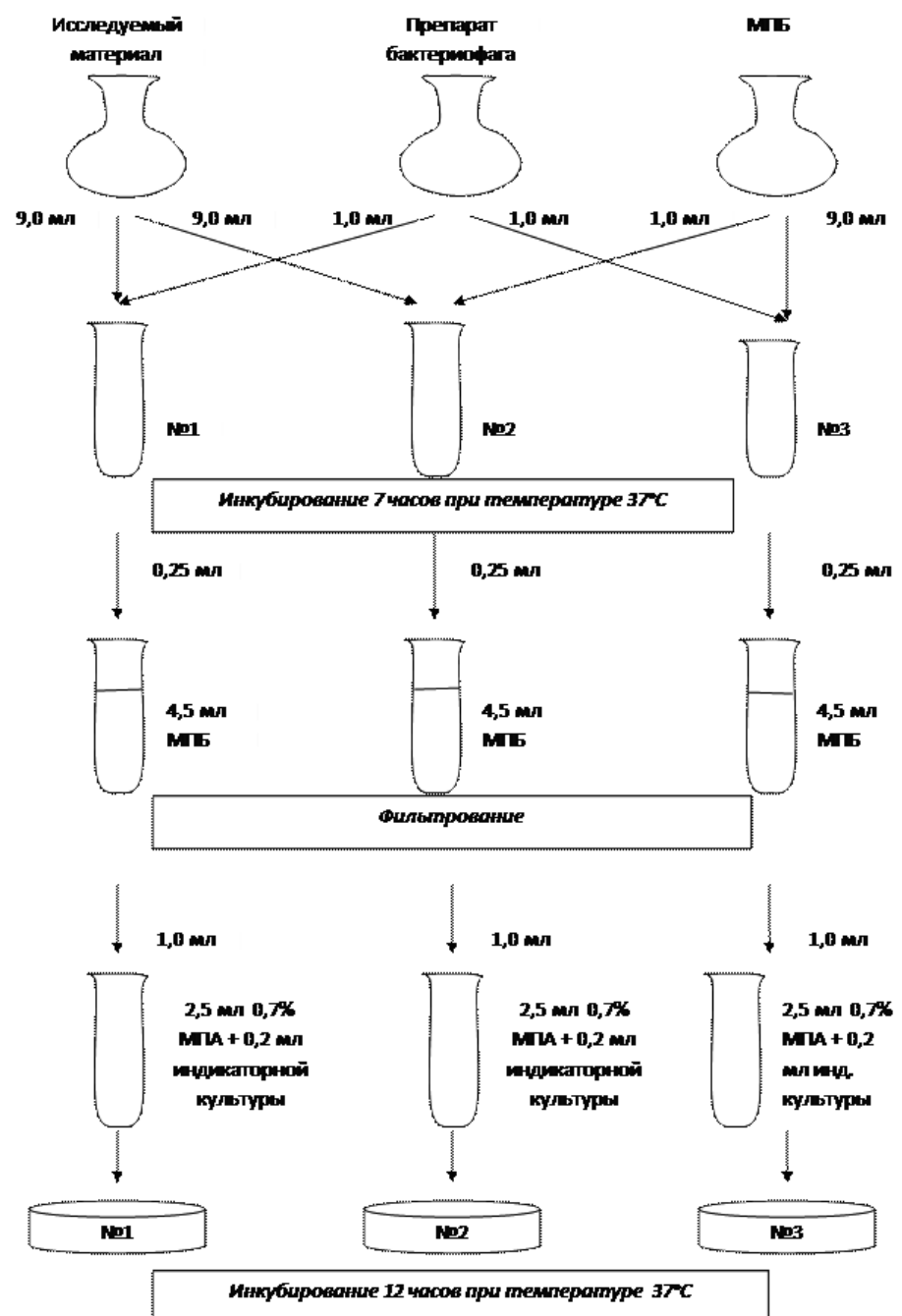


Рис. 2. Схема индикации бактерий *A. hydrophila* методом РНФ.

Пробирки инкубируются при температуре 37°C в течение 5 часов. После этого смесь из пробирок фильтровали через мембранные фильтры вакуумной фильтрации фирмы «Millipore» для удаления бактерий, и исследовали методом агаровых слоев по Грациа. Чашки инкубировали при температуре 37°C в течение 12 часов в перевернутом виде. Результаты представлены в таблице 3.

В ходе опытов установили чувствительность РНФ в зависимости от времени предварительно подращивания опытного материала при температуре 37°C в течение 5, 16, 24 часов и последующего инкубирования с бактериофагом 43-УГСХА в течение 5 часов. Инкубация агаровых слоев для подсчитывания негативных колоний 12 часов. В итоге, время, необходимое для проведения опытов с помощью РНФ, составляет 22, 33, 41 час. Бактерии *A. hydrophila* были обнаружены в концентрации 10^3 м. к./мл. Предварительная инкубация в течение 16 часов увеличила чувствительность РНФ до 10^2 м. к./мл. Значит, 24-часовая экспозиция подращивания кардинально не влияет на результаты РНФ.

Дальнейшей работой стало изучение чувствительности РНФ в зависимости от времени инкубирования опытного материала с бактериофагом. Для этого индикаторную культуру бактерий *A. hydrophila* в концентрации от 10^1 до 10^5 м. к./мл, не инкубируя в термостате, помещали в пробирке и исследовали методом РНФ по схеме на рисунке №1. На каждую опытную пробу необходимо 3 пробирки:

- пробирка №1 содержит 1,0 мл бактериофага и 9,0 мл опытного материала и является опытной;
- пробирка №2 содержит 9,0 мл опытного материала и 1 мл стерильного МПБ и является контролем на свободный фаг;
- пробирка №3 содержит 1,0 мл бактериофага и 9,0 мл стерильного МПБ и служит контролем титра индикаторного бактериофага.

Пробирки инкубировали при температуре 37°C в течение 7, 10, 16, 24 часов. По завершению инкубации из пробирок отбирали по 0,25 мл опытного материала и помещали в пробирки с 4,5 мл стерильного МПБ. Содержимое пробирок фильтровали через мембранные фильтры фирмы «Millipore» и исследовали методом агаровых слоев по Грациа. Чашки с материалом инкубировали при 37°C в течение 12 часов. В результате, время, необходимое для осуществления опыта с помощью РНФ, составило 19, 22, 28 и 36 часов соответственно. Проведенные нами исследования показали, что при инкубировании опытного материала в течение 7 часов бактерии *A. hydrophila* были обнаружены при постановке РНФ в концентрации 10^3 м. к./мл за 19 часов (таблица 4). Инкубация опытного материала с бактериофагом 43-УГСХА в течение 10 часов обнаружила бактерии *A. hydrophila* в концентрации 10^3 м. к./мл. Инкубация 16 и 24-часовая увеличили чувствительность реакции до концентрации 10^2 м. к./мл, но и увеличили время, необходимое для постановки РНФ.

Результаты экспериментов указывают, что наиболее оптимальным будет параметр постановки РНФ при 7-часовой экспозиции экспериментального материала с бактериофагами без предварительного подращивания так как, можно провести индикацию бактерий *A. hydrophila* при величине показателя 10^3 м. к./мл экспериментального материала и затрачивать 19-24 часа. Этот режим мы и будем использовать в дальнейшей работе.

Исследование с помощью РНФ озерной воды, контаминированной бактериями *A. hydrophila*. Пробы озерной воды в объеме 5,0 мл вносили в колбы со стерильным МПБ (50 мл) и контаминировали штаммом *A. hydrophila* в концентрации от 10^1 до 10^5 м. к./мл. Контроль – колба с озерной водой, не контаминированная бактериями *A. hydrophila*. Постановку РНФ проводили по схеме для всех разведений культуры. На каждую пробу использовали 3 пробирки: - №1 – опытная, №2 – контроль на свободный фаг, №3 – контроль титра индикаторного бактериофага.

Содержимое каждой колбы по 9,0 мл разливали в пробирки №1 и №2, в пробирке №3 находилось 9,0 мл МПБ. В пробирки №1 и №3 добавляли по 1,0 мл индикаторного бактериофага 43-УГСХА в рабочем разведении; в пробирку №2 добавляли 1,0 мл стерильного МПБ. Все пробирки инкубировали 7 часов при температуре 37°C. Параллельно делали контроль стерильности. По окончании инкубации 0,25 содержимого пробирок вносили в пробирки с 4,5 мл стерильного МПБ и фильтровали через мембранные фильтры фирмы «Millipore», фильтрат исследовали методом

Таблица 1. Результаты исследования устойчивости выделенных бактериофагов к обработке хлороформом.

№ пп	Штаммы бактериофагов	Титр исследуемых бактериофагов по Грациа, БОЕ/мл			
		Контроль	Время обработки хлороформом, мин.		
			15	30	45
1	Фаг43-УГСХА	2,0×10 ⁸	4,0×10 ⁸	3,0×10 ⁸	1,0×10 ⁸
2	Фаг1п-УГСХА	4,0×10 ⁶	5,0×10 ⁶	4,0×10 ⁶	4,0×10 ⁶
3	Фаг43г-УГСХА	3,0×10 ⁷	5,0×10 ⁷	4,0×10 ⁷	3,0×10 ⁷
4	Фаг13-УГСХА	5,0×10 ⁵	7,0×10 ⁵	6,0×10 ⁵	6,0×10 ⁵
5	ФагAhD-УГСХА	1,0×10 ⁸	3,0×10 ⁸	3,0×10 ⁸	1,0×10 ⁸

Таблица 2. Литическая активность выделенных бактериофагов.

Фаги	Литическая активность	
	по Аппельману (степень разведения)	по Грациа, БОЕ/мл
43-УГСХА	10 ⁻⁸	2,0×10 ⁸
1п-УГСХА	10 ⁻⁵	4,0×10 ⁶
43г-УГСХА	10 ⁻⁷	3,0×10 ⁷
13а-УГСХА	10 ⁻⁵	5,0×10 ⁵
AhD-УГСХА	10 ⁻⁷	1,0×10 ⁸

Таблица 3. Показатели чувствительность РНФ в зависимости от времени предварительного подрачивания опытного материала с бактериофагом *A. hydrophila* 43-УГСХА.

Время контакта, часов	Концентрация индикаторной культуры, м. к./мл					Время на исследование
	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	
5	-	-	-	+	+	22
16	-	-	+	+	+	33
24	-	-	+	+	+	41

Таблица 4. Чувствительность РНФ в зависимости от времени инкубирования опытного материала с бактериофагом 43-УГСХА без подрачивания.

Время контакта, часов	Концентрация индикаторной культуры, м. к./мл					Время на исследование
	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	
5	-	-	-	-	+	17
7	-	-	-	+	+	19
10	-	-	-	+	+	22
16	-	-	+	+	+	28
24	-	-	+	+	+	36

Таблица 5. Результат РНФ бактериофага *A. hydrophila* 43-УГСХА при исследовании озерной воды, контаминированной бактериями *A. hydrophila*.

Концентрация индикаторной культуры, м. к./мл	Количество негативных колоний, штук			Нарастание титра, раз	Результат РНФ
	Чашка №1	Чашка №2	Чашка №3		
10 ¹	5	-	6	-	-
10 ²	20	-	8	2	-
10 ³	70	-	10	7	+
10 ⁴	150	-	11	более 20	+
10 ⁵	лизис	-		более 20	
Контроль	6	-	8	-	-

агаровых слоев по Грациа. Чашки с посевами инкубировали в термостате при температуре 37°C в течение 12 часов. В результате исследования установили, что увеличение титра бактериофага *A. hydrophila* 43-УГСХА более чем в 5 раз произошло при концентрации бактерий *A. hydrophila* 10³ м.к./мл (таблица 5).

Исследование методом РНФ патологического материала из рыб, контаминированного бактериями *A. hydrophila*. Пробы внутренних органов рыб весом 5 г растирали в фарфоровой ступке и помещали в колбы с 50 мл МПБ, контаминировали бактериями *A. hydrophila* в концентрации от 10¹ до 10⁵ м. к./мл. Реакцию проводили по схеме. На каждую пробу использовали 3 пробирки: пробирка №1 – опытная, пробирка №2 – контроль свободного фага, пробирка №3 – контроль титра индикаторного бактериофага.

Содержимое каждой колбы разливали по 9,0 мл по пробиркам №1 и №2; в пробирку №3 наливали 9,0 мл стерильного МПБ. Бактериофаг в рабочем разведении вносили по 1,0 мл в пробирки №1 и №3; в пробирку №2 добавляли 1,0 мл стерильного МПБ. Пробирки инкубировали в течение 7 часов при температуре 37°C. После инкубации 0,25 опытного материала из пробирок добавляли в пробирки с 4,5 мл стерильного МПБ. Для удаления бактерий опытный материал фильтровали через мембранные фильтры фирмы «Millipore» и засеивали по методу агаровых слоев по Грациа. Инкубировали при температуре 37°C в течение 12 часов. Результаты опыта в таблице 6.

В ходе исследований установили, что в паренхиматозных органах из рыб, контаминированных бактериями *A. hydrophila* при помощи реакции РНФ, получили положительный результат при концентрации бактерий в количестве 10³ м. к./мл, без выделения чистой культуры, в присутствии посторонней микрофлоры.

Исследование методом РНФ сырого молока, контаминированного бактериями *A. hydrophila*. Пробы сырого молока в объеме 5 мл добавляли в колбы, содержащие 50 мл стерильного МПБ и контаминировали бактериями *A. hydrophila* в концентрации от 10¹ до 10⁵ м. к./мл, тщательно перемешивали в течение 10 минут. Контролем служила колба с пробой сырого молока без контаминации

Таблица 6. Результат РНФ бактериофага *A. hydrophila* 43-УГСХА при изучении патологического материала из рыб, контаминированного бактериями *A. hydrophila*.

Концентрация индикаторной культуры, м. к./мл	Количество негативных колоний, штук			Нарастание титра, раз	Результат РНФ
	Чашка №1	Чашка №2	Чашка №3		
10 ¹	10	-	8	-	-
10 ²	18	-	12	-	-
10 ³	90	-	15	более 5	+
10 ⁴	лизис	-	10	более 20	+
10 ⁵	лизис	-	14	более 20	+
Контроль	6	-	9	-	-

Таблица 7. Результат РНФ бактериофага *A. hydrophila* 43-УГСХА при изучении сырого молока, контаминированного бактериями *A. hydrophila*.

Концентрация индикаторной культуры, м. к./мл	Количество негативных колоний, штук			Нарастание титра, раз	Результат РНФ
	Чашка №1	Чашка №2	Чашка №3		
10 ¹	6	-	7	-	-
10 ²	10	-	10	-	-
10 ³	60	-	8	более 5	+
10 ⁴	лизис	-	12	более 20	
10 ⁵	лизис	-	3	более 20	
Контроль	4	-	9	-	-

бактериями *A. hydrophila*. Реакцию делали по схеме (рисунок №1), для каждого разведения культуры. На каждую пробу готовили по 3 пробирки: пробирка №1 – опытная, пробирка №2 – контроль свободного фага, пробирка №3 – контроль титра индикаторного бактериофага.

Из каждой колбы в пробирки №1 и №2 добавляли по 9,0 мл опытного содержимого; в пробирку №3 добавляли 9,0 мл стерильного МПБ. Индикаторный бактериофаг 43-УГСХА по 1,0 мл добавляли в пробирки №1 и №3; в пробирку №2 добавляли 1,0 мл стерильного МПБ. Одновременно делали контроль сред. Опытные образцы в пробирках помещали в термостат при температуре 37°C на 7 часов. После инкубации 0,25 из каждой опытной пробирки добавляли в пробирки с 4,5 мл МПБ, фильтровали через мембранные фильтры фирмы «Millipor» для удаления бактерий и исследовали методом агаровых слоев. Чашки инкубировали в условиях термостата при температуре 37°C в течение 12 - 16 часов. Увеличение титра фага в 5 и более раз при исследовании сырого молока установлено в образцах, контаминированных бактериями *A. hydrophila* при концентрации 10^3 м. к./мл, результат РНФ положительный. Результаты опыта в таблице 7.

В результате экспериментов по изучению методом РНФ объектов внешней среды (озерная вода, сырое молоко, патологический материал из рыб) при помощи бактериофага *A. hydrophila* 43-УГСХА нами выявлены бактерии *A. hydrophila* при концентрации 10^3 м. к./мл в указанных объектах, без выделения чистой культуры за 19 - 24 часа. При бактериологическом методе исследования указанных объектов внешней среды затрачивается от 2-х до 4-х суток, а индикация и идентификация бактерий *A. hydrophila* в случае положительного результата составляет не менее 10^4 м. к./мл.

КУКЛИНА Н. Г.

**ВЫДЕЛЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ ОСНОВНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ
СВОЙСТВ БАКТЕРИОФАГОВ ДЛЯ ИНДИКАЦИИ
И ИДЕНТИФИКАЦИИ *AEROMONAS SALMONICIDA***

KUKLINA N.G.

**THE DETACHMENT AND STUDY OF THE BASIC BIOLOGICAL
PROPERTIES OF BACTERIOPHAGE FOR INDICATION
AND IDENTIFICATION OF *AEROMONAS SALMONICIDA***

ИССЛЕДОВАНИЯ 2009-2014 гг

Бактерии рода *Aeromonas* были идентифицированы еще в конце XIX века, длительное время их считали сапрофитами, циркулирующими в воде открытых водоемов. Аэромонады широко распространены в окружающей среде: их выделяют из речной и морской воды, сточных вод, почвы, от гидробионтов (рыб, кальмаров, крабов, креветок и т.п.) (Khadori, Fainstein, 1988). Бактерия *A. salmonicida* является возбудителем фурункулеза (аэромоноза) лососевых, который был впервые описан Эммерихом и Вайбелем еще в 1894 году в Германии (Kumar D., 1997). До недавнего времени считалось, что *A. salmonicida* поражает рыб только семейства лососевые, но современные исследования показывают, увеличение количество инфицированных рыб других семейств. (Janda J.M. et al., 2010). Фурункулез - это высококонтагиозная болезнь, протекающая остро, подостро и хронически. Зараженные рыбы с открытыми ранами являются источниками распространения *A. salmonicida*. В связи с высокой плотностью выращивания рыбы в хозяйствах, эта болезнь быстро распространяется с высоким процентом летальности (Головина Н.А., и др., 2003).

В настоящее время не существует достаточно четкой разработанной схемы выделения и идентификации данного микроорганизма, а значит и бактериологической диагностики данного заболевания.

Цель исследования – разработка методов выделения, идентификации и индикации бактерии *A. salmonicida*.

Материалы и методы. Для изучения специфичности бактериофагов нами были использованы следующие референс-штаммы бактерий – *A. salmonicida* ATCC 33658, *A. hydrophila* ATCC 49140, *A. sobria* ATCC 9071, *A. caveae* ATCC 12633, *Ps. putida* №12633, *Ps. aeruginosa* №128, *Ps. fluorescens* №13525, *Y. ruckeri* №6, *Y. enterocolitica*, *P. mirabilis* №523, *Kl. pneumonia* №4463, *E. coli* №4, полученные из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ при ФГБОУ ВПО Ульяновской ГСХА им. П.А. Столыпина, а также 23 «полевых» штамма, выделенных из объектов водной среды г. Ульяновска и Ульяновской области. Все штаммы обладают типичными биологическими свойствами для бактерий указанного вида.

Характеристика выделенных бактериофагов *A. salmonicida*. Для получения искомым бактериофагов с целью использования их согласно поставленным задачам нами были проведены эксперименты по двум схемам выделения фагов: первая - из объектов санитарного надзора методом накопления, предложенным Гольдфарбом (1961) в модификации Викторова Д.А. (2011), вторая - методом индукции (Каттер, 2012).

При постановке эксперимента по выделению фагов методом накопления использовался индикаторный штамм *A. salmonicida* №1asl, в результате получено 15 активных фагов (Asl11-УГСХА, Asl23-УГСХА, Asl25- УГСХА, Asl1- УГСХА, Asl10- УГСХА, Asl24- УГСХА, Asl10/2-УГСХА, Asl27-УГСХА, Asl31/2-УГСХА, Asl33-УГСХА, Asl47-УГСХА, Asl52-УГСХА, Asl58/3-УГСХА, Asl64-УГСХА, Asl70-УГСХА). Методом индукции было выделено 2 штамма бактериофага (Asl05-УГСХА, Asl017-УГСХА).

После выделения нами были изучены следующие биологические свойства фагов: морфология негативных колоний, литическая активность, спектр литической активности, специфичность действия, температурная устойчивость и устойчивость к воздействию хлороформа. Выделенные бактериофаги имели различные типы негативных колоний: диаметр от 0,5 до 2,0 мм, прозрачные и полупрозрачные, с зоной вторичного лизиса и без нее. Результаты определения специфичности всех выделенных бактериофагов с бактериями вышеуказанных видов и родов показали, что они строго специфичны по отношению к *A. salmonicida* и не лизируют бактерии других видов. Литическая активность выделенных фагов по Грациа и Аппельмана представлена в таблице 1.

По результатам полученных данных в дальнейших исследованиях было решено использовать в качестве базовых для создания биопрепарата наиболее активные бактериофаги Asl10/2-УГСХА, Asl25- УГСХА, Asl11-УГСХА, которые характеризуются наибольшим числом активных корпускул в 1 мл.

Спектр литической активности нами был изучен на 24 штаммах – 1 референс-штамм *A. salmonicida* и 23 «полевых» штамма. Наиболее широким спектром литической активности к исследуемым культурам обладал штамм фага Asl25- УГСХА, который лизировал 21 из 24 штаммов *A. salmonicida* (87,5%). Фаг Asl10/2-УГСХА лизировал 19 из 24 штаммов (79,2%). Фаг Asl11-УГСХА лизировал 17 из 24 штаммов (70,8%). Результаты изучения температурной устойчивости показали, что прогревание бактериофага Asl25- УГСХА при температуре 45-47°C не оказывает влияния на содержание активных корпускул фага в 1 мл. Прогревание бактериофагов Asl10/2-УГСХА и Asl11-УГСХА до температуры 45°C не приводит к изменению числа титра фага, при повышении температуры – титр постепенно снижается. Дальнейшее повышение температуры приводит к снижению активности фага. При нагревании фага до 55°C и выше – бактериофаги погибают (табл. 2).

Все три бактериофага оказались не устойчивы к воздействию хлороформа (табл 3).

По результатам исследования основных биологических свойств выделенных бактериофагов для дальнейшего конструирования бактериофагового биопрепарата был выбран бактериофаг Asl25- УГСХА, имеющий достаточно высокий спектр литической активности – 87,5%; уровень литической активности составляет $3 \times 10^9 \pm 0,2 \times 10^9$ по Грациа и 10^8 по Аппельману; строго специфичен; температурная устойчивость до 45-47°C, от 55°C погибает; к хлороформу не устойчив.

Разработка технологических параметров изготовления и контроля бактериофагового биопрепарата *A. salmonicida*. Для лабораторного производства и контроля качества разрабатываемого нами фагового биопрепарата нами были проведены исследования по определению опти-

Таблица 1. Литическая активность выделенных бактериофагов по Грациа и Аппельману

№ п/п	Название фага	Титр по Грациа	Титр по Аппельману
1.	Asl11-УГСХА	$2 \times 10^9 \pm 0,1 \times 10^9$	10^{-9}
2.	Asl23-УГСХА	$4 \times 10^7 \pm 0,7 \times 10^7$	10^{-6}
3.	Asl25- УГСХА	$3 \times 10^9 \pm 0,2 \times 10^9$	10^{-8}
4.	Asl1- УГСХА	$5 \times 10^8 \pm 0,1 \times 10^8$	10^{-9}
5.	Asl10- УГСХА	$3 \times 10^8 \pm 0,5 \times 10^8$	10^{-8}
6.	Asl24- УГСХА	$5 \times 10^7 \pm 1,6 \times 10^7$	10^{-6}
7.	Asl10/2-УГСХА	$4 \times 10^9 \pm 1,2 \times 10^9$	10^{-9}
8.	Asl27-УГСХА	$4 \times 10^6 \pm 0,7 \times 10^6$	10^{-5}
9.	Asl31/2-УГСХА	$5 \times 10^7 \pm 1,2 \times 10^7$	10^{-6}
10.	Asl33-УГСХА	$5 \times 10^7 \pm 0,8 \times 10^7$	10^{-7}
11.	Asl47-УГСХА	$3 \times 10^4 \pm 0,4 \times 10^4$	10^{-4}
12.	Asl52-УГСХА	$2 \times 10^3 \pm 0,5 \times 10^3$	10^{-4}
13.	Asl58/3-УГСХА	$7 \times 10^6 \pm 1,5 \times 10^6$	10^{-5}
14.	Asl64-УГСХА	$2 \times 10^4 \pm 0,3 \times 10^4$	10^{-5}
15.	Asl70-УГСХА	$4 \times 10^6 \pm 0,2 \times 10^6$	10^{-7}
16.	Asl05-УГСХА	$2 \times 10^5 \pm 1,7 \times 10^5$	10^{-6}
17.	Asl017-УГСХА	$3 \times 10^6 \pm 2,1 \times 10^6$	10^{-6}

Таблица 2. Изменение титра бактериофагов Asl25- УГСХА, Asl10/2-УГСХА, Asl11-УГСХА при увеличении температуры культивирования

Температура, °С	Титр бактериофага Asl25-УГСХА	Титр бактериофага Asl10/2-УГСХА	Титр бактериофага Asl11-УГСХА
45	$0,3 \times 10^9 \pm 0,1 \times 10^9$	$0,4 \times 10^9 \pm 0,9 \times 10^9$	$0,2 \times 10^9 \pm 0,1 \times 10^9$
47	$0,3 \times 10^9 \pm 0,2 \times 10^9$	$0,5 \times 10^8 \pm 1,1 \times 10^8$	$0,2 \times 10^7 \pm 0,2 \times 10^7$
49	$0,4 \times 10^6 \pm 0,2 \times 10^6$	$0,4 \times 10^7 \pm 0,9 \times 10^7$	$0,4 \times 10^6 \pm 0,4 \times 10^6$
51	$0,7 \times 10^5 \pm 0,7 \times 10^5$	$0,8 \times 10^5 \pm 1,1 \times 10^5$	$0,3 \times 10^5 \pm 0,3 \times 10^5$
53	$0,5 \times 10^3 \pm 0,4 \times 10^3$	$0,6 \times 10^4 \pm 0,8 \times 10^4$	$0,5 \times 10^4 \pm 0,1 \times 10^4$
55	-	-	-
57	-	-	-
59	-	-	-
61	-	-	-
Контроль фага	$0,3 \times 10^9 \pm 0,2 \times 10^9$	$0,4 \times 10^9 \pm 1,2 \times 10^9$	$0,2 \times 10^9 \pm 0,1 \times 10^9$

Примечание: «-» - отсутствие лизиса.

Таблица 3. Устойчивость фагов к воздействию хлороформа.

№	Фаг	Количество активных корпускул фага в 1 мл				
		Обработка 10 мин.	Обработка 20 мин.	Обработка 30 мин.	Обработка 40 мин.	Контроль
1.	Asl25- УГСХА	-	-	-	-	$0,3 \times 10^9 \pm 0,2 \times 10^9$
2.	Asl10/2-УГСХА	-	-	-	-	$0,4 \times 10^9 \pm 1,2 \times 10^9$
3.	Asl11-УГСХА	-	-	-	-	$0,2 \times 10^9 \pm 0,1 \times 10^9$

Примечание: «-» - отсутствие лизиса.

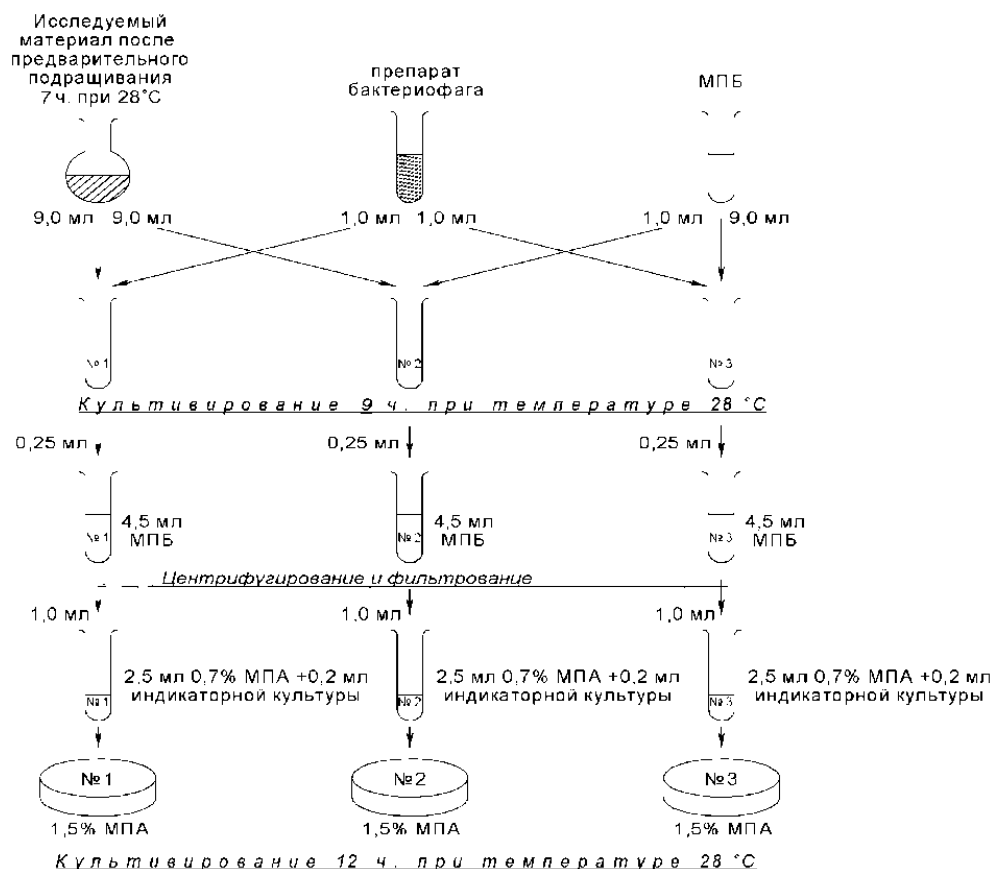


Рисунок 1. Схема постановки реакции нарастания титра фага для индикации бактерий *A. salmonicida*.

мальных технологических параметров изготовления и контроля биопрепарата для идентификации и индикации *A. salmonicida*.

Фаговый препарат готовится на МПБ. Оптимальные технологические параметры: температура культивирования фага Asl25- УГСХА 20-28 °С, время пассажа – 12 часов, соотношение бактериофага и бактериальной культуры – 1:2, титр биопрепарата не ниже $4 \times 10^9 \pm 0,1 \times 10^9$ по Грациа и не ниже 10^9 по Аппельману. Биопрепарат хранится в условиях холодильника при температуре 4-6 °С в герметичных флаконах до 3-х месяцев без снижения активности (сроки наблюдения).

Разработка условий постановки реакции нарастания титра фага с применением биопрепарата бактериофага Asl25- УГСХА. Для индикации бактерий *A. salmonicida* при помощи бактериофагового биопрепарата созданного на основе бактериофага Asl25- УГСХА были разработаны и модифицированы применительно к указанным бактериям и бактериофагам оптимальные условия постановки РНФ. В разработку оптимальных условий постановки реакции нарастания титра фага входит: установление времени, обеспечивающего наиболее полноценное взаимодействие бактериофага с бактериями, температурный режим этапов постановки РНФ, количественный показатель реакции.

По результатам проведенных опытов было установлено, что наиболее оптимальным является режим РНФ с предварительным подращиванием исследуемого материала в течение 7 часов и 9-часовой экспозицией исследуемого материала с фагом (титр $4 \times 10^9 \pm 0,1 \times 10^9$ по Грациа) при температуре 28 °С (рис. 1). Установленные параметры позволяют провести индикацию *A. salmonicida* в количестве 10^3 КОЕ/мл в течение 28 часов.

Апробация данной схемы показала, что из исследуемых нами 378 проб воды и тканевого материала и органокомплекса рыбы, в 23 были обнаружены бактерии *A. salmonicida* штаммов при помощи метода РНФ, что было подтверждено бактериологическим исследованием.

ГОРШКОВ И. Г.
ВЫДЕЛЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ
СВОЙСТВ БАКТЕРИОФАГОВ, АКТИВНЫХ В ОТНОШЕНИИ БАКТЕ-
РИИ *AEROMONAS SOBRIA*.

GORSHKOV I.G.
THE DETACHMENT AND STUDY OF BIOLOGICAL PROPERTIES
OF BACTERIOPHAGES, ACTIVE IN REFERENCE
TO *AEROMONAS SOBRIA* BACTERIA

ИССЛЕДОВАНИЯ 2009-2014 гг.

Аэромонозы рыб – это заболевание, встречающееся в рыбоводческих хозяйствах и вызываемое бактериями рода *Aeromonas*: *A. salmonicida*, *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. sobria*. При поражении аэромонозом рыбы становятся вялыми, держатся у поверхности воды вдоль берега, корм не принимают. Кожный покров иногда приобретает темную окраску или покрывается язвами. Поскольку существующие методы диагностики не предусматривают типирование возбудителей аэромонозов до вида, лечение заболевания заключается в применении антибиотиков широкого спектра, высокомолекулярных соединений, содержащих йод, а так же формалин.

В отечественной литературе нет подробной информации о выделении бактериофагов, активных в отношении *A. sobria*, разработке и применению биопрепаратов на основе бактериофагов. Однако были проведены работы по выделению и изучению биологических свойств бактериофагов, активных в отношении других аэромонад, прежде всего *A. salmonicida* и *A. hydrophila*.

Перечисленные причины обуславливают необходимость в разработке эффективной тест-системы для быстрой и точной индикации и идентификации бактерии *A. sobria* в патологическом материале рыб и образцах воды из прудов рыбоводческого назначения. В качестве дешевого и не требующего высоко квалифицированных специалистов метода диагностики аэромонозов для рыбоводческих хозяйств, правомерно рассмотреть реакцию нарастания титра фага.

Цель исследования - выделение бактериофагов, активных в отношении бактерии *A. sobria* и изучение их биологических свойств для дальнейшего конструирования на их основе диагностического биопрепарата.

В качестве источников для выделения бактериофагов из окружающей среды использовались образцы воды из различных источников: Черное море (близь станции Лоо), река Лоо, стоячий водоем рядом с железнодорожной станцией Лоо, родник в черте города Ульяновска. Всего исследовано 16 объектов.

При выделении бактериофагов в качестве индикаторных бактериальных культур использовались полевые штаммы *Aeromonas sobria* №23, № 22, № +/2, №+/1, полученные из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы Ульяновской ГСХА им. П.А. Столыпина. Для определения видовой и родовой специфичности выделенных бактериофагов использовали культуры бактерий следующих видов: *A. caviae*, *A. salmonicida*, *A. hydrophila*, *Ps. aeruginosa*, *Ps. fluorescens*, *Pr. mirabilis*, *E. coli*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*.

Выделение бактериофагов, активных в отношении *A. sobria*, проводили методом накопления по схемам, описанным в работах Викторова Д.А., Золотухина С.Н., Насибуллина И.Р. и оптимизированным нами с учётом биологических особенностей *A. sobria* и их бактериофагов.

В 8 колб на 200 мл с 50 мл стерильного концентрированного (концентрация бульона увеличена в два раза) мясопептонного бульона добавлялось по 50 мл исследуемых образцов воды, взятых из различных источников. В каждую из колб добавлялось по 0,5 мл суточных индикаторных культур полевых штаммов бактерии *A. sobria* (№23, № 22, № +/2, №+/1) после чего полученная смесь перемешивалась и помещалась в термостат на 24 часа при 27 °С (оптимум роста для штаммом *A. sobria*).

После инкубации из полученной в колбах суспензии отбиралось по 10 мл бульона в стерильные пластиковые пробирки для центрифугирования. Отобранные образцы центрифугировались 20 минут при 3000 об/мин (700 g). По окончании центрифугирования надосадочная жидкость фильтровалась через мембранные фильтры с диаметром пор 0,2 мкм (Millipore - Millivac), после чего фильтрат помечался в стерильные пробирки для хранения и дальнейших исследований.

После получения первичных фаговых стоков проводили пассирование и выделение чистых линий бактериофагов путём 5-10 кратного пересева их бляшек, образованных на бактериальном газоне соответствующих индикаторных бактериальных культур.

Определение наличия фагов, активных в отношении бактерий *A. sobria* и определение внутри родовой и межродовой активности бактериофагов проводили методом спот-теста. Для этого на чашки Петри, засеянные суточной культурой следующих бактериальных культур: *A. salmonicida*, *A. hydrophila*, *A. caveae*, *A. sobria*, *Ps. aeruginosa*, *Ps. fluorescens*, *Pr. mirabilis*, *E. coli*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica* и подсушенные в термостате в течение 20 минут при 37°C по каплям пипеткой наносился исследуемый фильтрат. После чего чашки Петри помечались в термостат на 24 часа при температуре 27°C. Время и температура инкубации подбирались эмпирически, исходя из температурного оптимума роста штаммов *A. sobria*.

Для исследования устойчивости выделенных бактериофагов к обработке хлороформом использовалась методика, предложенная Викторовым Д.А. Определение чувствительности бактериофага проводили путем обработки лизатов хлороформом в соотношении 1:10 при постоянном встряхивании. Контролем служила пробирка с лизатом, необработанным хлороформом. После воздействия хлороформа в течение различных промежутков времени (5, 10, 15, 20 минут) активность бактериофага определяли по методу Грациа.

Для изучения температурной устойчивости, ряд пробирок с суспензиями исследуемых бактериофагов, разведёнными мясоептонным бульоном 1:10, прогревали на водяной бане в течение 20 минут при температуре от 54 °C до 66 °C с интервалом 2 °C. Контрольные пробирки не прогревались. После воздействия температуры активность исследуемых фагов определяли по методу Грациа.

Литическую активность бактериофагов определяли по методу Грациа.

В результате исследования проб воды на наличие в них бактериофагов, активных по отношению к индикаторным штаммам *A. sobria* №23, № 22, № +/2 и №+/1, было выделено 8 штаммов бактериофагов.

Морфология негативных колоний выделенных бактериофагов *A. sobria*:

- негативные колонии бактериофагов Aer.sobr.1–УГСХА, Aer.sobr.3–УГСХА, Aer.sobr.5–УГСХА имели диаметр 1-2 мм, полностью прозрачны, без зоны вторичного лизиса;
- негативные колонии бактериофагов Aer.sobr.2–УГСХА, Aer.sobr.7–УГСХА, Aer.sobr.8–УГСХА, имели диаметр 0,5-1 мм с мутным центром, без зоны вторичного лизиса;
- негативные колонии бактериофагов Aer.sobr.4–УГСХА, Aer.sobr.6–УГСХА имели диаметр 3-4 мм и характеризовались наличием прозрачного центра и мутной зоной вторичного лизиса на периферии.

Таблица 1. Устойчивость выделенных бактериофагов к хлороформу.

№	Штаммы бактериофагов	Время обработки хлороформом				
		5 минут	10 минут	15 минут	20 минут	Контроль
1	Aer.sobr.1- УГСХА	3,0(±0,1)×10 ⁹	-	-	-	3,0(±0,1)×10 ⁹
2	Aer.sobr.2 -УГСХА	4,0(±0,4)×10 ⁷	-	-	-	4,0(±0,4)×10 ⁷
3	Aer.sobr.3 -УГСХА	5,0(±0,1)×10 ⁹	-	-	-	5,0(±0,1)×10 ⁹
4	Aer.sobr.4 -УГСХА	2,0(±0,2)×10 ¹⁰	-	-	-	2,0(±0,2)×10 ¹⁰
5	Aer.sobr.5 -УГСХА	5,0(±0,2)×10 ⁹	-	-	-	5,0(±0,2)×10 ⁹
6	Aer.sobr.6 -УГСХА	4,0(±0,2)×10 ⁷	-	-	-	4,0(±0,2)×10 ⁷
7	Aer.sobr.7 -УГСХА	0,6(±0,1)×10 ⁶	-	-	-	0,6(±0,1)×10 ⁶
8	Aer.sobr.8 -УГСХА	4,0(±0,6)×10 ⁹	-	-	-	4,0(±0,6)×10 ⁹

Таблица 2. Литическая активность бактериофагов *A. sobria* по методу Грация.

№ пп	Штаммы бактериофагов	Показатели литической активности изучаемых фагов по методу Грация
1	Aer.sobr.1- УГСХА	3,0(±0,1)×10 ⁹
2	Aer.sobr.2 –УГСХА	4,0(±0,4)×10 ⁷
3	Aer.sobr.3 –УГСХА	5,0(±0,1)×10 ⁹
4	Aer.sobr.4 –УГСХА	2,0(±0,2)×10 ¹⁰
5	Aer.sobr.5 –УГСХА	5,0(±0,2)×10 ⁹
6	Aer.sobr.6 –УГСХА	4,0(±0,2)×10 ⁷
7	Aer.sobr.7 –УГСХА	0,6(±0,1)×10 ⁶
8	Aer.sobr.8 –УГСХА	4,0(±0,6)×10 ⁹

Таблица 3. Активность бактериофагов по отношению к гетерогенным бактериальным культурам.

№ пп	Штаммы бактериофагов	Штаммы исследуемых бактерий					
		<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>E.coli</i>	<i>Y. pseudotuberculosis</i>	<i>Y. enterocolitica</i>
1	Aer.sobr.1- УГСХА	-	-	-	-	-	-
2	Aer.sobr.2 –УГСХА	-	-	-	-	-	-
3	Aer.sobr.3 –УГСХА	-	-	-	-	-	-
4	Aer.sobr.4 –УГСХА	-	-	-	-	-	-
5	Aer.sobr.5 –УГСХА	-	-	-	-	-	-
6	Aer.sobr.6 –УГСХА	-	-	-	-	-	-
7	Aer.sobr.7 –УГСХА	-	-	-	-	-	-
8	Aer.sobr.8 –УГСХА	-	-	-	-	-	-

Примечание: «+» наличие зон лизиса , «-» отсутствие зон лизиса.

Таблица 4. Специфичность выделенных штаммов бактериофагов по отношению к бактериям рода *Aeromonas*.

№	Штаммы бактериофагов	Штаммы бактерий рода <i>Aeromonas</i>						
		<i>A. sobria</i> № 23	<i>A. sobria</i> №+1/2	<i>A. sobria</i> № +1/1	<i>A. sobria</i> № 22	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. caviae</i>
1	Aer.sobr.1- УГСХА	+	+	+	+	-	-	-
2	Aer.sobr.2 –УГСХА	+	+	+	+	-	-	-
3	Aer.sobr.3 –УГСХА	+	+	+	+	-	-	-
4	Aer.sobr.4 –УГСХА	+	+	+	+	-	-	-
5	Aer.sobr.5 –УГСХА	+	+	+	+	-	-	-
6	Aer.sobr.6 –УГСХА	+	+	+	+	-	-	-
7	Aer.sobr.7 –УГСХА	+	+	+	+	-	-	-
8	Aer.sobr.8 –УГСХА	+	+	+	+	-	-	-

Примечание: «+» наличие зон лизиса, «-» отсутствие зон лизиса.

Результаты исследования устойчивости бактериофагов к обработке хлороформом приведены в таблице 1 и графике 1.

После 5 минут обработки фаголизата хлороформом изменения титра бактериофага не наблюдалось, все бактериофаги сохранили свою активность. После 10 минут обработки хлороформом образования негативных колоний не наблюдалось, что указывало на полную инактивацию бактериофагов.

В ходе исследований температурной устойчивости бактериофагов установили, что после воздействия температуры 54-58 °С в течение 20 минут бактериофаги значительно инактивировались. При дальнейшем повышении температуры наблюдалась полная потеря активности фагов.

Полученные результаты схожи с описанием свойств бактериофагов, активных по отношению к *A. hydrophila*, *A. salmonicida*.

Результаты исследования литической активности бактериофагов представлены в таблице 2.

В результате проведённых исследований объектов окружающей среды (образцов воды) нами было выделено 8 штаммов бактериофагов, активных в отношении бактерий *A. sobria*. Результаты исследований специфичности и спектра литической активности бактериофагов представлены в таблицах 3 и 4. Литическая активность выделенных бактериофагов находится в диапазоне от $0,6(\pm 0,1) \times 10^6$ до $2,0(\pm 0,2) \times 10^{10}$ БОЕ/мл. Установлено, что выделенные бактериофаги инактивируются при обработке хлороформом в течение 5 минут, теряют свою активность при воздействии температуры свыше 58°C в течение 20 минут. Полученные фаги обладают видовой специфичностью по отношению к *A. sobria*.

РАЗДЕЛ 2. БАКТЕРИОФАГИ РОДА *BACILLUS*

CHAPTER 2. BACTERIOPHAGES OF THE *BACILLUS* GENUS

ФЕОКТИСТОВА Н. А., МУСТАФИН А. Х.
ВЫДЕЛЕНИЕ, ИЗУЧЕНИЕ ОСНОВНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ
СВОЙСТВ БАКТЕРИОФАГОВ *BACILLUS SUBTILIS* И РАЗРАБОТКА
ПАРАМЕТРОВ ИХ ПРАКТИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

FEOKTISTOVA N. A., MUSTAFIN A. H.
THE DETACHMENT, STUDY OF THE BASIC BIOLOGICAL
PROPERTIES OF *BACILLUS SUBTILIS* BACTERIOPHAGE
AND DEVELOPMENT OF PARAMETERS OF THEIR APPLICATION

ИССЛЕДОВАНИЯ 2008 – 2010 гг.

Контаминация пищевого сырья и продуктов питания бактериями *Bacillus subtilis* на всех этапах технологического процесса - это серьезная проблема пищевого производства. Эти почвенные сапрофиты встречаются повсеместно, отличаются высокой температурной устойчивостью 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 создания 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 действия 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.

В период исследований был произведен анализ научных публикаций и установлено, что в Российской Федерации не разработаны методики фагоиндикации и фагоидентификации бактерий *B. subtilis* в объектах санитарного надзора. Использование подобных методик позволит в сжатые сроки идентифицировать бактерии вида *B. subtilis*, применяя минимальное количество расходных материалов в течение 25 часов.

Целью работы была разработка биотехнологических параметров изготовления фагового препарата для индикации и идентификации бактерий *B. subtilis* в пищевом сырье и продуктах питания.

Объекты исследований: 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 spp.* - 6 штаммов, *Klebsiella spp.* - 6 штаммов, *Salmonella spp.* - 6 штаммов, *Staphylococcus spp.* - 4 штамма, *Streptococcus spp.* - 2 штамма, *Pseudomonas spp.* - 4 штамма, *Y. enterocolitica* - 12 штаммов; *B. cereus* - 25 штаммов, *B. mycoides* - 15 штаммов, *B.*

megaterium - 14 штаммов, *B. mesentericus* - 18 штаммов, *B. thuringiensis* - 4 штамма, были получены из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ ФГБОУ ВПО Ульяновская ГСХА. Штаммы бактериофагов - 22 изолята бактериофагов *B. subtilis*, выделенные из объектов 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. Сентилея, 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). 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).

Первым этапом работы было выделение фагов 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 применяли 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 секунд при помощи бактерицидной лампы, 80 % энергии которой приходится на длину волны 2537А, 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. При исследовании 10 проб сточных вод, 32 проб почвы и 40 проб пищевых продуктов удалось выделить 22 изолята фагов бактерий *B. subtilis*.

Характеристика выделенных фагов бактерий *B. subtilis*

Морфологию бляшкообразующих единиц изучали при посевах фагов методом агаровых слоев по Грациа. Бляшкообразующие единицы, образуемые выделенными и селекционированными бактериофагами, были разделены нами на два типа:

- 1 тип: прозрачные, $1,0 \pm 0,5$ - $2,5 \pm 0,5$ мм в диаметре;
- 2 тип: прозрачные, $2,6 \pm 0,5$ - $4,0 \pm 0,5$ мм в диаметре.

Спектр литического действия. Для изучения спектра литического действия селекционированных фагов применяли 35 штаммов бактерий *B. subtilis*, исследования проводили методом нанесения фага на газон бактериальной культуры. Наиболее широким спектром литического действия обладают штаммы фагов Bs-13 УГСХА и Bs-16 УГСХА, которые лизировали 32 штамма *B. subtilis* из 35, что составляет 91,5 %.

Литическая активность. Литическую активность выделенных бактериофагов определяли методом агаровых слоев. Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что выделенные бактериофаги обладали различными показателями литической активности, показатели которой колебались от $1,7 \times 10^6 \pm 0,3 \times 10^6$ до $8,0 \times 10^9 \pm 0,5 \times 10^9$ БОЕ/мл (табл. 1). Наиболее высокими титрами литической активностью обладали фаги Bs-13 УГСХА и Bs-16 УГСХА - $2,8 \times 10^9 \pm 0,8 \times 10^9$ и $8,0 \times 10^9 \pm 0,5 \times 10^9$ БОЕ/мл, соответственно.

Для дальнейших исследований по конструированию экспериментального биопрепарата было отобрано два фага Bs-13 УГСХА и Bs-16 УГСХА, которые обладали наиболее высокими титрами литической активности и широким спектром литического действия. Результаты исследований по определению оптимальных температурных показателей культивирования свидетельствуют о том, что оптимальной является температура культивирования биопрепарата на основе фагов - 36 ± 1 °С. Нами решено инкубировать систему специфических бактериофагов Bs - 13 УГСХА и Bs - 16 УГ-

СХА с бактериями *B. subtilis* при температуре 36 ± 1 °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 36 ± 1 °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 μ m GV).

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. Совокупный процент лизиса биопрепаратом на 40 штаммах бактерий *B. subtilis* составил 95,0 %.

Изучение специфичности двух бактериофагов *B. subtilis* (Bs - 13 УГСХА, Bs - 16 УГСХА) проводили по отношению к представителям гетерологичных семейств и родов с использованием штаммов: *Morganella spp.*, *Klebsiella spp.*, *Salmonella spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Yenterocolitica*; *B. cereus*, *B. mycoides*, *B. megaterium*, *B. mesentericus*, *B. thuringiensis*. 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 трихлорметана. 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 трихлорметана.

Таблица 1. Характеристика выделенных фагов бактерий *B. subtilis*

№	Бактериальная культура <i>B. subtilis</i> / название фага	Диаметр бляшкообразую- щих единиц, мм	Спектр литического действия на 35 штаммах, %	Литическая активность, БОЕ/мл
1.	<i>B. subtilis</i> 61/ Bs -1 УГСХА	2,5-3,0 $\pm$ 0,5	48,6	3,5 $\pm$ 0,5 $\times 10^7$
2.	<i>B. subtilis</i> 3/ Bs - 2 УГСХА	3,0-4,0 $\pm$ 0,5	42,9	1,0 $\pm$ 0,3 $\times 10^8$
3.	<i>B. subtilis</i> 3П/ Bs - 3 УГСХА	1,0 $\pm$ 0,5	71,4	2,2 $\pm$ 1,2 $\times 10^7$
4.	<i>B. subtilis</i> 98 / Bs - 4 УГСХА	1,0-1,5 $\pm$ 0,5	51,4	2,4 $\pm$ 1,6 $\times 10^8$
5.	<i>B. subtilis</i> 8 / Bs - 5 УГСХА	0,5-1,0 $\pm$ 0,5	37,1	2,0 $\pm$ 0,9 $\times 10^7$
6.	<i>B. subtilis</i> 21 / Bs - 6 УГСХА	1,0-1,3 $\pm$ 0,5	34,2	6,0 $\pm$ 3,4 $\times 10^8$
7.	<i>B. subtilis</i> 17 / Bs - 7 УГСХА	1,0-1,5 $\pm$ 0,5	20,0	4,0 $\pm$ 2,9 $\times 10^7$
8.	<i>B. subtilis</i> 5 / Bs - 8 УГСХА	1,0-1,5 $\pm$ 0,5	28,6	1,7 $\pm$ 0,3 $\times 10^8$
9.	<i>B. subtilis</i> 16 / Bs - 9 УГСХА	1,0 $\pm$ 0,5	22,9	2,4 $\pm$ 1,1 $\times 10^7$
10.	<i>B. subtilis</i> 32 / Bs - 10 УГСХА	1,0-1,5 $\pm$ 0,5	25,7	3,0 $\pm$ 1,5 $\times 10^7$
11.	<i>B. subtilis</i> 10 / Bs - 11 УГСХА	2,6-3,0 $\pm$ 0,5	31,4	1,0 $\pm$ 0,3 $\times 10^8$
12.	<i>B. subtilis</i> 12 / Bs - 12 УГСХА	1,0-1,5 $\pm$ 0,5	34,3	4,0 $\pm$ 0,5 $\times 10^7$
13.	<i>B. subtilis</i> 26 / Bs - 13 УГСХА	6,0-8,0 $\pm$ 0,5	80,0	2,8 $\pm$ 0,8 $\times 10^8$
14.	<i>B. subtilis</i> 23 / Bs - 14 УГСХА	1,0 $\pm$ 0,5	22,9	2,4 $\pm$ 1,3 $\times 10^8$
15.	<i>B. subtilis</i> 12 / Bs - 15 УГСХА	1,5 $\pm$ 0,5	28,6	4,0 $\pm$ 2,1 $\times 10^7$
16.	<i>B. subtilis</i> 4 / Bs - 16 УГСХА	2,5-3,0 $\pm$ 0,5	88,6	8,0 $\pm$ 0,5 $\times 10^8$
17.	<i>B. subtilis</i> 19 / Bs - 17 УГСХА	1,5 $\pm$ 0,5	17,1	1,5 $\pm$ 0,7 $\times 10^7$
18.	<i>B. subtilis</i> 4 / Bs - 18 УГСХА	1,0-1,5 $\pm$ 0,5	54,3	5,1 $\pm$ 2,4 $\times 10^8$
19.	<i>B. subtilis</i> 31 / Bs - 9 УГСХА	1,0-1,5 $\pm$ 0,5	37,2	3,0 $\pm$ 1,6 $\times 10^7$
20.	<i>B. subtilis</i> 25 / Bs - 20 УГСХА	3,0-3,5 $\pm$ 0,5	20,0	1,2 $\pm$ 0,4 $\times 10^7$
21.	<i>B. subtilis</i> 27 / Bs - 21 УГСХА	2,6-3,0 $\pm$ 0,5	51,4	2,0 $\pm$ 1,7 $\times 10^7$
22.	<i>B. subtilis</i> 14 / Bs - 22 УГСХА	2,0-2,5 $\pm$ 0,5	28,6	3,4 $\pm$ 1,9 $\times 10^8$

Используя строгую специфичность биопрепарата, нами была разработана схема ускоренной идентификации бактерии *B. subtilis* по показателям лизиса на газоне культуры на плотной питательной среде («метод стекающей капли»). Разработанная нами схема 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 10⁸ БОЕ/мл.

Определение параметров постановки реакции нарастания титра фага (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 *B. subtilis* 26 (для фага Bs - 13 УГСХА) и *B. subtilis* 4 (для фага Bs - 16 УГСХА) от 10¹ до 10⁵ м.к./мл. В качестве контроля был использован интактный МПБ. Учет результатов проводили через 18 часов инкубирования. Установлено, что количество бляшкообразующих единиц более чем в 5 раз превышает количество бляшкообразующих единиц в контрольных пробах при контаминации бактериями *B. subtilis* МПБ в концентрации 10² 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 бактериофага в 1 мл) постановки РНФ. В качестве тест - объекта использовали МПБ, контаминированный бактериями *B. subtilis*.

Полученные экспериментальные данные позволяют считать наиболее оптимальным временной режим РНФ при 6 часовой экспозиции исследуемого материала с фагом без дополнительного



Рисунок 1. Схема постановки реакции нарастания титра фага с использованием биопрепарата.

подращивания, когда удастся провести индикацию бактерии *B. subtilis* в количестве 10^2 м.к./мл 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 (рисунок 1). 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.

Пробы образцов объектов санитарного надзора (водопроводная вода, комбикорм, специи, мясо) в количестве 10 г (мл) вносили в колбы и контаминировали штаммами *B. subtilis* 26 и *B. subtilis* 4 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, неконтаминированными бактериями *B. subtilis* 26 и *B. subtilis* 4.

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./мл водопроводной воды и 10^3 м.к./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.

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.

В результате проведенных исследований нами были выделены из объектов санитарного надзора и изучены биологические свойства бактериофагов *B. subtilis*, из них отобраны два бактериофага 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 продуктов с применением сконструированного биопрепарата. Усовершенствована схема выделения и идентификации бактерий *B. subtilis* в объектах санитарного надзора с помощью созданного фагового биопрепарата.

ФЕОКТИСТОВА Н.А., ЛЫДИНА М.А.

**ВЫДЕЛЕНИЕ, ИЗУЧЕНИЕ ОСНОВНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ
БАКТЕРИОФАГОВ *BACILLUS MESENTERICUS* И РАЗРАБОТКА
ПАРАМЕТРОВ ИХ ПРАКТИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ**

FEOKTOSTOVA N.A., LYDINA M.A.

THE DETACHMENT, STUDY OF THE BASIC BIOLOGICAL PROPERTIES OF *BACILLUS MESENTERICUS* BACTERIOPHAGE AND DEVELOPMENT OF PARAMETERS OF THEIR APPLICATION

ИССЛЕДОВАНИЯ 2010 – 2012 гг.

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 *B. mesentericus* в ассоциации с *B. subtilis* являются возбудителями картофельной

болезни хлеба. Разрушение структуры хлеба и разложение содержащихся в нем веществ, связано с продуцированием данными видами бактерий активных протеолитических и амилалитических ферментов. Спороносным бактериям *B. mesentericus*, особенно их термофильным формам, отводится значительная роль в процессах самосогревания зерна (Пельц, 2003; Пучкова, 2005; Мустафин, 2011).

Бактерии *B. mesentericus* являются возбудителями порчи пищевого сырья и продуктов питания, вызывают отравления, характеризующиеся острым течением болезни по типу отравлений, вызываемых *B. cereus*.

В настоящее время в бактериологических лабораториях идентификация бактерий *B. mesentericus* основана на выделении чистой культуры микроорганизмов и изучении их биологических свойств. Этот метод трудоемок и недостаточно эффективен из-за выраженного полиморфизма ферментативных свойств бактерий *B. mesentericus*. Поэтому перед исследователями стоит задача разработки достоверного метода индикации и идентификации названных микроорганизмов, т.к. классическая схема идентификации бактерий рода *Bacillus* первой морфологической группы по Gordon (1973) чрезвычайно материалозатратная и трудоемкая.

Патентный поиск и анализ литературных данных свидетельствует, что в настоящий момент в Российской Федерации не разработаны методики индикации и идентификации бактерий *B. mesentericus* с помощью бактериофагов в объектах санитарного надзора. Применение этих методик позволит в сжатые сроки обнаружить и идентифицировать бактерии *B. mesentericus*, в течение 25 часов, используя минимальное количество расходных материалов.

Цель наших исследований - разработка биотехнологических параметров изготовления фагового препарата для индикации и идентификации бактерий *B. mesentericus* в пищевом сырье и продуктах питания. Объекты исследований в данной работе были 22 штамма бактерий *B. mesentericus*, из них 2 музейных штамма из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы; 20 штаммов выделены из проб пищевых продуктов и объектов санитарного надзора. Штаммы бактерий *B. subtilis* - 35 штаммов, *B. mycoides* - 15 штаммов, *B. megaterium* - 14 штаммов, *B. cereus* - 25 штаммов, *B. thuringiensis* - 4 штамма получены из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ ФГБОУ ВПО Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина. Штаммы бактериофагов *B. mesentericus* - 22 изолята были выделены из проб почвы Ульяновской и Самарской областей самостоятельно. В качестве объектов исследований для постановки реакции нарастания титра фага использовали пищевые продукты, приобретенные на продовольственных рынках г. Ульяновска, г. Самары.

Для выделения бактерий *B. mesentericus* использовали схему дифференциации бактерий рода *Bacillus* (Gordon, 1973, Затула, 1973; Смирнов, 1982).

Первоочередной задачей наших исследований стало выделение бактерий *B. mesentericus* из объектов санитарного надзора. В период с 2010 по 2012 год было происследовано на наличие бактерий *B. 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 *B. mesentericus*. Уровень контаминации всех исследованных проб бактериями *B. mesentericus* составил 31 %.

Вторым этапом работы было выделение фагов бактерий *B. mesentericus*. Первоначально, мы исследовали штаммы *B. 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 *B. mesentericus*, исследуемые как «лизогенные», воздействовали индуцирующим фактором (воздей-

ствие на бактерии ультрафиолетовых лучей в течение 5-20 секунд при помощи бактерицидной лампы, 80 % энергии которой приходится на длину волны 2537 А, 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 *B. mesentericus* методом агаровых слоев. В исследованиях не наблюдалось естественной и искусственной лизогенности исследуемых штаммов *B. 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 *B. mesentericus*. Селекцию фагов проводили десятикратным пассированием изолированных бляшкообразующие единиц на мясо-пептонном агаре с перевиванием на мясо-пептонный бульон. Очистка фагов от бактериальных клеток осуществлялась методом фильтрации с использованием мембранных фильтров фирмы Millipore (filter type: 0,22 urn GV). Фаголизаты укупоривали в стерильные флаконы и хранили при низкой температуре (4-6 °C) без использования консервантов.

Характеристика выделенных бактериофагов B. mesentericus

Морфологию бляшкообразующих единиц изучали на плотных питательных средах для дифференциации их на умеренные и вирулентные, согласно классификации И.П. Ревенко (1978). Негативные колонии, образуемые 22 изолятами фагов *B. mesentericus*, были однотипными - это прозрачные негативные колонии округлой формы, 1,0 - 4,0 мм в диаметре (рисунок 1). Данная характеристика подтверждает их вирулентность, так как лизогенизированных фагами 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 *B. mesentericus* мы проводили на культурах гомологичного рода: *B. subtilis*, *B. mycoides*, *B. megaterium*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*. 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 трехкратно. Эталонные культуры выращивали на мясо-пептонном бульоне в течение 18 часов. Учет результатов проводили через 18 часов инкубирования посевов в термостате при 37 °C, 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 *B. mesentericus* обладали различной активностью. Ее показатели были выявлены в диапазоне от $1,0 \pm 0,1 \times 10^6$ до $4,0 \pm 0,3 \times 10^9$ БОЕ/мл. Наиболее высокой активностью обладали фаги Bm-3 УГСХА и Bm-8 УГСХА - $1,5 \pm 0,1 \times 10^9$ и $4,0 \pm 0,3 \times 10^9$ БОЕ/мл, соответственно.

Спектр литического действия. Важной характеристикой выделенных фагов является спектр их действия на штаммы бактерий в пределах вида. Для изучения спектра литического действия селекционированных фагов использовали 20 штаммов бактерий *B. 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» (рисунок 2). Экспериментальным путем установлено, что изучаемые

специфичные бактериофаги имеют различный спектр действия по отношению к 22 изучаемым штаммам *B. mesentericus*. Опыты демонстрируют, что наиболее широким спектром литического действия по отношению к изучаемым культурам обладают штаммы фагов Vm-3 УГСХА и Vm-8 УГСХА, совокупный процент лизиса которых составил 91,0 %. Для конструирования биопрепарата было отобрано два фага Vm-3 и Vm-8 серии УГСХА, характеризующихся высокими показателями литической активности и максимально широким совокупным спектром литического действия (таблица 1).

Последующие эксперименты были направлены на изучение изменения показателя литической активности укупоренных во флаконы бактериофагов Vm-3 и Vm-8 серии УГСХА, хранящихся при температуре 2-4 °С в течение 12 месяцев.

Установлено, что в течение 3 месяцев показатели литической активности исследуемых бактериофагов Vm-3 УГСХА и Vm-8 УГСХА оставались без изменений, $1,5 \pm 0,1 \times 10^9$ и $4,0 \pm 0,3 \times 10^9$ БОЕ/мл, соответственно. Через 6 месяцев литическая активность снижалась и составила у фага Vm-3 УГСХА $4,7 \pm 0,2 \times 10^8$ БОЕ/мл и у Vm-8 УГСХА $1,3 \pm 0,4 \times 10^8$ БОЕ/мл, через 9 месяцев - $1,8 \pm 0,1 \times 10^7$ и $0,9 \pm 0,2 \times 10^8$ БОЕ/мл, через 12 месяцев - $0,6 \times 10^7 \pm 0,3 \times 10^7$ и $1,1 \times 10^7 \pm 0,2 \times 10^7$ БОЕ/мл, соответственно. Опытным путем установлено, что пассирование каждого из бактериофагов на исходном штамме бактерий *B. mesentericus* в течение 7 пассажей методом агаровых слоев восстанавливает литическую активность бактериофагов на 1 порядок.

Для изготовления биопрепарата использовали штаммы фагов Vm-3 УГСХА и Vm-8 УГСХА и штаммы бактерий *B. 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.

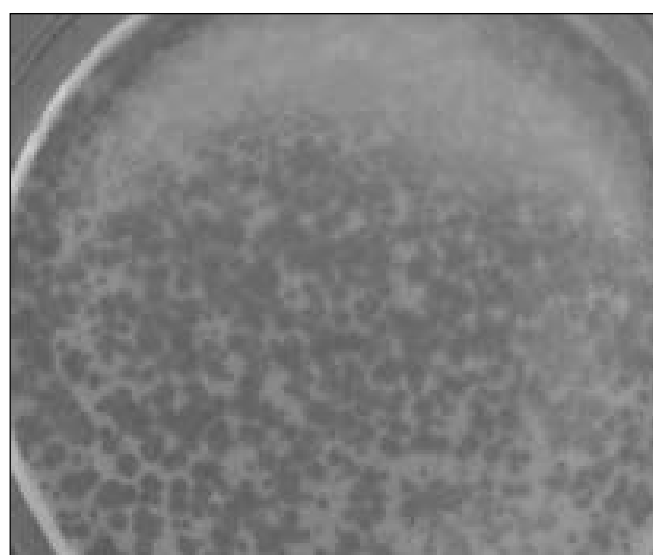
Биопрепарат готовится на коммерческом мясо-пептонном бульоне. Опытным путем установлено, что температурным оптимумом для культивирования биопрепарата на основе фагов Vm-3 УГСХА и Vm-8 УГСХА с индикаторными культурами была температура $36 \pm 1^\circ\text{C}$. Определено оптимальное соотношение бактериофага Vm-3 УГСХА и штамма *B. mesentericus* 66 - 1:1, т.е. 0,2 мл фага на 0,2 мл индикаторной культуры, время пассажа составляет 6 часов (параметры культивирования бактериофага Vm-8 УГСХА с культурой 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 10^8 БОЕ/мл. 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 метод ускоренной идентификации бактерии *B. 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 позволяет идентифицировать бактерии *B. 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). Первоначально определяли параметры постановки реакции. Были проведены эксперименты на модели - искусственно загрязненном бактериями *B. mesentericus* мясо-пептонном бульоне 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. Доказано, что количество бляшкообразующих единиц фага в эксперименте, более чем в 5 раз превышает количество бляшкообразующих единиц в контроле при контаминации МПБ бактериями *B. mesentericus* в концентрации 10^2 м.к./мл.

Таблица 1. Характеристика выделенных фагов *B. mesentericus*

№ п.п.	Бактериальная культура <i>B. mesentericus</i> / название фага	Диаметр бляшкообразу- ющих единиц, мм	Спектр литического действия на 22 штаммах, %	Литическая активность, БОЕ/мл
1.	<i>B. mesentericus</i> 1/Bm - 1 УГСХА	1,0±0,2	22,7	1,8±0,2x10 ⁷
2.	<i>B. mesentericus</i> 6/ Bm - 2 УГСХА	2,0±0,2	13,6	2,6±1,1x10 ⁷
3.	<i>B. mesentericus</i> 66/ Bm - 3 УГСХА	2,5±0,3	68,2	1,5±0,1x10 ⁹
4.	<i>B. mesentericus</i> 66/ Bm - 4 УГСХА	1,4±0,1	31,8	1,0±0,4x10 ⁶
5.	<i>B. mesentericus</i> 5/ Bm - 5 УГСХА	2,4±0,3	22,7	3,2±1,2x10 ⁸
6.	<i>B. mesentericus</i> 44/ Bm - 6 УГСХА	0,8±0,2	36,4	4,9±0,3x10 ⁸
7.	<i>B. mesentericus</i> 7/ Bm - 7 УГСХА	1,4±0,4	18,2	8,1±0,7x10 ⁸
8.	<i>B. mesentericus</i> 2/ Bm - 8 УГСХА	2,2±0,2	77,3	4,0±0,3x10 ⁹
9.	<i>B. mesentericus</i> 9/ Bm - 9 УГСХА	1,8±0,4	40,9	6,8±0,5x10 ⁶
10.	<i>B. mesentericus</i> 66/ Bm - 10 УГСХА	1,0±0,4	45,5	9,0±1,5x10 ⁷
11.	<i>B. mesentericus</i> 44/ Bm - 11 УГСХА	1,6±0,3	9,1	4,6±1,0x10 ⁸
12.	<i>B. mesentericus</i> 12/ Bm - 12 УГСХА	2,0±0,4	22,7	3,5±0,9x10 ⁸
13.	<i>B. mesentericus</i> 13/ Bm - 13 УГСХА	1,8±0,2	54,5	4,2±1,1x10 ⁹
14.	<i>B. mesentericus</i> 3/ Bm - 14 УГСХА	2,4±0,3	45,5	9,4±0,5x10 ⁹
15.	<i>B. mesentericus</i> 15/ Bm - 15 УГСХА	1,7±0,5	18,2	5,3±0,6x10 ⁹
16.	<i>B. mesentericus</i> 6/ Bm - 16 УГСХА	2,6±0,2	36,4	3,2±0,8x10 ⁷
17.	<i>B. mesentericus</i> 17/ Bm - 17 УГСХА	1,7±0,4	27,3	1,2±0,1x10 ⁹
18.	<i>B. mesentericus</i> 4/ Bm - 18 УГСХА	1,8±0,2	13,6	7,5±0,7x10 ⁷
19.	<i>B. mesentericus</i> 9/ Bm - 19 УГСХА	1,0±0,3	22,7	4,2±1,3x10 ⁶
20.	<i>B. mesentericus</i> 20/ Bm - 20 УГСХА	2,0±0,2	36,4	5,4±1,1x10 ⁸
21.	<i>B. mesentericus</i> 66/ Bm - 66 УГСХА	1,7±0,3	31,8	3,2±0,5x10 ⁸
22.	<i>B. mesentericus</i> 44 / Bm - 44 УГСХА	2,3±0,2	18,2	2,8±0,2x10 ⁹



А



Б

Рисунок 1. Морфология негативных колоний фагов *B. mesentericus*: Bm-3 УГСХА и Bm-19 УГСХА

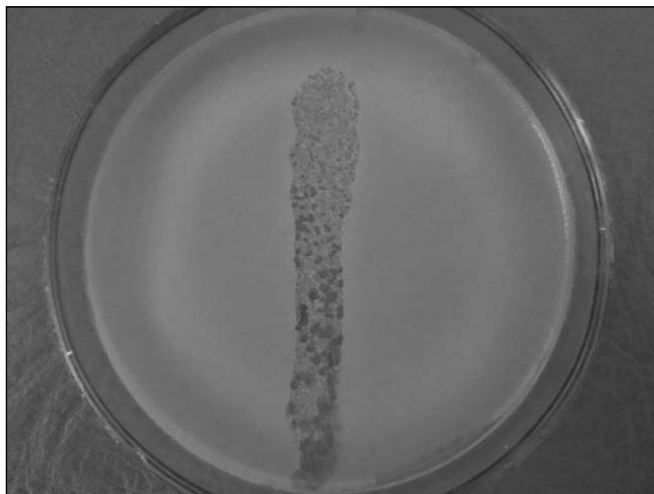


Рисунок 2. Зона лизиса на газоне культуры *B. mesentericus*.

Установлено, что при 6 часовой экспозиции индикаторной культуры с фагом без дополнительного ее подрачивания, удается провести индикацию бактерий *B. mesentericus* в концентрации 10^2 м.к./мл в 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.

Для ускоренной индикации бактерий *B. mesentericus* без выделения чистой культуры, нами была разработана модель постановки реакции нарастания титра фага на пищевом сырье и продуктах питания, максимально подверженных, согласно литературным данным, контаминации вышеуказанными бактериями. Использовали муку пшеничную высшего и первого сортов, персики, пряности - 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 гомогенной массы. Затем объекты исследований в количестве 10 г вносили в колбы с МПБ в соотношении 1:10 и искусственно контаминировали штаммами *B. mesentericus* 66 и *B. mesentericus* 2 в концентрации $10^1 - 10^5$ м.к./мл. В качестве контроля использовали колбы МПБ с пробами, неконтаминированными бактериями *B. mesentericus* 66 и *B. mesentericus* 2. Доказано, что увеличение титра фагов Vm-3 и Vm-8 серии УГСХА в 5 раз произошло при концентрации 10^3 м.к. бактерий *B. mesentericus* в 1 г объекта исследований. Данная концентрация бактерий

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 бляшкообразующих единиц в 1 мл). Установлено, что при 6 часовой экспозиции индикаторной культуры с фагом без дополнительного ее подрачивания, удается провести индикацию бактерий *B. mesentericus* в концентрации 10^2 м.к./мл в 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.

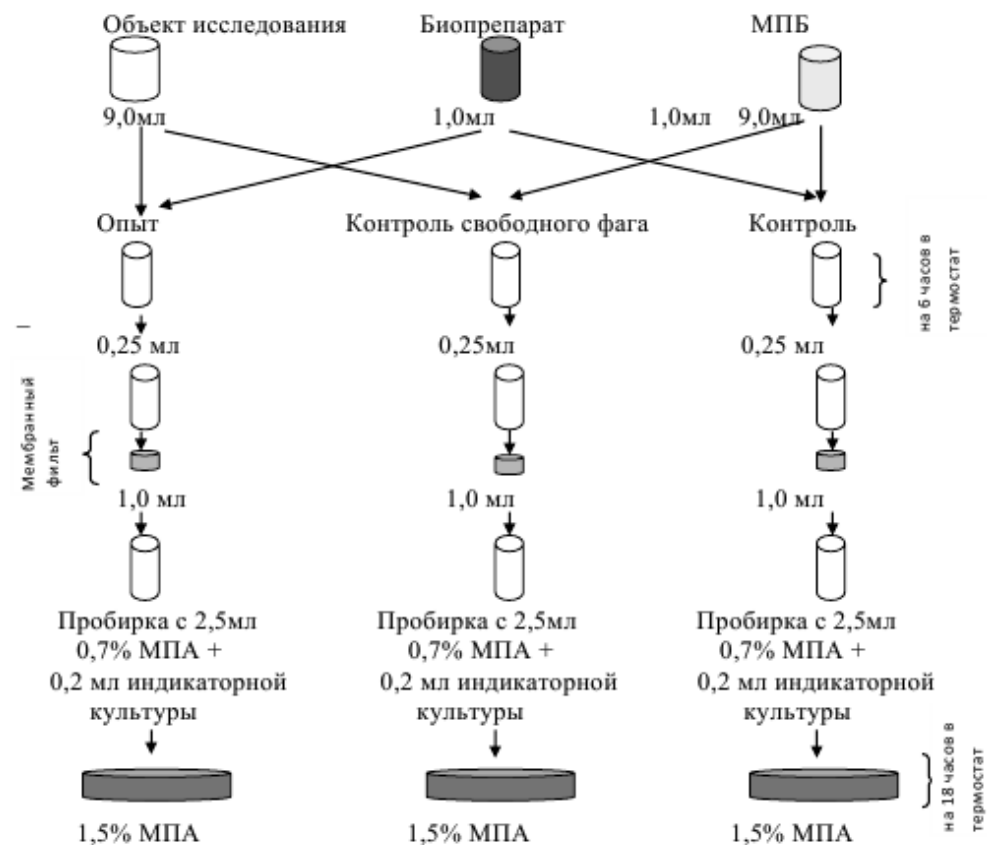


Рисунок 3. Схема постановки реакции нарастания титра фага с использованием биопрепарата.

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 *B. mesentericus*, из них для конструирования экспериментального биопрепарата отобраны фаги Bm-3 УГСХА и Bm-8 УГСХА, имеющие наиболее широкий спектр литического действия и высокие показатели литической активности, незначительно изменяющиеся при хранении в течение 12 месяцев. Разработаны биотехнологические параметры изготовления лабораторной серии биопрепарата для индикации и идентификации *B. mesentericus* в пищевом сырье и продуктах питания. Доказана возможность применения схемы фагоиндикации *B. mesentericus* в объектах внешней среды, пищевого сырья и пищевых продуктов с применением созданного биопрепарата. Предложен ускоренный метод выделения и идентификации бактерий вида *B. mesentericus* в объектах санитарного надзора с помощью созданного фагового биопрепарата.

Разработана схема фагоидентификации бактерий *B. 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 *B. mesentericus* методом реакции нарастания титра фага (РНФ) в течение 25 часов.

**КАЛДЫРКАЕВ А. И., ФЕОКТИСТОВА Н. А.
ВЫДЕЛЕНИЕ, ИЗУЧЕНИЕ ОСНОВНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ
БАКТЕРИОФАГОВ *BACILLUS CEREUS* И РАЗРАБОТКА ПАРАМЕТРОВ
ИХ ПРАКТИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ**

**KALDYRKAEV A. I., FEOKTISTOVA N. A.
THE DETACHMENT, STUDY OF THE BASIC BIOLOGICAL
PROPERTIES OF *BACILLUS CEREUS* BACTERIOPHAGE
AND DEVELOPMENT OF PARAMETERS OF THEIR APPLICATION**

ИССЛЕДОВАНИЯ 2007-2012 гг.

Бактерии *Bacillus cereus* – это грамположительные факультативно-анаэробные, подвижные, спорообразующие, палочковидные бактерии, широко распространенные в окружающей среде (почве, пресной и морской воде, кишечнике беспозвоночных, на растениях и т.д.) и имеющие 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).

Для подтверждения наличия бактерий *B. cereus* в пищевых продуктах и клинических образцах за рубежом применяют 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 – желточ-ный агар с маннитом, полимиксином и феноловым красным, и ее последующем биохимическом тестировании (Schulten et al., 2000; Food, 2000; Rhodhamel, Harmon, 2001). Однако, нестабильность ферментативных реакций *B. cereus* затрудняет межвидовую дифференциацию бактерий первой морфологической группы рода *Bacillus* и, кроме того, требует значительных временных затрат (Глинская, Пермякова, 2004; Селенинов, 2008; Ефимочкина, 2010). 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). W.J. Lee (2011) и J.H. Lee (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 диагностических, 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 работы – разработка системы фаговаров бактерий *B. cereus* для идентификации и мониторинга бактерий *B. cereus* в объектах санитарного надзора.

Объекты исследований. 105 штаммов бактерий *B. cereus*, из них 3 референс-штамма *Bacillus cereus* № 8035, № 96, № 2527. Штаммы бактерий рода *Bacillus*: *B. subtilis* – 8 штаммов; *B. mycoides* – 8 штаммов; *B. thuringiensis* – 3 штамма; вид *B. mesentericus* – 8 штаммов; *B. megaterium* – 8 штаммов; *B. pseudanthracis* – 3 штамма, которые были получены из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ ФГБОУ ВПО Ульяновская ГСХА

Штаммы бактериофагов – 57 изолятов бактериофагов *B. cereus* выделены из проб почвы различного хозяйственного назначения Приволжского, Южного и Центрального Федеральных округов.

В качестве объектов исследований использовали объекты ветеринарно-санитарного надзора.

Методы: для выделения и типизации бактерий *B. cereus* использовали схемы дифференциации бактерий рода *Bacillus* (Полховский, 1969; Gordon, 1973; Norris et al., 1981; Смирнов с соавт., 1983; Сидоров, 1995; Васильев с соавт., 1999). Изучение морфологических, культуральных, биохимических свойств выделенных бактерий проводили по методам, описанным А.С. Лабинской, Е.Г. Волгиной (2008). Выделение и изучение биологических свойств бактериофагов проводили методами, предложенными Д.М. Гольдфарбом (1961), Дж. Мейнеллом (1965), С. Лурия, Д. Дарнеллом (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 прикладных программ Statistica 6.0. (for Windows; «Stat Soft Ins.», США), Microsoft Excel 2003 (for Windows XP).

Первый этап исследования был посвящен выделению фагов бактерий *B. cereus*. Первоначально 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). Во второй серии экспериментов на культуры *B. cereus* оказывалось воздействие 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). В результате исследования 388 проб почвы различного хозяйственного назначения Приволжского, Южного и Центрального федеральных округов, нам удалось выделить 57 изолятов бактериофагов бактерий *B. cereus*.

Вторым этапом наших исследований было изучение основных биологических свойств (морфологии бляшкообразующих единиц, специфичности действия, литической активности и ее изменения при хранении, спектра литического действия) выделенных бактериофагов *B. cereus*. Экспериментальным путем было установлено, что бляшкообразующие единицы, образуемые 57 изолятами фагов *B. cereus*, имели различный тип колоний. Согласно данным Ревенко И.П. (1978), морфология бляшкообразующих единиц – это важный признак дифференциации фагов на умеренные и вирулентные. В исследованиях мы систематизированы 57 выделенных бактериофагов на 4 типа негативных колоний различающихся по размеру, форме и прозрачности (табл. 1 и рисунок 1-3).

Литическая активность выделенных фагов составила диапазон от 10^{-5} до 10^{-10} по методу Апфельмана и от $1,8 \pm 0,4 \times 10^7$ до $4,0 \pm 1,8 \times 10^{12}$ БОЕ/мл по методу Грация (табл. 2).

Для изучения спектра литического действия цереусных фагов использовали 102 штамма бактерий *B. cereus*, выделенных из пищевых продуктов и объектов ветеринарно-санитарного надзора и 3 референс-штамма, полученных из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ ФГБОУ ВПО Ульяновская ГСХА

Определение спектра литического действия проводили методом нанесения фага на газон бактериальной культуры по Отто. Установлено, что спектр литического действия 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.

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*. Установлена специфичность бактериофагов строго в пределах вида *B. cereus*.

В результате проведенных исследований была выявлена особенность селекционированных бактериофагов, связанная с избирательным лизисом тестируемых штаммов *B. cereus*, позволившая объединить бактериофаги и бактерии во взаимосвязанные группы (таблица 3).

Перекрест фагов не допускался, каждый фаг имел лизис строго внутри своей группы фагов. Фаг, обладающий более широким спектром литической активности исключался и далее

Таблица 1. Морфология бляшкообразующих единиц бактериофагов *Bacillus cereus*

№ п/п	Описание морфология бляшкообразующих единиц	Название бактериофага <i>Bacillus cereus</i>
1 тип	Прозрачные негативные колонии округлой формы, $1,0 \pm 0,5$ мм в диаметре	<i>FBc-6</i> УГСХА, <i>FBc-9</i> УГСХА, <i>FBc-21</i> УГСХА, <i>FBc-27</i> УГСХА, <i>FBc-37</i> УГСХА, <i>FBc-41</i> УГСХА, <i>FBc-49</i> УГСХА
2 тип	Прозрачные негативные колонии округлой формы, $3,5 \pm 2,0$ мм в диаметре	<i>FBc-1</i> УГСХА, <i>FBc-3</i> УГСХА, <i>FBc-4</i> УГСХА, <i>FBc-5</i> УГСХА, <i>FBc-7</i> УГСХА, <i>FBc-10</i> УГСХА, <i>FBc-11</i> УГСХА, <i>FBc-12</i> УГСХА, <i>FBc-14</i> УГСХА, <i>FBc-18</i> УГСХА, <i>FBc-19</i> УГСХА, <i>FBc-20</i> УГСХА, <i>FBc-22</i> УГСХА, <i>FBc-23</i> УГСХА, <i>FBc-26</i> УГСХА, <i>FBc-29</i> УГСХА, <i>FBc-30</i> УГСХА, <i>FBc-31</i> УГСХА, <i>FBc-32</i> УГСХА, <i>FBc-33</i> УГСХА, <i>FBc-34</i> УГСХА, <i>FBc-35</i> УГСХА, <i>FBc-36</i> УГСХА, <i>FBc-39</i> УГСХА, <i>FBc-42</i> УГСХА, <i>FBc-44</i> УГСХА, <i>FBc-45</i> УГСХА, <i>FBc-46</i> УГСХА, <i>FBc-48</i> УГСХА, <i>FBc-51</i> УГСХА, <i>FBc-53</i> УГСХА, <i>FBc-54</i> УГСХА, <i>FBc-57</i> УГСХА
3 тип	Непрозрачные негативные колонии округлой формы, 1,0-2,5 мм в диаметре	<i>FBc-2</i> УГСХА, <i>FBc-8</i> УГСХА, <i>FBc-15</i> УГСХА, <i>FBc-16</i> УГСХА, <i>FBc-50</i> УГСХА, <i>FBc-55</i> УГСХА
4 тип	Прозрачные негативные колонии округлой формы, $5,0 \pm 3,0$ мм с полным лизисом в центре, неполным лизисом в виде ореола по периферии, $8,5 \pm 0,5$ мм в диаметре	<i>FBc-13</i> УГСХА, <i>FBc-17</i> УГСХА, <i>FBc-24</i> УГСХА, <i>FBc-25</i> УГСХА, <i>FBc-28</i> УГСХА, <i>FBc-38</i> УГСХА, <i>FBc-40</i> УГСХА, <i>FBc-43</i> УГСХА, <i>FBc-47</i> УГСХА, <i>FBc-52</i> УГСХА, <i>FBc-56</i> УГСХА

не рассматривался. В результате такого отбора были исключены фаги *FBc* – 2; 5; 13; 29; 39; 53; 54 серии УГСХА. Таким образом, отобранные фаги были разделены на 18 групп (табл. 3). В последующем на их основе предложили схему, позволяющую типировать бактерии *B. cereus* на 18 фаговаров.

Алгоритм фаготипирования: 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 через 16 ± 2 часов культивирования при 36 ± 1 °C.

Лизируемые культуры сравниваются со схемой фаготипирования (табл. 4) и тестируемому штамму бацилл присваивается название группы фага, которой он лизируется (например, фаговар *I-Tun Bc* - № штамма).

Из группы выделенных фагов изготовлен набор из 18 фаговых биопрепаратов для проведения фаготипирования *B. cereus*. Для этого нами разработаны технологические параметры изготовления и контроля типовых бактериофагов *B. cereus*.

Для конструирования опытных образцов фаговых биопрепаратов был выбран 31 бактериофаг бактерий *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.

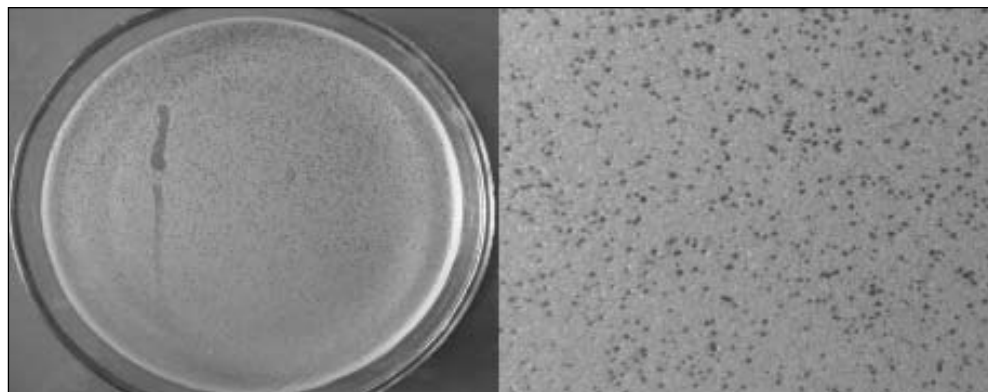


Рисунок 1. Формирование бляшкообразующих единиц бактериофагом B.a. Rot УГСХА на индикаторной культуре *B. anthracis* Шуя-15 – время термостатирования 18 часов при температуре 36 ± 1 °C

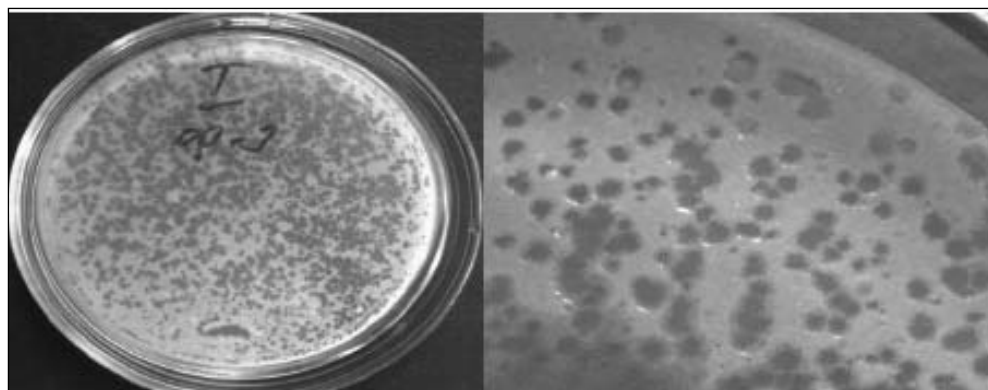


Рисунок 2. Формирование бляшкообразующих единиц «1 типа» бактериофагом *FBc* – 9 УГСХА на индикаторной культуре *B. cereus* 23 – время термостатирования 18 часов при температуре 36 ± 1 °C

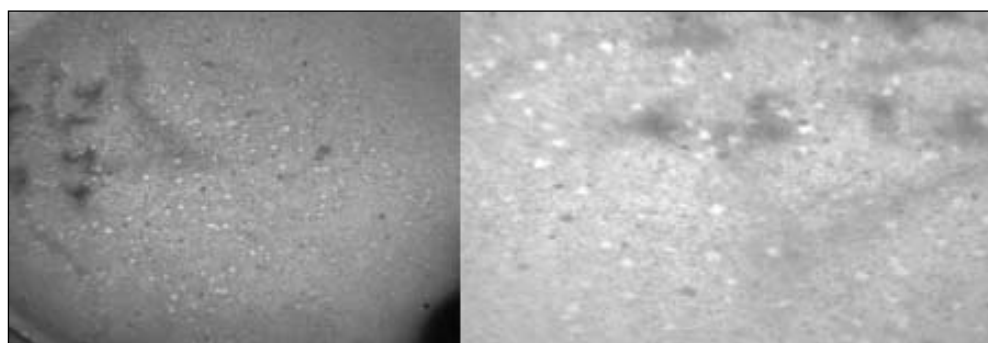


Рисунок 3. Формирование бляшкообразующих единиц «3 типа» бактериофагом *FBc* – 27 УГСХА на индикаторной культуре *B. cereus* 70 – время термостатирования 18 часов при температуре 36 ± 1 °C

Основными критериями отбора бактериофагов служили: спектр литического действия, специфичность и морфология бляшкообразующих единиц. Перечисленные бактериофаги согласно разработанной схеме фаготипирования были разделены на 18 групп, от 1 до 3 фагов серии УГСХА в каждой группе (табл. 2-3). В виду вариабельности биологических свойств селекционированных

Таблица 2. Литическая активность бактериофагов *B.cereus*

№ п/п	Название бактериофага	Литическая активность (титр)	
		титрование в МПБ, степень разведения	метод диффузии в мягком слое двуслойного МПА, БОЕ/мл
1.	<i>FBe</i> – 1 УГСХА	10^{-10}	$3,0 \pm 1,2 \times 10^{11}$
2.	<i>FBe</i> – 2 УГСХА	10^{-9}	$2,0 \pm 0,3 \times 10^{10}$
3.	<i>FBe</i> – 3 УГСХА	10^{-10}	$3,6 \pm 1,1 \times 10^{11}$
4.	<i>FBe</i> – 4 УГСХА	10^{-7}	$2,4 \pm 0,2 \times 10^8$
5.	<i>FBe</i> – 5 УГСХА	10^{-8}	$4,0 \pm 1,7 \times 10^9$
6.	<i>FBe</i> – 6 УГСХА	10^{-8}	$1,0 \pm 0,8 \times 10^9$
7.	<i>FBe</i> – 7 УГСХА	10^{-10}	$6,0 \pm 2,4 \times 10^{11}$
8.	<i>FBe</i> – 8 УГСХА	10^{-9}	$2,1 \pm 0,6 \times 10^{10}$
9.	<i>FBe</i> – 9 УГСХА	10^{-8}	$1,8 \pm 0,2 \times 10^9$
10.	<i>FBe</i> – 10 УГСХА	10^{-9}	$5,0 \pm 1,8 \times 10^{10}$
11.	<i>FBe</i> – 11 УГСХА	10^{-7}	$6,0 \pm 2,5 \times 10^8$
12.	<i>FBe</i> – 12 УГСХА	10^{-10}	$5,0 \pm 1,2 \times 10^{11}$
13.	<i>FBe</i> – 13 УГСХА	10^{-8}	$1,8 \pm 0,2 \times 10^9$
14.	<i>FBe</i> – 14 УГСХА	10^{-7}	$1,4 \pm 0,2 \times 10^8$
15.	<i>FBe</i> – 15 УГСХА	10^{-10}	$2,0 \pm 1,8 \times 10^{11}$
16.	<i>FBe</i> – 16 УГСХА	10^{-9}	$2,0 \pm 0,2 \times 10^{10}$
17.	<i>FBe</i> – 17 УГСХА	10^{-10}	$3,0 \pm 1,2 \times 10^{11}$
18.	<i>FBe</i> – 18 УГСХА	10^{-9}	$2,0 \pm 0,5 \times 10^{10}$
19.	<i>FBe</i> – 19 УГСХА	10^{-7}	$3,6 \pm 2,2 \times 10^8$
20.	<i>FBe</i> – 20 УГСХА	10^{-9}	$1,5 \pm 0,7 \times 10^{10}$
21.	<i>FBe</i> – 21 УГСХА	10^{-10}	$4,0 \pm 1,8 \times 10^{12}$
22.	<i>FBe</i> – 22 УГСХА	10^{-7}	$1,0 \pm 0,5 \times 10^8$
23.	<i>FBe</i> – 23 УГСХА	10^{-6}	$6,0 \pm 3,2 \times 10^7$
24.	<i>FBe</i> – 24 УГСХА	10^{-8}	$2,1 \pm 1,3 \times 10^9$
25.	<i>FBe</i> – 25 УГСХА	10^{-7}	$1,8 \pm 0,6 \times 10^8$
26.	<i>FBe</i> – 26 УГСХА	10^{-7}	$5,0 \pm 1,4 \times 10^8$
27.	<i>FBe</i> – 27 УГСХА	10^{-9}	$6,0 \pm 2,5 \times 10^{10}$
28.	<i>FBe</i> – 28 УГСХА	10^{-10}	$9,0 \pm 1,0 \times 10^{11}$
29.	<i>FBe</i> – 29 УГСХА	10^{-8}	$1,8 \pm 0,4 \times 10^9$
30.	<i>FBe</i> – 30 УГСХА	10^{-9}	$1,4 \pm 0,5 \times 10^{10}$
31.	<i>FBe</i> – 31 УГСХА	10^{-7}	$2,0 \pm 1,2 \times 10^8$
32.	<i>FBe</i> – 32 УГСХА	10^{-8}	$2,0 \pm 0,8 \times 10^9$
33.	<i>FBe</i> – 33 УГСХА	10^{-10}	$3,0 \pm 0,4 \times 10^{11}$
34.	<i>FBe</i> – 34 УГСХА	10^{-9}	$2,0 \pm 0,2 \times 10^{10}$
35.	<i>FBe</i> – 35 УГСХА	10^{-10}	$3,6 \pm 2,2 \times 10^{11}$

Продолжение таблицы 2. Литическая активность бактериофагов *B.cereus*

№ п/п	Название бактериофага	Литическая активность (титр)	
		титрование в МПБ, степень разведения	метод диффузии в мягком слое двуслойного МПА, БОЕ/мл
36.	<i>FBc</i> – 36 УГСХА	10^{-7}	$2,4 \pm 1,4 \times 10^8$
37.	<i>FBc</i> – 37 УГСХА	10^{-8}	$4,0 \pm 1,2 \times 10^9$
38.	<i>FBc</i> – 38 УГСХА	10^{-7}	$1,0 \pm 0,4 \times 10^8$
39.	<i>FBc</i> – 39 УГСХА	10^{-9}	$6,0 \pm 2,2 \times 10^{10}$
40.	<i>FBc</i> – 40 УГСХА	10^{-9}	$2,1 \pm 1,2 \times 10^{10}$
41.	<i>FBc</i> – 41 УГСХА	10^{-8}	$1,8 \pm 0,6 \times 10^9$
42.	<i>FBc</i> – 42 УГСХА	10^{-9}	$5,0 \pm 0,8 \times 10^{10}$
43.	<i>FBc</i> – 43 УГСХА	10^{-8}	$4,0 \pm 1,2 \times 10^9$
44.	<i>FBc</i> – 44 УГСХА	10^{-9}	$5,0 \pm 0,5 \times 10^{11}$
45.	<i>FBc</i> – 45 УГСХА	10^{-8}	$1,8 \pm 1,1 \times 10^9$
46.	<i>FBc</i> – 46 УГСХА	10^{-7}	$1,4 \pm 0,2 \times 10^8$
47.	<i>FBc</i> – 47 УГСХА	10^{-10}	$2,0 \pm 0,6 \times 10^{11}$
48.	<i>FBc</i> – 48 УГСХА	10^{-9}	$2,0 \pm 0,8 \times 10^{10}$
49.	<i>FBc</i> – 49 УГСХА	10^{-10}	$3,2 \pm 0,2 \times 10^{11}$
50.	<i>FBc</i> – 50 УГСХА	10^{-9}	$2,0 \pm 0,6 \times 10^{10}$
51.	<i>FBc</i> – 51 УГСХА	10^{-6}	$3,6 \pm 1,4 \times 10^7$
52.	<i>FBc</i> – 52 УГСХА	10^{-10}	$2,4 \pm 1,2 \times 10^{12}$
53.	<i>FBc</i> – 53 УГСХА	10^{-7}	$4,0 \pm 1,4 \times 10^9$
54.	<i>FBc</i> – 54 УГСХА	10^{-7}	$1,0 \pm 0,8 \times 10^8$
55.	<i>FBc</i> – 55 УГСХА	10^{-9}	$4,2 \pm 1,2 \times 10^{10}$
56.	<i>FBc</i> – 56 УГСХА	10^{-9}	$2,2 \pm 0,7 \times 10^{11}$
57.	<i>FBc</i> – 57 УГСХА	10^{-6}	$1,8 \pm 0,4 \times 10^7$

бактериофагов было предложено изготавливать каждый из них в отдельности и смешивать перед фасовкой во флаконы.

В результате проведенных исследований была разработана следующая пилотная технология производства биопрепарата:

- получение биологического сырья для изготовления биопрепарата (подготовка индикаторных культур бактерий *B. cereus* и подготовка специфичных фагов *B. cereus*);
- определение биологической активности полученного сырья (концентрации бактерий, титр бактериофага);
- расчет оптимальных соотношений индикаторной бактериальной культуры и фага с учетом температуры и времени культивирования;
- стерилизующая фильтрация фаголизата, с целью получения отдельных штаммов бактериофагов (31 фаг);
- составление линейки из 18 наборов диагностических фаговых биопрепаратов;
- розлив суспензии фагов во флаконы (ампулы);
- контроль биопрепаратов (проверка специфичности, спектра литического действия, стерильности и т.д.).

Качество изготовленных биопрепаратов «1-Фаг *Bc*» - «18-Фаг *Bc*» определяли по следующим показателям: внешнему виду, микробиологической чистоте, литической активности (титру), спектру литического действия и специфичности. Количество контролируемых образцов зависело от объема

партии готовой продукции, но не могло составлять менее 3 штук каждого из 18 биопрепаратов. Ответствие внешнего вида готового продукта определяли визуально. Индикаторный фаг не должен 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 Грация, на эталонной культуре соответствующей каждому штамму бактериофага. Препарат считали годным, если содержание бляшкообразующих единиц было не ниже 10^8 БОЕ/мл. Спектр литического действия и специфичность фаговых биопрепаратов оценивали на соответствие аналогичных свойств исходных бактериофагов, составляющих каждый набор. Дату изготовления серии исчисляли со дня закупки флаконов. Срок годности диагностических наборов бактериофагов устанавливали при температуре 2–4°C в течение времени, когда не происходило снижения показателя литической активности биопрепаратов. Установлено, что биопрепараты оставались годным в течение 12 месяцев после фасовки при хранении при температуре 2–4°C.

С учетом строгой родовой специфичности селекционированных бактериофагов нами была разработана схема ускоренной идентификации *B. cereus* в пробах пищевых продуктов с использованием набора специфичных фаговых биопрепаратов. Оценка эффективности была проведена при производственных испытаниях в аккредитованной лаборатории ОГУ «Ульяновская областная ветеринарная лаборатория». В качестве контроля применяли схему ГОСТ 1044.8-88 «Продукты пищевые. Методы определения *Bacillus cereus*». Алгоритм исследования: на поверхность МПА в чашках Петри пастеровской пипеткой наносили 18-24 часовую бульонную культуру исследуемых микроорганизмов. Чашки термостатировали в течение 15-20 минут для подсушивания при температуре $36 \pm 1^\circ\text{C}$, а затем, предварительно поделив на 7 секторов, на поверхность засеянной среды пастеровской пипеткой в размеченные сектора вносили поочередно 18 биопрепаратов с 1-Фаг *Bc* УГСХА по 18-Фаг *Bc* УГСХА. Для исследования 1 бактериальной культуры в опыте использовали 3 чашки Петри с МПА.

По результатам производственных испытаний было установлено, что метод позволяет идентифицировать бактерии *B. cereus* за 52 часа, в то время как по традиционной бактериологической схеме идентификации проводится в течение 96-120 часов. Таким образом, разработанный алгоритм идентификации бактерий *B. cereus* с помощью набора специфичных биопрепаратов бактериофагов существенно сокращает время проведения процедуры идентификации 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*. 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 идентификации бактерий *B. cereus* с помощью набора специфичных биопрепаратов бактериофагов не только сокращает до 52 часов процедуру идентификации, но и предполагает дополнительное типирование *B. cereus* на фаговары. Полученные в соответствии с пилотной технологией фаговые биопрепараты прошли производственные испытания в 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». На основании отработанной пилотной технологии получения фаговых биопрепаратов создана «Временная инструкция по изготовлению и контролю лабораторной серии индикаторных бактериофагов *B. cereus*».

Таблица 3. Характеристика фаговаров *B. cereus*

Фаговары <i>B. cereus</i>	Название бактериофагов УГСХА	Морфология негативных колоний	Название лизируемых штаммов <i>B. cereus</i>
1-Фаг Bc	<i>FBc</i> – 7 УГСХА	2 тип	№8035, №96, 4, 8, 18, 12, 17, 18, 20, 37, 42, 49, 50, 54
	<i>FBc</i> – 28 УГСХА	4 тип	1, 2, 4, 8, 18, 12, 17, 18, 20, 21, 37, 42, 49, 50
2-Фаг Bc	<i>FBc</i> – 3 УГСХА	2 тип	5, 6, 16, 25, 29, 30, 31, 33
	<i>FBc</i> – 6 УГСХА	1 тип	16, 31, 33
	<i>FBc</i> – 56 УГСХА	4 тип	13, 25, 26, 29, 30
3- Фаг Bc	<i>FBc</i> – 1 УГСХА	2 тип	№2527, 53, 64, 82, 85, 87, 90, 95, 98, 100
	<i>FBc</i> – 17 УГСХА	4 тип	38, 65, 82, 101
4- Фаг Bc	<i>FBc</i> – 50 УГСХА	3 тип	22, 76, 83
5- Фаг Bc	<i>FBc</i> – 43 УГСХА	4 тип	56
	<i>FBc</i> – 44 УГСХА	2 тип	102
6- Фаг Bc	<i>FBc</i> – 30 УГСХА	2 тип	9, 27, 55, 77
	<i>FBc</i> – 47 УГСХА	4 тип	9, 72
7- Фаг Bc	<i>FBc</i> – 33 УГСХА	2 тип	19, 28, 32, 36, 57, 68, 71, 80
8- Фаг Bc	<i>FBc</i> – 14 УГСХА	2 тип	7, 15, 39, 41, 74, 89
	<i>FBc</i> – 38 УГСХА	4 тип	14, 52
9- Фаг Bc	<i>FBc</i> – 21 УГСХА	1 тип	75
	<i>FBc</i> – 55 УГСХА	3 тип	75
10-Фаг Bc	<i>FBc</i> – 9 УГСХА	1 тип	23
	<i>FBc</i> – 15 УГСХА	3 тип	23
11- Фаг Bc	<i>FBc</i> – 18 УГСХА	2 тип	92
	<i>FBc</i> – 49 УГСХА	1 тип	92
12- Фаг Bc	<i>FBc</i> – 41 УГСХА	1 тип	46, 51
	<i>FBc</i> – 46 УГСХА	2 тип	51, 94
13- Фаг Bc	<i>FBc</i> – 23 УГСХА	2 тип	84
	<i>FBc</i> – 37 УГСХА	1 тип	84
14- Фаг Bc	<i>FBc</i> – 19 УГСХА	2 тип	45, 59
	<i>FBc</i> – 52 УГСХА	4 тип	45, 62
15- Фаг Bc	<i>FBc</i> – 27 УГСХА	1 тип	60, 70, 88, 91, 97
16- Фаг Bc	<i>FBc</i> – 20 УГСХА	2 тип	66, 78, 79
17- Фаг Bc	<i>FBc</i> – 34 УГСХА	2 тип	43, 81
18- Фаг Bc	<i>FBc</i> – 51 УГСХА	2 тип	35, 47, 48, 61, 67, 93, 99

Таблица 4. Схема фаготипирования

Типы фагов																		
Фаговары (фаготипы) бактерии	1-Тип Вс	2-Тип Вс	3-Тип Вс	4-Тип Вс	5-Тип Вс	6-Тип Вс	7-Тип Вс	8-Тип Вс	9-Тип Вс	10-Тип Вс	11-Тип Вс	12-Тип Вс	13-Тип Вс	14-Тип Вс	15-Тип Вс	16-Тип Вс	17-Тип Вс	18-Тип Вс
1-Тип Вс	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-Тип Вс	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3-Тип Вс	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4-Тип Вс	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5-Тип Вс	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6-Тип Вс	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7-Тип Вс	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8-Тип Вс	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9-Тип Вс	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10-Тип Вс	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
11-Тип Вс	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
12-Тип Вс	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
13-Тип Вс	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
14-Тип Вс	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
15-Тип Вс	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
16-Тип Вс	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
17-Тип Вс	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
18-Тип Вс	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

Примечание – «+» - лизис; «-» - отсутствие лизиса.

ФЕОКТИСТОВА Н.А., МАКЕЕВ В.А.

**ВЫДЕЛЕНИЕ, ИЗУЧЕНИЕ ОСНОВНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ
БАКТЕРИОФАГОВ *BACILLUS MYCOIDES* И РАЗРАБОТКА ПАРАМЕТРОВ
ИХ ПРАКТИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ**

FEOKTOSTOVA N.A., MAKEEV V.A.

**THE DETACHMENT, STUDY OF THE BASIC BIOLOGICAL
PROPERTIES OF *BACILLUS MYCOIDES* BACTERIOPHAGE AND DE-
VELOPMENT OF PARAMETERS OF THEIR APPLICATION**

ИССЛЕДОВАНИЯ 2011-2013 гг.

Группа «*Bacillus cereus*» состоит из семи видов бактерий *B. cereus*, *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. cytotoxicus* и *B. weihenstephanensis* (Soufiane B. & Côté J.C, 2013), которые имеют не только сходные фенотипические свойства, но и последовательности оснований 16S рРНК, что в случае *B. cereus*, *B. mycoides* и *B. thuringiensis*, даже может вызывать сомнения в законности их разделения на отдельные виды (Nakamura L.K & Jackson M.A., 1995). Бактерии *B. mycoides*, открытые Флюгге в 1886 году, грамположительные, неподвижные почвенные бактерии отдела *Firmicutes*, растущие на агаре как цепочки из клеток, связанных между собой конец в ко-

нец, образующие радиальные нити, изогнутые по часовой или против часовой стрелки (Stratford P.J. et al., 2013, Carmen Di Franco et al. 2002). И хотя данный вид бацилл современная микробиология **относит к сапрофитам, его ближайшие родственники являются патогенными для человека** (*B. cereus*, *B. anthracis*), животных (*B. anthracis*) и насекомых (*B. thuringiensis*) (Han C. et al., 2006). В тоже время ряд авторов, основываясь на результатах молекулярно-генетических методов исследования, предупреждают о широком распространении локусов патогенности, кодирующих энтеротоксины, среди штаммов формально относящихся к *B. mycoides*. Это относится к генам кодирующим цитотоксин К (cyt K), одному из трех компонентов энтеротоксина HBL (hblA) и двум компонентам NHE (nheA, nheC) вызывающим проявления диарейного синдрома при пищевой токсикоинфекции (Oltuszk-Walczak E., Walczak P., 2013, Zhou G. Et al., 2008, Prüss B.M. et al., 1999). С эпидемиологической точки зрения вероятность пищевого отравления, вызываемого *B. mycoides*, также нельзя сбрасывать со счетов. Вспышки токсикоинфекции, вызванные этим видом бацилл, были зарегистрированы в Канаде и на Тайване, сообщается также о случае эндогенного отфальмита вызванного *B. mycoides* (Hsieh Y.M. et al., 1999, McIntyre L. et al., 2008, Sahu C., 2013). Однако, чаще всего этот вид контаминирует пищевые продукты, нередко вызывая их порчу (Cosentino S., 1997, Manzano M., 2003).

В настоящее время в бактериологических лабораториях на территории Российской Федерации идентификация *B. mycoides* основана на выделении чистой культуры микроорганизма и изучении его биохимических свойств. Этот метод трудоемок и не достаточно эффективен из-за выраженного полиморфизма ферментативных свойств данного вида бактерий (Ефимочкина Н.Р., 2010). Широкое распространение находят молекулярно-генетические методы идентификации бацилл, в частности различные модификации ПЦР-анализа (Formińska K. et al., 2012, Tallent et al., 2012). Но чрезвычайное фенотипическое и генетическое сходство бацилл из группы «*Bacillus cereus*» все еще предполагает поиск надежного метода индикации и идентификации названных микроорганизмов. В этой связи, вызывает определенный интерес практическое применение бактериофагов в процедуре биоконтроля продуктов питания, подразумевающее их использование не только в качестве средств лечения животных и сельскохозяйственных культур и деkontаминационной обработке пищевого сырья и оборудования производств, но и в диагностических целях для идентификации пищевых патогенов (Sulakvelidze A., 2013, Алешкин А.В. и др., 2013). Создание отсутствующего на сегодняшний день в Российской Федерации специфического диагностикума на базе бактериофагов активных в отношении *B. mycoides* позволит в сжатые сроки проводить надежную идентификацию и индикацию данного вида бактерий в объектах санитарно-эпидемиологического надзора.

Цель исследования – разработать диагностическую систему эффективной фагоиндикации и фагоидентификации бактерий *B. mycoides* в объектах санитарно-эпидемиологического надзора.

Объекты исследований. 12 штаммов бактерий *B. mycoides* из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина», 10 штаммов были выделены в процессе научного исследования из проб пищевых продуктов и других объектов санитарного надзора.

Штаммы бактерий *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. mycoides* были получены из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ ФГБОУ ВПО Ульяновская ГСХА.

Штаммы бактериофагов – 8 изолятов бактериофагов *B. mycoides*, выделены из проб почвы Ульяновской и Самарской областей в процессе диссертационной работы.

В качестве объектов исследований использовали также пищевые продукты, приобретенные на продовольственных рынках г. Ульяновска и г. Самары.

Методы: для выделения бактерий *B. mycoides* 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. Блинковой, А.С. Ещиной (2004). Выделение и изучение биологических свойств бактериофагов проводили методами, предложенными Д.М. Гольдфарбом (1961),

А. И. Калдыркаевым (2013), Э. Каттер (2012), В.Я. Ганюшкиным (1988), С.Н. Золотухиным (2007), А.Г. Шестаковым (2010). Селекцию бактериофагов и повышение их литической активности проводили по методике, описанной С.Н. Золотухиным (2007). Обнаружение бактерий *B. mycoides* 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 опытов проводили с применением пакета прикладных программ Statistica 6.0. (for Windows; «Stat Soft Ins.», США), Microsoft Excel 2003 (for Windows XP).

Первым этапом работы было выделение фагов бактерий *B. mycoides*. Первоначально мы исследовали штаммы *B. mycoides* как потенциально лизогенные. Поиск умеренных фагов проводили по методике С. Лурия и Д. Дарнелла (1970) в модификации А.Г. Шестакова (2009). В первой серии экспериментов мы применяли методику выделения бактериофагов бацилл без воздействия на них индуцирующего фактора. Во второй серии экспериментов на культуры *B. mycoides*, исследуемые как «лизогенные», мы воздействовали индуцирующим фактором (воздействие на бактерии ультрафиолетовых лучей в течение 5-20 секунд 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 (2011). Полученный фильтрат исследовали на наличие фага на имеющихся культурах *B. mycoides* методом агаровых слоев. В исследованиях не наблюдалось естественной и искусственной лизогенности исследуемых штаммов *B. mycoides*, 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 384 проб почвы различного хозяйственного назначения Приволжского федерального округа, нам удалось выделить 8 изолятов фагов бактерий *B. mycoides*.

Селекцию фагов проводили десятикратным пассированием изолированных негативных колоний на мясо-пептонном агаре с перевиванием на мясо-пептонный бульон (Золотухин, 2007). Фаги очищали от бактериальных клеток через мембранные фильтры фирмы Millipore (filter type: 0,22 µm GV). Все фаголизаты укупоривались в стерильные флаконы и хранили при низкой температуре (4-6 °C) **не используя консервантов.**

Морфология бляшкообразующих единиц. Морфологию бляшкообразующих единиц изучали на плотных питательных средах для дифференциации их на умеренные и вирулентные, согласно классификации И.П. Ревенко (1978). Бляшкообразующие единицы, образуемые 8 изолятами фагов *B. mycoides*, были разделены на две группы (табл. 1).

Специфичность. Важнейшей характеристикой фага, входящего в состав биопрепарата для индикации и идентификации бактерий, является его специфичность в пределах вида. Изучение специфичности 8 выделенных изолятов бактериофагов *B. mycoides* мы проводили на культурах гомологичного рода: *B. cereus* – 105 штаммов, *B. thuringiensis* – 3 штамма, *B. subtilis* – 35 штаммов, *B. mesentericus (pumilus)* – 15 штаммов, *B. megaterium* – 14 штаммов. Эксперимент ставили, используя методику А.И. Калдыркаева (2011). Полученные нами бактериофаги строго специфичны в пределах вида, о чем свидетельствуют результаты.

Литическую активность выделенных бактериофагов оценивали по их способности вызывать лизис бактериальной культуры на плотной питательной среде методом агаровых слоев (Гольдфарб, 1961). Эксперименты проводили троекратно. Эталонные культуры выращивали на бульоне в течение 18 часов. Учет результатов проводили через 18±2 часов инкубирования посевов в термостате при 36±1 °C, используя формулу (Гольдфарб, 1961):

$$X = Y \times N, \text{ где}$$

Y – количество негативных колоний фага, выросших на чашке Петри,

N – фактор разведения.

Результаты исследований свидетельствуют, что выделенные бактериофаги *B. mycoides* име-

ют различный титр (таблица 2). Показатели литической активности находятся в диапазоне от $2,3 \pm 0,7 \times 10^6$ до $6,2 \pm 0,8 \times 10^{12}$ БОЕ/мл. Наиболее большой активностью обладали фаги FB мус – 4 УГСХА и FB мус – 8 УГСХА - $6,2 \pm 0,8 \times 10^{12}$ и $1,8 \pm 0,2 \times 10^{10}$ БОЕ/мл, соответственно.

Спектр литического действия. Важнейшим биологическим свойством выделенных фагов *B. mycoides* был спектр их действия на штаммы бактерий в пределах одного вида. Изучение спектра литического действия отобранных фагов использовали 10 штаммов бактерий *B. mycoides*, выделенных самостоятельно из проб пищевого сырья и продуктов питания и 2 штамма были получены из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ ФГБОУ ВПО Ульяновская ГСХА. Исследования проводили методом «стекающая капля», т.е. метод нанесения фага на газон бактериальной культуры. Опытным путем было установлено, что изучаемые бактериофаги имеют различный спектр действия по отношению к 12 изучаемым штаммам *B. mycoides* (таблица 3).

Опыты демонстрируют, что наиболее широким спектром литического действия по отношению к изучаемым культурам обладают штаммы фагов FB мус – 4 УГСХА и FB мус – 8 УГСХА, совокупный процент лизиса составил 100 % (табл. 3).

Для конструирования биопрепарата было отобрано два фага FB мус – 4 и FB мус – 8 серии УГСХА, у которых были самые высокие показателями литической активности и максимально широкий совместный спектр литического действия.

Последующие эксперименты были направлены на изучение изменения литической активности укупоренных во флаконы бактериофагов FB мус – 4 и FB мус – 8 серии УГСХА, хранящихся при температуре 2-4 °С в течение 12 месяцев. Установлено, что в течение 3 месяцев показатели литической активности исследуемых бактериофагов FB мус – 4 УГСХА и FB мус – 8 УГСХА оставались без изменений, $6,2 \pm 0,8 \times 10^{12}$ и $1,8 \pm 0,2 \times 10^{10}$ БОЕ/мл, соответственно. Через 6 месяцев литическая активность снижалась и составила у фага FB мус – 4 УГСХА $3,9 \pm 0,2 \times 10^9$ БОЕ/мл и у FB мус – 8 УГСХА - $5,1 \pm 0,3 \times 10^9$ БОЕ/мл, через 9 месяцев - $2,8 \pm 0,5 \times 10^7$ и $2,1 \pm 0,3 \times 10^8$ БОЕ/мл, через 12 месяцев - $1,7 \pm 0,4 \times 10^7$ и $0,8 \pm 0,1 \times 10^7$ БОЕ/мл, соответственно.

Экспериментально установлено, что пассирование каждого бактериофага на исходном штамме бактерий *B. mycoides* в течение 7-9 пассажей методом агаровых слоев восстанавливает литическую активность на 1 порядок.

Для изготовления биопрепарата использовали штаммы фагов FB мус - 4 УГСХА и FB мус - 8

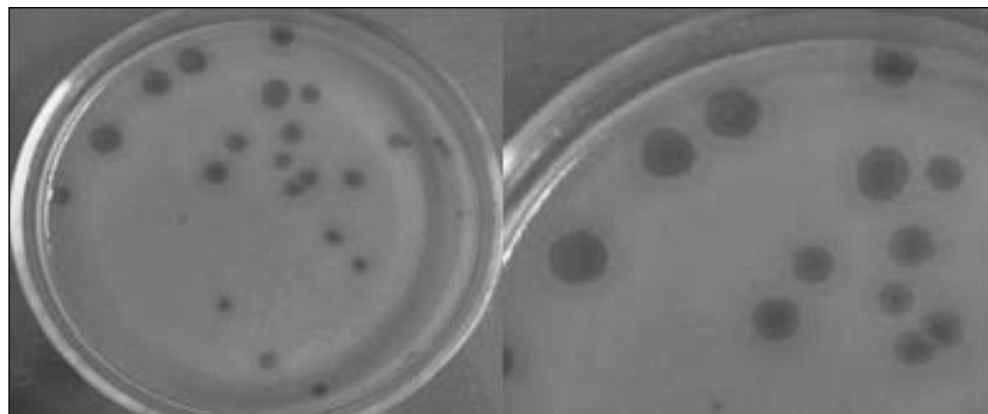


Рисунок 1. Формирование бляшкообразующих единиц выделенным бактериофагом FB мус – 4 УГСХА при культивировании на штамме *B. mycoides* 4 – время термостатирования 18 ± 2 часов при температуре 36 ± 1 °С

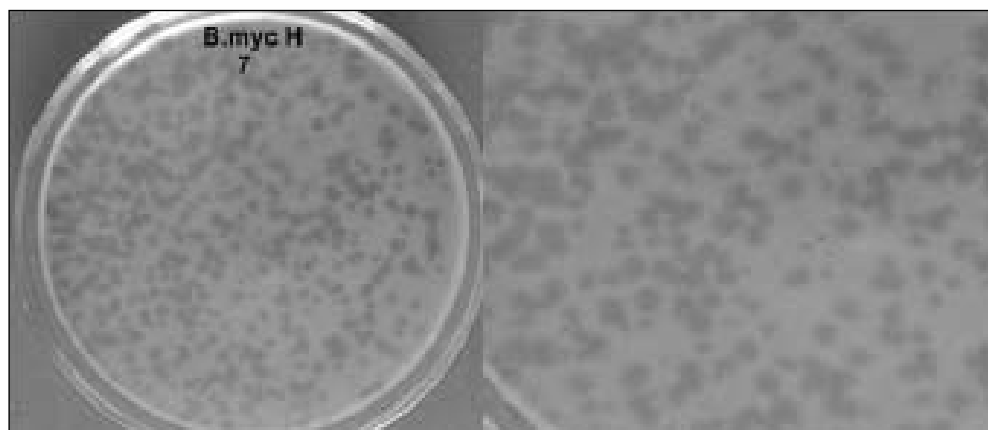


Рисунок 2. Формирование бляшкообразующих единиц выделенным бактериофагом FB мус – 7 УГСХА при культивировании на штамме *Bacillus mycoides* 537 – время термостатирования 18 ± 2 часов при температуре 36 ± 1 °С

УГСХА и штаммы бактерий *Bacillus mycoides* 4 и *Bacillus mycoides* 48. 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 FB мус - 4 УГСХА и FB мус - 8 УГСХА с индикаторными культурами была температура 36±1 °С. Определено оптимальное соотношение бактериофага FB мус - 4 УГСХА и штамма *Bacillus mycoides* 4 – 1:10 (0,1 мл фага на 1,0 мл индикаторной культуры), время пассажа составляет 6 часов; параметры культивирования бактериофага FB мус - 8 УГСХА с культурой *B. mycoides* 48 – 1:5 (0,2 мл фага на 1,0 мл индикаторной культуры), время пассажа составляет 6 часов.

Фаги очищаются от бактериальной массы методом фильтрации через мембранный фильтр фирмы Millipore (filter type: 0,22 µm GV), после чего они разливаются во флаконы по 10 мл. Далее определяют титр фага, контролируют его на стерильность и чистоту. Биопрепарат состоит из 2 флаконов со светло-желтой прозрачной жидкостью (цвет засеянной среды), он не должен иметь осадка и посторонних примесей. Титр должен быть не ниже 10⁸ БОЕ/мл. Дата серии изготовления исчисляют со дня укупоривания флаконов. Бактериофаг хранится 12 месяцев при температуре 2-4 °С.

Используя строгую специфичность биопрепарата, нами был разработан ускоренный метод идентификации бактерии *B. mycoides* 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 (рисунок 3) позволяет идентифицировать бактерии *B. mycoides* 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 параметры постановки реакции.

Были проведены эксперименты на модели – искусственно контаминированном бактериями *B. mycoides* в концентрации 10¹ - 10⁵ м.к./мл мясопептонном бульоне. 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 бляшкообразующих единиц, образовавшихся в контроле превышало количество бляшкообразующих единиц, образовавшихся в эксперименте в 5 и более раз.

Доказано, что количество бляшкообразующих единиц в эксперименте, более чем в 5 раз превышает количество бляшкообразующих единиц в контроле при контаминации МПБ бактериями *B. mycoides* в концентрации 10² 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 бляшкообразующих единиц в 1 мл).

Установлено, что при 6 часовой экспозиции индикаторной культуры с фагом без дополнительного ее подрачивания, удается провести индикацию бактерий *B. mycoides* в концентрации 10² 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.

Для разработки схемы биоиндикации бактерий вида *B. mycoides* 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 вышеперечисленными бактериями. В качестве объектов использовали пробы воды, пищевые продукты (пряности - красный молотый перец, корица молотая; мясо охлажденное (говядина и

Таблица 1. Морфология негативных колоний фагов *B. mycoides*

№ п/п	Описание морфология бляшкообразующих единиц	Название бактериофага
		<i>Bacillus mycoides</i>
2 тип	Прозрачные негативные колонии округлой формы, 3,5±2,0 мм в диаметре	<i>FB myc</i> – 1 УГСХА, <i>FB myc</i> – 2 УГСХА, <i>FB myc</i> – 3 УГСХА, <i>FB myc</i> – 5 УГСХА, <i>FB myc</i> – 6 УГСХА, <i>FB myc</i> – 7 УГСХА, <i>FB myc</i> – 8 УГСХА
4 тип	Прозрачные негативные колонии округлой формы, 5,0±3,0 мм с полным лизисом в центре, неполным лизисом в виде ореола по периферии, 8,5±0,5 мм в диаметре	<i>FB myc</i> – 4 УГСХА

Таблица 2. Литическая активность (титр) *Bacillus mycoides*

№ п/п	Название бактериофага	Литическая активность (титр)	
		титрование в МПБ, степень разведения	метод диффузии в мягком слое двуслойного МПА, БОЕ/мл
1.	<i>FB myc</i> – 1 УГСХА	10 ⁻⁸	1,5±0,4 x10 ⁹
2.	<i>FB myc</i> – 2 УГСХА	10 ⁻⁵	2,3±0,7 x10 ⁶
3.	<i>FB myc</i> – 3 УГСХА	10 ⁻⁷	7,8±0,2 x10 ⁸
4.	<i>FB myc</i> – 4 УГСХА	10 ⁻¹⁰	6,2±0,8 x10 ¹²
5.	<i>FB myc</i> – 5 УГСХА	10 ⁻⁹	1,6±0,6 x10 ¹⁰
6.	<i>FB myc</i> – 6 УГСХА	10 ⁻⁸	2,2±0,4 x10 ⁸
7.	<i>FB myc</i> – 7 УГСХА	10 ⁻⁶	4,2±1,3 x10 ⁷
8.	<i>FB myc</i> – 8 УГСХА	10 ⁻⁹	1,8±0,2 x10 ¹⁰

Таблица 3. Характеристика выделенных фагов бактерий *Bacillus mycoides*

№ п/п	Название бактериофага	Тип БОЕ	Наименование лизируемых штаммов	Кол-во лизируемых штаммов бактерий	
				шт.	%
1.	<i>FB myc</i> – 1 УГСХА	2 тип	<i>B. mycoides</i> 4, 6, 537, Н	4	33,3
2.	<i>FB myc</i> – 2 УГСХА	2 тип	<i>B. mycoides</i> 1, 2, 5, 6, 9, 10, 537	7	58,3
3.	<i>FB myc</i> – 3 УГСХА	2 тип	<i>B. mycoides</i> 3, 7, 8, 10	4	33,3
4.	<i>FB myc</i> – 4 УГСХА	4 тип	<i>B. mycoides</i> 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 537	10	83,3
5.	<i>FB myc</i> – 5 УГСХА	2 тип	<i>B. mycoides</i> 537, Н	2	16,6
6.	<i>FB myc</i> – 6 УГСХА	2 тип	<i>B. mycoides</i> 2, 4, 7, 8, 10, Н	6	50,0
7.	<i>FB myc</i> – 7 УГСХА	2 тип	<i>B. mycoides</i> 1, 2, 9, 537	5	41,6
8.	<i>FB myc</i> – 8 УГСХА	2 тип	<i>B. mycoides</i> 1, 2, 4, 7, 8, 9, 537, Н	8	66,7

баранина)). 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 *B. mycoides* 4 и *B. mycoides* 48 в концентрации

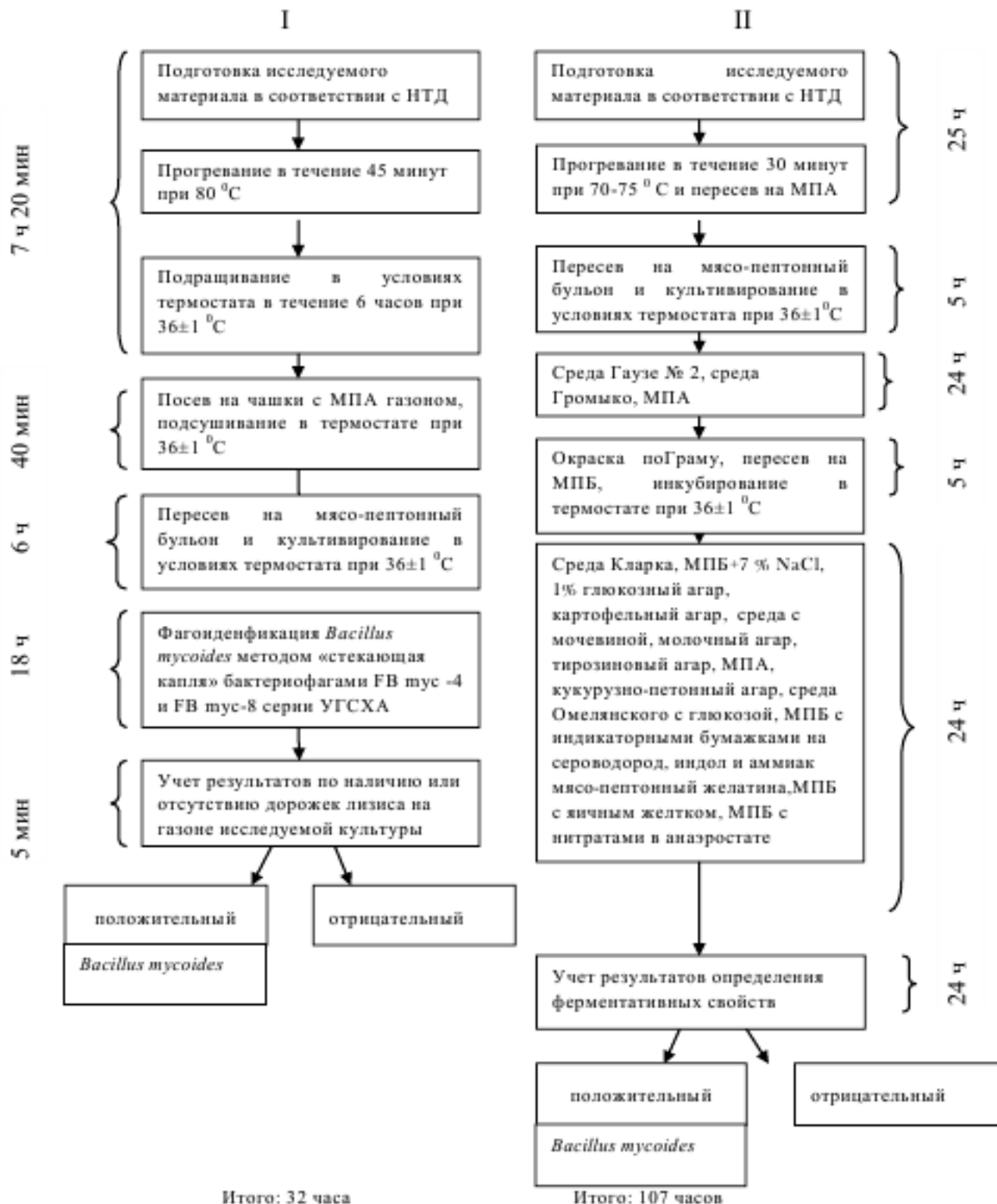


Рисунок 3. Схема ускоренной фагоидентификации бактерий *B. mycoides* (I) в сравнении со схемой выделения и дифференциации бацилл первой морфологической группы (II)

$10^1 - 10^5$ м.к./мл. В качестве контроля использовали колбы МПБ с пробами, неконтаминированными бактериями *B. mycoides*.

Доказано, что увеличение титра фагов FB мус – 4 и FB мус – 8 серии УГСХА в 10 раз произошло при концентрации 10^4 м.к. бактерий *B. mycoides* в 1 г объектов исследований. Данная концентрация бактерий в пищевом сырье и продуктах питания считается пороговой для их отбраковки или вторичной переработки с использованием соответствующих технологий.

Эксплуатация созданных схем фагоиндикации и фагоидентификации бактерий *B. mycoides* в лабораторной практике при микробиологической анализе пищевого сырья и продуктов питания

растительного и животного происхождения позволит снизить экономические и временные затраты на исследования возможной бациллярной контаминации до 32 часов при фагоидентификации и до 25 часов при постановке РНФ.

По материалам научной работы разработана нормативно-техническая документация: «Временная инструкция по изготовлению и контролю лабораторной серии фагов FB мус – 4 и FB мус - 8 серии УГСХА для индикации и идентификации бактерий *Bacillus mycoides*» и «Методические рекомендации по ускоренной индикации и идентификации бактерий *Bacillus mycoides* в объектах санитарного надзора с применением специфичных бактериофагов», рассмотренная на научно-техническом совете и утвержденная первым проректором – проректором по научной работе ФГБОУ ВПО Ульяновская ГСХА (16.09.2013).

Результаты изучения биологических свойств бактериофагов FB мус – 4 и FB мус - 8 серии УГСХА и методика фагоиндикации бактерий *Bacillus mycoides* в пищевом сырье и продуктах питания подтверждены актом производственных испытаний в ОГУ «Ульяновская областная ветеринарная лаборатория» (22.09.2013), утвержденным директором Юсуповым Р.М., актами комиссионных испытаний в ФГБОУ ВПО Ульяновская ГСХА (17.09.2013), утвержденными первым проректором – проректором по науке профессором Исайчевым В.А.

**ФЕОКТИСТОВА Н. А., ПЕТРУКОВА Н. А.
ВЫДЕЛЕНИЕ, ИЗУЧЕНИЕ ОСНОВНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ
БАКТЕРИОФАГОВ *BACILLUS MEGATERIUM* И РАЗРАБОТКА
ПАРАМЕТРОВ ИХ ПРАКТИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ**

**FEOKTISTOVA N.A., PETRUKOVA N.A.
THE DETACHMENT, STUDY OF THE BASIC BIOLOGICAL PROPERTIES OF *BACILLUS MEGATERIUM* BACTERIOPHAGE AND DEVELOPMENT OF PARAMETERS OF THEIR APPLICATION**

ИССЛЕДОВАНИЯ 2012-2014 гг.

Одним из основных требований, предъявляемых к пищевым продуктам, является их безопасность для потребителя и стабильность состава. Основной причиной порчи продуктов и развития пищевых отравлений людей являются микроорганизмы. Особенно остро эта проблема касается портящихся продуктов – свежих фруктов, овощей, мясных и хлебобулочных изделий, соков, молочных продуктов (Джей, Дж.М., 2011).

Спорообразующие бактерии рода *Bacillus* (*Bacillus cereus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus mesentericus* (*pumilus*), *Bacillus megaterium*, *Bacillus coagulans*) являются одним из этиологических факторов биологического разрушения продуктов питания, в том числе молока. Наличие у бацилл спор препятствует инактивации этих микроорганизмов после кратковременного термического воздействия, а выраженная их протеолитическая активность приводит к различным порокам P.Garry, (Vendeuvre I., Bellon-Fontaine M., 1998).

Результаты исследований, полученные ВНИИМС, показали, что бактерии *B. megaterium* активно развиваются при различных температурах хранения, изменяя органолептические характеристики продукта. При размножении в диапазоне температур 28-37°C бациллярные факультативные анаэробы придают молоку и молочным продуктам специфический вяжущий вкус, запах порченных фруктов, дрожжевой привкус, полынную и хинную горечь и изменяют цвет. Установлено, что в условиях холодильного хранения процессы порчи идут аналогично, но значительно медленнее (Rasko, D.A., 2005).

Анализ нормативно-технической документации (ГОСТов и СанПиНов) свидетельствует о том, что в настоящее время для молочных продуктов споровые факультативно-анаэробные микро-

организмы, которыми являются бациллы, не являются санитарно-показательными, поэтому их наличие не нормируется и не подлежит обязательному контролю в условиях производственных лабораторий. Однако при появлении ряда характерных пороков вкуса и внешнего вида у молочных продуктов для бактериологического контроля рекомендуется делать посевы 2–4-кратно разведенного продукта на наличие указанной неспецифической микрофлоры.

Основным источником контаминации молока являются объекты окружающей среды, корма и воздуха. Доказано, что пастеризация не снижает уровень контаминации, а анаэробные условия и низкие температуры хранения задерживают, но не предотвращают развитие бактерий рода *Bacillus*, в том числе и *B. megaterium*.

При производстве ряда продуктов, в технологическом процессе которых заложено концентрирование сухих веществ молока (сыры, сгущенные и сухие молочные продукты), происходит увеличение количества бактериальных клеток изучаемых споровых микроорганизмов за счет их концентрации. Для плавленых сыров и молокосодержащих продуктов, в рецептуре которых используются разнообразные молочные и немолочные компоненты и высокотемпературная обработка сырья (пастеризация или плавление), споровая микрофлора становится подавляющей. Так, в плавленых сырах ее количество может превышать 70% от общего количества микроорганизмов в продукте (Свириденко Г., 2013).

Своевременное качественное и количественное обнаружение этих микроорганизмов поможет предотвратить негативные процессы. Поэтому разработка методов детекции бактерий рода *Bacillus* в молоке и молочных продуктах является той практической задачей, которую необходимо решать в пищевой и перерабатывающей промышленности.

Использование для этих целей тест-систем ПЦР ограничено по нескольким причинам: отсутствие коммерческих праймеров на многие виды рода *Bacillus*, дорогостоящие оборудование и расходные материалы, отсутствие квалифицированных специалистов. Применение бактериологического метода исследований для этих целей затруднено в связи с отсутствием соответствующей современной нормативно-технической документации, позволяющей проводить идентификацию бацилл.

Объекты исследований. Штаммы бактерий *B. megaterium*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. subtilis*, *B. mesentericus(pumulus)*, *Bacillus mycoides*, *B. coagulans*. были получены из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ ФГБОУ ВПО Ульяновская ГСХА и выделены самостоятельно в ходе исследований.

Штаммы бактериофагов *Bacillus megaterium* – 18 изолятов бактериофагов были выделены из проб почвы Приволжского, Центрального и Южного федерального округов на этапе данной работы.

В качестве объектов исследований использовали пищевое сырье и продукты питания, приобретенные на продовольственных рынках г. Ульяновска и г. Самары.

Для выделения бактерий *B. megaterium* использовали схемы дифференциации бактерий рода *Bacillus*, которые составляли обширный список фенотипических признаков большинства представителей рода, в них были представлены процедуры для индикации и идентификации видов (Gordonetal., 1973; Berkeley and Goodfellow,1981; Norrisetal., 1981; Clausand Berkeley,1986).

Изучение морфологических, культуральных, биохимических свойств выделенных бактерий проводили по методам, описанным А.С. Лабинской, Л.П. Блинковой, А.С. Ещиной (2004). Выделение и изучение биологических свойств бактериофагов проводили методами, предложенными Д.М. Гольдфарбом (1961), А.И. Калдыркаевым (2013), Э. Каттер (2012), В.Я. Ганюшкиным (1988), С.Н. Золотухиным (2007), А.Г. Шестаковым (2010). Селекцию бактериофагов и повышение их литической активности проводили по методике, описанной С.Н. Золотухиным (2007). Обнаружение бактерий *B. megaterium* 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 опытов проводили с применением пакета прикладных программ Statistica 6.0. (for Windows; «Stat Soft Ins.», США), Microsoft Exsel 2003 (for Windows XP).

Первым этапом работы было выделение фагов *B. megaterium*. Первоначально, мы исследовали штаммы *B. megaterium* как потенциально лизогенные. Поиск умеренных фагов проводили по методике С. Лурия и Д. Дарнелла (1970) в модификации А.Г. Шестакова (2009). Первоначально мы использовали методику выделения бактериофагов бацилл без воздействия на них индуцирующего фактора. Во второй серии экспериментов на культуры *B. megaterium*, исследуемые как «лизогенные», мы воздействовали индуцирующим фактором (воздействие на бактерии ультрафиолетовых лучей в течение 5-20 секунд 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 (2011). Полученный фильтрат исследовали на наличие фага на имеющихся культурах *B. megaterium* методом агаровых слоев. В исследованиях не было выявлено естественной и искусственной лизогенности исследуемых штаммов *B. megaterium*, т.е. профаги, интегрированные с хромосомой микробной клетки, выявлены не были. Третья серия экспериментов – это выделение бактериофагов из объектов внешней среды. Известно, наиболее эффективно в качестве источника выделения бактерий рода *Bacillus* использовать пробы почвы, так как они являются почвенными сапрофитами. При исследовании 216 проб почвы различного хозяйственного назначения двух областей Приволжского федерального округа, нам удалось выделить 18 изолятов фагов бактерий *B. megaterium*.

Селекцию фагов проводили десятикратным пассированием изолированных бляшкообразующих единиц на мясо-пептонном агаре с перевиванием на мясо-пептонный бульон (Золотухин, 2007). Фаги очищали от бактериальных клеток через мембранные фильтры фирмы Millipore (filter type: 0,22 µm GV) Все фаголизаты укупоривались в стерильные флаконы и хранились при температуре (2-4 °C) **без применения консервирующих веществ.**

Морфология бляшкообразующих единиц. Морфологию бляшкообразующих единиц изучали на МПА. Установлено, что бляшкообразующие единицы, образуемые 18 изолятами фагов *B. megaterium*, прозрачные округлой формы, 0,5 – 2,3 мм в диаметре.

Специфичность. Важнейшей характеристикой фага, входящего в состав биопрепарата для индикации и идентификации бактерий, является его специфичность в пределах вида. Изучение специфичности 18 выделенных изолятов бактериофагов *B. megaterium* мы проводили на культурах гомологичного рода: *B. cereus* – 105 штаммов, *B. thuringiensis* – 3 штамма, *B. subtilis* – 16 штаммов, *B. mesentericus (pumilus)* – 18 штаммов, *B. mycoides* – 12 штаммов, *B. coagulans* – 5 штаммов. В работе применяли метод «стекающая капля» по Отто. Установлено, что выделенные и селекционированные бактериофаги строго специфичны в пределах вида *B. megaterium*.

Литическую активность бактериофагов оценивали по их способности вызывать лизис бактериальной культуры на плотной питательной среде методом агаровых слоев (Гольдфарб, 1961) и на мясо-пептонном бульоне по методу Аппельмана. Эксперименты проводили троекратно для статистической обработки. Эталонные культуры выращивали на бульоне в течение 18±2 часов. Учет результатов по методу Грациа проводили через 18±2 часов инкубирования посевов в термостате при 36±1 °C. Определено, что бактериофаги *B. megaterium* имеют различные показатели титра, которые находятся в диапазоне от 2,3±0,7х10⁶ до 6,2±0,8х10⁹ БОЕ/мл по Грациа и от 10⁻⁵ до 10⁻⁹ по Аппельману (табл.1). Наиболее высокими показателями литической активности характеризовались фаги Bmeg-1 УГСХА и Bmeg-16 УГСХА - 6,2±0,8х10⁹ и 3,8±1,2х10⁹ БОЕ/мл, соответственно по методу Грациа и 10⁻⁸ по Аппельману.

Спектр литического действия. Одним из важнейших критериев отбора фагов *B. megaterium* для конструирования экспериментального биопрепарата был спектр литического действия в пределах вида. Методика исследования исследования - метод «стекающая капля» по Отто. Экспериментально определено, что изучаемые бактериофаги имеют различный диапазон действия по отношению к 8 изучаемым штаммам *B. megaterium* (табл.1).

Опыты демонстрируют, что наиболее широким совокупным спектром литического действия по отношению к изучаемым культурам обладают штаммы фагов Bmeg-1 УГСХА и Bmeg-16 УГСХА, совокупный процент лизиса составил 100 % (табл. 1).

Для конструирования биопрепарата было отобрано два фага Bmeg-1 УГСХА и Bmeg-16 УГСХА, у которых были самые высокие показателями литической активности и максимально широкий совокупный спектр литического действия.

Таблица 1. Основные биологические свойства фагов *B. megaterium*

№	Бактериальная культура <i>B. megaterium</i> / название фага	Характеристика бляшкообразующих единиц	Спектр литического действия, %	Литическая активность, БОЕ/мл	Литическая актив ность по Аппельману
1.	<i>B.megaterium</i> 182/ <i>B meg-1</i> УГСХА	2,3±0,3	62,5	6,2±0,8x10 ⁹	10 ⁻⁸
2.	<i>B.megaterium</i> 1/ <i>B meg-2</i> УГСХА	1,9±0,2	37,5	2,3±0,7x10 ⁶	10 ⁻⁵
3.	<i>B.megaterium</i> 5/ <i>B meg-3</i> УГСХА	1,1±0,2	50,0	1,5±0,4x10 ⁹	10 ⁻⁸
4.	<i>B.megaterium</i> 7/ <i>B meg-4</i> УГСХА	1,5±0,1	50,0	7,8±0,2x10 ⁸	10 ⁻⁷
5.	<i>B.megaterium</i> 1/ <i>B meg-5</i> УГСХА	1,8±0,2	25,0	1,6±0,6x10 ⁷	10 ⁻⁶
6.	<i>B.megaterium</i> 2/ <i>B meg-6</i> УГСХА	0,9±0,2	50,0	2,2±0,4x10 ⁸	10 ⁻⁷
7.	<i>B.megaterium</i> 6/ <i>B meg-7</i> УГСХА	1,6±0,4	37,5	4,2±1,3x10 ⁷	10 ⁻⁶
8.	<i>B.megaterium</i> 2/ <i>B meg-8</i> УГСХА	1,7±0,2	25,0	1,8±0,2x10 ⁸	10 ⁻⁷
9	<i>B.megaterium</i> 3/ <i>B meg-9</i> УГСХА	1,2±0,2	50,0	1,4±0,2x10 ⁸	10 ⁻⁷
10	<i>B.megaterium</i> 7/ <i>B meg-10</i> УГСХА	0,7±0,3	37,5	1,2±0,8x10 ⁹	10 ⁻⁸
11	<i>B.megaterium</i> 182/ <i>B meg-11</i> УГСХА	2,0±0,2	25,0	4,2±0,2x10 ⁸	10 ⁻⁷
12	<i>B.megaterium</i> 1/ <i>B meg-12</i> УГСХА	0,9±0,4	50,0	3,5±0,5x10 ⁷	10 ⁻⁶
13	<i>B.megaterium</i> 182/ <i>B meg-13</i> УГСХА	1,3±0,2	25,0	2,8±0,7x10 ⁶	10 ⁻⁵
14	<i>B.megaterium</i> 4/ <i>B meg-14</i> УГСХА	0,8±0,3	37,5	1,0±0,3x10 ⁷	10 ⁻⁶
15	<i>B.megaterium</i> 6/ <i>B meg-15</i> УГСХА	2,2±0,2	50,0	2,5±0,5x10 ⁸	10 ⁻⁷
16	<i>B.megaterium</i> 182/ <i>B meg-16</i> УГСХА	1,4±0,1	87,5	3,8±1,2x10 ⁹	10 ⁻⁸
17	<i>B.megaterium</i> 7/ <i>B meg-17</i> УГСХА	2,1±0,2	25,0	2,5±1,1x10 ⁸	10 ⁻⁸
18	<i>B.megaterium</i> 2/ <i>B meg-18</i> УГСХА	1,7±0,1	50,0	1,4±0,4x10 ⁷	10 ⁻⁶

Последующие эксперименты были направлены на изучение изменения литической активности укупоренных во флаконы бактериофагов Bmeg-1 УГСХА и Bmeg-16 УГСХА, хранящихся при температуре 2-4 °С в течение 12 месяцев.

Установлено, что в течение 3 месяцев показатели литической активности исследуемых бактериофагов Bmeg-1 УГСХА и Bmeg-16 УГСХА оставались без изменений, 6,2±0,8x10⁹ и 3,8±1,2x10⁹

БОЕ/мл, соответственно. Через 6 месяцев литическая активность снижалась и составила у фага Vmeg-1 УГСХА $3,5 \pm 0,2 \times 10^8$ БОЕ/мл и у Vmeg-16 УГСХА - $1,3 \pm 0,3 \times 10^8$ БОЕ/мл, через 9 месяцев - $2,5 \pm 0,1 \times 10^7$ и $0,7 \pm 0,2 \times 10^8$ БОЕ/мл, через 12 месяцев - $1,3 \pm 0,3 \times 10^7$ и $0,3 \pm 0,1 \times 10^7$ БОЕ/мл, соответственно.

Экспериментально установлено, что пассирование бактериофагов на исходном штамме бактерий *B. megaterium* в течение 7 пассажей методом агаровых слоев восстанавливает литическую активность бактериофагов на 1 порядок.

Для изготовления биопрепарата использовали штаммы фагов Vmeg-1 УГСХА и Vmeg-16 УГСХА и штамм бактерий *B. megaterium* 182. Индикаторная культура хранится 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.

Экспериментальный биопрепарат готовится на коммерческом мясо-пептонном бульоне. Температурный оптимум для культивирования биопрепарата на основе фагов Vmeg-1 УГСХА и Vmeg-16 УГСХА с индикаторными культурами - 36 ± 1 °С. Оптимальное соотношение бактериофага Vmeg-1 УГСХА и индикаторного штамма *Bacillus megaterium* 182 - 1:1, т.е. 0,2 мл фага на 0,2 мл индикаторной культуры, время пассажа составляет 6 часов (параметры культивирования бактериофага Vmeg-16 УГСХА с индикаторной культурой *Bacillus megaterium* 182 - аналогичны).

Бактериофаги очищаются от бактериальной массы методом фильтрации через мембранный фильтр фирмы Millipore (filter type: 0,22 μ m GV), после чего они разливаются во флаконы по 10 мл без добавления консервирующих веществ. У фага после розлива во флаконы определяют титр литической активности, контролируют его стерильность. Внешний вид биопрепарата - два флакона со светло-желтой прозрачной жидкостью (цвет засеянной среды) без осадка и посторонних примесей, титр фагов должен быть не ниже 10^7 БОЕ/мл. Дата серии изготовления исчисляется со дня укупоривания флаконов. Биопрепарат хранится 12 месяцев при температуре 2-4 °С.

Используя специфичность экспериментального биопрепарата, нами был разработан ускоренный метод идентификации бактерии *B. megaterium* по показателям лизиса культуры на газоне на мясо-пептонном агаре («метод стекающей капли»). Подготовку проб пищевых продуктов, подлежащих исследованию, проводили в соответствии ГОСТ 26669 – 85 «Продукты пищевые и вкусовые. Подготовка проб для микробиологических анализов». Разработанная нами схема позволяет идентифицировать бактерии *B. megaterium* 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 *B. megaterium* использовали метод реакции нарастания титра фага. Установлено, что при 6 часовой экспозиции индикаторной культуры с фагом



Рисунок 1. Зоны лизиса на газоне культуры фагов *B. megaterium*: А) Vmeg-1 УГСХА; Б) Vmeg-16 УГСХА

без дополнительного ее подращивания, удастся провести индикацию бактерий *B. megaterium* 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.

Апробация схемы биоиндикации бактерий *B. megaterium* проводилась на пробы воды, пищевых продуктов (молоко, сыры и мясо, капуста), которые искусственно контаминировали штаммами *B. megaterium* 182 в концентрации $10^1 - 10^5$ м.к./мл. Подготовку и посев проб пищевых продуктов, подлежащих исследованию, проводили в соответствии ГОСТ 26669 – 85 «Продукты пищевые и вкусовые. Подготовка проб для микробиологических анализов».

Доказано, что увеличение титра фагов Bmeg–1 УГСХА и Bmeg–16 УГСХА в 5 и более раз произошло при концентрации 10^3 м.к. бактерий *B. megaterium* в 1 г (мл) объектов исследований. Данная концентрация бактерий в пищевом сырье и продуктах питания считается пороговой для их отбраковки или вторичной переработки с использованием соответствующих технологий. В таблице 2 представлены результаты применения РНФ для детекции *B. megaterium* в пробах молока, искусственно контаминированного бактериями *B. megaterium* в концентрации 10^3 КОЕ/мл. Применение разработанных схем фагоиндикации и фагоидентификации бактерий *B. megaterium* в лабораторной практике при микробиологическом анализе пищевого сырья и продуктов питания растительного и животного происхождения позволит снизить экономические и временные затраты на исследования возможной бациллярной контаминации до 32 часов при фагоидентификации и до 25 часов при постановке РНФ.

На основании данных данных научных исследований разработана нормативно-техническая документация: «Временная инструкция по изготовлению и контролю лабораторной серии фагов Bmeg–1 УГСХА и Bmeg–16 УГСХА для индикации и идентификации бактерий *Bacillus megaterium*» и «Методические рекомендации по ускоренной индикации и идентификации бактерий *Bacillus megaterium* 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 имени П.А. Столыпина» (22.10.2014).

Таблица 2. Результаты использования РНФ для детекции *B. megaterium* в пробах молока, искусственно контаминированного бактериями *B. megaterium* в концентрации 10^3 КОЕ/мл

№ пробы	№ фага	Количество негативных колоний в контроле	Количество негативных колоний в опыте	Увеличение титра фага, раз	Результат РНФ (время исследования 26 часов)	Результат бактериологических исследований (время исследования 96 часов)
<i>Bacillus megaterium</i>						
1	B.meg – 1	39 ± 2	280 ± 13	7,2	Положительный	Отрицательный при выявлении концентрации 10^3 КОЕ/мл молока при использовании схемы Gordon (1973)
	B.meg – 16	43 ± 4	296 ± 9	6,9	Положительный	
2	B.meg – 1	39 ± 2	273 ± 11	7,0	Положительный	
	B.meg – 16	43 ± 4	233 ± 8	7,3	Положительный	
3	B.meg – 1	39 ± 2	288 ± 12	7,4	Положительный	
	B.meg – 16	43 ± 4	305 ± 6	7,1	Положительный	

**ФЕОКТИСТОВА Н. А., КЛИМУШКИН Е. И.
ВЫДЕЛЕНИЕ, ИЗУЧЕНИЕ ОСНОВНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ
СВОЙСТВ БАКТЕРИОФАГОВ *BACILLUS ANTHRACIS* И РАЗРАБОТКА
ПАРАМЕТРОВ ИХ ПРАКТИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ**

**FEOKTOSTOVA N.A., KLIMUSHIN E.I.
THE DETACHMENT, STUDY OF THE BASIC BIOLOGICAL PROPERTIES OF *BACILLUS ANTHRACIS* BACTERIOPHAGE AND DEVELOPMENT OF PARAMETERS OF THEIR APPLICATION**

ИССЛЕДОВАНИЯ 2013-2016 гг.

По мнению эпизоотологов и эпидемиологов современная ситуация по сибирской язве на фоне значительного снижения заболеваемости в Российской Федерации не расценивается как благополучная (Локтионова М.Н., 2011; Рязанова А.Г., 2011, 2012; Куличенко А.Н. с соавт., 2012; Картавая С.А., 2014). В настоящее время по-прежнему регистрируются эпизоотии среди животных и эпидемические очаги среди населения (Петров С.П., 1997; Буравцева Н.П. с соавт., 2011; Онищенко Г. Г. с соавт., 2012; Еременко Е.И. с соавт., 2013). Широкое применение в медицине антибиотиков, инактивированных и живых вакцин привело к реверсии и длительной персистенции вакцинных штаммов в макроорганизме, загрязнению окружающей среды живыми микроорганизмами с измененными свойствами, циркуляции атипичных штаммов, которые не поддаются диагностике антраксин-кожным тестом, генотипическими и бактериологическими методами (Бургасов П.Н., Рожков Г.И., 1984; Онищенко Г.Г. с соавт., 1999; Бакулов И.А. с соавт., 2011). Традиционные методы дифференциации *Bacillus anthracis* от спорообразующих почвенных бацилл, к которым можно отнести и фагоиндикацию, и в настоящее время актуальны (Васильев П.Г. с соавт., 1998; Куличенко А.Н. с соавт., 2010; Головинская Т.М. с соавт., 2013). Феномен фаголизиса - растворения бактерий под воздействием фага - используют для дифференциации возбудителя сибирской язвы от близкородственных сапрофитных бацилл. Очевидно, что для использования в целях индикации *B. anthracis* в объектах окружающей среды, содержащих в большом количестве близкородственные сапрофиты рода *Bacillus*, индикаторный бактериофаг должен обладать сочетанием широкого спектра литического действия на штаммы сибиреязвенного микроба с высокой специфичностью (Русалеев В.С., 1998; Цыганкова О.В. с соавт., 1995; Попов В.Г., 2006).

В настоящее время известен целый спектр коммерческих сибиреязвенных бактериофагов «Бактериофаг Fah-ВНИИВВиМ сибиреязвенный диагностический» - для ветеринарной практики, бактериофаг R/D-Ph-6, который является основой фаг-тест-набора «Оболensk R1» - для медицины, «Бактериофаг диагностический сибиреязвенный Гамма А-26 жидкий», «Бактериофаг сибиреязвенный «К» ВИЭВ», «Бактериофаг сибиреязвенный «Гамма-МВА», экспериментальные серии бактериофагов «Саратов», «186», «ВА-9», *Bacillus anthracis* OZR-1, *Bacillus anthracis* Ф-2, *Bacillus anthracis* ФАУТ, *Bacillus anthracis* ФПП. Вышеназванные бактериофаги обладают различным спектром специфической литической активности и специфичностью (Павлова И.И., 1977; Ипатенко Н.Г. с соавт., Цыганкова О.В., 1998; Васильев П.Г. с соавт., 1999; Солодовников Б.В., 2002; Попова В.Г. с соавт., 2006; Саяпина Л.В. с соавт., 2011; Головинская Т.М., 2014), что делает поиск новых сибиреязвенных фагов по указанным параметрам, актуальным.

Выделение новых бактериофагов, специфичных к возбудителю сибирской язвы, и изучение их биологических свойств позволит не только расширить знания в области биологии фагов, но и сконструировать новый биопрепарат с более широким спектром действия по сравнению с аналогами, разработать схему индикации *B. anthracis* в объектах санитарного надзора.

Цель работы – выделение, изучение основных биологических свойств бактериофага *B. anthracis* и разработка параметров его практического применения.

В строго контролируемых экспериментах использовали штаммы культур бактерий, которые были получены из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы ФГБОУ ВО Ульяновская ГСХА: *Bacillus anthracis* СТИ-1, 55-ВНИИВВиМ, Шуя-15, Sterne 34 F₂, 1007, 1190R, 104; 94; *Ichtiman*, «Девус», М-71; *Bacillus mycoides* – 12 штаммов, *Bacillus cereus* – 106 штаммов; *Bacillus thuringiensis* – 3 штамма; *Bacillus subtilis* – 16 штаммов, *Bacillus megaterium* – 6 штаммов, *Bacillus mesentericus (pumilus)* – 18 штаммов, *Bacillus coagulans* – 5 штаммов, *Paenibacillus polimixa* – 2 штамма, *Paenibacillus larvae* – 2 штамма, *Listeria monocytogenes* – 3 штамма.

Бактериальные культуры хранились в виде столбика мягкого 0,7 % мясо-пептонного агара, засеянного уколом при температуре 2-4 °С.

Подбор мест для отбора образцов почв с целью выделения сибиреязвенных бактериофагов проводили на основании анализа сибиреязвенных захоронений, которые были обобщены и систематизированы нами в «Кадастре сибиреязвенных захоронений на территории Ульяновской области». Из 108 точечных проб почвы СЯЗ п. Октябрьский Чердаклинского района Ульяновской области было выделено 4 бактериофага, специфичные для штаммов *B. anthracis* – Шуя-15, *B. anthracis* Sterne 34 F₂, *B. anthracis* СТИ-1 и *B. anthracis* 55-ВНИИВВиМ. Нужно отметить, что фаги выделены из проб почвы с глубины 15-20 см из одного квадрата «условного» квадрата.

При выделении фага из объектов окружающей среды (Каттер Э., Сулаквелидзе А., 2012) был заменен в протоколе исследований этап высева фильтрата на 1,5 % МПА методом агаровых слоев по А. Gratia на метод Отто «стекающая капля» (Алексеев В.В., 2013) (рисунок 1). Также нами было установлено, что при первичном выявлении бактериофага метод Отто позволяет четко видеть наличие или отсутствие бактериофага, в то время как метод агаровых слоев затрудняет этот этап. Для подтверждения мы провели эксперименты, заключающиеся в том, что каждый из 108 фильтратов был исследован на наличие фага методом агаровых слоев. Установлено, что на газоне культур *B. anthracis* СТИ-1, *B. anthracis* 55-ВНИИВВиМ, *B. anthracis* Шуя-15 и *B. anthracis* Sterne

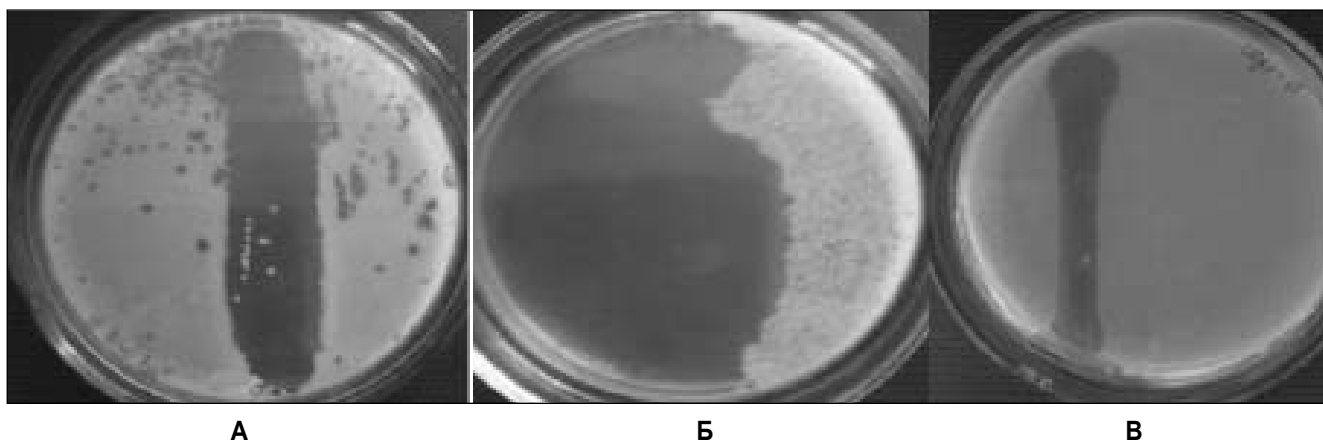


Рисунок 1. Наличие зоны лизиса выделенного сибиреязвенного бактериофага серии УГСХА на газоне индикаторной культуры: А) *B. anthracis* 34 F₂, Б) *B. anthracis* СТИ-1, В) *B. anthracis* Шуя-15 при нанесении фильтрата по методу Отто – время термостатирования 18 часов при температуре 36±1 °С

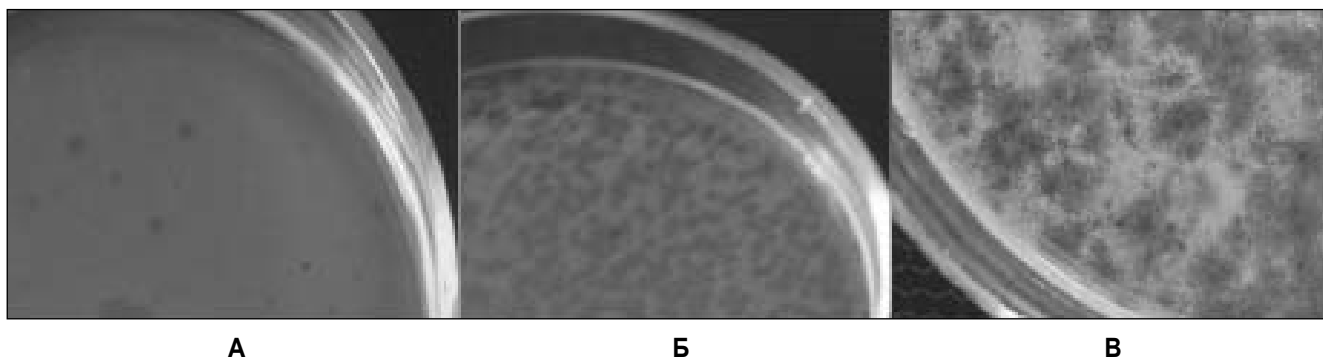


Рисунок 2. Формирование негативных колоний выделенного сибиреязвенного бактериофага серии УГСХА на индикаторной культуре А) *B. anthracis* 55-ВНИИВВиМ, Б) *B. anthracis* Шуя-15, В) *B. anthracis* 34 F₂ – время термостатирования 18 часов при температуре 36±1 °С

34 F₂ выявлены зоны лизиса (рисунок 2). Затраты на постановку эксперимента в 3 раза больше и при аналогичном результате, что и при применении метода Отто.

Схема селекции бактериофагов: зоны лизиса отбирали бактериологической петлей и вносили в пробирку с 4,5 мл стерильного мясо-пептонного бульона (МПБ), туда же вносили 0,2 мл 16-18 часовой индикаторной культуры (та культура *B. anthracis*, на газоне которой был выявлен лизис).

Время культивирования подбирали визуально в диапазоне от 4 до 7 часов с интервалом 30 минут при температурном оптимуме (36±1) °C. Ориентиром завершения пассажа было наличие роста в контрольной пробирке.

Эмпирическим методом было установлено, что 6,5-7,0 часовое культивирование посевов достаточно для пассирования выделенных фагов на вышеперечисленных культурах, используемых нами в качестве индикаторных: *B. anthracis* СТИ-1, *B. anthracis* 55-ВНИИВВиМ, *B. anthracis* Шуя-15 и *B. anthracis* Sterne 34 F₂.

Очистка бактериофага от бактериальных клеток, эндотоксина и балластных веществ проводилась методом многоступенчатой мембранной фильтрации. Очищенные бактериофаги хранились в условиях бытового холодильника при температуре 2-4 °C.

Проведенный нами эксперимент по определению возможности замены индикаторной культуры при пассировании каждого из четырех фаголизатов на каждой из четырех культур *B. anthracis* – Шуя-15, *B. anthracis* Sterne 34 F₂, *B. anthracis* СТИ-1 и *B. anthracis* 55-ВНИИВВиМ, подтвердил, что в 2015 году нами был выделен из СЯЗ п. Октябрьский один бактериофаг, специфичный в отношении вышеперечисленных культур, что позволило нам в дальней работе проводить исследования с одним штаммом сибиреязвенного бактериофага серии УГСХА - *B.a. Rot* УГСХА, который был выделен на культуру *B. anthracis* – Шуя-15.

Литическая активность сибиреязвенного бактериофага *B.a. Rot* УГСХА определялась нами методом титрования на жидкой среде (метод Аппельмана) и диффузии верхнем слое мягкого агара (методом агаровых слоев по А. Gratia). Посев последовательных разведений фагового препарата с целью повышения точности эксперимента проводили в трех повторностях. Результаты исследований отражены в таблице 1.

Проведенные исследования по определению титра выделенного бактериофага *B.a. Rot* УГСХА позволяют нам утверждать, что при культивировании на различных индикаторных культурах выделенный сибиреязвенный бактериофаг имеет различный титр в диапазоне от 10⁻⁵ до 10⁻⁷ по Аппельману и от 1,9±0,1х10⁶ до 3,0±0,1х10⁸ БОЕ/мл по Грациа.

На основании полученных данных установлено, что для достижения поставленной цели в качестве перспективного производственного штамма для культивирования сибиреязвенного бактериофага *B.a. Rot* УГСХА рекомендовано применять штамм *B. anthracis* Шуя-15, на котором при высеве на мясо-пептонный агар (МПА) образуются негативные колонии с четким краем и прозрачным центром, что чрезвычайно важно при визуальном подсчете колоний в случае постановки реакции нарастания титра фага (рисунок 2).

Изучение специфичности выделенного бактериофага *B.a. Rot* УГСХА *B. anthracis* мы проводили на культурах гомологичного рода: *B. mycoides*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. subtilis*, *B. mesentericus* (*pumilus*), *B. coagulans*, *B. megaterium* и гетерологичных родов: *Paenibacillus polymixa*, *Paenibacillus larvae*, *Listeria monocytogenes*. Экспериментально установлено, что на чашках Петри, засеянных вышеперечисленными культурами, зон лизиса при нанесении выделенного и селекционированного нами фага *B.a. Rot* УГСХА при визуальном осмотре выявлено не было, что свидетельствует о строгой его специфичности в пределах вида *B. anthracis*. Этот факт дает возможность в дальнейшем использовать бактериофаг *B.a. Rot* УГСХА для индикации возбудителя инфекции. Наиболее важной, по нашему мнению, характеристикой выделенного и селекционированного сибиреязвенного фага *B.a. Rot* УГСХА была его специфичность по отношению к штаммам *B. anthracis* и отсутствие способности лизировать культуры *B. mycoides*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, которые составляют группу близкородственной ассоциации бацилл, получивших в литературе название «группа «*Bacillus cereus*»».

В ходе эксперимента нами было установлено, что при изменении показателя pH в пределах 3,4-8,2 не происходит разрушения бактериофага *B.a. Rot* УГСХА, которое, общеизвестно, начи-

нается с разрыва капсида фага и вытекания внутреннего содержимого головки во внешнюю среду при рН от 10,0-11,5.

Нами была изучена устойчивость *B.a. Rot* УГСХА к воздействию температуры в диапазоне 50-90 °С с интервалом в 4 °С. Нагревание фага проводили на водяной бане в течение 30 минут. Установлено, что температура в диапазоне 50-61 °С не значительно влияет на титр бактериофага по сравнению с контролем. Эксперимент показал, что температура в 62 °С для выделенного бактериофага активно влияет на выход ДНК выделенного сибиреязвенного фага – литическая активность снизилась в среднем на 2-3 порядка. Температурный диапазон 62-66 °С не снизил титр фага, который был зафиксирован при 62 °С. При повышении температуры до 70-78 °С титр изучаемого фага продолжал снижаться на 1-3 порядка. При температуре 82 °С был зафиксирован максимально низкий титр сибиреязвенного бактериофага *B.a. Rot* УГСХА. При температуре 86-90 °С бактериофаг перестал существовать, как морфологическая единица независимо от того, на какой индикаторной культуре культивировался бактериофаг в процессе всего эксперимента.

Эмпирическим методом нами установлено, что деструктивные изменения у исследуемого бактериофага *B.a. Rot* УГСХА были зафиксированы при 35 минутном взаимодействии с трихлорметаном в соотношении 10:1.

Исследования сибиреязвенного бактериофага *B.a. Rot* УГСХА, закрытого в стерильные флаконы без добавления консерванта, который хранился в условиях бытового холодильника (2-4 °С), проводили методом диффузии в «мягкий» методом агаровых слоев по А. Gratia. Опытным путем нами установлено, что в течение 3 месяцев показатели литической активности исследуемого бактериофага оставались без изменений. Последующие исследования свидетельствуют об относительно невысокой скорости снижения показателя литической активности в пределах 21 месяца, когда велся мониторинг данного показателя. К окончанию анализируемого периода – 21 месяц с момента закупоривания - нами было зафиксировано снижение титра фага на 2-3 порядка. Последующее 5-6 кратное пассирование бактериофага *B.a. Rot* УГСХА на индикаторной культуре позволило восстановить исходный титр фага, который был установлен при закупоривании в стерильные флаконы.

С целью расширения количества тестируемых культур *B. anthracis* были проведены дополнительные исследования на 7 штаммах выше названного вида: *B. anthracis* 1007, *B. anthracis* 1190R, *B. anthracis* 104; *B. anthracis* 94; *B. anthracis* Ichtiman, *B. anthracis* «Девис», *B. anthracis* М-71. Культуры для исследований готовили стандартным образом, исследования проводили методом «стекающая капля» по Отто. Бактериофаг *B.a. Rot* УГСХА для эксперимента культивировался на культуре *B. anthracis* Sterne 34 F₂, так как именно на этой культуре был зафиксирован его наиболее высокий титр. Параметры культивирования посевов были стандартны для всей работы. Полученные данные по изучению спектра специфического литического действия свидетельствуют о том, что выделенный и селекционированный в 2015 году сибиреязвенный бактериофаг *B.a. Rot* УГСХА активно лизирует 9 культур *B. anthracis* из 11 изученных на всех этапах работы, лизис не установлен на культурах *B. anthracis* 1190R и *B. anthracis* М-71. Таким образом, совокупный показатель спектра специфического литического действия равен 81,82 %.

Модификация методики реакции нарастания титра фага для сибиреязвенного бактериофага. Подбор параметров постановки реакции нарастания титра фага. Экспериментальным путем нами было установлено, что количество БОЕ/мл в опыте в более чем 5 раз превышало количество БОЕ/мл в контроле при концентрации бактериальной массы *B. anthracis* Шуя-15 в МПБ 10³ м.к./мл. Данные показатели являются индикаторными, согласно принятых критериев оценки реакции.

Опытным путем нами было установлено, что предварительное подрачивание материала во временной экспозиции (5, 16, 24 ч) и культивирование посевов в условиях термостата при температуре (36±1) °С в промежутке времени (5, 10, 15, 24 ч) позволяет обнаружить *B. anthracis* Шуя-15 при постановке реакции нарастания титра фага (РНФ) в концентрации 10³ м.к./мл. Аналогичную концентрацию бактерий *B. anthracis* Шуя-15 возможно выявить при постановке РНФ без предварительного подрачивания исследуемого материала при временной экспозиции культивирования (фаг+индикаторная культура) равной 5 часам.

Таким образом, временной интервал, затрачиваемый на постановку РНФ, составляет: 30 мин (закладка опыта) + 5 часов (время культивирования посевов) + 30 мин (посев методом Грация) + 18 часов (время культивирования посевов) = 24 часа. Подрачивание исследуемого материала не повышает чувствительность реакции, поэтому использовать его не рекомендуется.

Первоначально исследования проводились нами с использованием в качестве тест-объекта стерильных проб почвы, искусственно контаминированных *B. anthracis* – Шуя-15. Опытным путем нами было установлено, что предварительное подрачивание материала в течение 5 часов и культивирование посевов в условиях термостата при температуре $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 18 часов позволяет провести индикацию бактерий *B. anthracis* – Шуя-15 в пробах стерильной почвы при постановке РНФ в концентрации $n \times 10^3$ м.к./мл. Результаты исследований отражены в таблице 2.

Вторым этапом нашей работы была отработка реакции нарастания титра фага на нестерильных пробах почвы, искусственно контаминированных *B. anthracis*. Полученные данные сгруппированы в таблицы 3.

Результаты этих экспериментов показали, что чувствительность РНФ при фагоиндикации возбудителя сибирской язвы в стерильных пробах почвы составляет $n \times 10^3$ КОЕ/г против $n \times 10^4$ - 10^7 КОЕ/г для нестерильных образцов почвы. Следует отметить, что чувствительность РНФ при исследовании искусственно зараженных проб нестерильной почвы значительно колебалась в вышеназванном диапазоне, что объясняется конкурентным ростом близкородственных видов аэробных сапрофитных бацилл, которые были естественной нормофлорой образцов исследований.

Следующая серия экспериментов была посвящена детальному разбору методики постановки РНФ и выяснению возможных причин ее недостаточной чувствительности. Следует отметить, что при проведении экспериментов освобождение исследуемых проб от контаминации сопутствующими аэробными спорообразующими сапрофитами путем прогревания при различных температурных режимах (60 - 76°C с интервалом в 2 часа) и низкоскоростным центрифугированием (1000 - 2000 тыс./об. в минуту в течение 20-35 минут с интервалом в 5 минут) не обеспечивало в должной степени достижения поставленной цели.

С целью максимально избавиться от микробной контаминации исследуемых образцов нестерильной почвы мы испытывали следующий методический прием: в колбы, подлежащие исследова-

Таблица 1. Основная характеристика биологических свойств изучаемого сибиреязвенного бактериофага *B.a. Rot* УГСХА

№	Название изучаемого биологического свойства бактериофага	Результат изучения характерных биологических свойств сибиреязвенного бактериофага на бактериальной культуре			
		<i>B. anthracis</i> Шуя-15	<i>B. anthracis</i> 55-ВНИИВВиМ	<i>B. anthracis</i> -СТИ	<i>B. anthracis</i> Sterne 34 F ₂
1	Литическая активность (метод диффузии в мягком слое двуслойного МПА), БОЕ /мл	$1,0 \pm 0,1 \times 10^8$	$1,9 \pm 0,1 \times 10^6$	$1,4 \pm 0,1 \times 10^7$	$3,0 \pm 0,1 \times 10^8$
2	Литическая активность (титрование в МПБ), степень разведения	10^{-7}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
3	Спектр литического действия на культуре (по Отто)	+	++	+++	++

Примечание: «+» - отмечена зона лизиса по ходу стекания капли бактериофага на газоне культуры;

«++» - отмечена зона лизиса по ходу стекания капли бактериофага с проявлением стерильных пятен на газоне культуры;

«+++» - отмечено наличие стерильного пятна и зон лизиса на газоне культуры.

Таблица 2. Результаты постановки РНФ (тест-объект стерильная проба почвы)

Объект исследования - контаминированная бактериями <i>B.</i> <i>anthracis</i> стерильная проба почвы № 1 в концентрации: (м.к./г)	Контроль индикаторного фага (M±m)	Контроль свободного фага (M±m)	Опыт (M±m)	Примерное увеличение количества БОЕ в опыте по сравнению с контролем
	Количество бляшкообразующих единиц			
10 ³	21±3	-	136±5	6,4
10 ⁴	21±3	-	269±8	12,8
10 ⁵	21±3	-	лизис	-

Таблица 3. Результаты постановки РНФ (тест-объект нестерильная проба почвы)

Объект исследования - контаминированная бактериями <i>B. anthracis</i> нестерильная проба почвы № 1 в концентрации: (м.к./г)	Контроль индикаторного фага (M±m)	Контроль свободного фага (M±m)	Опыт (M±m)	Примерное увеличение количества БОЕ в опыте по сравнению с контролем
	Количество бляшкообразующих единиц			
10 ³	23±1	-	39±5	1,7
10 ⁴	23±1	-	74±7	3,2
10 ⁵	23±1	-	101±9	4,4
10 ⁶	23±1	-	144±7	6,3
10 ⁷	23±1	-	лизис	-

нию, после добавления индикаторного фага и соответствующего периода инкубирования добавляли трихлорметан (хлороформ) из расчета 1 мл/10 мл исследуемой жидкости. Содержимое тщательно перемешивали и оставляли при комнатной температуре на 30-40 мин. После оседания трихлорметана на дно пробирки надосадочную часть исследовали на наличие фага. Этот прием может быть заменен фильтрованием через мембранные фильтры фирмы Millipore (filter type: 0,22 µm GV) в целях экономии времени на проведение исследования. Результаты исследований представлены в таблице 4.

При такой модификации РНФ на фоне нежного газона индикаторной культуры наблюдаются четко различимые негативные колонии, количество которых в опытной пробе было в 5-10 раз больше, чем в контрольной.

После отработки методики освобождения исследуемого материала от сопутствующей микрофлоры оптимизировали целиком всю схему постановки РНФ в нестерильных пробах почвы.

При оптимизации методики постановки РНФ использовали два варианта условий – подращивание исследуемого материала и последующее подращивание композиции (фаг+культура) при температуре (36±1) °С и отработанные на стерильных пробах почвы условия - подращивание композиции (фаг+культура) в течение 5 часов при температуре (36±1) °С. В том и другом случае опыты проводили с применением заражающей дозы *B. anthracis* – Шуя-15 10²-10⁴ КОЕ/г почвы. Экспериментально установлено, что подращивание в течение 2 часов гарантирует прорастание более 60 % спор *B. anthracis*, внесенных в исследуемую пробу.

Таким образом, эксперименты по оптимизации методики постановки РНФ показали, что для обнаружения бациллы антракса в нестерильной почве в лабораторных условиях наиболее оптимальным является предварительное подращивание исследуемого материала в течение 2 ч при (36±1) °С с последующим заражением фагом и инкубированием смеси в течение 4 ч при (36±1) °С (рисунок 3).

Для определения специфичности РНФ с применением сибиреязвенного фага было проведено исследование образцов почвы, контаминированных бактериями *B. mycoides*, *B. cereus*, *B.*

Таблица 4. Результаты постановки РНФ оптимизированной (тест-объект - нестерильная проба почвы)

Объект исследования - контаминированная бактериями <i>B.</i> <i>anthracis</i> нестерильная проба почвы № 1 в концентрации: (м.к./г)	Контроль индикаторного фага (M±m)	Контроль свободного фага (M±m)	Опыт (M±m)	Примерное увеличение количества БОЕ в опыте по сравнению с контролем
	Количество бляшкообразующих единиц			
10 ³	21±3	-	124±5	5,9
10 ⁴	21±3	-	лизис	-
10 ⁵	21±3	-	лизис	-
10 ⁶	21±3	-	лизис	-
10 ⁷	21±3	-	лизис	-

thuringiensis, *B. subtilis*, *B. mesentericus* (*pumilus*), *B. coagulans*, *B. megaterium* в монокультуре. Результаты получены отрицательные. Методика исследований описана выше.

Применение разработанной схемы фагоиндикации бактерий *Bacillus anthracis* методом реакции нарастания титра фага (чувствительность метода - 10^3 КОЕ/г) открывает перспективы ее использования в лабораторной практике для оценки проб почвы, позволяющие сократить время исследования до 26 часов.

Результаты изучения биологических свойств сибиреязвенного бактериофага и апробация методики фагоиндикации бактерий *Bacillus anthracis* в пробах почвы были подтверждены актами комиссионных испытаний в ФГБОУ ВО Ульяновская ГСХА, утвержденными первым проректором – проректором по науке, профессором Исайчевым В.А.

По материалам научных исследований разработана нормативно-техническая документация: «Временная инструкции по изготовлению и контролю лабораторной партии сибиреязвенного

бактериофага серии УГСХА» и «Методические рекомендации по индикации бактерий *Bacillus anthracis* в пробах почвы с применением специфического бактериофага серии УГСХА», рассмотренная на научно-техническом совете и утвержденная первым проректором – проректором по научной работе ФГБОУ ВО Ульяновская ГСХА.

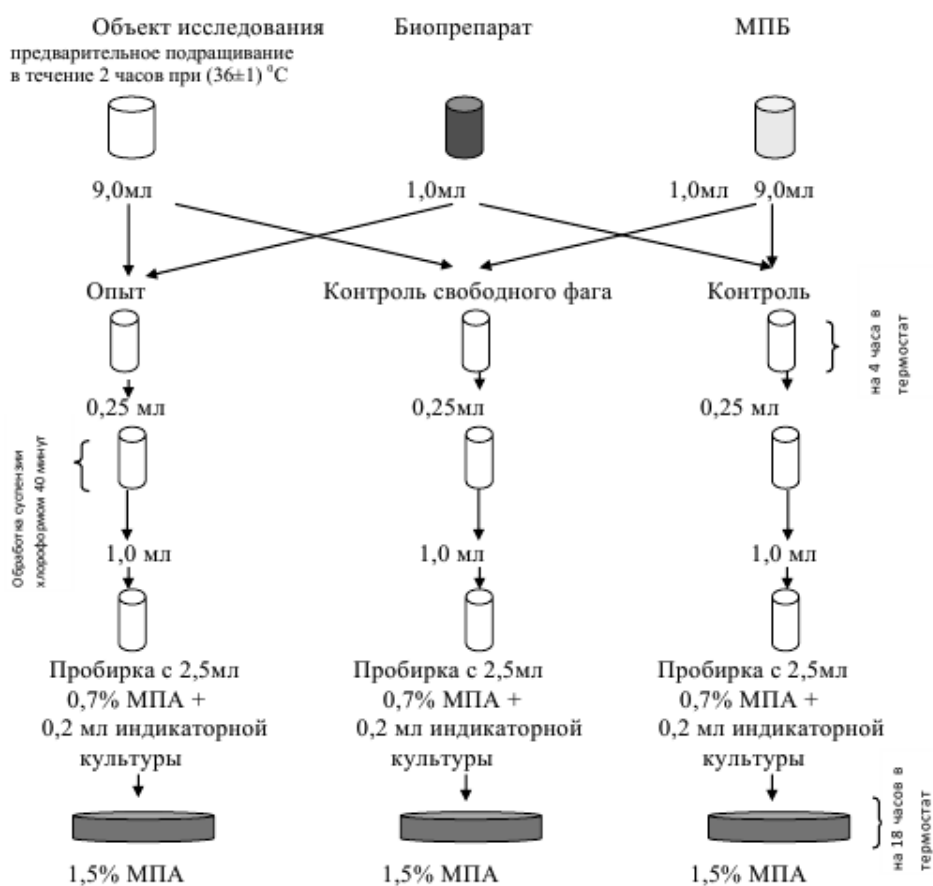


Рисунок 3. Оптимизированная схема постановки реакции нарастания титра фага с применением изучаемого сибиреязвенного фага в пробах нестерильной почвы в целях индикации *B. anthracis*

РАЗДЕЛ 3. БАКТЕРИОФАГИ РОДА *BRONCHISEPTICA* CHAPTER 3. BACTERIOPHAGES OF *BRONCHISEPTICA* GENUS

СЕМАНИНА Е.Н., ВАСИЛЬЕВА Ю.Б. ВЫДЕЛЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЯ ОСНОВНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ФАГОВ БАКТЕРИЙ ВИДА *BORDETELLA BRONCHISEPTICA*

SEMANINA E.N., VASYLYEVA U.B. ISOLATION AND STUDY OF THE MAIN QUALITIES OF *BORDETELLA BRONCHISEPTICA* PHAGES

ИССЛЕДОВАНИЯ 2008-2012 гг.

Целью настоящего исследования явилось выделение фагов *B. bronchiseptica*, изучение их основных биологических свойств и конструирование на их основе диагностического биопрепарата.

Материалы и методы. 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, № AKX 25922, *Proteus mirabilis* № 1, № 523, № 491, *Salmonella typhimurium* № 82, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* № 189, *Providencia rettgeri* № 104a, № 102d, № 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 Ульяновской УГСХА, 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*. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов проводили с помощью методов, предложенных М. Адамсом (1961), Д.М. Гольдфарбом (1961), И.М. Габриловичем (1973). Постановку РНФ для индикации *B. bronchiseptica* в объектах внешней среды проводили по методикам, предложенным Д.М. Гольдфарбом (1961).

Выделение бактериофагов *B. Bronchiseptica*.

Исследование культур *B. bronchiseptica* на наличие бактериофагов без воздействия индуцирующего фактора. Результаты исследований 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.

1 день: посев газонем 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 агар, 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 агар, 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 мясоептонным 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 пассивировали 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 *B. 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 *B. bronchiseptica* из 14 штаммов бактерий. Выяснилось, что 6 штаммов бактерий *B. bronchiseptica* не проявили лизогенных свойств.

Характеристика фагов бактерий *B. Bronchiseptica*.

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. - 214УГСХА. 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. - 8344УГСХА. Литическую активность селекционированных фагов определяли по методам Аппельмана и Грациа.

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: *B. bronchiseptica* - 1 УГСХА по Аппельману 10^{-7} , по Грациа $3,1 \times 10^8$ и *B. 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 *B. 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 V. br. - 1 УГСХА и V. br. - 7 УГСХА не вызывали лизис ни одной из испытываемых культур других видов бактерий. В результате исследований температурной устойчивости было установлено, что прогревание фагов V. br. - 1 УГСХА и V. 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 V.br. - 1 УГСХА и V.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 V.br. - 1 УГСХА и с $2,1 \times 10^9$ до $5,3 \times 10^7$ у V.br. - 7 УГСХА по методу Грациа. Активность бактериофагов V.br. - 1 УГСХА и V.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. При наличии в мазках грамотрицательных палочек, располагающихся одиночно или короткими цепочками, проводили типирование бактерий бактериологическим методом и с помощью бактериофагов V.br. - 1 УГСХА и V.br. - 7 УГСХА. Результаты проведенных опытов демонстрируют возможность идентификации *B. bronchiseptica* с помощью фагов V.br. - 1 УГСХА 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 биопрепарата. Бордетеллзные индикаторные бактериофаги получали путем культивирования в мясопептонном бульоне с *B. bronchiseptica*. В качестве индикаторной культуры использовали штамм *B. 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 *B. bronchiseptica*. Результаты проведенных исследований показали, что литическая активность бордетеллзных 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 V.br. - 7 УГСХА, V.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 подобрали оптимальный температурный режим культивирования бактериофагов *B. bronchiseptica*. Литическая активность фага V.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 Грациа - $1,3 \times 10^7$, $3,1 \times 10^8$ и $1,1 \times 10^7$, соответственно. Титр фага V.br. - 7 УГСХА составил по методу Аппельмана 10^{-7} , 10^{-8} и 10^{-7} -при 25 °С, 37 °С и 42 °С; по методу Грациа $1,4 \times 10^8$, $4,3 \times 10^9$ 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 V.br. - 1 УГСХА и V.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 V.br. - 1 УГСХА и V.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 V.br. - 1 УГСХА и V.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.

Разработка схемы ускоренной идентификации бактерий *B. Bronchiseptica*.

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 мясopептонного бульона бактериями *B. bronchiseptica* в концентрации 10^3 микробных клеток в 1 мл.

Разработка оптимальных условий постановки РНФ. Определили оптимальное время постановки РНФ. В исследованиях использовали воду, смывы с глотки, фекалии, контаминированные бактериями *B. 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 *B. 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 *B. bronchiseptica* в количестве 10^3 м.к./мл, время проведения исследований составляет 26 часов. Далее изучили возможность использования РНФ для выявления *B. 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 *B. 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 *B. 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 *B. 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 *B. 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 *B. bronchiseptica* путём многократного 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 Грация, 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 V.br. - 1 УГСХА и V.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 «V.br. - 11 УГСХА» на основе выделенных и изученных фагов V.br. - 1 УГСХА и V.br. - 7 УГСХА и параметры постановки реакции нарастания титра фага для ускоренной индикации *V. bronchiseptica* в объектах внешней среды. Метод РНФ с использованием биопрепарата «V.br. - 11 УГСХА» позволяет обнаружить указанные бактерии в концентрации от 10^3 м.к. в 1 мл исследуемого материала за 26 часов.

РАЗДЕЛ 4 БАКТЕРИОФАГИ РОДА *LISTERIA* CHAPTER 4. BACTERIOPHAGES OF *LISTERIA* GENUS

СУЛЬДИНА Е.В ВЫДЕЛЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ ОСНОВНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БАКТЕРИОФАГОВ РОДА *LISTERIA*

SULDINA E.V. ISOLATION AND STUDY OF THE MAIN QUALITIES OF *LISTERIA* GENUS PHAGES

ИССЛЕДОВАНИЯ 2012-2017 гг.

Цель. исследования являлось выделение и изучение основных биологических свойств листериозных бактериофагов и создание на их основе препарата для мониторинга и биоконтроля листерий в пищевом сырье и продуктах питания.

Материалы и методы. В работе использованы 50 штаммов бактерий рода *Listeria* (33 - *L.monocytogenes* 4 – *L.innocua*, 2 – *L.seeligeri*, 3 – *L.welshimeri*, 2 - *L.grayi*, 2 - *L.murray*, 4 - *L.ivanovii*) и референс-штаммы других родов из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы Ульяновской ГСХА (1 штамм бактерий рода *Erysipelothrix*, 2 – *Jonesia*, и 6 штаммов бактерий рода *Staphylococcus*). Бактерии обладали типичными для данных родов и видов биологическими свойствами.

Питательные среды и реактивы

Мясопептонный агар (Nutrient Agar, TM Media, Rajasthan, India) 0,7 %-ный, 2%-ный; мясопептонный бульон (Nutrient Broth, TM Media, Rajasthan, India); агар - агар (Agar Agar, TM Media, Rajasthan, India); Палкам агар (*Listeria* identification Agar base (PALCAM) TM Media, Rajasthan, India); Оксфорд агар (*Listeria* Oxford Medium Base, India); Оксфордский агар с селективной добавкой (Oxoid, Англия); полужидкий агар (*Listeria* Motility Medium, India); хромогенный агар (Chromogenic *Listeria* Agar Base TM Media, Rajasthan, India); натрий хлорид, слабощелочной фосфатный буфер (pH-7,6).

Выделение и изучение биологических свойств фагов проводили по методам, предложенным Н.А. Капыриной (1973), M.R.J. Clokie, A.M. Kropinski (2009), Э.Каттер, А. Сулаквелидзе (2012).

Выделение листериозных бактериофагов.

Для выделения листериозных бактериофагов из лизогенных культур методом индукции необходимо подобрать оптимальные параметры воздействия индуцирующих факторов на бактериальную клетку и взаимодействия бактериальных клеток и фаговых корпускул, определить рациональный метод очищения фаголизата.

В качестве тест-штамма для оптимизации параметров индукции использовали вирулентный штамм *L.monocytogenes* – 766 (рис.1), индикаторным служил референс-штамм *L.monocytogenes* 9-127. В качестве индуцирующего агента использовали ультрафиолетовые лучи (УФ-лучи), источником которых служила ртутно-кварцевая лампа, дающая не менее 90 % излучаемой энергии в виде УФ-лучей с длиной волны 254 нм. Плотность среды при облучении, время экспозиции и расстояние до источника света варьировали, в ходе эксперимента.

Облучению подвергали 4-х часовую бульонную культуру тест-штамма *L.monocytogenes* - 766, выращенную при 37°C. Перед облучением бактерии разводили в слабощелочном фосфатном буфере (pH-7,6) в отношении 1:100. Разведенную бактериальную взвесь выливали в чашку Петри с таким расчетом, чтобы толщина облучаемого слоя не превышала 2 мм. Чашки с культурой помещали на расстоянии 40 см от источника излучения и облучали с экспозицией (с) – 20; 30; 40; 60.

Для более равномерного воздействия УФ-лучей на бактериальные клетки чашки во время облучения периодически покачивали. После облучения 50 мкл культуры вносили в мясопептонный бульон комнатной температуры. Облученные листериозные культуры инкубировали при 22°C в течение 16 часов, после чего полученные лизаты пропускали через бактериальные фильтры с диаметром пор 0,2 мкм, выдерживали сутки при комнатной температуре, а затем исследовали на присутствие в них бактериофага. Во время облучения, с целью предохранения обработанных культур от фотореактивации, все манипуляции проводили в затемненном помещении. Выявление индуцированных фагов проводили методом «стекающей капли» с индикаторным штаммом *L.monocytogenes* 9-127. Учет результатов осуществляли после 24-х часового инкубирования в термостате при 37°C (рис.1). Присутствие бактериофага, определяли по наличию участков лизиса на равномерном газоне культуры индикаторного штамма. При отсутствии зон лизиса на фоне бактериального роста в первые сутки, наблюдение за посевами продолжали до 5 суток.

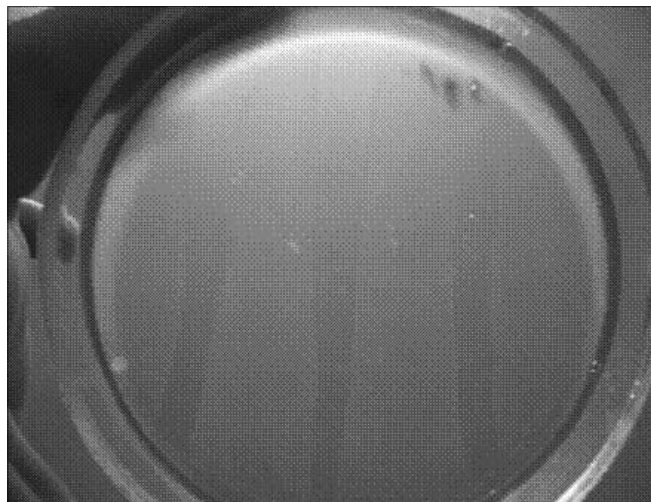


Рис. 1. Дорожки лизиса на сплошном бактериальном газоне индикаторной культуры *L.monocytogenes* 9-127.

Фаголизаты, полученные после обработки лизогенных бактерий индуцирующими агентами, представляли собой смесь фаговых частиц, обладающих недостаточной активностью по отношению к соответствующим возбудителям, в связи, с чем возникла необходимость получения чистых линий бактериальных вирусов. Выделение однородной популяции листериозных бактериофагов добивались при помощи метода непрерывного пассирования их с индикаторной культурой. Материал, взятый бактериальной петлей, эмульгировали в одной или последовательно в 2-х, 3-х пробирках, содержащих 1-3 мл бульона, количество пробирок брали с учетом активности исследуемых фагов. Пассируемый фаг после добавления к нему индикаторной культуры, засеивали двухслойным методом, пассирование фагов продолжали до тех пор, пока на газоне чувствительной культуры не образовывались однородные по морфологии бляшки.

С помощью предложенной методики нами выделено три листериозных бактериофага – L.m 1, L.m 2, L.m 12.

Характеристика фагов бактерий рода *Listeria*.

Размножение бактериофагов проводили на плотной питательной среде, фаг и культуру засеивали методом агаровых слоев в таком отношении, при котором наблюдается сплошной лизис бактерий. Верхний слой агара, в котором сконцентрированы фаговые частицы, освободившиеся из клеток в

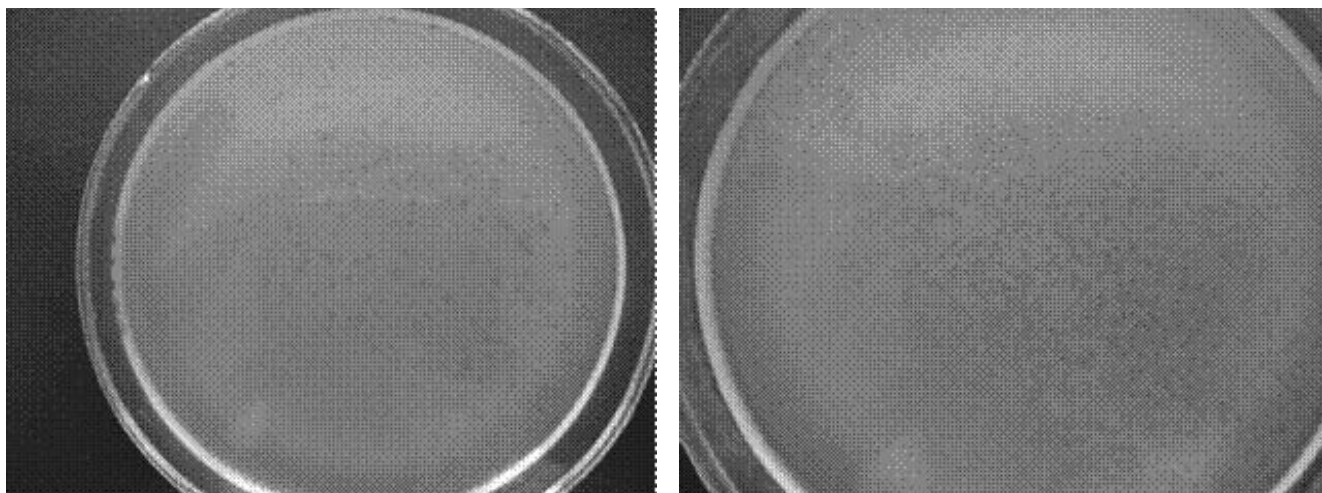


Рис. 2. Негативные колонии листериозных бактериофагов, а – L.m-1, б - L.m-12

результате лизиса, осторожно снимали шпателем и переносили в колбочку, куда добавляли мясо-пептонный бульон из расчета 5 мл на одну чашку. Содержимое колбочки энергично встряхивали и оставляли на 30-40- минут при комнатной температуре, затем центрифугировали 20 минут при 3000 об/мин, что позволяло освободить фаголизат от крупных частичек агара. Для более полной очистки фагализата от остатков агара и бактериальных клеток жидкость повторно центрифугировали при 3000 об/мин 30 мин. С целью получения безбактериального лизата, последний пропускали через бактериальные фильтры с диаметром пор равной 0,2 мкм. Полученные таким образом листериозные бактериофаги, представляющие собой прозрачную желтую жидкость, выдерживали сутки при комнатной температуре, после чего хранили в условиях холодильника.

Морфологию негативных колоний бактериофагов изучали двухслойным методом Грациа (A.Gratia, 1936) с использованием 1,5%-ного агара и мясопептонного бульона с добавлением 1% глюкозы. Для этого в пробирки, содержащие 2,5 мл расплавленного и остуженного до 45°C мясопептонного агара добавляли по 1 мл фаголизата и 0,1 мл суточной культуры *L.monocytogenes*, в концентрации 1×10^9 мк/мл. После тщательного перемешивания содержимое пробирок распределяли равномерным слоем по поверхности подсушенного 1,5%-ного агара. Учет результатов проводили через 24 часа инкубации при температуре 37°C.

Негативные колонии, образуемые изучаемыми бактериофагами, имели схожую морфологию: колонии округлой формы с ровными краями, в диаметре от 1 до 2 мм, прозрачные, без зоны неполного лизиса (рис. 2 а,б).

Литическую активность бактериофагов оценивали по их способности вызывать лизис бактериальной культуры в жидких и на плотных питательных средах и выражали максимальным разведением, в котором испытуемый фаг проявил свое литическое действие. Литическую активность листериозных бактериофагов определяли методами Аппельмана (метод серийных разведений в жидких питательных средах) и Грациа (метод агаровых слоев на плотных питательных средах).

Для титрования в жидкой питательной среде (по методу Аппельмана) двенадцать пробирок, содержащих по 4,5 мл мясопептонного бульона, ставили в штатив в один ряд. В 1-ю пробирку стерильной пипеткой вносили 0,5 мл исследуемого фага, содержимое пробирки перемешивали и 0,5 мл жидкости из 1-й пробирки переносили во 2-ю, из 2-й – в 3-ю и т.д. до 10-й включительно. Из 10-й пробирки лишние 0,5 мл выливали; 11-я и 12-я пробирки – контрольные. Жидкость переносили из одной пробирки в другую каждый раз отдельной стерильной пипеткой емкостью 1 мл. Таким образом, в 10 пробирках получали разведение бактериофага от 10^{-1} до 10^{-10} .

Во все 10 пробирок ряда приготовленных разведений вносили по 0,1 мл суточной культуры *L.monocytogenes*. Пробирка 11-я – контроль культуры, содержит 4,5 мл бульона и 0,1 мл суточной культуры *L.monocytogenes*. Пробирка 12-я – контроль на стерильность, содержит 4,5 мл бульона без добавления бактерий и фага. Штатив с пробирками помещали в термостат при 37°C на 6 – 8 часов.

Титром считали то максимальное разведение бактериофага, при котором наблюдали полный лизис чувствительной к нему культуры – это соответствовало той последней пробирке в ряду, в которой бульон еще оставался совершенно прозрачным.

Определение литической активности бактериофагов на плотной питательной среде (по Грациа) основано на внесении последовательных разведений исследуемого бактериофага в соответствующую культуру бактерий и посева смеси на плотную питательную среду с целью получения негативных колоний фага.

Проведенные исследования показали, что изучаемые бактериофаги обладали литической активностью в диапазоне от 10^{-6} до 10^{-7} , по методу Аппельмана и от $1 \pm 0,1 \times 10^6$ до $2 \pm 0,1 \times 10^7$ фаговых корпускул в 1 мл по методу Грациа (табл. 1).

Спектр литической активности является характерной особенностью штаммов фага. Определение проводили методом нанесения фага на газон бактериальной культуры.

В стерильные бактериологические чашки разливали мясопептонный агар и оставляли для застывания. На поверхность агара пипеткой наносили 3 – 4 капли суточной культуры *L.monocytogenes*. Нанесенную культуру равномерно распределяли по поверхности среды стерильным шпателем и

Таблица 1. Литическая активность листериозных бактериофагов

Бактериофаги	Литическая активность	
	по методу Аппельмана	по методу Грация
Lm 1	10 ⁻⁶	1±0,1 x 10 ⁶
Lm 2	10 ⁻⁷	2±0,1 x 10 ⁷
Lm 12	10 ⁻⁶	2±0,1 x 10 ⁶

Таблица 2. Спектр литической активности фагов листерий*

№ п/п	№ штамма	Листериозные бактериофаги		
		Lm 1	Lm 2	Lm 12
1.	<i>L.monocytogenes</i> № 766	+	—	—
2.	<i>L.monocytogenes</i> № 634	—	—	+
3.	<i>L.monocytogenes</i> № 10522	+	+	+
4.	<i>L.monocytogenes</i> № 11944	+	+	—
5.	<i>L.monocytogenes</i> № 139	—	+	—
6.	<i>L.monocytogenes</i> № 1197	—	—	+
7.	<i>L.monocytogenes</i> № 1213	—	—	—
8.	<i>L.monocytogenes</i> № 9-72	—	+	—
9.	<i>L.monocytogenes</i> № 9-127	+	—	+
10.	<i>L.monocytogenes</i> № 9-130	—	+	—
11.	<i>L.monocytogenes</i> № 129	+	+	—
12.	<i>L.monocytogenes</i> № 17/57	—	+	+
13.	<i>L.monocytogenes</i> № K-1	—	+	—
14.	<i>L.monocytogenes</i> № 56	—	+	+
15.	<i>L.monocytogenes</i> № 1221	+	—	+
16.	<i>L.monocytogenes</i> № 4в	—	+	—
Процент лизируемых культур:		37,5	62,5	43,7

*Примечание: «+» - лизис, «—» - отсутствие лизиса.

Таблица 3. Специфичность листериозных бактериофагов

Род (вид) бактерий	Количество исследуемых штаммов	Бактериофаги		
		L.m 1	L. m 2	L. m 12
		Процент лизируемых культур		
<i>L.monocytogenes</i>	16	37,5	62,5	43,7
<i>L.innocua</i>	3	—	—	—
<i>L.ivanovii</i>	2	—	—	—
<i>L.grayi</i>	1	—	—	—
<i>L.murrayi</i>	1	—	—	—
<i>Erysipelothrix insidiosa</i>	1	—	—	—
<i>Jonesia dentrificans</i>	2	—	—	—
<i>Staphylococcus spp</i>	4	—	—	—

*Примечание: «—» - отсутствие лизиса

Таблица 4. Фаготипирование листерий

№ п/п	Индукцированные штамма	Индикаторные штаммы																				
		L.m. № 766	L.m. № 634	L.m. № 10522	L.m. № 11944	L.m. № 139	L.m. № 1197	L.m.№ 1213	L.m. № 9-72	L.m. № 9-127	L.m.№ 9-130	L.m. № 129	L.m. № 17/57	L.m. № К-1	L.m. № 56	L.m. № 1221	L.m. № 4в	L.i. № 1	L.i. № 6a	L.iv. № 5b	L.gr.	L.mr.
1.																						
2.																						
3.																						
4.																						
5.																						
6.																						
7.																						
8.																						
9.																						
10.																						
11.																						
12.																						
13.																						
14.																						
15.																						
16.																						
17.																						
18.																						
19.																						
20.																						
21.																						

ставили чашки в термостат для подсушивания на 15 – 20 минут. Чашку делили карандашом по стеклу на сектора (количество исследуемых фагов и контроль). На поверхность засеянной среды каждого сектора пипеткой наносили исследуемый фаг. Для контроля на газон исследуемой культуры наносили стерильный мясопептонный бульон. Чашки оставляли для подсушивания в боксе на 15 – 20 минут и ставили в термостат на 18 – 20 часов при 37°C. При положительном результате на газоне сплошного роста культуры на месте нанесения капли фага была видна прозрачная зона лизиса. При отсутствии лизиса на газоне исследуемой культуры результат считали отрицательным. Спектр литической активности находится в пределах от 37,5 % до 62,5 % из числа исследуемых штаммов (табл. 2).

Специфичность – одно из основных свойств бактериофага, определяющее возможность его применения для идентификации культур возбудителя. Специфичность исследуемых фагов изучали методом нанесения фага на газон гетерологичных бактериальных культур.

В результате изучения бактериофагов L.m 1 и L.m 2 по отношению к представителям других родов (*Erysipelothrix*, *Jonesia*, *Staphylococcus*) и видов рода *Listeria* (*L.monocytogenes*, *L.innocua*, *L.murrayi*, *L.grayi*, *L.ivanovii*) установлено, что данные фаги лизировали только бактерии вида *L.monocytogenes*. Показатели специфичности бактериофагов *Listeria* представлены в таблице 3.

Отбор штаммов бактериофагов для фаготипирования листерий

Выделенные бактериофаги обладают высокой литической активностью в отношении *L.monocytogenes* в диапазоне от 10^{-6} до 10^{-7} , по методу Аппельмана и от $1 \pm 0,1 \times 10^6$ до $2 \pm 0,1 \times 10^7$ фаговых корпускул в 1 мл по методу Грациа. Спектр литической активности фагов находится в пределах от 37,5 % до 62,5 % из числа исследуемых штаммов, что свидетельствует о выраженной типоспецифичности выделенных бактериофагов. Диапазон литического действия фагов L.m 1, L.m 2 и L.m 12 представлен в таблице 4. С помощью данного набора бактериофагов мы типировали до 93% исследуемых культур, что позволяет применять данные фаги для мониторинга и биоконтроля пищевого листериоза и эпидемиологического анализа листериозной инфекции: установления источника и путей ее передачи.

Выделения листериозных бактериофагов из внешней среды.

В настоящее время нами ведется работа по выделению листериозных бактериофагов из внешней среды.

РАЗДЕЛ 5. БАКТЕРИОФАГИ МИКРООРГАНИЗМОВ РОДА *ENTEROCOCCUS* CHAPTER 5. BACTERIOPHAGES OF *ENTEROCOCCUS* GENUS

КОВАЛЁВА Е.Н.

**ВЫДЕЛЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЯ ОСНОВНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ
СВОЙСТВ ФАГОВ БАКТЕРИЙ ВИДА *ENTEROCOCCUS FAECALIS***

KOVALEVA E.N.

**ISOLATION AND STUDY OF THE MAIN QUALITIES
OF *ENTEROCOCCUS FAECALIS* SP. PHAGES**

ИССЛЕДОВАНИЯ 2005-2009 гг.

Целью исследований являлась разработка технологии изготовления и применения биопрепарата энтерококковых бактериофагов для идентификации и индикации бактерий вида *Enterococcus faecalis* в объектах внешней среды.

Материалы и методы. 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. faecium*), выделенные нами из патологического материала павших животных, фекалий больных животных, объектов внешней среды; 169 штаммов бактерий рода *Enterococcus* (82 - *E. faecalis*, 76 - *E. faecium*, 3 - *E. raffinosus*, 3 - *E. casseliflavus*, 2 - *E. durans*, 1 - *E. avium*, 1 - *E. gallinarum*, 1 - *E. hirae*) 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*).

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 г. 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.

Таблица 1. Диапазон активности и специфичность бактериофагов *E. faecalis*

Род (вид) бактерий	Кол-во исследуемых штаммов	Бактериофаги серии УГСХА						
		<i>EF-1 EF-2 EF-3 EF-4 EF-5 EF-6 EF-7</i>						
		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. raffinosus</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	-	-	-	-	-	-	-

Характеристика фагов бактерий *E. faecalis*

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.

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 Апельмана и 4×10^9 - 2×10^{10} по методу Грациа. Все изоляты фагов обладали литической активностью, достаточной для использования их в качестве диагностических препаратов.

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. 1).

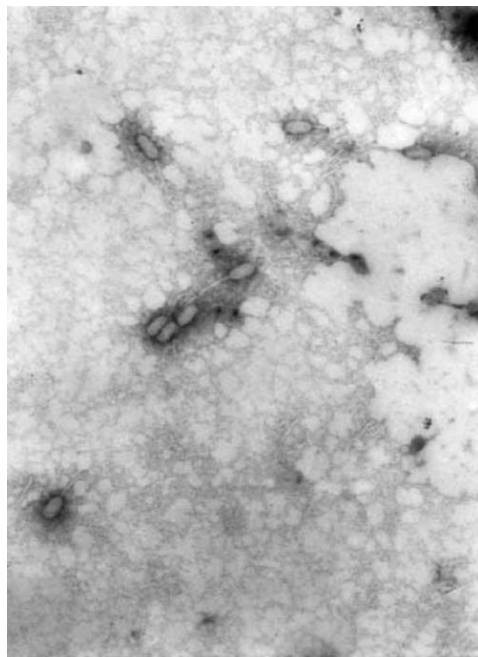


Рис. 1. Морфология бактериофага EF – 4 УГСХА

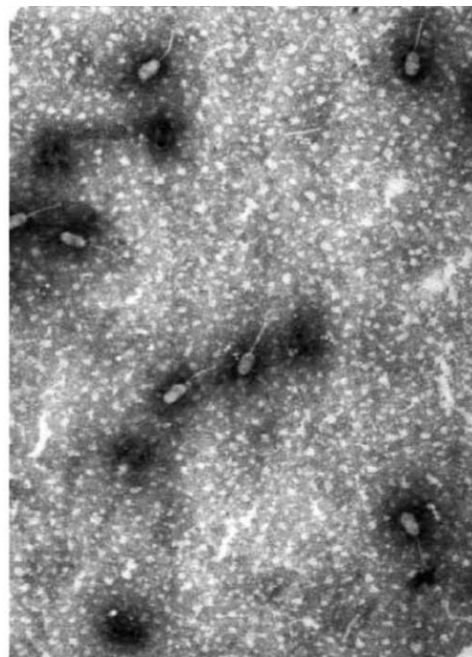


Рис. 2. Морфология бактериофага EF – 5 УГ-

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.

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.

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 инаktivации изучаемых микроорганизмов.

Для электронно-микроскопических исследований морфологии фаговых корпускул использовали фаголизаты EF - 4 УГСХА и EF - 5 УГСХА в титре 3×10^9 - 1×10^{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 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, посеvy 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.

Таблица 2. Чувствительность РНФ в зависимости от времени подрачивания 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

Таблица 3. Чувствительность РНФ в зависимости от времени подрачивания

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

Таблица 4. 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

Таблица 5. 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

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.

Разработка оптимальных условий постановки РНФ. Для определения уровня нарастания титра, при котором РНФ можно считать положительной, были проведены эксперименты 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. В разработку оптимальных условий постановки реакции входит установление времени, обеспечивающего наиболее полноценное взаимодействие бактериофага с бактериями. Оптимальное время экспозиции выбирали из следующих параметров:

1 - 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;

2 - 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. 2, 3). 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 УГ-СХА 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.

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.

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.

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 фаго-индикации 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 литическая 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.

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.

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.

**РАЗДЕЛ 6. БАКТЕРИОФАГИ БАКТЕРИЙ СЕМЕЙСТВА
ENTEROBACTERIACEAE
CHAPTER 6. BACTERIOPHAGES
OF THE *ENTEROBACTERIACEAE* FAMILY**

**БАРТ Н.Г.
ВЫДЕЛЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ ОСНОВНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ
СВОЙСТВ БАКТЕРИОФАГОВ РОДА *PROVIDENCIA***

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

ИССЛЕДОВАНИЯ 2005-2012 гг.

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.

Материалы и методы. В работе были использованы штаммы бактерий, полученные из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ УГСХА 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 *Providencia rettgeri* 175, полученные из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии;

- 26 полевых штаммов *Providencia rettgeri* (*Providencia rettgeri* A 101, *Providencia rettgeri* H 20, *Providencia rettgeri* M 45, *Providencia rettgeri* C 17, *Providencia rettgeri* H 5, *Providencia rettgeri* H 11, *Providencia rettgeri* H 15, *Providencia rettgeri* H 10, *Providencia rettgeri* H 3, *Providencia rettgeri* H 4, *Providencia rettgeri* Д 1, *Providencia rettgeri* H 12, *Providencia rettgeri* Д 73, *Providencia rettgeri* H 2, *Providencia rettgeri* H 87, *Providencia rettgeri* H 8, *Providencia rettgeri* H 6, *Providencia rettgeri* K 1, *Providencia rettgeri* H 14, *Providencia rettgeri* Д 102, *Providencia rettgeri* H 13, *Providencia rettgeri* H 9, *Providencia rettgeri* H 7, *Providencia rettgeri* H 67, *Providencia rettgeri* H 16, *Providencia rettgeri* H 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*, 7 штаммов *Salmonella typhimurium*, 3 штамма бактерий рода *Serratia*, 3 штамма *Pseudomonas aeruginosa*, 2 штамма *Pseudomonas putida*, по 1 штамму 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. Выделено из объектов внешней среды 14 штаммов бактериофагов бактерий рода *Providencia*.

Биологические свойства фагов изучали по методам М. Адамса (1961), Д.М. Гольдфарба (1961), А.С. Тихоненко (1968), И.М. Габрилович (1973), В.Я. Ганюшкина (1988). Индикацию бактерий рода *Providencia* в объектах ветеринарного надзора и патологическом материале проводили с по-

мощью реакции нарастания титра фага по методике описанной В.Д. Тимаковым, Д.М. Гольдфарбом (1961), В.Я. Ганюшкиным (1988).

Выделение бактериофагов *Providencia*. 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 испытывалась на наличие фагов ко всем имеющимся штаммам 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 помещали в термостат и инкубировали их при 37 °С до выраженного помутнения в контрольной пробирке (4-6 часов). Затем содержимое опытной пробирки прогревали 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 отщипкой типичных негативных колоний. Готовили разведение фага в мясопептонном бульоне рН (7,27,4) от 10^{-1} до 10^{-9} . Фаг высевали методом агаровых слоев (по Грациа), используя разведения 10^{-6} - 10^{-9} , таким образом, чтобы на питательном агаре сформировались отдельные негативные колонии. После 24-часового инкубирования в термостате, отщипывали 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 - МПБ 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 Грациа. 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).

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.

Литическую активность бактериофагов оценивали 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 дальнейших исследований были отобраны два бактериофага с наибольшим диапазоном литической активности по отношению к изучаемым культурам: фаг F-87 УГСХА, который лизировал 82,1% штаммов бактерий рода *Providencia* и фаг F-67 УГСХА - 85,7 %. В сумме фаги проявили литическое действие в отношении 96,4 % всех исследованных культур.

Специфичность бактериофагов рода *Providencia* осуществляли по отношению к представителям следующих видов: *Proteus mirabilis*, *Morganella morganii*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus*

Таблица 1. Литическая активность бактериофагов рода *Providencia*

№ п/п	Название фага	Индикаторная культура	Активность фагов	
			по Аппельману	по Грациа
1	F-73 УГСХА	<i>Providencia rettgeri</i> 104a	10^{-5}	$1,1 \times 10^8$ $\pm 0,2 \times 10^8$
2	F-45 УГСХА	<i>Providencia rettgeri</i> Д 102	10^{-6}	$1,5 \times 10^8$ $\pm 0,1 \times 10^8$
3	F-17 УГСХА	<i>Providencia rettgeri</i> Н 5	10^{-6}	$3,2 \times 10^9$ $\pm 0,1 \times 10^9$
4	F-20 УГСХА	<i>Providencia rettgeri</i> 104 a	10^{-6}	$5,3 \times 10^9$ $\pm 0,3 \times 10^9$
5	F-1 УГСХА	<i>Providencia rettgeri</i> Д 102	10^{-6}	$1,1 \times 10^9$ $\pm 0,3 \times 10^9$
6	F-70 УГСХА	<i>Providencia rettgeri</i> Д 73	10^{-5}	$1,4 \times 10^8$ $\pm 0,2 \times 10^8$
7	F-9 УГСХА	<i>Providencia rettgeri</i> М 45	10^{-5}	$7,1 \times 10^9$ $\pm 0,3 \times 10^9$
8	F-7 УГСХА	<i>Providencia rettgeri</i> Н 20	10^{-5}	$2,4 \times 10^9$ $\pm 0,2 \times 10^9$
9	F-67 УГСХА	<i>Providencia rettgeri</i> Н 67	10^{-9}	$4,2 \times 10^8$ $\pm 0,1 \times 10^8$
10	F-87 УГСХА	<i>Providencia rettgeri</i> Н 87	10^{-10}	$1,8 \times 10^9$ $\pm 0,2 \times 10^9$
11	F-36 УГСХА	<i>Providencia rettgeri</i> С 17	10^{-5}	$1,4 \times 10^9$ $\pm 0,3 \times 10^9$
12	F-38 УГСХА	<i>Providencia rettgeri</i> Н 87	10^{-6}	$2,6 \times 10^9$ $\pm 0,1 \times 10^9$
13	F-28 УГСХА	<i>Providencia rettgeri</i> 104a	10^{-5}	$2,5 \times 10^9$ $\pm 0,4 \times 10^9$
14	F-41 УГСХА	<i>Providencia rettgeri</i> 175	10^{-8}	$2,5 \times 10^9$ $\pm 0,2 \times 10^9$

vulgaris, *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.* (методом нанесения капель фагов на газон исследуемой культуры (Ганюшкин, 1988)). В ходе исследований было установлено, что изучаемые бактериофаги строго специфичны по отношению к бактериям рода *Providencia*.

В результате изучения чувствительности бактериофагов к действию температуры, установили, что фаги F-87 УГСХА и F-67 УГ-СХА 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 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*, разработали схему ускоренной идентификации данных микроорганизмов. Посев материала производили на среды: Эндо, Плоскирева, Левина. Посевы инкубировали при 37 °С 18-20 часов. Для дальнейшего изучения отобранные колонии с чашек пересеивали в МПБ, МПА и инкубировали при 37 °С 6-18 часов до появления выраженного помутнения среды. Бактериальные культуры микроскопировали 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.

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 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 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.

Были проведены исследования по определению минимальной концентрации микробных клеток в исследуемых объектах, при которой возможно обнаружить бактерии рода *Providencia* бактериологическим методом. По результатам данных исследований концентрация микробных клеток бактерий рода *Providencia* в объектах исследования составила $2,3 \times 10^4$ м.к./мл. При исследовании 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.

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. 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 по 3 широкие 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 засеянными бактериями МПБ и индикаторным фагом является опытной. Пробирка № 2 (содержащая бактерии 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.

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.

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* H 87, *Providencia rettgeri* H 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.

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

ЛЯШЕНКО Е.А.
ВЫДЕЛЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ ОСНОВНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ
СВОЙСТВ БАКТЕРИОФАГОВ БАКТЕРИЙ РОДА *KLEBSIELLA*

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

ИССЛЕДОВАНИЯ 2002-2006 гг.

Идентификация клебсиелл в основном проводится бактериологическим методом. Ряд исследователей сообщают о положительных результатах индикации и идентификации возбудителей некоторых заболеваний с помощью специфических бактериофагов (Д.М. Гольдфарб, 1961). Метод фагодиагностики является специфичным, не требующий больших затрат времени, материалов и доступен лабораториям всех уровней. В арсенале 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 заключалась в разработке технологических параметров по индикации и идентификации бактерий рода *Klebsiella* с помощью специфических бактериофагов.

Материалы и методы. В работе были использованы:

- 38 штаммов бактерий рода *Klebsiella*, из 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 селекцию бактериофагов проводили по методам Л.И. Адельсона (1962), С. Лурия, Д. Дарнела (1970), И.П. Ревенко (1978), В.Я. Ганюшкина (1988), И.М. Габриловича (1992). Биологические свойства фагов изучали по методам М. Адамса (1961), Д.М. Гольдфарба (1961), И.М. Габриловича (1973). 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).

Выделение бактериофагов. Первым 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 (Д.М. Гольдфарб, 1961). В результате проведенных исследований штаммы *Klebsiella* не проявили лизогенных свойств.

Во второй серии опытов на исследуемые культуры воздействовали индуцирующим фактором (С. Лурия, Д. 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 «Изольда» с ртутной лампой ДРБ8, 18 % мощ-

ности которой приходится на область 254 нм. В результате индукции исследуемые штаммы *Klebsiella* 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 неполного лизиса.

Образовавшиеся негативные колонии разделили на два типа. 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.

Литическую активность бактериофага оценивали по его способности вызывать лизис бактериальной культуры в жидких или плотных питательных средах. Активность по методу Аппельмана выражали максимальным разведением, в котором испытуемый бактериофаг проявил свое литическое действие. Более точным методом оценки литической активности бактериофага являлось определение количества активных корпускул фага в единице объема (по Грация). 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 Грация). Результаты исследований представлены в таблице 1.

Для изучения спектра литической активности использовали метод нанесения капель бактериофагов на газон исследуемой культуры. В качестве исследуемых культур использовали 28 (5 референс-штаммов, 11 музейных и 12 выделенных нами) штаммов бактерий рода *Klebsiella*. Результаты проведенных исследований свидетельствуют о диапазоне литической активности изолятов фагов 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. Бактериофаги К - 10 УГСХА и К - 81 УГСХА с широким спектром литической активности были отобраны для конструирования диагностического биопрепарата.

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

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 - 10УГСХА) и 88 °С (К - 81 УГСХА) в течение 30 минут.

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) (таблица 2).

Обработка бактериофагов К - 10 УГСХА, К - 81 УГСХА хлороформом выявила выраженную устойчивость их к воздействию данного агента в течение 40 минут. Данный химический агент использовали в исследованиях для освобождения фаголизата от жизнеспособных бактерий.

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 структуры, состоящие из симметричной головки в виде многогранника с отростком (рисунок 1-2)

Вирусные частицы фага К - 10 УГСХА имеют следующие размеры:

- высота головки - 62 нм;
- диаметр головки - 50 нм;
- длина отростка - 10^5 нм.

Отношение высоты головки к ее диаметру у фагов равно 1,24.

Вирусные частицы фага К - 81 УГСХА имеют следующие размеры:

- высота головки - 60 нм;
- диаметр головки - 55 нм;
- длина отростка – 85 нм.

Отношение высоты головки к ее диаметру у фагов равно 1,09.

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 бактериофага К - 10 УГСХА (увел. х 110 000) для бактериофага К - 81 УГСХА (увел. х 110 000) с литической активностью 10^9 . При исследовании литической актив-

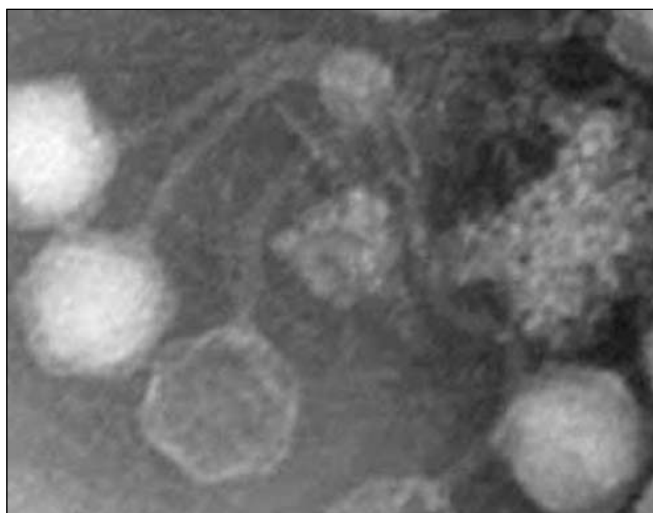


Рисунок 1. Электронная микрофотография морфологии бактериофага К-10 УГСХА (увел.х 110000)



Рисунок 2. Электронная микрофотография морфологии бактериофага К-81 УГСХА (увел.х 110000)

ности 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.

Разработка схемы ускоренной идентификации бактерий рода *Klebsiella*. 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.

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

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 подрачивание исследуемого материала в течение 5, 16, 24 часов при 37 °С, после добавления фагов смесь выдерживали в течение 5 часов при температуре 37 °С (таблица 3);
- 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 подрачивании материала в течение 5 часов можно обнаружить клебсиеллы в концентрации 10^3 м.к./мл. С увеличением времени подрачивания материала до 16 часов чувствительность реакции повышается и позволяет обнаружить бактерии в количестве 10^2 м.к./мл. На проведение исследования затрачивается 33 часа.

Во втором варианте опыта МПБ, контаминированный бактериями рода *Klebsiella* от 10^1 до 1×10^5 м.к./мл не подрачивали, 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 чувствительность реакции с указанным фагом до 10^3 м.к./мл, а 10 часовая инкубация - до 10^2 м.к./мл (таблица 4).

На основании полученных данных можно сделать вывод, что оптимальным является режим РНФ при 6 часовой экспозиции исследуемого материала с фагом, когда удается 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).

Таблица 1. Литическая активность фагов бактерий рода *Klebsiella*

№ п/п	Название фага серии УГСХА	Индикаторная культура	Активность фагов	
			по методу Аппельмана	по методу Грация
1	K - 281	<i>K. pneumoniae</i> № 8172	10 ⁻⁵	1,0 x 10 ⁸
2	K - 210	<i>K. pneumoniae</i> № 1071	10 ⁻⁶	1,5 x 10 ⁸
3	K - 41	<i>K. pneumoniae</i> № 4463	10 ⁻⁶	7,0 x 10 ⁹
4	K - 42	<i>K. pneumoniae</i> № 4463	10 ⁻⁶	5,0 x 10 ⁸
5	K - 4	<i>K. pneumoniae</i> № 4463	10 ⁻⁶	1,0 x 10 ⁹
6	K - 14	<i>K. pneumoniae</i> № 4463	10 ⁻⁵	1,1 x 10 ⁹
7	K - 24	<i>K. pneumoniae</i> № 4463	10 ⁻⁵	1,0 x 10 ⁹
8	K - 101	<i>K. pneumoniae</i> № 01	10 ⁻⁵	7,0 x 10 ⁹
9	K - 201	<i>K. pneumoniae</i> № 01	10 ⁻⁵	2,0 x 10 ⁹
10	K - 2	<i>K. pneumoniae</i> № 265	10 ⁻⁵	4,0 x 10 ⁷
11	K - 12	<i>K. pneumoniae</i> № 265	10 ⁻⁵	1,0 x 10 ⁹
12	K - 10	<i>K. pneumoniae</i> № 1017	10 ⁻⁶	2,0 x 10 ⁹
13	K - 60	<i>K. pneumoniae</i> № 60	10 ⁻⁵	2,5 x 10 ⁹
14	K - 11	<i>K. pneumoniae</i> № 1	10 ⁻⁸	2,5 x 10 ⁹
15	K - 0x1	<i>K. oxytoca</i> № 1/1	10 ⁻⁵	8,0 x 10 ⁹
16	K - 33	<i>K. oxytoca</i> № 5	10 ⁻⁸	5,0 x 10 ⁹
17	K - 44	<i>K. pneumoniae</i> № 4463	10 ⁻⁶	2,0 x 10 ⁹
18	K - 03	<i>K. pneumoniae</i> № 03	10 ⁻⁷	1,0 x 10 ⁹
19	K - 032	<i>K. pneumoniae</i> № 03	10 ⁻⁷	1,0 x 10 ⁹
20	K - 81	<i>K. pneumoniae</i> № 8172	10 ⁻⁶	4,0 x 10 ⁹
21	K - 8	<i>K. pneumoniae</i> № 423	10 ⁻⁷	1,0x 10 ⁹

Таблица 2. 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	K - 10 УГСХА	1 x 10 ⁹	1,5 x 10 ⁹	2,5 x 10 ⁹	2 x 10 ⁹	1 x 10 ⁹	1,5x10 ⁹	1,2 x 10 ⁹
2	K - 81 УГСХА	3 x 10 ⁹	3 x 10 ⁹	4 x 10 ⁹	2 x 10 ⁹	3 x 10 ⁹	3,2 x 10 ⁹	3 x 10 ⁹

Таблица 3. 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
		K - 10 УГСХА	K - 81 УГСХА	
1	5	10 ³	10 ³	22
2	16	10 ²	10 ²	33
3	24	10 ²	10 ²	41

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 фагов более чем в 5 раз произошло при минимальной концентрации бактерий рода *Klebsiella* 10^3

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 ч.

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

В качестве усовершенствования предложенного метода нами изучалась возможность использования смеси из монофагов. Определение активности монофагов К - 10 УГСХА и К - 81 УГСХА и активности смеси данных фагов на индикаторных штаммах, показало равнозначные результа-

Таблица 4. 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

Таблица 5. 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 К - 81 УГСХА	<i>K. pneumoniae</i> № 1017	$1,2 \times 10^9$
	<i>K. pneumoniae</i> № 8172	$2,1 \times 10^9$

ты. Интерференция, то есть взаимное усиление или подавление при взаимодействии фагов отсутствовала (таблица 5).

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. 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.

**САДРТДИНОВА Г.Р.
УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ СХЕМЫ ИНДИКАЦИИ И
ИДЕНТИФИКАЦИИ БАКТЕРИЙ ВИДА *KLEBSIELLA OXYTOCA*
С ПОМОЩЬЮ ФАГОВОГО БИОПРЕПАРАТА**

**SADRTDINOVA G.R.
IMPROVEMENT OF THE SCHEME OF INDICATION AND IDENTIFICATION OF BACTERIA OF *KLEBSIELLA OXYTOCA* TYPE WITH THE USE OF STAGE BIOPREPARATION**

ИССЛЕДОВАНИЯ 2013-2017 ГГ.

Бактерии рода *Klebsiella* - третий по частоте граммотрицательный возбудитель инфекций животных и человека (Киселева Б.С., 1985; Сельникова О.П. с соавт., 1992; Ольховик О.П., 2009; Анганова Е.В., 2012; Онищенко Г.Г., 2002, 2014). Чаще всего негативное проявление осуществляют виды: *Klebsiella pneumoniae* подвид *pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* подвид *rhinoscleromatis* и *Klebsiella oxytoca*. Данные микроорганизмы могут быть причиной метрита и бесплодия у лошадей, мастита у коров, гематогенного остеомиелита, конъюнктивитов, менингитов, сепсисов, острых кишечных инфекций, легочных поражений у животных и человека (Красноголовец В.Н., 1996; Красиков А.П., 1998; Roberts D.E. et al., 2000; Brisse D. et al., 2000; Золотухин С.Н., 2004; Бульканова Е.А., 2004; Андросик Н.Н., 2008).

Выделение и идентификацию бактерий вида *K. oxytoca* проводят бактериологическим методом с использованием целого ряда дифференциально-диагностических питательных сред и тест-систем, что требует значительных затрат времени. Работы Е.А. Булькановой с соавт. (2006) приводят данные о положительных результатах идентификации и индикации бактерий рода *Klebsiella* методом фагодиагностики.

Цель исследования - усовершенствование схемы индикации и идентификации бактерий вида *K. oxytoca* с помощью фагового биопрепарата.

Материалы и методы. В работе был использован музейный референс-штамм *K. oxytoca* ATCC 8724, а также 24 штамма бактерий выделенных из объектов окружающей среды, изучение биологических свойств которых позволило отнести их к бактериям вида *K. oxytoca*. В качестве гетерологичных родов и видов бактерий использованы штаммы бактерий семейства *Enterobacteriaceae*.

Выделение фагов проводили с помощью методов, предложенных Д.М. Гольдфарбом (1961), С. Лурия, Д. Дарнелл (1970), С.Н. Золотухиным (2006), Н.Н. Карамышевой (2012), Е.А. Ляшенко (2008, 2013).

Биологические свойства выделенных бактериофагов изучали методами, предложенными С.Н. Золотухиным (2006), Е.А. Булькановой (2006). Морфологию негативных колоний фагов изучали на плотных средах при посеве методом Грация (по Булькановой Е.А., 2006; Журавской Н.П., 2013, Феоктистовой Н.А., 2013). Литическую активность фагов определяли методами Аппельмана и Грация (по Ревенко И.П., 1978). Спектр литической активности и специфичность фагов определяли методами Отто («стекающая капля»), методом Фишера (по Р. Шах Махмуд с соавт., 2013), методом Фюрта. Селекцию бактериофагов проводили по методикам С.Н. Золотухина (2006), Е.А. Ляшенко (2013).

Постановку и оценку результатов реакции нарастания титра фага для индикации бактерий вида *K. oxytoca* в объектах внешней среды проводили согласно методикам В.Д. Тимакова, Д.М. Гольдфарба (1962), В.Я. Ганюшкина (1988), С.Н. Золотухина (2006), Е.А. Булькановой (2006).

Выделение бактериофагов бактерий вида *K. oxytoca*. При проведении исследований использовали наиболее применяемые в научной практике методики, с нашими дополнениями для изучаемого микроорганизма:

1. Метод выделения бактериофагов без воздействия на них индуцирующего фактора по С. Лурия, Д. Дарнеллу. В результате проведенных исследований было установлено, что изучаемые штаммы бактерий не проявили лизогенных свойств;

2. Выделение фагов из бактериальных культур с использованием индуцирующего фактора. Во второй серии опытов на исследуемые культуры воздействовали ультрафиолетовым и рентгеновским облучением, являющимися индуцирующим фактором. В результате проведенных исследований было выделено 4 штамма бактериофагов;

3. Далее нами были проведены опыты по выделению фагов из объектов внешней среды (по методике Адельсона Л.И., Ляшенко Е.А.). Материалом для исследований были пробы почвы, пробы песка с мест активного пребывания человека, отходы молочного производства, пробы мочи и фекалий больных людей, фекалии крупного и мелкого рогатого скота, пробы воды, раневой экссудат. Использование данной методики в работе позволило выделить 11 бактериофагов, активных в отношении бактерий вида *K. oxytoca*.

Характеристика фагов бактерий вида *K. oxytoca*. Морфологию негативных колоний изучали в разведении фага (10^{-7} – 10^{-10}) с индикаторной культурой *K. oxytoca* методом агаровых слоев по Грация (рисунки 1).

Изоляты выделенных бактериофагов формировали негативные колонии следующих типов: I тип: бактериофаги Кох-3 УГСХА, Кох-4 УГСХА, Кох-6 УГСХА, Кох-7 УГСХА, Кох-8 УГСХА, Кох-10 УГСХА, Кох-12 УГСХА, Кох-13 УГСХА, Кох-14 УГСХА, Кох-15 УГСХА; II тип: Кох-9 УГСХА, Кох-11 УГСХА; III тип: Кох-1 УГСХА, Кох-2 УГСХА; V тип: Кох-5 УГСХА. Активность фага заключается в способности бактериофага вызывать лизис бактериальной культуры в жидких и на плотных питательных средах. По Аппельману титр исследуемого фага определяли по последней прозрачной пробирке ряда и выражали разведением фага. По Грация титр фага определяли путем подсчета количества негативных колоний. Литическая активность исследуемых фагов составила от 10^{-5} до 10^{-9} по методу Аппельмана и от $(1,0 \pm 0,1) \times 10^7$ до $(4,0 \pm 0,1) \times 10^8$ по методу Грация.

Анализ спектра лизиса заключался в определении диапазона литической активности бактериофага. С этой целью использовали метод Отто (метод «стекающей капли»), метод Фишера. В качестве исследуемых культур использовали штаммы бактерий вида *K. oxytoca* - 24 штамма. В результате исследования, нами было установлено, что спектр литической активности изучае-

мых фагов находился в пределах от 4,2 до 75,0 %. Для дальнейших исследований отметили два бактериофага с наибольшим диапазоном литического действия. Совместный спектр литического действия у двух штаммов бактериофагов Кох-9 УГСХА и Кох-11 УГСХА – 79,2%. Данные фаги были отобраны для дальнейших исследований.

Специфичность фагов заключалась в отсутствии литического действия бактериофагов изучаемого микроорганизма по отношению к бактериям других родов и видов (метод Отто, метод Фюрта). В качестве гетерологичных культур использовали штаммы: *K. pneumoniae*, *Escherichia spp.*, *Proteus spp.*, *Citrobacter spp.*, *Serratia spp.*, *Yersinia spp.*, *Enterobacter spp.*, *Hafnia spp.* Анализ полученных результатов позволяет заключить об отсутствии литической активности фагов Кох-9 УГСХА и Кох-11 УГСХА в отношении гетерологичных культур и выраженной специфичности по отношению к бактериям вида *K. oxytoca*.

Изучение температурной чувствительности фагов позволило отметить, что в диапазоне температур 54 – 68 °С активность бактериофагов Кох-9 УГСХА и Кох-11 УГСХА снижается (таблица 1).

Повышение температуры прогревания до 69 – 71 °С вызывает полную инактивацию фага Кох-9 УГСХА, до 79 – 81 °С -фага Кох-11 УГСХА.

Чувствительность фагов к хлороформу определяли в соотношении 1:10 при разных временных параметрах: 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 минут (таблица 2).

Отмечено, что бактериофаги Кох-9 УГСХА и Кох-11 УГСХА устойчивы к воздействию хлороформа в течение 20 минут. Более длительное воздействие хлороформа (25-40 минут) приводило к инактивации изучаемых фагов, что не позволяет использовать данный химический агент в качестве средства для освобождения фаголизата от жизнеспособных клеток *K. oxytoca*.

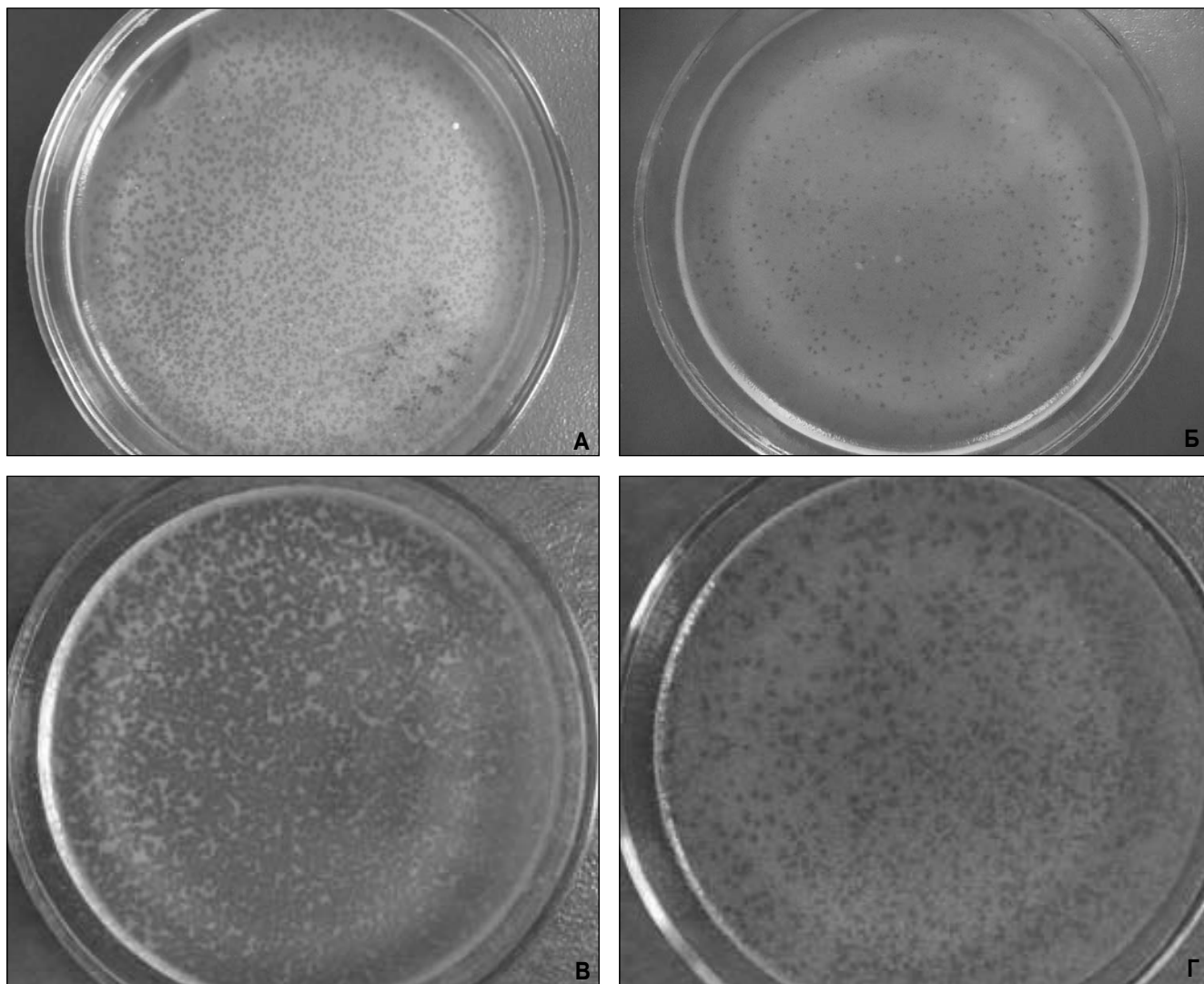


Рисунок 1. Формирование негативных колоний выделенными фагами: А) Кох-9 УГСХА; Б) Кох-11 УГСХА; В) Кох-7 УГСХА; Г) Кох-8 УГСХА

Разработка оптимальных условий постановки РНФ. В наших исследованиях положительным считали увеличение титра фагов в 5 и более раз. В результате проведенных исследований нами было установлено, что количество фаговых частиц более чем в 5 раз превышает количество фаговых корпускул в контрольных пробах, при контаминации мясопептонного бульона бактериями вида *K. oxytoca* в концентрации 10^3 м.к./мл.

Определение оптимального времени наиболее эффективного взаимодействия фага с бактериями заключалось в установлении временных параметров реакции, обеспечивающих оптимальное взаимодействие корпускул фага с бактериями (таблица 3).

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 5 часов, поскольку позволяет обнаружить бактерии *K. oxytoca* в количестве 10^3 м.к./мл за 22 часа (21 час (время исследований) + 1 час (на постановку опыта)).

Для определения возможности использования реакции нарастания титра фага для индикации бактерий вида *K. oxytoca* в объектах ветеринарно-санитарного надзора исследовали образцы воды, комбикорма, фарша, фекалий (рисунок 2).

Одновременно проводили исследования бактериологическим методом. Результаты исследований (с помощью бактериофагов Кох-9 УГСХА и Кох-11 УГСХА) мясопептонного бульона, водопроводной воды, фекалий, комбикорма, мясного фарша, контаминированных бактериями вида *K. oxytoca*, подтверждают целесообразность применения реакции нарастания титра фага для индикации бактерий вида *K. oxytoca* в исследуемых субстратах. Искомые бактерии обнаруживались в концентрации 10^3 м.к./мл за 22 часа.

Для конструирования биопрепарата на основе изученных фагов необходимо изучить эффект их совместного действия. Необходимым условием совместного использования фагов является

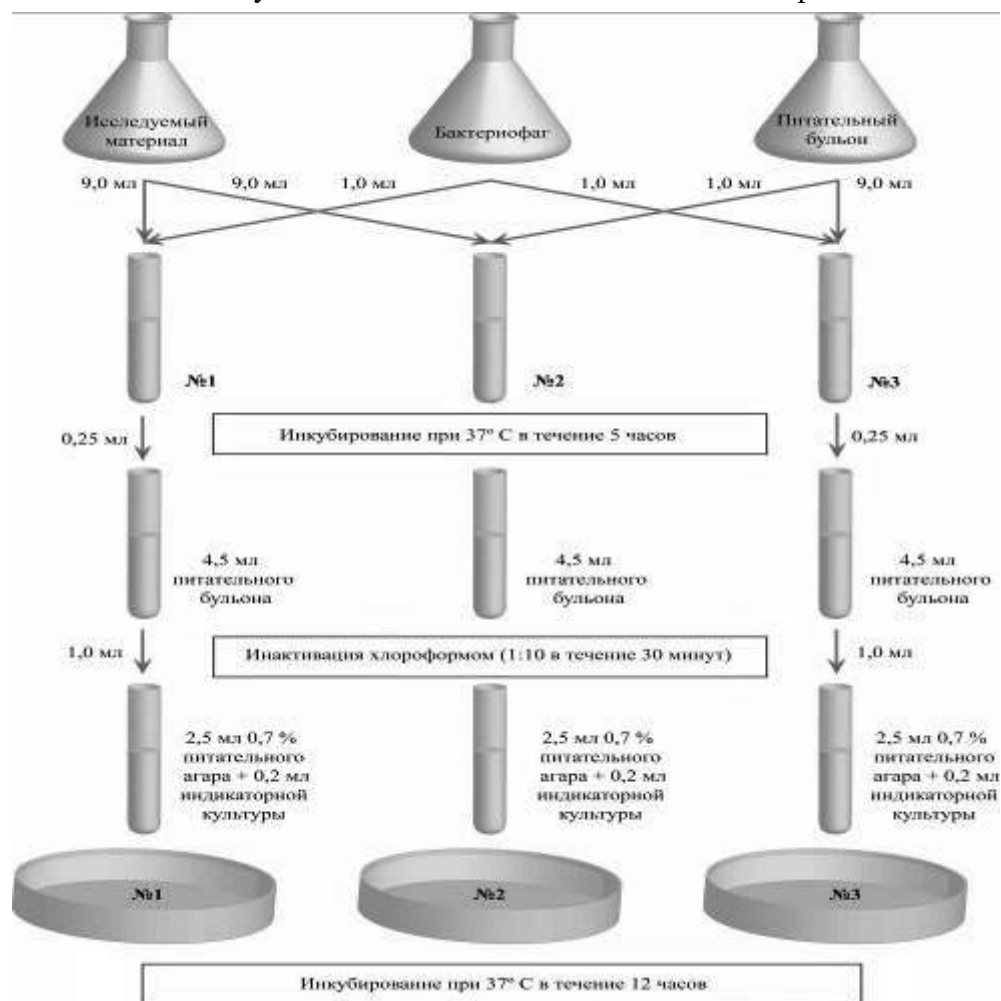


Рисунок 2. Предлагаемая схема постановки реакции нарастания титра фага

Таблица 1. Температурная устойчивость бактериофагов *K. oxytoca*

Температурный диапазон, °С	Концентрация фаговых частиц, БОЕ/мл	
	Кох-9 УГСХА	Кох-11 УГСХА
54-56	$(2,7 \pm 0,3) \times 10^8$ *	$(3,3 \pm 0,2) \times 10^8$ *
57-59	$(2,7 \pm 0,3) \times 10^8$ *	$(3,1 \pm 0,1) \times 10^8$ *
60-62	$(2,8 \pm 0,1) \times 10^8$	$(3,9 \pm 0,1) \times 10^8$
63-65	$(2,4 \pm 0,2) \times 10^{6**}$	$(3,1 \pm 0,2) \times 10^{7*}$
66-68	$(1,8 \pm 0,1) \times 10^{4*}$	$(2,3 \pm 0,2) \times 10^7$
69-71	-	$(2,1 \pm 0,2) \times 10^{6*}$
72-74	-	$(1,6 \pm 0,1) \times 10^{4*}$
75-77	-	$(0,8 \pm 0,1) \times 10^{3**}$
79-81	-	-
82-84	-	-
85-87	-	-
88-90	-	-
Контроль фага	$(3,0 \pm 0,1) \times 10^8$	$(4,0 \pm 0,1) \times 10^8$

Примечание: *) – $P < 0,05$; **) – $P < 0,01$; «-» - отсутствие негативных колоний фага

Таблица 2. Устойчивость бактериофагов *K. oxytoca* к хлороформу

Исследуемый фаг	Концентрация фаговых частиц после воздействия хлороформом, БОЕ/мл						
	10 мин	15 мин	20 мин	25 мин	30 мин	35 мин	40 мин
Кох-9 УГСХА	$(2,3 \pm 0,1) \times 10^6$	$(1,2 \pm 0,2) \times 10^{4*}$	$(0,3 \pm 0,1) \times 10^2$	-	-	-	-
Кох-11 УГСХА	$(2,1 \pm 0,1) \times 10^{7*}$	$(1,7 \pm 0,1) \times 10^{6*}$	$(1,0 \pm 0,2) \times 10^2$	-	-	-	-

Примечание: *) – $P < 0,05$; «-» - отсутствие негативных колоний фага

Таблица 3. Чувствительность РНФ в зависимости от времени инкубирования исследуемого материала с исследуемыми бактериофагами

Примечание: *) – $P < 0,05$; «-» - отсутствие негативных колоний фага	Инкубация опытных чашек в термостате, час	Концентрация бактерий <i>K. oxytoca</i> , обнаруживаемая методом РНФ		Время исследований, час
		Кох-9 УГСХА	Кох-11 УГСХА	
5	16	10^3	10^3	21
6	16	10^3	10^3	22
10	16	10^2	10^3	26
16	16	10^2	10^2	32
24	16	10^2	10^2	40

отсутствие антагонистического эффекта при их взаимодействии. Литическую активность бактериофагов Кох-9 УГСХА и Кох-11 УГСХА и их смеси в равном объеме определяли методами Аппельмана и Грациа, в качестве индикаторной культуры использовали штамм *K. oxytoca* 124.

Биопрепарат на основе смеси фагов Кох-9 УГСХА и Кох-11 УГСХА по биологическим свойствам (высокая литическая активность, широкий спектр литической активности, выраженная специфичность, более высокий по сравнению с бактериями порог инактивации) соответствует отдельным монофагам. Антагонистический эффект при взаимодействии данных фагов отсутствует.

Результаты наших исследований подтверждают возможность использования метода РНФ для индикации и идентификации бактерий вида *K. oxytoca* в объектах внешней среды с помощью специфических бактериофагов Кох-9 УГСХА и Кох-11 УГСХА. Фаги обладают литической активностью не ниже 10^{-7} по методу Аппельмана, 10^8 по методу Грациа, широким спектром литической активности (79,2%), являются специфичными по отношению к бактериям вида *K. oxytoca*.

КОРИТНЯК Б.М.
ВЫДЕЛЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ ОСНОВНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ
СВОЙСТВ БАКТЕРИОФАГОВ
БАКТЕРИЙ *YERSINIA ENTEROCOLITICA*

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

ИССЛЕДОВАНИЯ 2002 - 2005 гг.

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

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

Материалы и методы. В работе были использованы как гомологичные, так и гетерологичные штаммы бактерий. В качестве гомологичных бактерий использовали: 38 штаммов бактерий вида *Y. enterocolitica* полученные из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ УГСХА и выделенные нами из объектов окружающей среды и патологического материала. Использовали 101 штамм бактерий гетерологичных родов и семейств: *Proteus*, *Morganella*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Ps. aureginosa*, *B. 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.

Из культур выделяли бактериофаги методами, предложенными С. Лурия, Д. Дарнел (1970). Фаги выделяли из объектов окружающей среды методом, предложенным Л.И. Адельсоном (1962). Изучение биологических свойств фагов проводили по методам, предложенным М. Adams (1961), Д.М. Гольдфарбом (1961), 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). 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).

Выделение бактериофагов. 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* 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 И.П., 1978). Полученный фильтрат исследовали на наличие фага на имеющихся культурах *Y. enterocolitica* методом агаровых слоев предложенного А. Грация (Гольдфарб Д.М., 1961). Установлено, что при действии индуцирующего фактора на бактерии вида *Y. enterocolitica* в наших опытах не приводило к появлению зон лизиса. Резюмируя полученные данные, можно утвер-

ждать, 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 (Адельсон Л.И., 1958; Ганюшкин В.Я., 1988).

Для проведения исследований, брали сточные воды из общественных туалетов, свиноводческих хозяйств и молочнотоварных ферм в различных хозяйствах Ульяновской и Самарской областей, а также на Ульяновском мясокомбинате. В результате проведённых опытов, нами были выделены и изолированы 9 штаммов фагов бактерий вида *Y. enterocolitica*. Из выделенных фагов, мы отобрали 3 штамма фагов, обладавших стабильными биологическими свойствами. 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 фагов бактерий вида *Y. enterocolitica*. 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.

Литическая активность выделенных бактериофагов бактерий рода. Литическую активность селекционированных бактериофагов определяли по методу Аппельмана и Грация. 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.

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.

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%), 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.

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 УГ-СХА, 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 испытуемых 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.

Степень устойчивости бактериофагов и клеточных хозяев к инактивирующим факторам физического воздействия имеет теоретическое и практическое значение, поэтому при изучении био-

логических 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 730 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.

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 проведенных исследований свидетельствуют о том, что селекционированные бактериофаги Y/9 УГСХА, Y/3УГСХА проявили выраженную устойчивость к воздействию хлороформа. В то время как бактериофаг Y/4 УГ-СХА терял свою активность при воздействии хлороформа на фаголизаты в течение 60 минут, и является умеренно устойчивым к действию хлороформа.

Определение температурных условий культивирования фагов бактерий вида *Y. enterocolitica*: Y/3 УГСХА, Y/4 УГСХА, Y/9 УГ СХА - 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.

Разработка схемы ускоренной идентификации бактерий вида *Y. enterocolitica*. 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. Результат исследований считали положительным, если на месте нанесения фага на газоне сплошного роста культуры образовывалась прозрачная зона лизиса с вторичным ростом фагорезистентных 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).

Разработка оптимальных условий постановки РНФ. Определение параметров постановки РНФ и разработку количественного показателя реакции, имеющего диагностическое значение, проводили по методике, предложенной В.Д. Тимаковым и Д.М. Голтдфарбом (1962). Проведение

ны 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). 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 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 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 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 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;

- в предварительном подрачивании 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 подрачивания 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. Установлено, что результаты исследования при подрачивания 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 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 подрачивали, а сразу же вносили в пробирки. Установлено, что результаты исследования при инкубировании исследуемого материала с бактериофагом без подрачивания 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);

Таблица 1. Чувствительность РНФ в зависимости от времени подрачивания исследуемого материала (вода, комбикорм), загрязненного *Y. enterocolitica* (Y/9 УГСХА).

№ п/п	Варианты исследований	Минимальное количество бактерий, обнаруживаемое с помощью бактериологический метод		Время, затраченное на проведение исследований (в часах)	
		РНФ	бактериологический метод	РНФ	бактериологический метод
1	5	10 ¹	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

Таблица 2. Чувствительность РНФ в зависимости от времени подрачивания исследуемого материала (фекалии, мясо), загрязненного *Y. enterocolitica* (Y/9 УГСХА).

№ п/п	Варианты исследований	Минимальное количество бактерий, обнаруживаемого помощью		Время, затраченное на проведение исследований (в часах)	
		РНФ	Бактериологический метод	РНФ	бактериологический метод
1	5	10 ⁵	10 ⁴	24	96
2	10	10 ⁴	Н.о.	29	н.о.
3	16	10 ¹	Н.о.	35	н.о.
4	24	10 ²	Н.о.	44	н.о.

Примечание: н.о. - не обнаружено

Таблица 3. Чувствительность РНФ в зависимости от времени инкубирования исследуемого материала (сточная вода, комбикорм), загрязненного *Y. enterocolitica* (Y/9 УГСХА)

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

Примечание: н.о. - не обнаружено

Таблица 4. 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 бактериологический метод		Время, затраченное на проведение исследований (в часах)	
		РНФ	бактериологический метод	РНФ	бактериологический метод
1	7	10 ⁵	10 ⁴	19	96
2	10	10 ⁴	н.о.	22	н.о.
3	16	10 ³	н.о.	28	н.о.
4	24	10 ²	н.о.	36	н.о.

Примечание: н.о. - не обнаружено

- 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 ч, а для проб фекалий и мяса в течение 16 ч, экспозиции исследуемого материала с фагом, когда удастся провести индикацию бактерий в количестве 10^3 в 1 мл исследуемого субстрата, на исследование которого затрачивается - 19 и 35 часов соответственно, поэтому данные режимы используем в дальнейших исследованиях.

По результатам исследования метод подращивания (таблица 1-2) по чувствительности не уступает методу экспозиции исследуемого материала (таблица 3-4) с фагом в течение 10, 16, 24 часов, но недостаток в том, что при этом затрачивается больше времени.

В последние годы исследователи уделяют большое внимание проблеме обнаружения патогенных микроорганизмов в объектах внешней среды: в воде, кормах и фекалиях. Эти субстраты, подвергаясь 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.

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). 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*. Из результатов проведенных опытов видно, что увеличение титра фагов Y/9 УГСХА более чем в 5 раз произошло уже при концентрации 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 час.

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. enterocolitica* серовариант 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*. Из результатов проведенных опытов видно, что увеличение титра фагов Y/9 УГСХА более чем в 5 раз 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. enterocolitica* серовариант 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*. По результатам установлено, что увеличение титра фага Y/9 УГСХА более чем в 5 раз произошло уже при концентрации 10^3 микробных клеток бактерий в 1 г мяса (на опыт затрачено 35 часов).

Для оценки эффективности РНФ 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. В результате проведенных исследований сорока проб сточных вод из четырех хозяйств удалось обнаружить бактерии вида *Y. enterocolitica*: без холодного обогащения из 3 проб (17,5 %), на исследование затрачивалось 96 часов; методом холодного 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.)

**ЖУРАВСКАЯ (КАТМАКОВА) Н. П.
ВЫДЕЛЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ ОСНОВНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ
СВОЙСТВ БАКТЕРИОФАГОВ БАКТЕРИЙ
ВИДА *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS***

**GHURAVSKAYA (KATMAKOVA) N. P.
ISOLATION AND STUDY OF THE MAIN QUALITIES
OF *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS* SP. PHAGES**

ИССЛЕДОВАНИЯ 2004-2009 гг.

В последние годы выражена тенденция к активному изучению и применению в лабораторно-диагностической практике фагов бактерий различных родов и видов (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.

Цель - разработка технологических параметров изготовления и применения биопрепарата «Y/9 УГСХА» на основе выделенных специфических фагов для индикации и идентификации бактерий вида *Y. pseudotuberculosis*.

Материалы и методы. В работе использовали 96 штаммов бактерий: 5 штаммов бактерий вида *Y. pseudotuberculosis*, полученные из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоот-

ологии и ВСЭ Ульяновской ГСХА, а так-же 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).

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

Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов проводили с помощью методов, предложенных предложенным М. Адамсом (1961), Д.М. Гольдфарбом (1961), С. Лурия, 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).

Выделение бактериофагов *Y. pseudotuberculosis*. 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 засеивали 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* (таблица 1).

Характеристика фагов *Y. pseudotuberculosis*. Морфологию негативных колоний бактериофагов определяли на плотной питательной среде при посеве фагов методом Грациа (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 (рисунок 1-4).

Литическую активность выделенных бактериофагов определяли методами Аппельмана (метод серийных разведений в жидкой питательной среде) и Грациа (метод агаровых слоев на плотной питательной среде) (таблица 2).

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 Грациа. Все изоляты фагов обладали литической активностью, достаточной для использования их в качестве диагностических препаратов.

Определение спектра литической активности проводили методом нанесения бактериофага на газон роста 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.



Рисунок 1. Морфология негативных колоний фага YP – 1 УГСХА

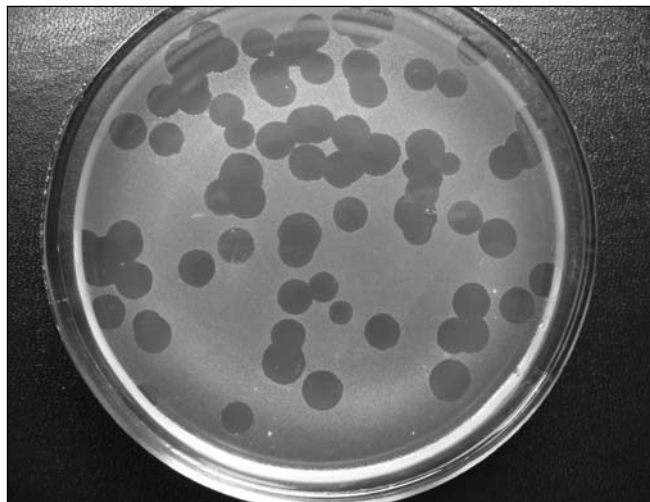


Рисунок 2. Морфология негативных колоний фага YP – 2 УГСХА



Рисунок 3. Морфология негативных колоний фага YP – 3 УГСХА

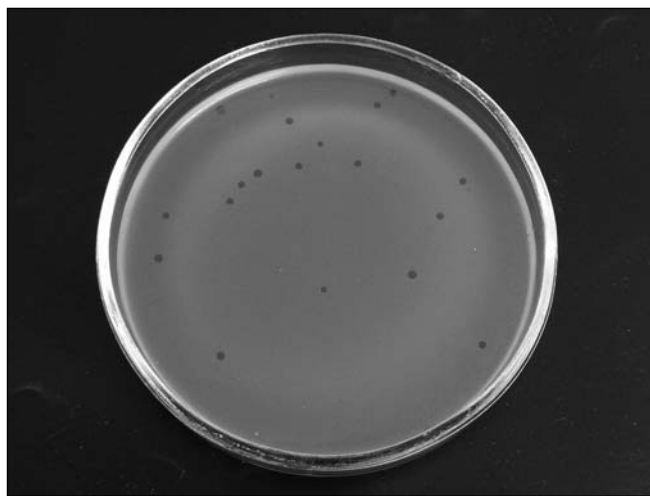


Рисунок 7. Морфология негативных колоний фага YP – 7 УГСХА

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 pseudotuberculosis* и проявляют себя неактивными по отношению к бактериям других родов, видов.

В результате изучения воздействия температурного фактора на бактериофаги *Y. pseudotuberculosis* установлено, что все изоляты 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 (таблица 3).

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.

При изучении устойчивости фагов *Y. pseudotuberculosis* к воздействию хлороформа установлено, что обработка хлороформом в течение 60 минут не оказывает существенного влияния на активность фагов (таблица 4). Дисперсионный анализ полученных данных показал, что степень влияния хлороформа составляет от 14, 29 до 26, 91 % при недостоверном влиянии факториальной дисперсии на активность фагов.

Воздействие хлороформом на индикаторные бактериальные культуры *Y. pseudotuberculosis* в течение 15 минут вызывает полную инактивацию исследуемых штаммов. Полученные данные

Таблица 1. Источники выделения фагов *Y. pseudotuberculosis*

Фаг	Индикаторная культура	Материал выделения	Место 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	№19ВИЭВ	Сточные воды	п. Октябрьский, Чердаклинский р-н, 2006
УР - 4 УГСХА	№19ВИЭВ	Фекалии поросят	Самарская область, 2006
УР - 5 УГСХА	01 №7	Сточные воды	Птицефабрика «Ульяновская», Чердаклинский р-н, 2007
УР - 6 УГСХА	РЯЗ	Фекалии поросят	Ставропольский район, Самарская область, 2006
УР - 7 УГСХА	0630	Сточные воды	п. Тимирязевский, Ульяновский р-н, 2007

Таблица 2. Литическая активность бактериофагов *Y. pseudotuberculosis*

Бактериофаги	Литическая активность	
	по методу Аппельмана (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	5×10^8
УР - 5 УГСХА	10^9	3×10^8
УР - 6 УГСХА	10^9	2×10^8
УР - 7 УГСХА	10^{10}	1×10^9

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 10^8 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°C - 6 часов.

Разработка схемы ускоренной идентификации бактерий вида *Y. pseudotuberculosis*. 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. 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°C . 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.

Таблица 3. 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	$1,5 \times 10^5$ $\pm 0,3 \times 10^{5*}$	$3,0 \times 10^3$ $\pm 1,0 \times 10^{3*}$	$1,3 \times 10^1$ $\pm 0,3 \times 10^{1*}$	–	–	$1,3 \times 10^8$ $\pm 0,3 \times 10^8$
УР – 2	$3,0 \times 10^4$ $\pm 1,1 \times 10^{4*}$	$2,7 \times 10^4$ $\pm 1,6 \times 10^{4*}$	$6,3 \times 10^2$ $\pm 1,3 \times 10^{2*}$	$4,7 \times 10^1$ $\pm 0,8 \times 10^{1*}$	$3,0 \times 10^1$ $\pm 1,1 \times 10^{1*}$	$4,6 \times 10^8$ $\pm 1,2 \times 10^8$
УР – 3	$3,3 \times 10^4$ $\pm 1,8 \times 10^4$	$2,3 \times 10^3$ $\pm 0,8 \times 10^3$	–	–	–	$1,6 \times 10^8$ $\pm 0,6 \times 10^8$
УР – 4	$6,0 \times 10^3$ $\pm 2,0 \times 10^{3**}$	$3,0 \times 10^4$ $\pm 0,5 \times 10^{4**}$	$3,1 \times 10^2$ $\pm 1,0 \times 10^{2**}$	–	–	$8,0 \times 10^7$ $\pm 1,1 \times 10^7$
УР – 5	$8,7 \times 10^4$ $\pm 0,8 \times 10^{4*}$	$11,7 \times 10^4$ $\pm 0,8 \times 10^{4*}$	$2,3 \times 10^4$ $\pm 0,6 \times 10^{4*}$	$5,0 \times 10^1$ $\pm 1,1 \times 10^{1*}$	–	$1,3 \times 10^8$ $\pm 0,3 \times 10^8$
УР – 6	$3,7 \times 10^6$ $\pm 1,2 \times 10^{6*}$	$4,7 \times 10^5$ $\pm 0,8 \times 10^{5**}$	$9,0 \times 10^5$ $\pm 2,6 \times 10^{5*}$	$7,0 \times 10^2$ $\pm 1,5 \times 10^{2**}$	–	$5,0 \times 10^7$ $\pm 0,5 \times 10^7$
УР – 7	$7,0 \times 10^4$ $\pm 1,0 \times 10^4$	$1,3 \times 10^3$ $\pm 0,3 \times 10^3$	$1,4 \times 10^2$ $\pm 0,2 \times 10^2$	$2,7 \times 10^1$ $\pm 0,8 \times 10^1$	–	$2,6 \times 10^8$ $\pm 1,2 \times 10^8$

Таблица 4. Устойчивость бактериофагов *Y. pseudotuberculosis* к воздействию хлороформа

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	$2,0 \times 10^8$ $\pm 1,0 \times 10^8$	$2,3 \times 10^8$ $\pm 1,3 \times 10^8$	$1,3 \times 10^8$ $\pm 0,3 \times 10^8$	$9,0 \times 10^7$ $\pm 1,0 \times 10^7$	$1,3 \times 10^8$ $\pm 0,3 \times 10^8$
УР – 2	$1,2 \times 10^8$ $\pm 0,3 \times 10^{8*}$	$2,3 \times 10^8$ $\pm 1,3 \times 10^{8*}$	$1,6 \times 10^8$ $\pm 0,7 \times 10^{8*}$	$7,7 \times 10^8$ $\pm 2,3 \times 10^8$	$1,3 \times 10^9$ $\pm 0,3 \times 10^9$
УР – 3	$1,6 \times 10^8$ $\pm 0,6 \times 10^8$	$2,0 \times 10^8$ $\pm 0,5 \times 10^8$	$2,3 \times 10^8$ $\pm 0,8 \times 10^8$	$1,3 \times 10^8$ $\pm 0,3 \times 10^8$	$4,0 \times 10^8$ $\pm 3,0 \times 10^8$
УР – 4	$4,3 \times 10^8$ $\pm 1,2 \times 10^8$	$6,0 \times 10^8$ $\pm 2,6 \times 10^8$	$2,9 \times 10^8$ $\pm 1,2 \times 10^{8*}$	$4,0 \times 10^8$ $\pm 0,5 \times 10^{8*}$	$1,3 \times 10^9$ $\pm 0,3 \times 10^9$
УР – 5	$5,0 \times 10^8$ $\pm 1,5 \times 10^8$	$2,3 \times 10^8$ $\pm 0,3 \times 10^8$	$3,3 \times 10^8$ $\pm 1,2 \times 10^8$	$3,2 \times 10^8$ $\pm 1,0 \times 10^8$	$6,0 \times 10^8$ $\pm 1,5 \times 10^8$
УР – 6	$1,3 \times 10^8$ $\pm 0,3 \times 10^8$	$6,3 \times 10^7$ $\pm 2,0 \times 10^7$	$4,0 \times 10^7$ $\pm 1,0 \times 10^7$	$2,7 \times 10^7$ $\pm 1,2 \times 10^7$	$5,7 \times 10^7$ $\pm 0,8 \times 10^7$
УР – 7	$4,0 \times 10^8$ $\pm 3,0 \times 10^8$	$5,0 \times 10^8$ $\pm 0,5 \times 10^{8*}$	$4,0 \times 10^8$ $\pm 3,0 \times 10^8$	$1,5 \times 10^8$ $\pm 0,7 \times 10^8$	$2,7 \times 10^8$ $\pm 0,3 \times 10^8$

* Примечание: *) – $P < 0,05$

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.

Разработка оптимальных условий постановки 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.

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

- предварительное подрачивание 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 подрачиванием исследуемого материала в течение 5 часов позволяет обнаружить бактерии *Y. pseudotuberculosis* в количестве 10^3 м.к./мл, время проведения исследований составляет 22 часа (таблица 5-6).

Таблица 5. Чувствительность РНФ в зависимости от времени подрачивания исследуемого материала с фагом УР – 2 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

Таблица 6. Чувствительность РНФ в зависимости от времени подрачивания исследуемого материала с фагом 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

Таблица 6. 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

Таблица 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

Увеличение времени подрачивания исследуемого материала до 16 часов повышает чувствительность реакции до 10^1 м.к./мл с увеличением сроков исследования до 33 часов. Подрачивание материала в течение 24 часов существенно не повлияло на результаты РНФ.

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 (таблица 6-7). 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.

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).

ЗОЛОТУХИН Д.С. ВЫДЕЛЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ ОСНОВНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БАКТЕРИОФАГОВ БАКТЕРИЙ *HAFNIA ALVEI*

ZOLOTUKHIN D.S. OF THE MAIN QUALITIES OF *HAFNIA ALVEI* PHAGES

ИССЛЕДОВАНИЯ 2009-2013 гг.

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.

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

Выделение бактериофагов *Hafnia alvei*. 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 бульон-

ной 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 пересеивали 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 пересеивали 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. 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 отливкой 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 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*.

Характеристика фагов бактерий вида *Hafnia alvei*. 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 5,08,0 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) (таблица 1).

Проведенные исследования показали, что выделенные нами бактериофаги гафний имели литическую активность от 10^{-7} до 10^{-8} (по Аппельману) и $4,1 \times 10^8$ - $2,7 \times 10^9$ фаговых корпускул в 1,0 см³ (по Грациа).

Для изучения диапазона литической активности селекционированных гафниозных бактериофагов использовали 16 штаммов *Hafnia alvei*. 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. Из показателей таблицы видно, что все изученные изоляты фагов обладали строгой специфичностью, ни один из них не лизировал гетерологичных бактерий.

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 (лизует 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.

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 вышеуказанного 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 (таблица 2).

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. 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.

Разработка схемы ускоренной идентификации бактерий вида *Hafnia alvei*. Используя строгую видовую специфичность селекционированного бактериофага, нами были разработаны схемы ускоренной идентификации вышеуказанного микроорганизма.

Таблица 1. Литическая активность фагов *Hafnia alvei*

№	Название фага	Индикаторная культура	Активность фагов	
			титр по Аппельману	титр по Грациа
1	Н-1 УГСХА	<i>Hafnia alvei</i> 131	10^{-9}	$3,3(\pm 1,1) \times 10^9$
2	Н-2 УГСХА	<i>Hafnia alvei</i> 2636	10^{-7}	$4,1(\pm 2,3) \times 10^8$
3	Н-3 УГСХА	<i>Hafnia alvei</i> 134	10^{-8}	$5,5(\pm 1,5) \times 10^9$
4	Н-4 УГСХА	<i>Hafnia alvei</i> 133	10^{-6}	$2,7(\pm 2,1) \times 10^9$
5	Н-5 УГСХА	<i>Hafnia alvei</i> 9(1)	10^{-7}	$8,2(\pm 4,1) \times 10^8$

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.

Разработка оптимальных условий постановки РНФ. 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. 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 питательного 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. 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 Грациа) 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 производили согласно таблице используя показатели, разработанные В.Д. Тимакowym, Д.М. Гольбфарбом (1962). В результате проведенных исследований, установлено, РНФ имеет положительный результат с фагом Haf-3 УГСХА при контаминации питательного бульона гомологичными бактериями 10³ м.к./см³.

Таблица 2. Изучение температурной устойчивости фага Haf-3 УГСХА.

Температура, °С	Титр фага
59-60	2,1х10 ⁹
62-63	1,1х10 ⁹
64-65	1,2х10 ⁹
67	3,4х10 ⁷
71-73	2,0х10 ²
74-75	0
76-77	0
78-80	0
81-82	0
Контроль фага	3,5х10 ⁹

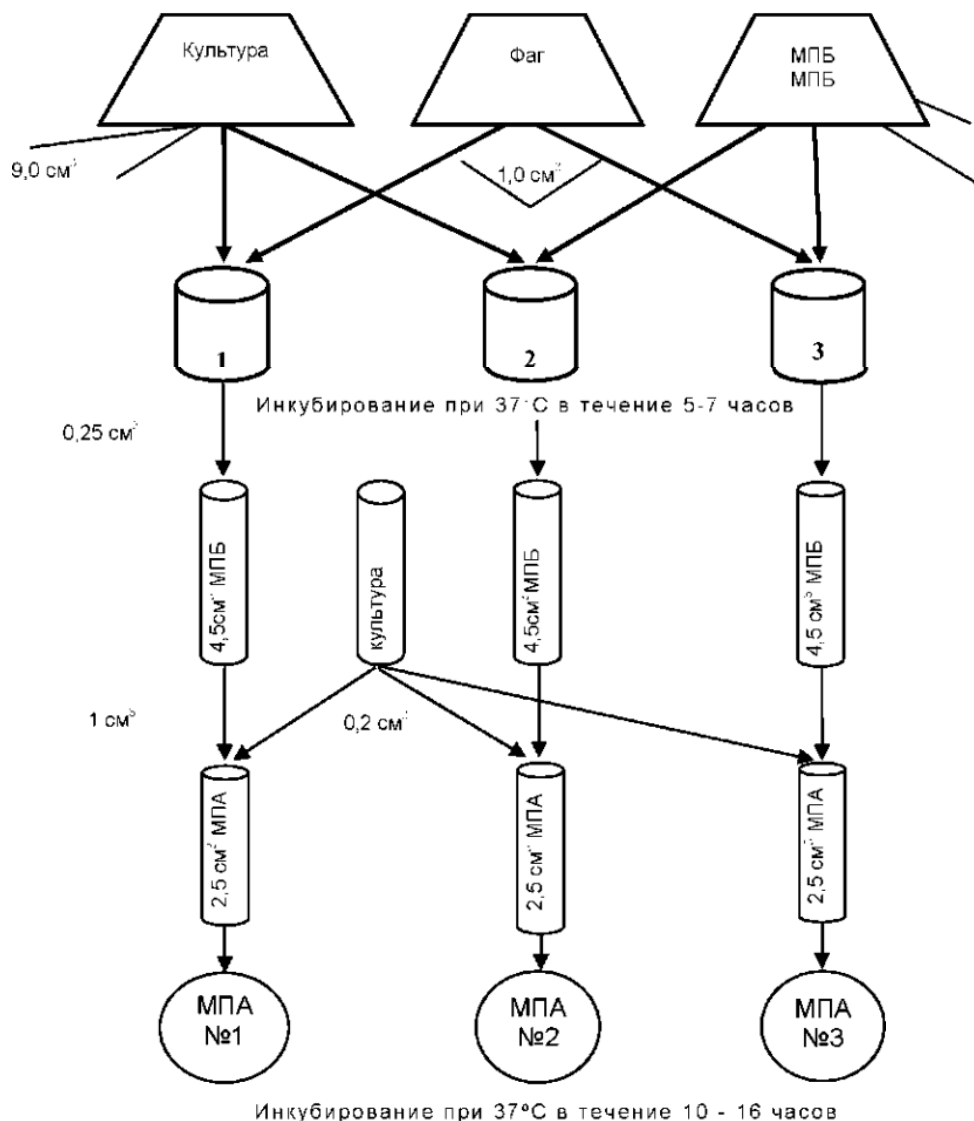


Рисунок 1. Схема постановки реакции нарастания титра фага

Исследование в РНФ контаминированной гафниями суспензии из павших пчел с помощью индикаторного фага Haf-3 УГСХА. Полученные экспериментальные данные позволяют считать, что наиболее оптимальным являются режимы РНФ при 5-6 часовой экспозиции исследуемого материала с фагами без подращивания, 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. 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 10^1 до 10^5 м.к./см³. Контаминированные образцы тщательно перемешивали и вносили в колбы, содержащие по 50,0 см³ питательного бульона. Ставили реакцию как указано в схеме (рисунок 1) для каждого разведения культуры.

Результаты исследований свидетельствуют о том, что гафнии были обнаружены с помощью фага Haf-3 УГСХА в концентрации 10^3 м.к./см³. Бактериологическим способом удалось выделить названных микроорганизмов в концентрации 10^4 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.

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 противогрифозного биопрепарата.

КУЗНЕЦОВ А.Ю.
ВЫДЕЛЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ ОСНОВНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ
СВОЙСТВ БАКТЕРИОФАГОВ БАКТЕРИЙ
ВИДА *MORGANELLA MORGANII*
KUZNETSOV A.U.
PHAGES OF *MORGANELLA MORGANII* SP. AND THEIR APPLICATION
ИССЛЕДОВАНИЯ 1998 - 2002 гг.

В настоящее время в ветеринарной практике для ускоренного обнаружения некоторых микроорганизмов в патологическом материале и объектах внешней среды используют индикаторные бактериофаги в реакции нарастания титра фага РНФ. Исходя из вышеизложенного, нами была поставлена цель: разработать метод ускоренного обнаружения бактерий 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 из:

- 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;
- 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 pneumoniae*). 2 штамма *Enterobacter cloacae*, 2 штамма *Listeria monocitogenes*, 8 штаммов *Staphylococcus aureus*, 8 штаммов рода *Bacillus* (*Bac. cereus* и *Bac. subtilis*).

Для выделения бактериофагов использовали пробы сточных вод свиноводников-маточников, коровников, телятников, больниц и содержимое толстого отдела кишечника больных и павших телят и поросят. Диапазон литического действия и специфичность морганеллезных бактериофагов изучали по методу J. Gragie, A. Felix, описанным В.Я. Ганюшкиным.

Выделение бактериофагов вида *Morganella morganii*. При выделении морганеллезных фагов нами исследовался материал, взятый из прямой кишки у поросят-сосунков и телят, больных диареей, а так же сточные воды из свиноводников-маточников хозяйств Ульяновской области, неблагополучных по желудочно-кишечным заболеваниям поросят-сосунков. Выделение штаммов фагов *Morganella morganii* производили на индикаторных штаммах морганелл серогрупп: O33 (№36/82); O16; O1 (№619) и «13», O29.

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

Характеристика фагов бактерий вида *Morganella morganii*. После 10-16-ти кратного пассирования на индикаторных культурах морганелл фаги УГСХА М8, УГСХА М9, УГСХА М10,

УГСХА М11, УГСХА М1 2, УГСХА М14, М16 оказались умеренными и проявили невысокую литическую активность (10^2 - 10^3). Фаги УГСХА М15, УГСХА М13, УГСХА М1 7, УГСХА М18, УГСХА М19, УГСХА М 20 имели титр 10^9 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%) (таблица 1-2).

Все фаги лизировали штаммы серогрупп О16, О33, штамм морганелл серогруппы О1 лизировали только две расы фагов (УГСХА М13, УГСХА М17 и УГСХА М20), а культуру бактерий серогруппы «13» лизировал только и только штамм фага УГСХА М 17. Исходя из диапазона литической активности выделенных фагов, для дальнейшей работы использовали фаги штаммов УГСХА М17 и М20, 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. Из результатов видно, что оба штамма фагов не лизировали 7 культур морганелл (18,4%) с неустановленной серогрупповой принадлежностью. Штамм УГСХА М17 лизировал 17 культур (44,7%), а фаг М20 - 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.

Разработка схемы ускоренной идентификации бактерий вида *Morganella morganii*. Для определения количественного показателя реакции, имеющего диагностическое значение, были поставлены опыты с заражением, фекалий, фуража, мясокостной муки и паренхиматозных 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 в опытной пробе и в контрольной пробе (контроль титра фага). Результат реакции учитывают путем подсчета негативных колоний фага в опытных и контрольных чашках. 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, фураже и мясокостной муке 10^3 м.к./г и более и 10^2 м.к./г и более - при исследовании паренхиматозных органов.

Разработка оптимальных условий постановки РНФ. 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 °С 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 °С. 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 °С 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 °С 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 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, 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.

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

Фаги серии УГСХ	№ штамма и серогруппа исследуемых культур								%
	01	16	026	029	033	045	049	«13»	
M13	+		+	+	+				62,5
M15	+	+	+	+	+	+			75,0
M17		+	+		+	+		+	62,5
M18	+	+			+	+			50,0
M19	+	+			+	+	+		62,5
M20	+	+	+	+	+	+	+		87,5

Таблица 2. Изучение диапазона литической 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	

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. Предложены два штамма активных морганеллезных бактериофагов для производства диагностических препаратов обладающих 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.

МОЛОФЕЕВА Н. И.

ВЫДЕЛЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ ОСНОВНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БАКТЕРИОФАГОВ БАКТЕРИЙ *ESCHERICHIA COLI* 0157

MOLOFEYEVA N. I.

ISOLATION AND STUDY OF THE MAIN QUALITIES OF *ESCHERICHIA COLI* 0157 PHAGES

ИССЛЕДОВАНИЯ 2000 -2004 ГГ.

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, Neigerson, 1985; Покровский др., 1989; Ратинер, Бондаренко, 1998).

Эффективность профилактических мероприятий во многом зависит от своевременной диагностики болезни у сельскохозяйственных животных, поэтому совершенствованию методов лабораторной диагностики вышеуказанной инфекции уделяется большое внимание.

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.

Материалы и методы. 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. Исследования фагов проводили общепринятыми методами Грация (1936), Д.М. Гольдфарб (1961), И.М. Габрилович (1973).

Выделение бактериофагов *E. coli* O157. 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, на культуры, исследуемые как «лизогенные», воздействовали индуцирующим фактором, затем фильтровали 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 проведенных опытов нами были выделены и изолированы методом прогревания 5 штаммов фагов *E. coli* O157 (таблица 1).

Характеристика фагов *E. coli* O157. Изучение биологических свойств фагов проводили по современным схемам классификации бактериофагов (А.С. Тихоненко, 1968; Т.Г. Чинашвили, 1968; И.М. Габрилович, 1973). Исследовались следующие свойства фагов *E. coli* O157:

- а) морфология негативных колоний;
- б) литическая активность;
- в) спектр литической активности;
- г) специфичность действия;
- д) температурная устойчивость;

Таблица 1. Источники выделений бактериофагов *E. coli* O157

№ п/п	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,	Сточные воды МТФ	САМАРА, 2001

е) устойчивость к хлороформу;

ж) 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 УГ-СХА) 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} (таблица 1).

Результаты изучения литической активности выделенных фагов по Грация представлены в таблице № 2 и на 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 УГ-СХА, Е-67 УГСХА) мы использовали 6 референс штаммов *E.coli* серологической группы О157 (шт. РЛ, № 904, № 35150, № 43895, № 51659 и ХЛ1) и эпизоотические штаммы бактерий *E.coli* других серологических групп (67 штаммов) и проводили его методом нанесения фага на газон бактериальной культуры (Ганюшкин, 1988). 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* О157, 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* О157 (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 aeruginosa* -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* О157.

Степень устойчивости бактериофагов к инактивирующим температурным факторам имеет таксономическое значение. Исследования были проведены по методике, предложенной М. Адамс (1961); Д.М. Гольдфарб (1961); И.М. Габрилович (1973). Полученные данные свидетельствуют о выраженной устойчивости фагов к воздействию высокой температуры в 80 °С (таблица 2).

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* О157 из индикаторных штаммов РЛ, № 904, № 51659 в течение 17 минут хлороформом приводила к их полной инактивации. 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-ую 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, а фаг Е-3 УГСХА и Е-67 УГСХА образуют ореолы 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 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).

Разработка схемы ускоренной идентификации бактерий *E.coli* O157. Используя строгую специфичность селекционированных нами бактериофагов по отношению к патогенным штам-

Таблица 1. Литическая активность бактериофагов *E.coli* O157 по Грациа

№ п/п	Фаги	Активность
1	Е-61 УГСХА	3,2x10 ⁸
2	Е-2 УГСХА	1,0 x10 ⁹
3	Е-3 УГСХА	2,0x10 ⁹
4	Е-67 УГСХА	1,5x10 ⁹

Таблица 2. 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	3,0x10 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	3,0x10 ⁸
81 -83	1,5x10 ⁶	1,2x10 ⁶	3,4x10 ⁶	4,1x10 ⁶
84 -85	3,1x10 ²	1,0x10 ¹	8,0x10 ¹	2,5x10 ²
86 -88	4,0±1,2		1,0±0,1	1,5x10 ¹
88-90				
Контроль фага	4,0x10 ⁸	5,0x10 ⁸	1,0x10 ⁸	1,0x10 ⁸
Контроль культуры	Рост бактерий	Рост бактерий	Рост бактерий	Рост бактерий

мам *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», утвержденные Департаментом ветеринарии МСХ и П РФ 27.07.2000. 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 бактериологического исследования по схеме изложенной в «Методических указаниях по бактериологической диагностике колибактериоза (эшерихиоза) животных» составил 120 часов (5 суток) при большей затрате посуды и реактивов.

Разработка оптимальных условий постановки РНФ. 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). В случае наличия в исследуемом материале свободного фага, число корпускул свободного 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 МПБ *E.coli* O157 в концентрации 103 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 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 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.

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 № 51659 от 10^1 - 10^5 м.к./мл не подращивали, а увеличивали время контакта материала с фагом до 10, 16, 24 часов.

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 исследуемого 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 эпидемиологическом и эпидемиологическом отношении 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 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 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 В.Д. Тимаковым и Д.М.Гольдфарбом (1962). 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 рас 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.

ПОЖАРНИКОВА Е.Н.

ВЫДЕЛЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ ОСНОВНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БАКТЕРИОФАГОВ БАКТЕРИЙ РОДА *ENTEROBACTER*

POZHARNIKOVA E.N.

ISOLATION AND STUDY OF THE MAIN QUALITIES OF *ENTEROBACTER* PHAGES

ИССЛЕДОВАНИЯ 2002 -2006 гг.

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). Использование метода фагодиагностики позволяет сократить время постановки диагноза с нескольких суток до 19 - 40 часов (Тимаков, Гольдфарб, 1956, 1962, Земцова 1965;). 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. В работе использованы 21 штамм бактерий рода *Enterobacter*, 114 штаммов гетерологичных родов *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Escherihia*, *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.

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. Askermann (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).

Выделение бактериофагов рода *Enterobacter*. 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 «Изоolda» 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* после 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 оттивкой типичных негативных колоний по методике, описанной и использованной И.М. Габриловичем (1992). В результате проведенных опытов, нами было выделены и отселекционированы 21 штамм фагов бактерий рода *Enterobacter*.

Характеристика фагов бактерий рода *Enterobacter*.

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 °С. 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 Еп-1 УГСХА, Еп-2 УГСХА, Еп-3 УГСХА, Еп-4 УГСХА, Еп-5 УГСХА, Еп-6 УГСХА, Еп-7 УГСХА, Еп-8 УГСХА, Еп-10 УГСХА, Еп-14 УГСХА, Еп-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 Еп-9 УГСХА, Еп-11 УГСХА, Еп-12 УГСХА, Еп-13 УГСХА, Еп-15 УГСХА, Еп-16 УГСХА, Еп-17 УГСХА, Еп-18 УГСХА, Еп-20 УГСХА, Еп-21 УГСХА.

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: Еп - 1 УГСХА, Еп - 2 УГСХА, Еп - 3 УГСХА, Еп - 5 УГСХА, Еп - 6 УГСХА, Еп - 7 УГСХА, Еп - 13 УГСХА.

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).

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, соответствующими перечисленным требованиям, являются Еп-2 УГСХА и Еп-13 УГСХА.

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 можно сделать вывод, о том, что фаги являются специфичными по отношению к бактериям рода *Enterobacter* и не активны к представителям других видов бактерий.

В результате исследований температурной устойчивости фагов Еп - 2 УГСХА и Еп - 13 УГСХА было установлено (таблица 2), 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 Еп - 2 УГСХА, бактериофаг Еп - 13 УГСХА инактивируется при температуре 87 °С.

Устойчивость бактериофагов к воздействию хлороформа. Обрабатывали фаголизат хлороформом в соотношении 1:10 при постоянном перемешивании в течение 10 - 40 минут. После чего определяли активность фаголизата исследуемого фага методом агаровых слоев (таблица 3).

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.

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 размеры: 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 (рисунок 1).

Вирусные частицы фага Еп - 13 УГСХА имеют следующий размеры: 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 (рисунок 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».

Таблица 1. Литическая активность фагов бактерий рода *Enterobacter*

№ п.п.	Фаг	Индикаторная культура	Активность по Аппельмана, степень разведения	Активность по Грация, корпускул в 1 мл
1	Еп-1 УГСХА	<i>E.cloacae</i> № 10005	10 ⁻¹⁰	9 x 10 ⁸
2	Еп-2 УГСХА	<i>E.cloacae</i> № 10005	10 ⁻⁹	1,2 x 10 ⁹
3	Еп-3 УГСХА	<i>E.cloacae</i> № 10005	10 ⁻⁸	1,6 x 10 ⁹
4	Еп-4 УГСХА	<i>E.cloacae</i> № 10005	10 ⁻⁶	3 x 10 ⁷
5	Еп-5 УГСХА	<i>E.cloacae</i> № 10005	10 ⁻⁹	3 x 10 ⁸
6	Еп-6 УГСХА	<i>E.cloacae</i> № 10005	10 ⁻⁶	3 x 10 ⁸
7	Еп-7 УГСХА	<i>E.cloacae</i> № 10005	10 ⁻⁷	1 x 10 ⁹
8	Еп-8 УГСХА	<i>E.cloacae</i> № 10005	10 ⁻⁵	1 x 10 ⁸
9	Еп-9 УГСХА	<i>E.cloacae</i> № 10005	10 ⁻⁶	2 x 10 ⁷
10	Еп-10 УГСХА	<i>E.cloacae</i> № 10005	10 ⁻⁴	4 x 10 ⁶
11	Еп-11 УГСХА	<i>E.aerogenes</i> № 2601	10 ⁻⁵	3 x 10 ⁶
12	Еп-12 УГСХА	<i>E.aerogenes</i> № 2601	10 ⁻⁷	2 x 10 ⁸
13	Еп-13 УГСХА	<i>E.aerogenes</i> № 2601	10 ⁻⁸	1,6 x 10 ¹⁰
14	Еп-14 УГСХА	<i>E.aerogenes</i> № 2601	10 ⁻⁵	1,9 x 10 ⁸
15	Еп-15 УГСХА	<i>E.aerogenes</i> № 2601	10 ⁻⁵	4 x 10 ⁷
16	Еп-16 УГСХА	<i>E.dissolvens</i> № 802	10 ⁻⁶	1 x 10 ⁸
17	Еп-17 УГСХА	<i>E.cloacae</i> № 1487	10 ⁻⁷	5 x 10 ⁸
18	Еп-18 УГСХА	<i>E.cloacae</i> № 1487	10 ⁻⁴	2 x 10 ⁵
19	Еп-19 УГСХА	<i>E.cloacae</i> № 1487	10 ⁻⁴	4 x 10 ⁶
20	Еп-20 УГСХА	<i>E.cloacae</i> № 1487	10 ⁻⁵	3 x 10 ⁶
21	Еп-21 УГСХА	<i>E.cloacae</i> № 1487	10 ⁻⁵	2 x 10 ⁶

Таблица 2. Температурная устойчивость бактериофагов бактерий рода *Enterobacter*

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

Таблица 3. Устойчивость бактериофагов бактерий рода *Enterobacter* к воздействию хлороформ

№ 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 x 10 ⁹	7 x 10 ⁹	1,2 x 10 ⁹	2 x 10 ⁹	1,4 x 10 ⁹
2	Еп - 13 УГСХА	1 x 10 ¹⁰	1,5 x 10 ¹⁰	1,7 x 10 ¹⁰	8 x 10 ⁹	1,6 x 10 ¹⁰

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 фага на 1 бактериальную клетку, фага Еп - 13 УГСХА - 4,5.

Разработка схемы ускоренной идентификации бактерий рода *Enterobacter*. Используя строгую специфичность индикаторных бактериофагов Еп - 2 УГСХА и Еп - 13 УГСХА, мы разработали схему ускоренной идентификации этих микроорганизмов. В исследованиях использовали воду, комбикорм, фекалии и мясо, контаминированные 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 Еп - 2 УГСХА и Еп - 13 УГСХА.

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

Разработка оптимальных условий постановки РНФ. Следующая поставленная задача заключалась в разработке оптимальных условий постановки РНФ для обнаружения бактерий рода *Enterobacter* в различных субстратах.

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 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 Еп - 2 УГСХА и Еп - 13

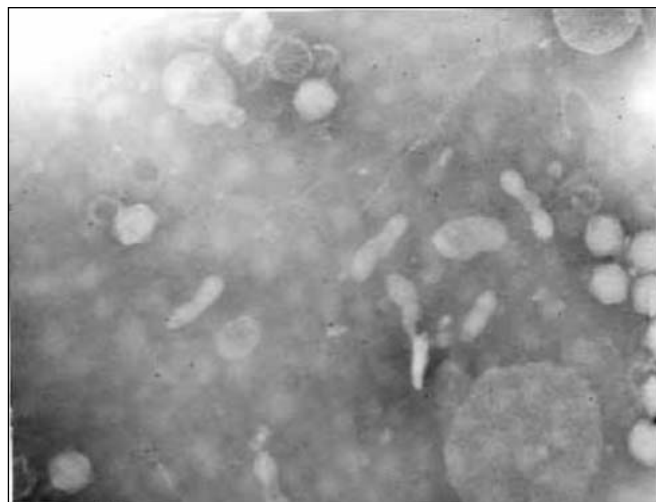


Рисунок 1. Морфология вирионов бактериофага Еп - 2 УГСХА (увел.Х98000)

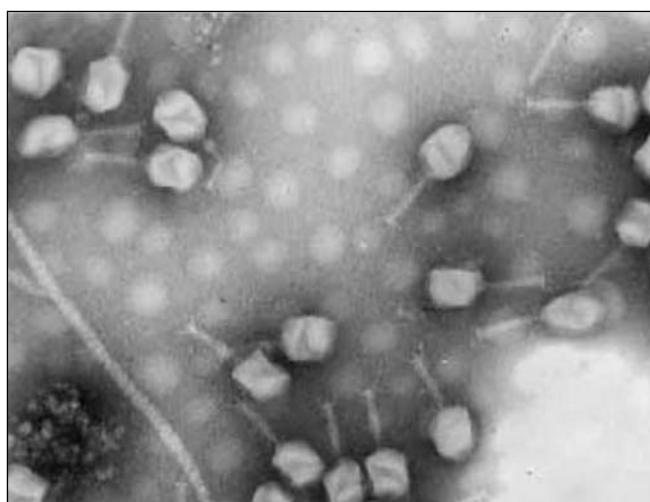


Рисунок 2. Морфология вириона бактериофага Еп - 13-УГСХА (увеличение x 98000)

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 (таблица 4).

Во втором варианте опыта мясопептонный бульон, контаминированный 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.cloacae* № 10005 в концентрации 104 м.к./мл, увеличение времени культивирования до 7 часов повышает чувствительность реакции с фагом Еп - 2 УГСХА до 10^3 , а 10 часовая инкубация - до 10^2 м.к./мл (таблица 5).

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 бактериологическим 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 бактерий 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.

Таблица 4. Чувствительность РНФ в зависимости от времени инкубирования исследуемого материала, контаминированного бактериями рода *Enterobacter*

№ п/п.	Длительность инкубирования исследуемого материала с фагом, ч	Фаг Еп - 2 УГСХА	Фаг Еп - 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

Таблица 5. Чувствительность РНФ в зависимости от времени подрачивания исследуемого материала, контаминированного бактериями рода *Enterobacter*

№ п.п.	Длительность подрачивания исследуемого материала, ч	Бактериофаг Еп - 2 УГСХА	Бактериофаг Еп - 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

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 Еп - 2 УГСХА и Еп - 13 УГСХА отдельно и их смеси, мы получили аналогичные результаты. Антагонистический эффект взаимодействия фагов отсутствует. Установлена возможность конструирования биопрепарата, состоящего из двух бактериофагов Еп - 2 УГСХА и Еп - 13 УГСХА.

Таким образом, в результате проведенных исследований, предложен биопрепарат-диагностикум, состоящий из фагов Еп-2 УГСХА и Еп-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*.

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 Еп - 2 УГСХА и

Еп - 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 Грациа 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 Еп - 2 УГСХА семейству *Siphoviridae* согласно Международной классификации и номенклатуре вирусов, по классификации А.С. Тихоненко (1968) к IV морфологической группе: «Фаги с длинным несокращающимся отростком», фага Еп - 13 УГСХА - семейству *Myoviridae* и V группе: «Фаги с отростком сложного строения, чехол которого способен к сокращению».

Разработана схема фагоидентификации бактерий рода *Enterobacter* с помощью индикаторных бактериофагов Еп - 2 УГ-СХА и Еп - 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 РНФ для ускоренной индикации бактерий рода *Enterobacter* в объектах ветеринарного надзора с использованием фагов Еп - 2 УГ-СХА и Еп - 13 УГСХА. Схема позволяет обнаружить в исследуемом материале указанные бактерии в концентрации от 10^3 и более микробных клеток в 1 г за 19 - 28 часов.

Два штамма бактериофагов Еп - 2 УГСХА и Еп - 13 УГСХА депонированы во «Всероссийском государственном центре качества и стандартизации лекарственных препаратов для животных и кормов (ВГНКИ)» ветеринарных препаратов и признаны перспективными для конструирования диагностических и лечебно-профилактических препаратов.

**ПУЛЬЧЕРОВСКАЯ Л. П.
ВЫДЕЛЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ ОСНОВНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ
СВОЙСТВ БАКТЕРИОФАГОВ БАКТЕРИЙ *CITROBACTER***

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

ИССЛЕДОВАНИЯ 2000-2004 гг.

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.

Материалы и методы. В работе были использованы 13 штаммов бактерий рода *Citrobacter*, полученные 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.

Из бактериальных 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), 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). Подготовку препаратов для электронной микроскопии проводили осаждением вирусных частиц в режиме низкоскоростного центрифугирования (Пономорёв, Андреева, Артамонова, 2002).

Выделение бактериофагов 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 «Изольда» 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 искомым 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 фагов бактерий рода *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, 2,03,0 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.

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 (рисунок 1-3).

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. Корпускулы фага С-52 УГСХА имеют более симметричную головку. Ее 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 *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).

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

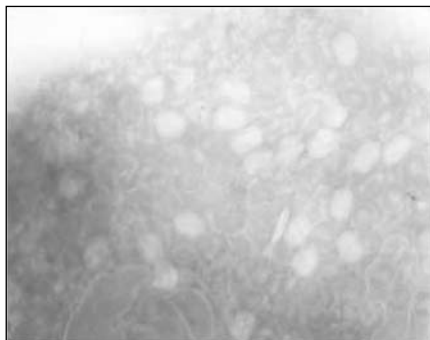


Рисунок 1. Электронная микрофотография. Морфология бактериофага С-52 УГСХА (увел.х 167 000).

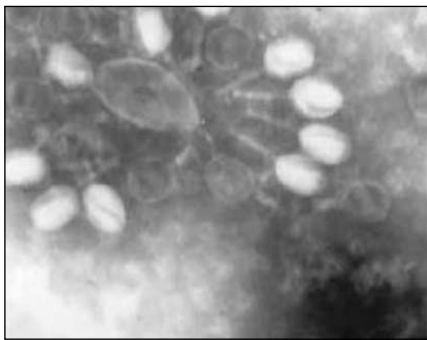


Рисунок 2. Электронная микрофотография. Морфология бактериофага С-61 УГСХА(увел. х 167000)

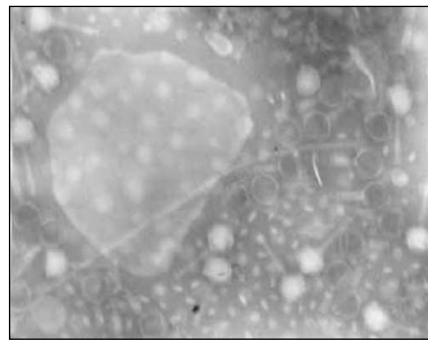


Рисунок 3. Электронная микрофотография. Морфология бактериофага С-66 УГСХА (увел. х 167 000)

нивается 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 Ап-пельману от 10^{-4} до 10^{-8} , по Грациа 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 Грациа $3,0 \times 10^9$ у С-52 УГСХА и С-66 УГСХА, у С-61 УГ-СХА $4,0 \times 10^9$. Для конструирования биопрепарата было отобрано три фага: С-52 УГСХА, С-66 УГСХА и С-61 УГСХА, которые обладали наиболее высокими титрами по Грациа и Аппельману и широким спектром литического действия.

Спектр литической активности является характерной особенностью фага, и им пользуются для его идентификации (Адамс, 1961; Ганюшкин, 1988). Для изучения спектра литической активности бактериофагов С-52 УГСХА, С-66 УГСХА и С-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°C , 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 С-61 УГСХА, который лизировал 7 из имеющихся у нас 13 штаммов бактерий рода *Citrobacter*. Фаги С-52 УГСХА и С-66 УГСХА проявили одинаковый спектр литической активности и лизировали по 6 разных штаммов бактерий *Citrobacter*. Из 13 штаммов бактерий *Citrobacter* фаги С-52, С-61 и С-66 серии УГСХА лизировали все имеющиеся у нас штаммы, что составляет 100%.

Специфичность действия бактериофагов определяется, прежде всего, родством их к фаговым рецепторам лизируемых бактерий и используется в практике для дифференциации бактерий. Изучение специфичности трех бактериофагов *Citrobacter* (С-52 УГСХА, С-61 УГСХА, С-66 УГ-

СХА) 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 гетеро-логичных 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 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 пересеивали 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).

Разработка схемы ускоренной идентификации бактерий рода *Citrobacter*. Используя специфичность 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).

Разработка оптимальных условий постановки РНФ. 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 *C.freundii* №16 (для фага С-61 УГСХА), *C.freundii* № 9 (для фага С-66 УГСХА) и *C.amalonaticus* № 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).

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.

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 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 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.

Установлено, что при подращивании 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 подращивании исследуемого материала в течение 16 часов чувствительность реакции повышается и 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 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.

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 УГ-СХА - 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 бактерии 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 10^4 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 УГ-СХА 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 вышеуказанными 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 УГ-СХА 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 1 г 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 вышеуказанными бактериями.

По результатам 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 в 37,5% случаев, а в РНФ - 62,5%.

Итогом 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 УГ-СХА, 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 бактериофагов.» утвержденные Отделением ветеринарной медицины Российской академии сельскохозяйственных наук (РАСХН) 4 октября 2004 года.

ФЕОКТИСТОВА Н. А.
ВЫДЕЛЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ ОСНОВНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ
СВОЙСТВ БАКТЕРИОФАГОВ БАКТЕРИЙ РОДА *PROTEUS*

FEOKTISTOVA N. A.
ISOLATION AND STUDY OF THE MAIN QUALITIES
OF *PROTEUS* GENUS PHAGES

ИССЛЕДОВАНИЯ 2002-2005 гг.

По литературным данным бактерии рода *Proteus* относятся к группе сапрофитных микроорганизмов желудочно-кишечного тракта животных и птицы. Удельный вес бактерии рода *Proteus* относительно микроорганизмов других родов и семейств в тонком кишечнике молодняка сельскохозяйственных животных и птицы в хозяйствах, неблагополучных по желудочно-кишечным заболеваниям, составляет в среднем – 23-48 %. Установлено, что развитие протейной диареи зависит от условий кормления, зоогигиенических параметров содержания животных и птицы, иммунного статуса. Бактерии рода *Proteus* становятся причиной болезни молодняка сельскохозяйственных животных и птицы, находящихся в иммунодепрессивном состоянии и наиболее подверженных стрессам,. Кроме того, протейные инфекции часто развиваются вторично при дисбактериозах неспецифического характера (диспепсия, гастроэнтериты) и при вирусной инфекции (ротавирусной диарее, корона-, парво-, аденовирусной и других инфекциях) (Золотухин С.Н. с соавт., 2004; Куриленко, А.Н., 2005).

Вспышки протейной инфекции регистрируются преимущественно спорадически, в случаях эпизоотии в стаде бактерии рода *Proteus* играют сопряженную роль секундарной инфекции при смешанном (ассоциативном) инфекционном поражении. Известно, что основной путь передачи возбудителя данной инфекции - алиментарный. К восприимчивым животным относятся преимущественно телята первых трех недель жизни и поросята до 2-месячного возраста. Летальность при указанной инфекции колеблется в пределах 5-18 %, однако экономический ущерб при желудочно-кишечных заболеваниях складывается из снижения живой массы переболевшего поголовья и снижения иммунного статуса в дальнейший период жизни, что приводит к недополучению прироста на 1 кормовую единицу, или 1 рубль инвестиций (Феоктистова, 2005).

Выделение бактерий рода *Proteus* из микробиоты патологического материала, фекалий и смывов животноводческих и птицеводческих помещений из хозяйств, неблагополучных по желудочно-кишечным заболеваниям, чрезвычайно интересно в плане выделения вирулентных штаммов протеев с целью поиска специфических вирулентных бактериофагов, которые могут быть использованы с целью конструирования фагового биопрепарата для диагностики, профилактики и лечения дисбиозов, возбудителем которых являются протей в смешанной или монокультурах.

В настоящее время лабораторная диагностика заболеваний, вызываемых протеем, основана на выделении чистой культуры микроорганизмов и их идентификации по общепринятым тестам. 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 ветеринарно-санитарного надзора. Использовали 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 ФБОУ ВПО Ульяновская ГСХА. В качестве объектов исследований использовали водопроводную воду, сточные воды животноводческих ферм и общественных туалетов, фекалии животных и комбикорм, патологический материал от больных и павших животных, контаминированное бактериями рода *Proteus* мясо.

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).

Первым этапом наших исследований было изучение спектра литического действия коммерческого коли-протейного 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 «Изольда» 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 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).

Характеристика выделенных фагов *Proteus*

Морфологию негативных колоний изучали при посевах фагов методом агаровых слоев. Негативные колонии, образуемые выделенными бактериофагами, были разделены нами на пять типов.

1 тип: прозрачные негативные колонии округлой формы, $1,0 \pm 0,5$ - $1,5 \pm 0,5$ мм в диаметре - 7 фагов.

2 тип: прозрачные негативные колонии округлой формы, $2,0 \pm 0,5$ - $4,0 \pm 0,5$ мм в диаметре - 4 фага.

3 тип: непрозрачные негативные колонии округлой формы, $1,0$ - $2,5 \pm 0,5$ мм в диаметре - 6 фагов.

4 тип: относительно непрозрачные негативные колонии округлой формы с выраженным вторичным ростом бактерий в центре и ореолом по периферии, $6,0 \pm 0,5$ - $8,0 \pm 0,5$ мм в диаметре - 1 фаг.

5 тип: прозрачные негативные колонии округлой формы с ровными краями и ореолом по периферии, $2,0$ - $3,0 \pm 0,5$ мм в диаметре - 2 фага.

Для изучения морфологии бляшкообразующих единиц 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 $1,8 \times 10^9 \pm 0,5 \times 10^9$ до $2,0 \times 10^9 \pm 0,6 \times 10^9$ бляшкообразующих единиц (БОЕ) в 1 мл (по Грациа). 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 ($\pm 0,1$) (рисунок 1). В соответствии с Международной номенклатурой вирусов по морфологическим 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 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 %.

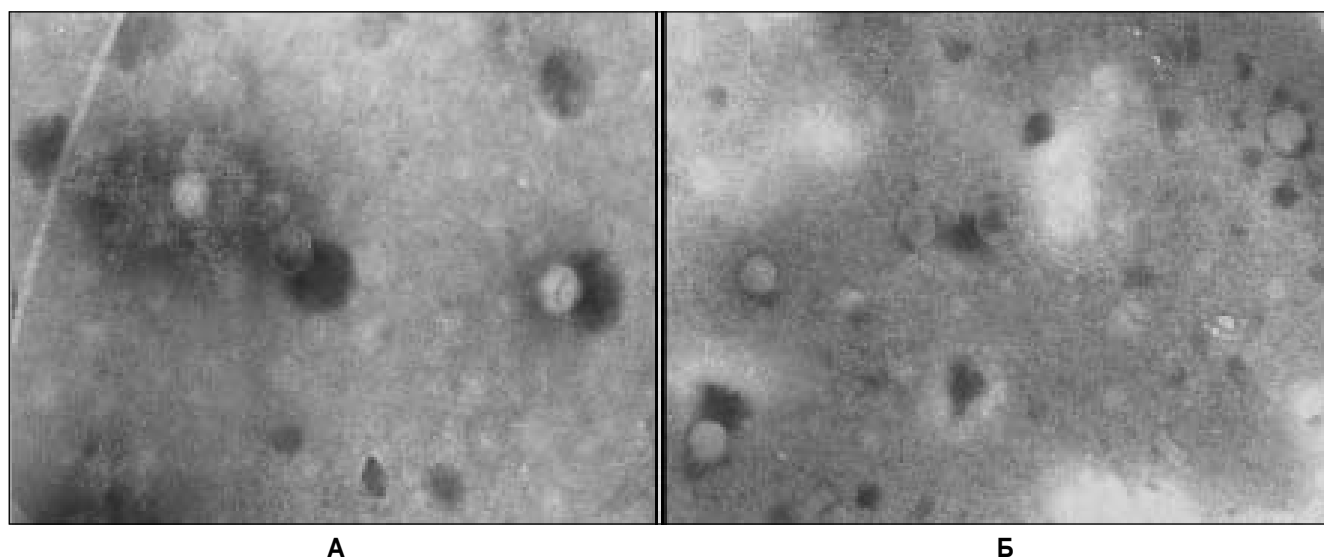


Рисунок 1. Морфология негативных колоний фага: А) бактериофага *Proteus* П-16 УГСХА; Б) фага *Proteus* П-261 УГСХА

Литическую активность выделенных бактериофагов определяли методами Аппельмана и Грациа (табл 1). 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 $2,1 \pm 0,2 \times 10^6$ до $2,0 \pm 0,6 \times 10^9$ БОЕ/мл.

Наиболее высокой литической активностью обладали фаги П-16 УГСХА и П-261 УГСХА: титр по Аппельману 10^{-8} у обоих фагов, по Грациа $2,0 \pm 0,6 \times 10^9$ и $1,8 \pm 0,5 \times 10^9$ БОЕ/мл, 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 свойств 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. Таким образом, совместный процент лизиса бактериофагов П-16 и П-261 серии УГСХА на 40 штаммах бактерий рода *Proteus* составил 95,0 % (табл. 2).

Таблица 1. Литическая активность выделенных протейных бактериофагов

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

Таблица 2. Спектр литической активности бактериофагов П-16 и П-261 серии УГСХА

Название бактериофага	Количество исследуемых культур	Из них чувствительны к фагу	Процент лизируемых культур
П - 16 УГСХА	40	22	55,0
П - 261 УСХА	40	27	67,5
Процент лизиса			95,0

Изучение специфичности двух бактериофагов *Proteus* (П-16 УГСХА, П-261 УГСХА) проводили по отношению к представителям 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 aeruginosa* - 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 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 в течение 30 минут температуре 62 °С.

Бактериофаги обычно устойчивее к трихлорметану, чем клетки микроорганизмов, поэтому данный химический агент является хорошим средством для освобождения фаголизата от жизнеспособных бактерий. Определение чувствительности бактериофагов и бактерий проводили методом обработки фаговой суспензии и бульонных культур протеев трихлорметаном 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 трихлорметана. В то время как бактериофаг П-261 УГСХА уже через 15 минут обработки трихлорметаном значительно терял свою активность. Обработка бактерий индикаторных штаммов *P.vulgaris* 261 и *P.vulgaris* 3 в течение 15 минут трихлорметаном приводила к их полной гибели **протейных бактериофагов**

Для разработки технологических параметров изготовления биопрепарата на основе фагов П-16 и П-261 серии УГСХА (рисунок 2) 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 12 месяцев незначительно снижали литическую активность до 10⁷-10⁸ БОЕ/мл. При 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.

Экспериментальный 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 УГ-СХА 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).

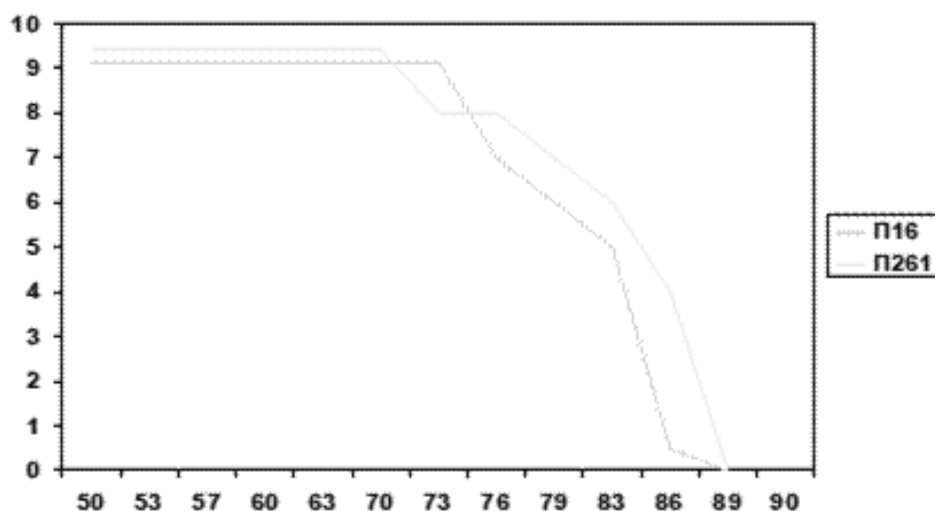


Рисунок 2. График термоинактивации протейных бактериофагов

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 (рисунок 3). 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).

О высокой чувствительности РНФ для индикации возбудителей во внешней среде сообщают многие исследователи (Земцова, 1965; Золотухин, Каврук, Васильев, 2005). Нами изучена возможность использования индикаторных бактериофагов П-16 УГСХА и П-261 УГСХА для идентификации бактерий рода *Proteus*.

Существующие методы идентификации бактерий рода *Proteus* основаны на определении биохимических свойств выделенных культур (Покровский, Поздеев, 1999). Нами предложена схема ускоренной их идентификации с помощью индикаторных бактериофагов П-16 УГСХА и П-261 УГСХА. Лизис культуры на поверхности питательного агара служит основанием для отнесения исследуемого штамма к роду *Proteus*. Для ускоренной индикации протеев в объектах ветеринарного надзора нами разработаны оптимальные условия постановки РНФ.

Определение параметров постановки реакции нарастания титра фага (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 *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 мясо-пептонный бульон (МПБ). Учет результатов проводили через 12-16 часов инкубирования. С этой целью подсчитывали число бляшкообразующих единиц, образовавшихся на плотной питательной среде в опытной пробе и в контроле (контроль титра фага). По результатам проведенных опытов установлено, что количество фаговых частиц более чем в 5 раз превышает количество бляшкообразующих единиц в контрольных пробах при контаминации протеем 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 бляшкообразующих единиц) постановки РНФ. В качестве тест-объекта использовали МПБ, контаминированный бактериями рода *Proteus*, оптимальное время экспозиции устанавливали из шести следующих параметров:

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

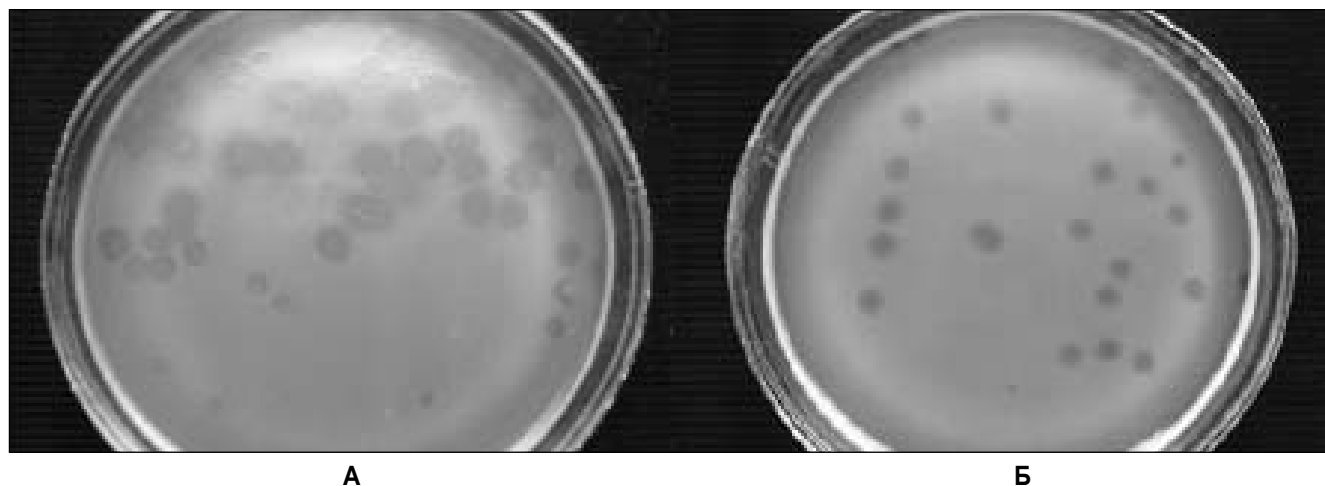


Рисунок 3. Морфология бляшкообразующих единиц протейных фагов: А) П-261 УГСХА и Б) П-16 УГСХА

Для изучения чувствительности РНФ, в зависимости от времени подрачивания, 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. Установлено, что подрачивание 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 подрачивании 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 исследование затрачивается 32 часа. Бактериологическим методом это же количество протеев обнаружить удалось через 88 часов. При подрачивании 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 подрачивали, а увеличивали время контакта с фагом до 5, 10, 16, 24 часов.

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 (табл.3-4).

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

Таблица 3. Чувствительность РНФ в зависимости от времени инкубирования исследуемого материала с фагом П - 16 УГСХА

№ п.п.	Варианты исследований	Минимальное количество <i>P. vulgaris</i> 3, обнаруживаемое с помощью		Время, затраченное на проведение исследований (в часах)	
	Время контакта исследуемого материала с фагом	РНФ	Бактериологический метод	РНФ	Бактериологический метод
	Часы				
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

Таблица 4. Чувствительность РНФ в зависимости от времени инкубирования исследуемого материала с фагом П-261 УГСХА

№ п.п.	Варианты исследований	Минимальное количество <i>P. vulgaris</i> 261, обнаруживаемое с помощью		Время, затраченное на проведение исследований (в часах)	
	Время контакта исследуемого материала с фагом	РНФ	бактериологический метод	РНФ	бактериологический метод
	Часы				
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

м.к./мл соответственно. Бактериологическим 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.

Сведений о применении РНФ для обнаружения бактерий рода *Proteus* в объектах внешней среды мы не встречали. Поэтому необходимо было изучить возможность использования РНФ для обнаружения данных микроорганизмов в объектах ветеринарно-санитарного надзора. Для этого мы провели исследования по выяснению возможности использования РНФ для обнаружения бактерий рода *Proteus* в патологическом материале, объектах внешней среды и пищевом сырье. Прежде всего, мы провели опыты с фекалиями, содержащими постороннюю микрофлору, которые контаминировали различным количеством бактерий рода *Proteus* - от 10^1 до 10^5 м.к./г. На основании полученных данных при исследовании фекалий, РНФ оказалась эффективнее бактериологического метода исследования. С помощью РНФ вы-

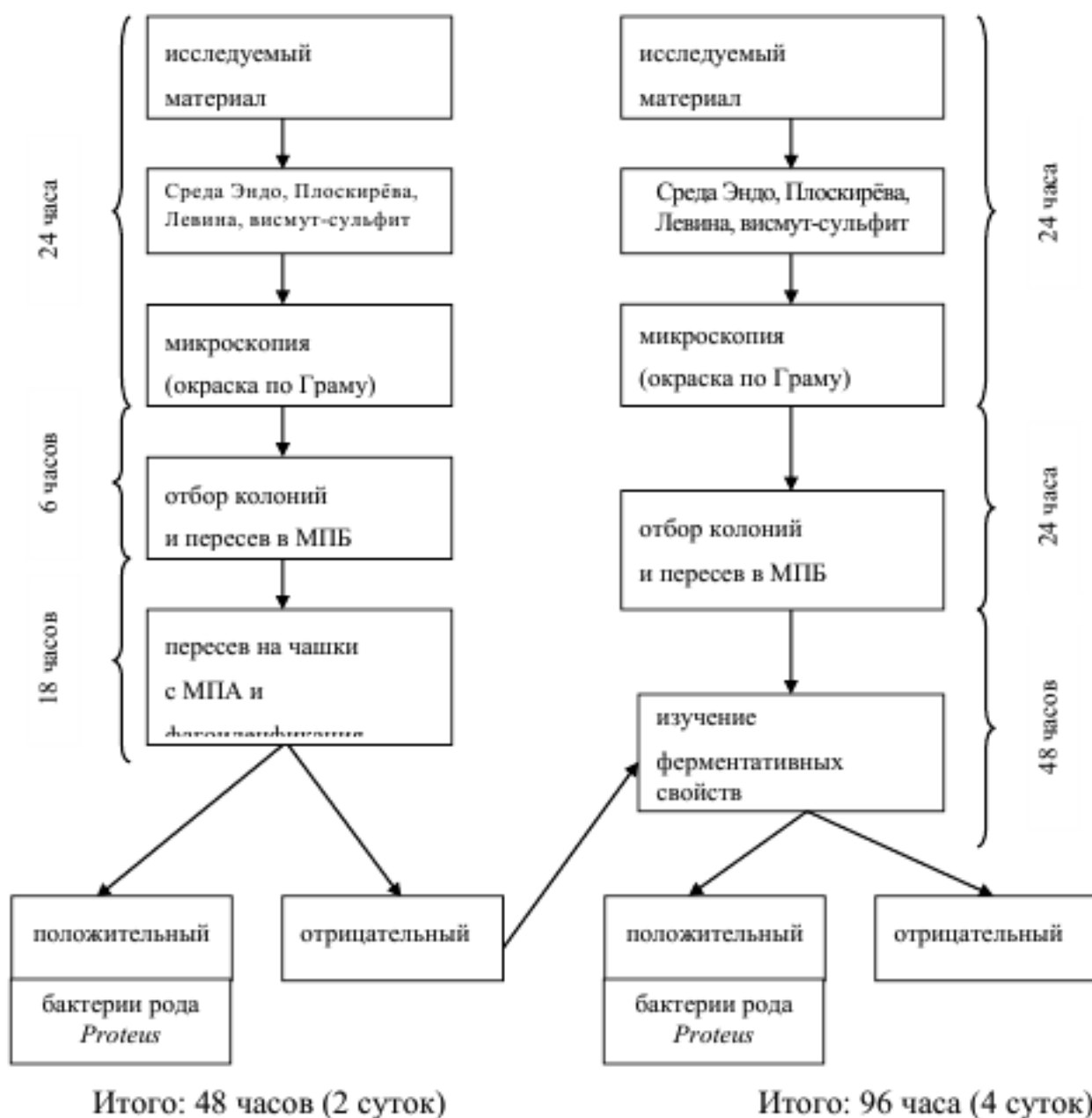


Рисунок 4. Схема ускоренной идентификации бактерий рода *Proteus* с помощью селекционированных нами бактериофагов в сравнении со схемой бактериологического исследования, изложенной в «Методических указаниях по бактериологической диагностике смешанной кишечной инфекции молодняка животных, вызываемой патогенными энтеробактериями»

являли бактерии *Proteus* в фекалиях в концентрации 10^3 м.к./г. за 18 часов. На обнаружение бактерий рода *Proteus* в фекалиях бактериологическим методом требовалась более высокая концентрация протеев, исчисляемая 10^4 м.к./г. и выше. Время же исследования увеличивалось до 96 часов. При исследовании мяса, содержащего постороннюю микрофлору в количестве от 10^1 до 10^5 м.к./г, нами было обнаружено явное преимущество РНФ перед бактериологическим методом исследования. С помощью РНФ за 22 часа исследования можно обнаружить протей в мясе в количестве 10^3 м.к./г.

Для оценки эффективности реакции нарастания титра фага в условиях производства нами были проведены исследования по фагоиндикации и фагоидентификации кишечной инфекции поросят, протекающей с 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 результате проведенных исследований были получены новые штаммы бактериофагов, активные в отношении бактерий рода *Proteus*, выделенных из объектов ветеринарно-санитарного надзора. Были изучены основные биологические свойства выделенных фагов. Впервые разработаны биотехнологические параметры фагоиндикации и фагоидентификации бактерий рода *Proteus* в объектах ветеринарно-санитарного 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).

РАЗДЕЛ 7. БАКТЕРИОФАГИ БАКТЕРИЙ РОДА *PSEUDOMONAS* **CHAPTER 7. BACTERIOPHAGES OF *PSEUDOMONAS* GENUS**

ШЕСТАКОВ А. Г.

**ВЫДЕЛЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЯ ОСНОВНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ
СВОЙСТВ ФАГОВ БАКТЕРИЙ ВИДА *PSEUDOMONAS AERUGINOSA***

SHESTAKOV A. G.

**ISOLATION AND STUDY OF THE MAIN QUALITIES
OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* SP. PHAGES**

ГОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ 2004-2010 гг.

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. Для 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 биологическими свойствами. Объектами исследования так же являлись семь штаммов бактериофагов *P. aeruginosa*, выделенных из объектов внешней среды.

Характеристика выделенных фагов Pseudomonas aeruginosa

Первым 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. Дальнейшим этапом изучения биологических свойств выделенных бактериофагов было определение их литической активности. Изучили литическую активность 7 выделенных бактериофагов *P. aeruginosa* методами предложенными Аппельманом и Грациа.

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 урсХА - 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 Апельману: 10^{-8} , 10^{-10} соответственно. Определение спектра литической активности проводили методом нанесения фага на газон бактериальных культур.

Таблица 1. Объекты выделения бактериофагов *P. aeruginosa*

№ п/п	Название фага	Источник выделения
1	УГСХА- Р.а.№1	Канализация жилого дома в Засвияжском районе города Ульяновска
2	УГСХА- Р.а.№4	Сточные воды стоков канализации в Засвияжском районе города Ульяновска
3	УГСХА- Р.а.№9	Уличные лужи в Чердаклинском районе Ульяновской области
4	УГСХА- Р.а.№18	Стоки свиноводческого подворья села Тагай в Ульяновской области
5	УГСХА- Р.а.№35	Сточные воды стоков канализации в северном районе города Ульяновска
6	УГСХА- Р.а.№44	р. Волга г. Ульяновск
7	УГСХА- Р.а.№52	р. Свияга г. Ульяновск

Таблица 2. Литическая активность фагов *P. aeruginosa* по Аппельману

№ п/п	Название фага	Литическая активность Аппельману
1	УГСХА- Р.а.№1	10^{-8}
2	УГСХА- Р.а.№4	10^{-10}
3	УГСХА- Р.а.№9	10^{-8}
4	УГСХА- Р.а.№18	10^{-8}
5	УГСХА- Р.а.№35	10^{-7}
6	УГСХА- Р.а.№44	10^{-8}
7	УГСХА- Р.а.№52	10^{-7}

Таблица 3. Литическая активность бактериофагов *P. aeruginosa* по Грациа

№ п/п	Название фага	Литическая активность по Грациа
1	УГСХА- Р.а.№1	2×10^{10}
2	УГСХА- Р.а.№4	4×10^{10}
3	УГСХА- Р.а.№9	5×10^9
4	УГСХА- Р.а.№18	3×10^9
5	УГСХА- Р.а.№35	2×10^7
6	УГСХА- Р.а.№44	8×10^8
7	УГСХА- Р.а.№52	5×10^8

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.

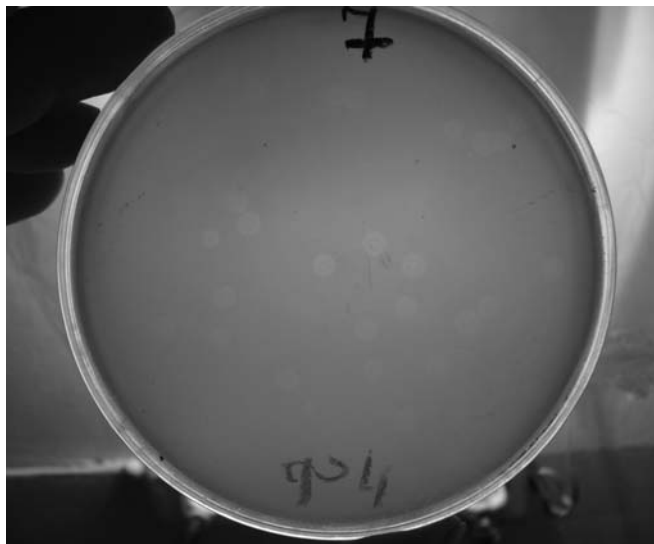


Рис. 1. Негативные колонии бактериофага УГСХА – Р.а.№4



Рис. 2. Четкие стерильные зоны лизиса в месте нанесения фага УГСХА- Р.а.№4 и зоны слабого лизиса с вторичным ростом культуры в месте нанесения фага УГСХА - Р.а.№1

Разработка технологических параметров изготовления и контроля биопрепарата для диагностики *Pseudomonas aeruginosa*

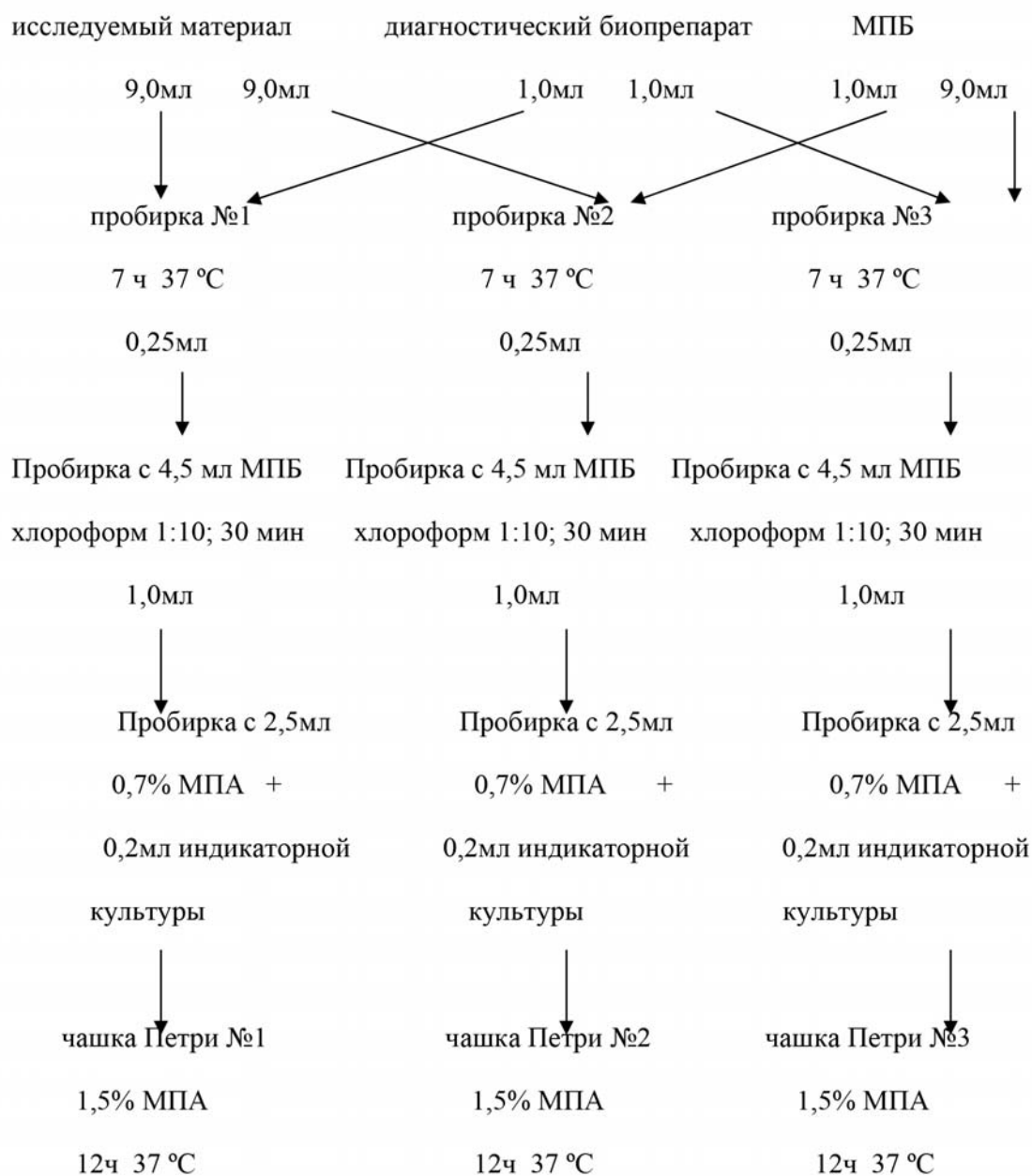
Результаты определения оптимальных температурных показателей культивирования свидетельствуют о том, что оптимальной является температура культивирования специфического бактериофага УГСХА-Р.а. №4 30 °С - 37 °С. Нами решено инкубировать систему специфического бактериофага УГСХА-Р.а. №4 с клетками *P. aeruginosa* 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

Таблица 4. Специфичность, выделенных бактериофагов

№	Вид бактерий	УГСХА-Р.а.№1	УГСХА- Р.а.№4
1	<i>Escherichia coli</i>	-	-
2	<i>Proteus mirabilis</i>	-	-
3	<i>Citrobacter freundii</i>	-	-
4	<i>Morganella morganii</i>	-	-
5	<i>Salmonella spp.</i>	-	-
6	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-
7	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-
8	<i>Pseudomonas putida</i>	-	-
9	<i>Bacillus cereus</i>	-	-
10	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-
11	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	-	-
12	<i>Streptococcus spp.</i>	-	-
13	<i>Yersinia enterocolitica</i>	-	-
14	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	-	-
15	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	-
16	<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	-

Примечание: «-» - отсутствие лизиса.



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

Рис. 3. Схема постановки реакции нарастания титра фага с диагностическим биопрепаратом

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 исследу-

емом материале 10 м.к./мл. В результате проведенных многолетних исследований 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.

ВИКТОРОВ Д.А.
ВЫДЕЛЕНИЕ, ИЗУЧЕНИЕ ОСНОВНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ
СВОЙСТВ БАКТЕРИОФАГОВ *PSEUDOMONAS PUTIDA*
И РАЗРАБОТКА ПАРАМЕТРОВ ИХ ПРАКТИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

VICTOROV D.A.
THE DETACHMENT, STUDY OF THE BASIC BIOLOGICAL
PROPERTIES OF *PSEUDOMONAS PUTIDA* BACTERIOPHAGE
AND DEVELOPMENT OF PARAMETERS OF THEIR APPLICATION

ИССЛЕДОВАНИЯ 2008-2011 гг.

Цель работы - усовершенствование методов выделения, идентификации и индикации бактерий *P. putida* из объектов внешней среды, пищевого сырья и пищевых продуктов.

В работе было использовано 2 референс-штамма бактерии *P. putida* №901 IV-89; ATCC 12633 IV-87, полученные из музея ГИСК им. Л.А. Тарасевича, а также 33 «полевых» штамма, выделенные из объектов окружающей среды. Для определения специфичности сконструированных сред, а также изучения специфичности бактериофагов использовали 3 референс-штамма бактерии *P. aeruginosa* №128, №381, №1677, референс-штамм бактерии *P. fluorescens* 13525 IV-96, 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. Все штаммы обладали типичными биологическими свойствами. Объектами исследования так же являлись четырнадцать штаммов бактериофагов *P. putida*, выделенных из объектов внешней среды.

Характеристика выделенных фагов *Pseudomonas putida*

Первым этапом наших исследований стало выделение бактериофагов *P. putida* из объектов внешней среды. Материалом для выделения являлись сточные воды. Всего исследовано 76 проб, из которых выделено 14 культур бактериофагов. Морфологию негативных колоний бактериофагов изучали методом агаровых слоев по Грациа. Выделенные бактериофаги имели различные типы негативных колоний: диаметр от 0,5 до 5,0 мм, с мутным и прозрачным центром, с зоной вторичного лизиса и без неё.

Дальнейшим этапом изучения биологических свойств выделенных бактериофагов было определение их литической активности. Изучили литическую активность 14 выделенных бактериофагов *P. putida* 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 из всех выделенных нами бактериофагов Psp1-УГСХА, Psp4b-УГСХА, Psp10-УГСХА и Psp17-УГСХА характеризующиеся максимальным количеством активных корпускул фага в 1 мл. Установили, что наиболее широким спектром литической активности по отношению к исследуемым культурам обладал штамм фага Psp10-УГСХА, который лизировал 30 из 35 штаммов *P. putida* (85,7%). Фаги Psp1-УГСХА и Psp17-УГСХА лизировали 28 из имеющихся у

нас 35 штаммов *P. putida* (80%). Фаг Psp4b-УГСХА лизировал 25 из 35 штаммов *P. putida* (71,4%). Поэтому фаг Psp10-УГСХА был выбран для конструирования биопрепарата для индикации и идентификации бактерий *P. putida*. Результаты определения специфичности всех выделенных бактериофагов, в том числе Psp10-УГСХА, показали, что они строго специфичны по отношению к *P. putida* и не лизировали бактерии других видов и родов.

Бактериофаг Psp10-УГСХА проявил выраженную устойчивость к воздействию обработки хлороформом в соотношении 1:10 в течение 40 минут. Также изучили устойчивость бактериофага Psp10-УГСХА к температуре. Выяснено, что бактериофаг Psp10-УГСХА инактивировался при температуре выше 66 °С в течение 30 минут.

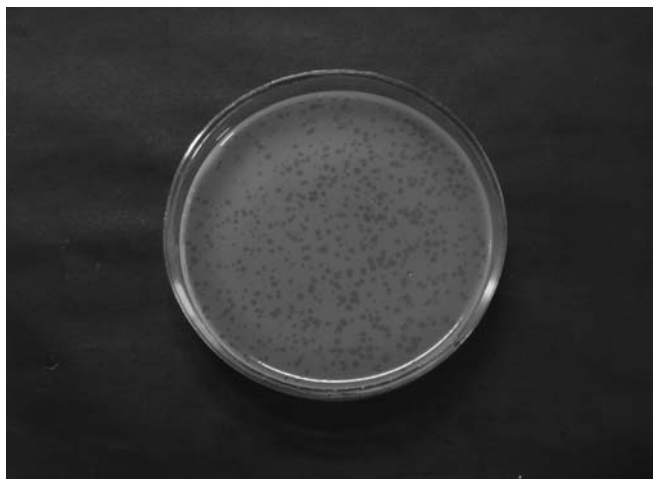


Рис. 1. Морфология негативных колоний бактериофага Psp10-УГСХА

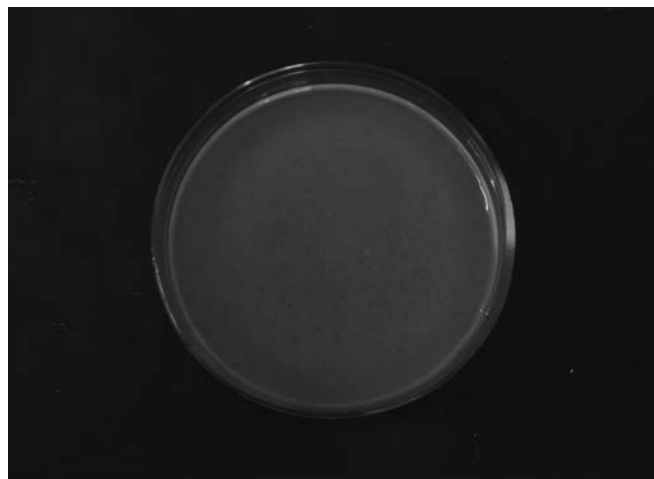


Рис. 2. Морфология негативных колоний бактериофага Psp17-УГСХА

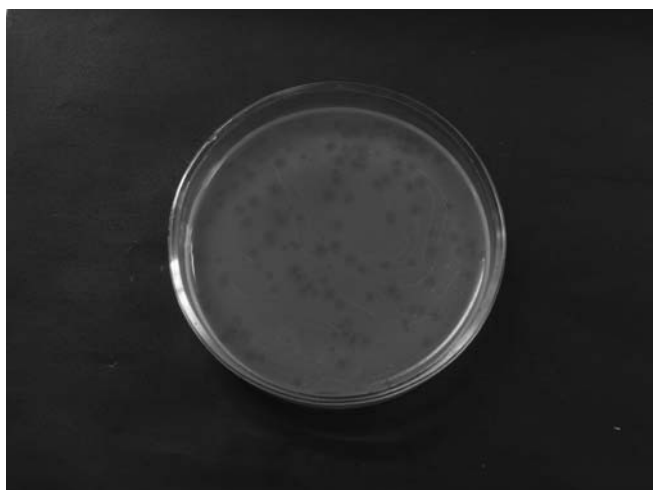


Рис. 3. Морфология негативных колоний бактериофага Psp1-УГСХА

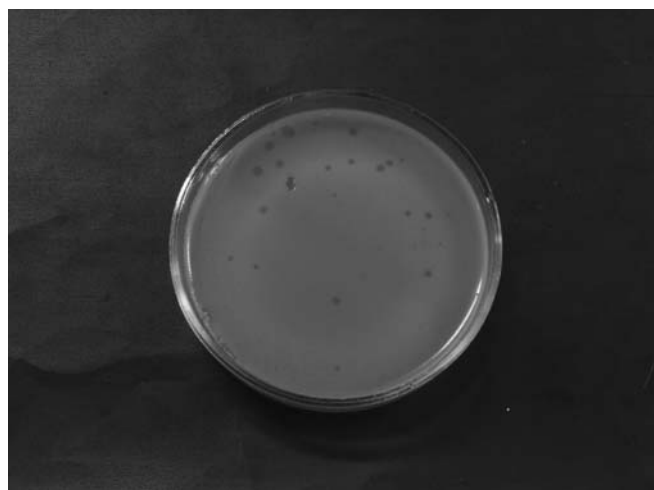


Рис. 4. Морфология негативных колоний бактериофага Psp4a-УГСХА

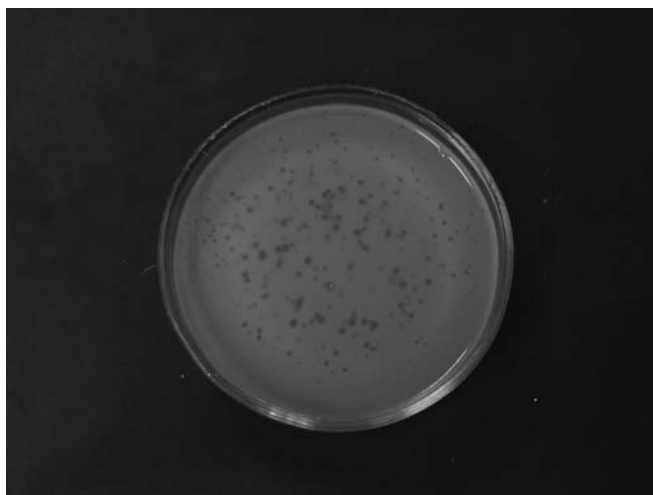


Рис. 5. Морфология негативных колоний бактериофага Psp72-УГСХА

Разработка технологических параметров изготовления и контроля биопрепарата для диагностики *Pseudomonas putida*

При разработке технологических параметров изготовления и контроля биопрепарата для идентификации *P. putida* была проведена серия исследований.

В результате получены технологические параметры изготовления биопрепарата:

- 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-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 4×10^{10} по Грациа.

Таблица 1. Литическая активность фагов *P. putida* по Аппельману

№ п/п	Название фага	Литическая активность Аппельману
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}

Таблица 2. Литическая активность бактериофагов *P. putida* по Грациа.

№ п/п	Название фага	Литическая активность по Грациа
1	Psp1-УГСХА	2×10^{10}
2	Psp2-УГСХА	4×10^8
3	Psp4a-УГСХА	7×10^8
4	Psp4b-УГСХА	2×10^{10}
5	Psp6-УГСХА	3×10^9
6	Psp10-УГСХА	4×10^{10}
7	Psp17-УГСХА	6×10^9
8	Psp26-УГСХА	4×10^8
9	Psp41-УГСХА	8×10^7
10	Psp43-УГСХА	9×10^7
11	Psp56a-УГСХА	2×10^8
12	Psp60-УГСХА	10^9
13	Psp72-УГСХА	6×10^7
14	Psp75-УГСХА	5×10^8

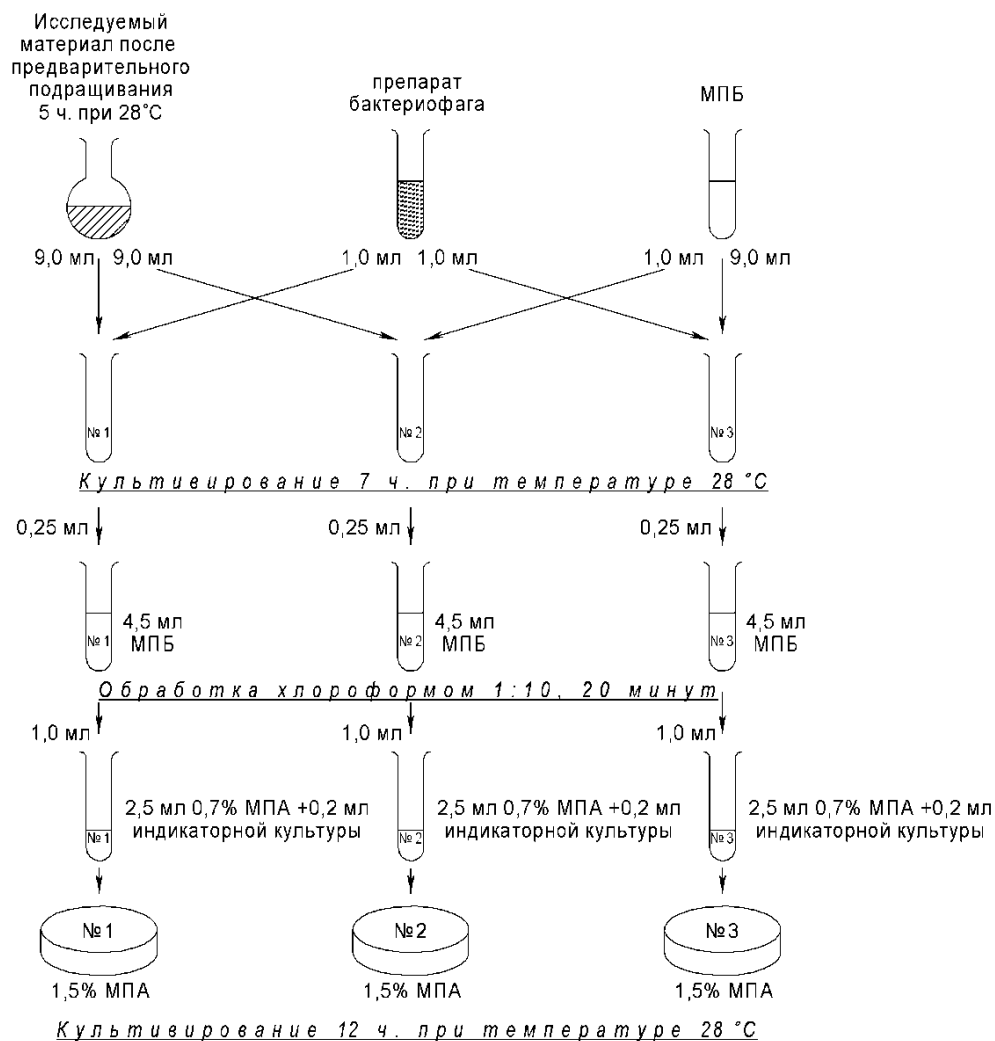


Рис. 6. Схема постановки реакции нарастания титра фага для индикации бактерий *P. putida*

Таблица 3. 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.

Разработка оптимальных условий постановки реакции нарастания титра фага с применением диагностического биопрепарата

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 10^3 м.к/мл.

Полученные экспериментальные данные позволяют считать, что наиболее оптимальным является временной режим РНФ при 7 часовой экспозиции исследуемого материала с фагом с предварительным подрачиванием исследуемого материала в течение 5 часов при температуре 28 °С. Такой режим позволяет провести индикацию бактерий *P. putida* в количестве 10^3 м.к./мл, в течение 24 часов. Таким образом, на основе детального изучения биологических свойств различных штаммов бактериофагов *P. putida*, был 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.

ВИКТОРОВ Д.А.

**ВЫДЕЛЕНИЕ, ИЗУЧЕНИЕ ОСНОВНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ
СВОЙСТВ БАКТЕРИОФАГОВ *PSEUDOMONAS FLUORESCENS*
И РАЗРАБОТКА ПАРАМЕТРОВ ИХ ПРАКТИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ**

VICTOROV D.A.

**THE DETACHMENT, STUDY OF THE BASIC BIOLOGICAL
PROPERTIES OF *PSEUDOMONAS FLUORESCENS* BACTERIOPHAGE
AND DEVELOPMENT OF PARAMETERS OF THEIR APPLICATION**

ИССЛЕДОВАНИЯ 2008-2011 гг.

Цель работы - Усовершенствование методов выделения, идентификации и индикации бактерий *P. fluorescens* из объектов внешней среды, пищевого сырья и пищевых продуктов.

В работе было использовано 4 референс-штамма бактерии *P. fluorescens*: ATCC 13525 IV-96, B-896, B-970, B-1470, а также 28 «полевых» штаммов, выделенных из объектов внешней среды. Для определения специфичности сконструированных сред, а также изучения специфичности бактериофагов использовали 5 референс-штаммов бактерии *P. putida*: №901 IV-89; ATCC 12633 IV-87, B-899, B-550, B-1292, 3 референс-штамма бактерии *P. aeruginosa* №128, №381, №1677, 2 референс-штамма бактерии *P. chlororaphis*: B-1246, B-1249, 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*, полученных из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ при ФГБОУ ВПО Ульяновской ГСХА. Все штаммы обладали типичными биологическими свойствами. Объектами исследования так же являлись десять штаммов бактериофагов *P. fluorescens*, выделенных из объектов внешней среды.

Характеристика выделенных фагов *Pseudomonas fluorescens*

Первым этапом наших исследований стало выделение бактериофагов *P. fluorescens* из объектов внешней среды. Материалом для выделения являлись сточные воды. Всего исследовано 76 проб. Морфологию негативных колоний бактериофагов изучали с помощью метода агаровых

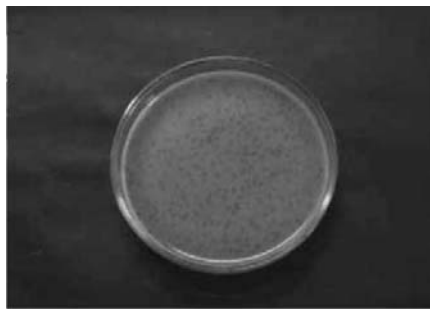


Рис. 1. Морфология негативных колоний риофага Psp10-УГСХА и Psp17-УГСХА соответственно.

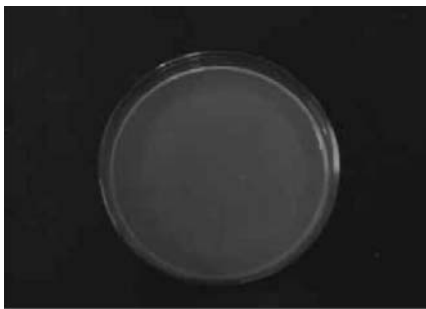


Рис. 2. Морфология негативных колоний риофага Psp1-УГСХА и Psp4a-УГСХА соответственно.

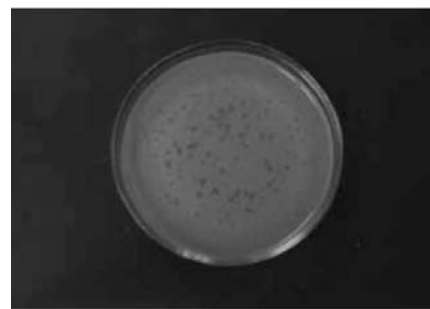


Рис. 3. Морфология негативных колоний бактериофага РБр72-УГСХА

слоев по Грация. В пробирку с расплавленным и остуженным до 45 °С 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. fluorescens* ATCC 13525. 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 имеют диаметр 0,5-5 мм, полностью прозрачны или с мутным центром, без зоны вторичного лизиса или с мутной зоной вторичного лизиса на периферии.

Дальнейшим этапом изучения биологических свойств выделенных бактериофагов было определение их литической активности. Литическую активность селекционированных бактериофагов определяли по методу Аппельмана и Грация (Гольдфарб, 1961).

Селекционированные бактериофаги проявили разную литическую активность на культуре бактериальных клеток штамма *P. fluorescens* ATCC 13525 как в жидкой среде, так и на плотной среде. По результатам полученных данных, нами было решено в дальнейших исследованиях использовать наиболее активный из всех выделенных нами фагов Pf01F1 и характеризующийся максимальным титром.

Титр селекционированного бактериофага Pf01F1 по Грация: 4×10^{10} фаговых корпускул в 1 мл. Титр бактериофага Pf01F1 - по Апельману: 10^9 . Определение спектра литической активности проводили методом нанесения фага на газон бактериальных культур. Опыты показали, что изученные фаги характеризуются различным спектром литической активности. Наиболее широким спектром литической активности по отношению к изучаемым культурам обладает штамм фага Pf01F1, который лизировал 30 из имеющихся у нас 35 штаммов *P. fluorescens* (85,7%). Другие фаги лизировали не более 28 из имеющихся у нас 35 штаммов *P. fluorescens* (80%). По результатам полученных данных мы решили использовать в дальнейших исследованиях бактериофаг Pf01F1. 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*.

По результатам определения спектра литической активности и изучения специфичности выделенных бактериофагов пришли к выводу, что в дальнейших исследованиях целесообразно использовать бактериофаг Pf01F1. 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 Грация. Установлено, что прогревание фага Pf01F1 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 инактивировали исследуемый бактериофаг.

Полученные данные свидетельствуют об устойчивости фага к воздействию температуры до 58 °С. При температуре от 60 °С фаг Pf01F1 терял свою активность и полностью погибал при

Табл. 1. Литическая активность фагов *P. putida* по Аппельману

№ п.п.	Название фага	Литическая активность Аппельману
1	Psp1-yrCXA	10 ⁹
2	Psp2-yrCXA	10 ⁸
3	Psp4a-yrCXA	10 ⁻⁹
4	Psp4b-yrCXA	10 ⁻¹⁰
5	Psp6-yrCXA	10 ⁸
6	Psp10-yrCXA	10 ⁹
7	Psp17-yrCXA	10 ⁻⁸
8	Psp26-yrCXA	10 ⁹
9	Psp41-yrCXA	10 ⁻⁸
10	Psp43-yrCXA	10 ⁻⁷
11	Psp56a-yrCXA	10 ⁻⁹
12	Psp60-yrCXA	10 ⁻¹⁰
13	Psp72-yrCXA	10 ⁸
14	Psp75-yrCXA	10 ⁻⁹

Табл. 2. Литическая активность бактериофагов *P. putida* по Грациа.

№ п.п.	Название фага	Литическая активность по Грациа
1	Psp1-yrCXA	2x10 ¹⁰
2	Psp2-yrCXA	4x10
3	Psp4a-yrCXA	7x10
4	Psp4b-yrCXA	2x10 ¹⁰
5	Psp6-yrCXA	3x10
6	PspW-УГCXA	4x10 ¹⁰
7	PspU-УГCXA	6x10
8	Psp26-yrCXA	4x10
9	Psp41-yrCXA	8x10'
10	Psp43-yrCXA	9x10'
11	Psp56a-yrCXA	2x10
12	Psp60-yrCXA	10
13	Psp72-yrCXA	6x10
14	Psp75-yrCXA	5x10

Табл. 3. Специфичность выделенных бактериофагов

№ п.п.	Вид бактерий	PspI-УГCXA	Psp4b-yrCXA	PspIO-УГCXA	Psp17-yrCXA
1	<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-
2	<i>P. fluorescens</i>	-	-	-	-
3	<i>A. hydrophila</i>	-	-	-	-
4	<i>P. mirabilis</i>	-	-	-	-
5	<i>M. morongii</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.

температуре выше 66 °С. Бактериофаги обычно устойчивее к хлороформу, чем клетки микроорганизмов, поэтому данный химический агент 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 с бактериофагом, необработанным хлороформом. После воздействия хлороформа активность бактериофага определяли по методу Грациа. Бактериофаг Pf01F1 проявил выраженную устойчивость к воздействию хлороформа в течение 40 минут. Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что бактериофаг Pf01F1 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. fluorescens* ATCC 13525 к воздействию хлороформа. Для этого суточную бульонную культуру штамма *P. fluorescens* ATCC 13525 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. fluorescens*. Полученные данные свидетельствуют о высокой активности хлороформа в отношении бактерий *P. fluorescens* и были использованы нами при разработке биопрепарата на основе бактериофага Pf01F1 и в реакции нарастания титра фага.

Разработка технологических параметров изготовления и контроля биопрепарата для диагностики *Pseudomonas fluorescens*

Результаты свидетельствуют о том, что диапазон оптимальных температур культивирования фага Pf01F1 составляет 26-32 °С. Нами решено инкубировать систему фага Pf01F1 с *P. fluorescens* при температуре 28 °С.

В результате проведенных исследований было установлено что для бактериофага Pf01F1 оптимальным соотношением бактериофага и культуры является 1:2, т.е. 0,2 мл фага х 0,4 мл индикаторной культуры. Установлено, что оптимальное время пассажа при температуре 28 °С для фага Pf01F1 составляет 8 часов. Литическая активность фага составляет 10^{-10} по методу Аппельмана и 4×10^{10} по методу Грациа.

Разработка оптимальных условий постановки реакции нарастания титра фага с применением диагностического биопрепарата

При разработке оптимальных условий постановки реакции нарастания титра фага (РНФ) необходимо определить: количественный показатель реакции, имеющий диагностическое значение; оптимальное время, обеспечивающее полноценное взаимодействие фага с бактериями.

По результатам проведенных опытов было установлено, что при 5-часовой экспозиции фага с культурой количество фаговых частиц более чем в 5 раз превышает количество фаговых частиц в контрольных пробах, при контаминации МПБ штаммом *P. fluorescens* ATCC 13525 в концентрации 10^5 м.к./мл для фага Pf01F1. Было установлено, что после предварительного подращивания исследуемого материала в течение 5 часов удалось обнаружить *P. fluorescens* в концентрации 10^4 м.к./мл. Увеличение времени предварительной инкубации до 10 часов позволило обнаружить *P. fluorescens* в концентрации 10^3 м.к./мл. 16- и 24-часовая экспозиция предварительного подращивания существенно не повлияла на результаты реакции. В результате проведенных исследований было установлено, что при инкубировании материала в течение 7 и 10 часов *P. fluorescens* были обнаружены с помощью РНФ гомологичным фагом Pf01F1 в концентрации 10^4 м.к./мл. При инкубировании в течение 16 и 24 часов – 10^3 м.к./мл. Таким образом, результаты проведенных исследований показали, что увеличение экспозиции с фагом без предварительного подращивания исследуемого материала повышают чувствительность реакции по сравнению с 5-часовой экспозицией. Однако, соотношение чувствительности к общему времени реакции при этом несколько ниже, чем в РНФ с предварительным подращиванием исследуемого материала и последующей 5-часовой экспозицией с фагом. Полученные данные позволяют считать, что наиболее оптималь-

ным является режим РНФ с предварительным подращиванием исследуемого материала в течение 5 часов и 7-часовой экспозицией исследуемого материала с фагом. Такой режим позволяет провести индикацию *P. fluorescens* в количестве 10^3 м.к./мл в течение 24 часов. При исследовании методом РНФ различных субстратов (прудовой воды, овощей, внутренних органов рыб) с помощью бактериофага Pf01F1 удалось обнаружить бактерии *P. fluorescens* в концентрации 10^3 м.к. в изучаемом объекте без выделения чистой культуры за 24 часа. При использовании бактериологического метода на исследование затрачивается 96 часов.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Акимкин, В.Г. Перспективы научных исследований в области неспецифической профилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи / В.Г. Акимкин // Дезинфекционное дело. - 2014. - Т. 89. - № 3. - С. 5-10.
2. Алешкин, А.В. Бактериофаги как пробиотики и средства деkontаминации пищевых продуктов / А.В. Алешкин, Н.В. Воложанцев, Э.А. Светоч, В.А. Алешкин, С.С. Афанасьев, А.И. Борзилов, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин, А.В. Караулов, Х.М. Галимзянов, Ю.Ф. Космачев, И.А. Киселева, М.С. Афанасьев, Е.О. Рубальский, М.О. Рубальский // Астраханский мед. журнал. – 2012. – №3 (7), – С.31-39.
3. 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.
4. Асланов, Б.И. Рациональное применение бактериофагов в лечебной и противэпидемической практике. Федеральные клинические (методические) рекомендации / Б.И. Асланов, Л.П. Зуева, Л.А. Кафтырева, А.Г. Бойцов, В.Г. Акимкин, А.А. Долгий, Е.Б. Бруси́на, О.М. Дроздова. - Москва, 2014.
5. Барт, Н.Г. **Спектр литической активности бактериофагов *Providencia*** / Н.Г. Барт, С.Н. Золотухин, Д.А.Васильев // Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения: материалы V Международной научно-практической конференции. - Ульяновск, 2013. - С. 12-15.
6. Барт, Н.Г. **Разработка методов диагностики, лечения и профилактики инфекционных заболеваний с использованием биопрепарата на основе бактериофагов *Providencia*** / Н.Г. Барт, А.С. Мелехин А.С.// Ветеринарная медицина XXI века: инновации, опыт, проблемы и пути их решения Международная научно-практическая конференция, посвященная Всемирному году ветеринарии в ознаменование 250-летия профессии ветеринарного врача. – Ульяновск, 2011. - С. 46-48.
7. Буравцева, Н.П., Эпизоотолого-эпидемиологическая обстановка по сибирской язве в Ставропольском крае / Н.П. Буравцева, С.Н. Антюганов, А.Г. Рязанова, Е.А. Цыганкова, Л.Ю. Аксенова // Мат. науч.-практич. конф. «Здоровье населения и среда обитания» 15-я ежегодная Неделя медицины Ставрополя. – Ставрополь, 2011. – С. 96-101.
8. Бургасов, П.Н. Сибиреязвенная инфекция / П.Н. Бургасов, Г.И. Рожков. – М., 1984. – 212 с.
9. Васильев, Д.А. Детекция *Aeromonas hydrophila* в пищевой продукции из гидробионтов с применением биосенсоров на основе гомологичных бактериофагов / Д.А. Васильев, Д.А. Викторов, И.Р. Насибуллин, С.Н. Золотухин, А.А. Нафеев, И.Г. Горшков, Н.Г. Куклина, Н.Г. Барт // Фундаментальные исследования. - 2014. - № 5-1. - С. 50-54.
10. Васильев, Д.А. Характеристика биологических свойств бактериофагов вида *Bacillus subtilis* / Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин, И.Н. Хайруллин, Н.А. Феоктистова, А.И. Калдыркаев, М.А. Юдина, А.Х. Мустафин // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2011. - № 1.- С. 79-83.
11. Васильев, Д.А. Биологические свойства бактериофагов *Enterococcus* / Д.А. Васильев, Е.Н. Ковалева, С.Н. Золотухин // Проблемы профилактики и борьбы с особо опасными, экзотическими и малоизученными инфекционными болезнями животных. – Покров, 2008. - С. 219-221.
12. Васильев, Д.А. Выделение и изучение биологических свойств бактериофагов рода *Enterobacter*, конструирование на их основе биопрепарата и разработка параметров практического применения / Д.А. Васильев, Е.Н. Пожарникова, С.Н. // Проблемы профилактики и борьбы с особо опасными,

экзотическими и малоизученными инфекционными болезнями животных Международная научно-практическая конференция, посвященная 50-летию ВНИИВВиМ. – Покров, 2008. – С. 228-230.

13. Васильев, П.Г. Спектр литической активности видоспецифического сибиреязвенного бактериофага ФПГ / П.Г. Васильев, Л.И. Маринин, Р.Ш. Зиганшин, И.В. Литусов, А.В. Стенькин, А.В. Степанов, А.Н. Шевцов, А.В. Маслов // Проблемы медицинской и экологической биотехнологии: сб. тезисов докл. юбилейной науч. конф., посвящ. 25-летию ГНЦ прикладной микробиологии 14-15 декабря 1999 г., г. Оболенск. – Оболенск, 1999. – С. 33.
14. Васильева, Ю.Б. Технология конструирования диагностического биопрепарата на основе бактериофагов *Bordetella bronchiseptica* и перспективы его применения / Ю.Б. Васильева, Д.А. Васильев, Е.Н. Семанина // Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности: материалы Международной научно-практической конференции. – Ульяновск, 2013. С. 99-103.
15. Викторов, Д.А. **Разработка системы тестов для выделения и идентификации *Pseudomonas putida*** / Д.А. Викторов, И.И. Богданов, А.Г. Шестаков, Д.А. Васильев // В сборнике: Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения: материалы Международной научно-практической конференции. – Ульяновск, 2009. – С. 21-25.
16. Габрилович, И.М. Общая характеристика бактериофагов / И.М. Габрилович // Основы бактериофагии. Минск, 1973. С.5 – 24.
17. Габрилович, И.М. Биологические свойства бактериофагов *Serratia marcescens* / И.М. Габрилович // ЖМЭИ. – 1992. – №6. – С.10–12. Ганюшкин, В.Я. Бактериофаги сальмонелл и их применение в ветеринарии / В.Я. Ганюшкин. – Ульяновск: УГСХА, 1988. – С.42–45.
18. Глинская, Е.В. Гетерогенность свойств бактерий рода *Bacillus*, выделенных из колбасных изделий / Е. В. Глинская, Н. Ф. Пермязова // Успехи современного естествознания. – 2004. – № 2 – С. 123-125.
19. Головинская, Т.М. Совершенствование фагодиагностики сибирской язвы: оценка специфичности бактериофага «186» / Т.М. Головинская, О.И. Цыганкова, А.Г. Рязанова, А.Н. Куличенко // Медицинский вестник Северного Кавказа. – Ставрополь, 2013. – Том 8. – № 1. – С. 68-69.
20. Гольдфарб, Д.М. Бактериофагия // Д.М. Гольдфарб. – М.: Медгиз, 1961. – С. 169–187.
21. **Горшков И.Г. Перспективы применения бактериофагов для индикации патогенных бактерий рода *Aeromonas*** / И.Г. Горшков, Н.Г. Кукулина, Д.А. Викторов, И.Р. Насибуллин, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин // Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности: материалы Международной научно-практической конференции. – Ульяновск, 2013. – С. 5-7.
22. ГОСТ 26669-85 Продукты пищевые и вкусовые. Подготовка проб для микробиологических анализов. – М.: Госстандарт СССР, 1985. – С.4-6.
23. Дарбеева, О.С. Опыт использования адаптированных препаратов бактериофагов / О.С. Дарбеева, Л.М. Майская, Т.С. Перепанова // БИОпрепараты. – 2002. – № 1. – С. 13-17.
24. Дроздова, О.М. Применение бактериофагов в эпидемиологической практике: взгляд через столетие / О.М. Дроздова, Е.Б. Брусина // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2010. – № 5. – С. 20-24.
25. Еременко, Е.И. Анализ эпидемиологической ситуации по сибирской язве в РФ в 2012 г., прогноз на 2013 г. / Е.И. Еременко, А.Г. Рязанова, Н.П. Буравцева, О.И. Цыганкова, Л.Ю. Аксенова, С.Н. Антюганов, Е.А. Цыганкова, Т.М. Головинская, В.В. Воропаев, А.Н. Куличенко // Проблемы особо опасных инфекций. – Саратов, 2013. – Вып. 1. – С. 18-20.
26. 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.
27. Загула, Д.Г. Влияние метаболитов споровых сапрофитных бактерий на организм человека / Д.Г. Загула, С.Р. Резник С.Р. – Киев: «Наукова Думка», 1973. – С. 10-12.
28. Золотухин, С.Н. Бактериофаги *M.morganii* и их применение при желудочно-кишечных заболеваниях поросят: автореф. дис. ...канд. ветеринарных наук: 16.00.03 / Золотухин Сергей Николаевич. – М, 1994. – С.13.
29. Золотухин, С.Н. Бактерии рода *Citrobacter* и их бактериофаги / С.Н. Золотухин, Л.П. Пульчеровская, Д.А. Васильев // Вопросы микробиологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы Сборник на-

учных работ. - Ульяновск, 2000. - С. 53-58.

30. Золотухин, С.Н. Малоизученные энтеробактерии и их роль в патологии животных / С.Н. Золотухин. – Ульяновск: Копиринг, 2004. – С.29–37 (130с).
31. 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. – 32с.
32. Ипатенко, Н.Г. Испытание сибиреязвенных бактериофагов К ВИЭВ и Гамма МВА / Н.Г. Ипатенко, А.А. Маничев, В.А. Седов, В.Н. Гуцин // Ветеринария. – М., 1989. Вып. 10. – С. 58-59.
33. Калдыркаев, А.И. Методика выделения фагов бактерий вида *Bacillus cereus* и *Bacillus subtilis*, перспективы их применения / А.И. Калдыркаев, Н.А. Феоктистова, А.Х. Мустафин, Д.А. Васильев // Естественные и технические науки. – 2011. – №2 (52). – С. 83–84.
34. 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.
35. Калдыркаев А.И. **Разработка системы фаговаров бактерий *Bacillus cereus* для идентификации и мониторинга данного микроорганизма/ Диссертация на соискание кандидата биологических наук // Калдыркаев Андрей Иванович. – Саратов, 2013. – с. 12-20.**
36. **Картава, С. А Оценка эпизоотолого-эпидемиологической опасности сибиреязвенных захоронений на территории российской федерации / Автореф. дисс. на соискание уч. степ. кандидата медицинских наук /Картава Светлана Александровна. - Москва, 2014.- С 20-22.**
37. Каттер, Э. Бактериофаги. Биология и практическое применение / Э. Каттер, А. Сулаквелидзе. – М.: Научный мир, 2012. – С. 588-593
38. 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. - 2009. - Т. 11. - № 2 S1.- С. 19.
39. Ковалева, Е.Н. Выделение бактериофагов *Listeria monocytogenes* методом индукции / Е.Н. Ковалева, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин, Е.В. Сульдина, М.А. Имамов, И.Г. Швиденко И.Г. // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. 2013. № 1 (21). С. 45-48.
40. Ковалева, Е.Н. Выделение и характеристика бактериофагов *Listeria monocytogenes* / Ковалева Е.Н., Васильев Д.А., Сульдина Е.В., Имамов М.А.// Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности: Материалы Международной научно-практической конференции. – Ульяновск, 2013. - С. 130-133.
41. **Коритняк, Б.М. Сравнительное изучение различных методов выделения фагов возбудителя кишечного иерсиниоза / Б.М. Коритняк, С.Н. Золотухин, Д.А. Васильев // Материалы Всероссийской научно-производственной конференции «Инновационные технологии в аграрном образовании, науке и АПК России» 60-летию академии посвящается. – Ульяновск, Ульяновская государственная академия, 2003. - С. 231-233.**
42. **Коритняк, Б.М. Эпидемиология кишечного иерсиниоза / Б.М. Коритняк, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2004. - № 12. - С. 60-63.**
43. Коритняк, Б.М. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов *Yersinia enterocolitica* и их применение в диагностике: автореф. дис. ...канд. биол. наук: 03.00.07, 03.00.23 / Коритняк Богдан Михайлович. – Саратов, 2005. – С.12.
44. Куклина, Н.Г. **Изучение культуральных свойств бактерии вида *Aeromonas salmonicida* / Н.Г. Куклина, И.Г. Горшков, Д.А. Виктор, Д.А. Васильев // Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения: материалы V Международной научно-практической конференции.- Ульяновск, 2013. - С. 81-83.**
45. Куклина, Н.Г. **Конструирование питательных сред для выделения и индикации бактерий рода *Aeromonas* / Н.Г. Куклина, И.Г. Горшков, Д.А. Виктор, Д.А. Васильев // Вестник ветеринарии. 2013. № 1 (64). С. 75-77.**
46. Куличенко, А.Н. Сибирская язва в XXI веке: эпидемиология и диагностика / А.Н. Куличенко, А.Г. Рязанова, О.И. Цыганкова, Е.А. Цыганкова, Н.П. Буравцева, Л.Ю. Аксенова, Т.М. Головинская, В.В. Воропаев, И.С. Тюменцева, Е.В. Жданова, В.М. Мезенцев, Е.И. Еременко // Мат. X съезда Все-

- российской науч.-практич. общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов «Итоги и перспективы обеспечения эпидемиологического благополучия населения Российской Федерации», 12-13 апреля 2012 // Инфекция и иммунитет. – 2012. – Т. 2. – № 1-2. – С. 161-162.
47. Куличенко, А.Н. Диагностика сибирской язвы в Российской Федерации // А.Н. Куличенко, Е.И. Еременко, Н.П. Буравцева, А.Г. Рязанова // ЖМЭИ. – М., 2010. – № 5. – С. 62-66.
 48. Куриленко, А.Н. Бактериальные и вирусные болезни молодняка сельскохозяйственных животных / А.Н. Куриленко, В.Л. Крупальник, Н.В. Пименов. – М.: Колосс, 2005. – С. 35-36 (296 с).
 49. Локтионова, М.Н. Закономерности территориального распределения и проявления активности стационарно неблагополучных по сибирской язве пунктов Российской Федерации / Автореф. дисс. на соискание уч. степ. кандидата медицинских наук /Локтионова Марина Николаевна. – Москва, 2011.- С 3-4, 10-20.
 50. Лурия, С. Общая вирусология / С. Лурия, Д. Дарнелл. – М., Мир, 1970. С.36–47.
 51. **Ляшенко, Е.А. Сравнительный анализ биологических свойств бактериофагов бактерий *Klebsiella pneumonia*** / Е.А. Ляшенко, Г.Р. Садртдинова, Д.А. Васильев // Инфекция и иммунитет. – 2014. – № 5. – С. 94-95.
 52. **Ляшенко, Е.А. Разработка и применение фагового биопрепарата для диагностики клебсиеллёзной инфекции** / Е.А. Ляшенко, С.Н. Золотухин, Д.А. Васильев // Вестник ветеринарии. – 2011. – № 4 (59). – С. 90-92.
 53. 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 Оренбургского государственного университета. – 2010. – № 2 (108). – С. 114–118.
 54. Медицинские лабораторные технологии: руководство по клинической лабораторной диагностике: в 2 томах. / [В.В. Алексеев и др.]: под ред. А.И. Карпищенко. – 3-е изд... перераб и доп. – Т.2 – М.:ГОЭТАР-Медиа, 2013.- 792с. – С. 422-423.
 55. **Мирошников, К.А. Молекулярно-биологические и генетические принципы селекции терапевтических бактериофагов бактерий родов *Pseudomonas* и *Staphylococcus*** / К.А. Мирошников, Е.Е. Куликов, О.С. Дарбеева, К.А. Лыско, Г.М. Игнатьев // Прикладная биохимия и микробиология. – 2014. – Т. 50. – № 3. – С. 338.
 56. **Молофеева, Н.И. Ветеринарно-санитарный контроль продуктов питания на наличие энтеропатогенных бактерий *Escherichia coli* серотипа O157** / Н.И. Молофеева, С.Н. Золотухин, Д.А. Васильев // Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения. – Ульяновск, 2012. – Т. 1. – С. 299-303.
 57. **Молофеева, Н.И. Биологическая характеристика фагов *Escherichia coli* O157 для создания диагностического препарата** / Н.И. Молофеева, С.Н. Золотухин, Д.А. Васильев // Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности: материалы Международной научно-практической конференции. – Ульяновск, 2013. – С. 87-91.
 58. Мустафин, А.Х. Методика выделения *Bacillus subtilis* / А.Х. Мустафин, Н.А. Феоктистова // **Актуальные вопросы аграрной науки и образования: материалы международной научно-практической конференции посвященной 65-летию УГСХА.** – Ульяновск: УГСХА, 2008. – Ч.IV. – С.100–104
 59. Насибуллин, И.Р. Выделение фагов бактерий *Aeromonas hydrophila* и изучение их биологических свойств / И.Р. Насибуллин, Д.А. Викторов, Д.А. Васильев, А.А. Нафеев, И.Г. Швиденко // Вестник ветеринарии. – 2013. – № 3 (66). – С. 8-10.
 60. Натидзе, Л. Бактериофаги в ветеринарии: реальность и перспективы Л. Натидзе, С. Ригвава, М. Натидзе, Л. Гваладзе, Н. Пиранишвили // Перспективы использования препаратов бактериофага для превенции и лечения инфекций, вызванных патогенными и условно-патогенными микроорганизмами: материалы международного семинара. – Тбилиси, 2005. – С.15.
 61. Онищенко, Г.Г. Сибирская язва: актуальные аспекты микробиологии, эпидемиологии, клиники, диагностики, лечения и профилактики / Г.Г. Онищенко, Н.Т. Васильев, Н.В. Литусов, А.Т. Харечко, П.Г. Васильев, Н.В. Садовой, В.В. Кожухов // М.: ВУНМЦ МЗ РФ. – 1999. – 447 с.
 62. Онищенко, Г.Г. Анализ вспышки сибирской язвы в Омской области в 2010 г. / Г.Г. Онищенко, А.Н. Куличенко, А.Г. Рязанова, Ю.Д. Демина, А.С. Крива, Е.И. Еременко, О.И. Цыганкова, Е.А. Цыганкова,

- Н.П. Буравцева, Л.Ю. Аксенова, Т.М. Головинская // ЖМЭИ. – М., 2012. – № 5. – С. 33-36.
63. Павлова, И.П. Изучение морфологии и биологических свойств фагов *B. anthracis* и *B. cereus* / И.П. Павлова // ЖМЭИ. – 1971. - № 7. – С. 147.
64. 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
65. Петров, С.П. Заболеваемость людей сибирской язвой в Апанасенковском районе Ставропольского края в 1996 году / С.П. Петров, Е.П. Забудская, М.М. Кохов // Матер. науч.-практич. конф. , посвящ. 75-летию санэпидслужбы России «Здоровье населения и среда обитания». – Ставрополь. 1997. – Сб. III. – С. 188-189.
66. **Пожарникова, Е.Н. Фагоиндикация бактерий рода *Enterobacter*** / Е.Н. Пожарникова, С.Н. Золотухин, Д.А. Васильев // Роль молодых ученых в реализации национального проекта «РАЗВИТИЕ АПК»: материалы Международной научно-практической конференции. – Ульяновск, 2007. - С. 296-298.
67. Попов, В.Г. Роль бактериофагов *B. anthracis* в противодействии биотерроризму / В.Г. Попов, В.Н. Каркищенко, С.Ю. Пчелинцев, Д.В. Попов, А.А. Старшов // Биомедицина. – М., 2006. – Вып. 2. – С. 24-32.
68. **Пульчеровская, Л.П. Биологические свойства бактериофагов *Citrobacter*** / Л.П. Пульчеровская, Е.О. Ефрейторова, С.Н. Золотухин, Д.А. Васильев // Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности: материалы Международной научно-практической конференции. – Ульяновск, 2013. С. 98-103.
69. Пучкова, Л.И. Технология хлеба / Л.И. Пучкова, Р.Д. Поландова, И.В. Матвеева. – СПб. ГИОРД, 2005. – С.65.
70. Ревенко, И.П. Бактериофаги и их использование в ветеринарной практике / И.П. Ревенко. – Киев: Урожай, 1978. – С. 41–88.
71. Русалеев, В.С. Фагочувствительность аэробных спорообразующих бактерий / В.С. Русалеев // Ветеринария. – 1990. – №8. – С.29–30.
72. Русалеев, В.С. Фагочувствительность консервированных культур *Bacillus anthracis* / В.С. Русалеев // Ветеринария. – 1990. – №9. – С. 39.
73. Русалеев, В.С. Фагоиндикация *Bacillus anthracis* в почве / В.С. Русалеев // Вестник Сибирского отделения ВАСХНИЛ. – Новосибирск, 1988. – С.29-33.
74. Рязанова А.Г. Анализ заболеваемости сибирской язвой в 2011 г., прогноз на 2012 г. / А.Г. Рязанова, Е.И. Еременко, Е.А. Цыганкова, Л.Ю. Аксенова, О.И. Цыганкова, Н.П. Буравцева, Т.М. Головинская, А.Н.Куличенко // Проблемы особо опасных инфекций. – Саратов, 2012. – Вып.1 (111). – С. 37-38.
75. **Садртдинова, Г.Р. Детекция биопленок, образованных бактериями рода *Klebsiella*, при помощи агаризованной среды** / Г.Р. Садртдинова, Е.А. Ляшенко, А.Г. Шестаков, Д.А. Васильев // Актуальные вопросы контроля инфекционных болезней животных: материалы Международной научно-практической конференции, посвященной 55-летию ВНИИВВиМ. – Покров, 2014. - С. 106-111.
76. **Садртдинова, Г.Р. Особенности селекции фагов активных к *Klebsiella oxytoca*** / Г.Р. Садртдинова, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин, Е.А. Ляшенко // Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности: Материалы Третьей научно-практической конференции с международным участием. – Москва, 2016. - С. 82.
77. **Садртдинова, Г.Р. Особенности выделения вирулентных фагов активных к трибе *Klebsiellae*** / Г.Р. Садртдинова, Л.П. Пульчеровская, Е.О. Ефрейторова, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин, Е.А. Ляшенко, 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. – Ульяновск, 2016. - С. 83.
78. Саяпина, Л.В. Характеристика нового бактериофага диагностического сибиреязвенного Гамма А-26 жидкого / Л.В. Саяпина, А.Е. Абдрашитова, И.В. Кашина и др. // Биопрепараты. – 2011. – Т. 41, № 1. – С. 36–39.
79. Селянинов, Ю.О. Об ошибках при индикации и идентификации *B.anthraxis* / Ю. О. Селянинов, И. Ю. Егорова // Ветеринария. - 2008. - N 10. - С. 30-33.
80. **Семанина, Е.Н. Выделение фагов *Bordetella brohchiseptica*** / Е.Н. Семанина, Ю.Б. Васильева, Д.А. Васильев // Молодежь и наука XXI века: материалы III-й Международной научно-практической кон-

ференции молодых ученых. – Ульяновск, 2010. – С. 60-62.

81. Сидоров, М.А. Определитель зоопатогенных микроорганизмов: справочник / М.А. Сидоров. – М.: Колос, 1995. – С.104–112
82. Солодовников Б.В. Совершенствование биотехнологии производства сибиреязвенного диагностического бактериофага : автореф. дис. ... канд. биол. наук / Б.В. Солодовников. – Ставрополь, 2002. – 21 с.
83. Смирнов, В.В. Споробразующие аэробные бактерии – продуценты биологически активных веществ / В.В. Смирнов, С.Р. Резник, И.А. Василевская. – Киев: Наукова Думка, 1982. – С.117–120.
84. Тимаков, В.Д. Реакция нарастания титра фага (РНФ) / В.Д. Тимаков, Д.М. Гольдфарб. – М., Наука, 1962. – С.65–71.
85. Тихоненко, А.С. Ультраструктура вирусов бактерий / А.С. Тихоненко // М. Наука, 1968. – С.89–168.
86. Феоктистова, Н.А. Биологические особенности бактерий рода *Proteus* и их роль в патологии животных // Региональные проблемы народного хозяйства: Матер. Всерос. науч.- практ. конф. молодых ученых, 8-9 апреля 2004 г. – Ульяновск, 2004. – Ч. 1 – С.329-336.
87. **Феоктистова, Н.А. Разработка схемы исследования материала с целью выделения и ускоренной идентификации бактерий видов *Bacillus subtilis* и *Bacillus cereus* / Н.А. Феоктистова, А.И. Калдыркаев, А.Х. Мустафин // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. – 2011. – Т. 4. – № 32-1. – С. 288-290.**
88. Феоктистова, Н.А. Бактериофаги рода *Bacillus* и перспективы их применения. Инфекция и иммунитет / Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин, А.В. Алешкин. – 2014. – № 5. – С. 116-117.
89. Цыганкова, О.И. Выбор бактериофагов для идентификации сибиреязвенного микроба / О.И. Цыганкова, В.А. Ярощук, Н.П. Буравцева // Актуальные вопросы профилактики особо опасных и других инфекционных заболеваний: матер. науч. практ. конф. «60 лет противочумной службы Кавказа». – Ставрополь, 1995. – С.245-246.
90. 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.
91. **Шестаков, А.Г. Результаты разработки схемы выделения и идентификации *Pseudomonas aeruginosa* / А.Г. Шестаков, И.И. Богданов, Д.А. Васильев // Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения: материалы Международной научно-практической конференции. – Ульяновск, 2009. – С. 120-123.**
92. **Шестаков, А.Г. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов бактерии вида *Pseudomonas aeruginosa* / Шестаков А.Г., Богданов И.И. // Бактериофаги микроорганизмов значимых для животных, растений и человека. - Ульяновск, 2013. С. 262-273.**
93. 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.
94. «*Bacteriophages and Probiotics – Alternatives to Antibiotics*» dedicated to the 120th birth anniversary of Professor George Eliava. – July 1–4. – 2012. – Tbilisi, Georgia.
95. Abuladze, T. Bacteriophages reduce experimental contamination of hard surfaces, tomato, spinach, broccoli, and ground beef by *Escherichia coli* O157:H7 / T. Abuladze, M. Li, M.Y. Menetrez, T. Dean, A. Senecal, A. Sulakvelidze // Appl. Environ Microbiol. – 2008. – 74(20). – P. 6230-6238.
96. Abedon, T.S. Phage treatment of human infections / T.S. Abedon, J.S. Kuhl, G.B. Blasdel, M.E. Kutter // Bacteriophage. – 2011. – № 1(2). – P. 66-85.
97. Alisky, J. Bacteriophages show promise as antimicrobial agents / J. Alisky, K. Iczkowski, A. Rapoport, N. Troitsky // J. Infect. -1998. – 36. – P. 5-15.
98. Boratyński, J. Preparation of endotoxin-free bacteriophage / J. Boratyński, D. Syper, B. Weber-Dabrowska, M. Łusiak-Szelachowska, G. Poźniak, A. Górski // Cell mol boil lett. – 2004. – № 9. – P. 253-259.
99. Breitbart, M. Viral diversity and dynamics in an infant gut / M. Breitbart, M. Haynes, S. Kelley, F. Angly, R.A. Edwards, B. Felts et al. // Research in Microbiology. – 2008. – № 159. – P. 367-373.
100. Brussow, H. Phage therapy: the *Escherichia coli* experience / H. Brussow // Microbiology. – 2005. – № 151. – P. 2133-40.
101. Carlton, R.M. Bacteriophage P100 for control of *Listeria monocytogenes* in foods: Genome sequence,

- bioinformatic analyses, oral toxicity study, and application / R.M. Carlton, W.H. Noordman, B. Biswas, E.D. de Meester, M.J. Loessner // *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. -2005. - № 43. - P. 301-12.
102. Jung, M.Y. *Bacillus manliponensis* sp. nov., a New Member of the *Bacillus cereus* Group Isolated from Fore-shore 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.
 103. Gordon, R. The genus *Bacillus* / R. Gordon // In *Handb. Microbiol. Cleveland (Ohio)*. – 1973. – V.1. – P.71–88.
 104. 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.
 105. Lee, J-H. Complete Genome Sequence of *Bacillus cereus* Bacteriophage BCP78 / J-H. Lee, H. Shin, Son et al. // *J. Virol.* – 2012. - № 86(1). – P. 637–638.
 106. 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
 107. Rasko, DA. 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.
 108. Rhodehamel, E. J. In *FDA Bacteriological Analytical Manual* / E.J. Rhodehamel, S.M. Harmon. – International Organization for Standardization. – 2001. –P. 793.
 109. Schulten, S.M. Evaluation of the ISO 7932 standard for the enumeration of *Bacillus cereus* in foods / S.M. Schulten, P.H. Veld, N.J.D. Nagelkerke, S. Scotter, M.L. Buyser, P. Rollier // *Int. J. Food. Microbiol.* – 2000. – № 57. – P.53 – 63
 110. 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.

СОДЕРЖАНИЕ

ПРЕДИСЛОВИЕ	7
-------------------	---

РАЗДЕЛ 1. БАКТЕРИОФАГИ РОДА AEROMONAS / CHAPTER 1. BACTERIOPHAGES OF AEROMONAS GENUS.....	12
--	-----------

НАСИБУЛЛИН И. Р. ИДЕНТИФИКАЦИЯ БАКТЕРИЙ AEROMONAS HYDROPHILA С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ВЫДЕЛЕННЫХ БАКТЕРИОФАГОВ / NASIBULLIN I. R. IDENTIFICATION OF AEROMONAS HYDROPHILA BACTERIA BASED ON THE OBTAINED BACTERIOPHAGES	12
---	----

КУКЛИНА Н. Г. ВЫДЕЛЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ ОСНОВНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БАКТЕРИОФАГОВ ДЛЯ ИНДИКАЦИИ И ИДЕНТИФИКАЦИИ AEROMONAS SALMONICIDA / KUKLINA N.G. THE DETACHMENT AND STUDY OF THE BASIC BIOLOGICAL PROPERTIES OF BACTERIOPHAGE FOR INDICATION AND IDENTIFICATION OF AEROMONAS SALMONICIDA	19
---	----

ГОРШКОВ И. Г. ВЫДЕЛЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БАКТЕРИОФАГОВ, АКТИВНЫХ В ОТНОШЕНИИ БАКТЕРИИ AEROMONAS SOBRIA / GORSHKOV I.G. THE DETACHMENT AND STUDY OF BIOLOGICAL PROPERTIES OF BACTERIOPHAGES, ACTIVE IN REFERENCE TO AEROMONAS SOBRIA BACTERIA.....	23
--	----

РАЗДЕЛ 2. БАКТЕРИОФАГИ РОДА BACILLUS / CHAPTER 2. BACTERIOPHAGES OF THE BACILLUS GENUS	27
---	-----------

ФЕОКТИСТОВА Н. А., МУСТАФИН А. Х. ВЫДЕЛЕНИЕ, ИЗУЧЕНИЕ ОСНОВНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БАКТЕРИОФАГОВ BACILLUS SUBTILIS И РАЗРАБОТКА ПАРАМЕТРОВ ИХ ПРАКТИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ / FEOKTISTOVA N. A., MUSTAFIN A. H. THE DETACHMENT, STUDY OF THE BASIC BIOLOGICAL PROPERTIES OF BACILLUS SUBTILIS BACTERIOPHAGE AND DEVELOPMENT OF PARAMETERS OF THEIR APPLICATION.	27
---	----

ФЕОКТИСТОВА Н.А., ЛЫДИНА М.А. ВЫДЕЛЕНИЕ, ИЗУЧЕНИЕ ОСНОВНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БАКТЕРИОФАГОВ BACILLUS MESENTERICUS И РАЗРАБОТКА ПАРАМЕТРОВ ИХ ПРАКТИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ / FEOKTOSTOVA N.A., LYDINA M.A. THE DETACHMENT, STUDY OF THE BASIC BIOLOGICAL PROPERTIES OF BACILLUS MESENTERICUS BACTERIOPHAGE AND DEVELOPMENT OF PARAMETERS OF THEIR APPLICATION.	31
---	----

КАЛДЫРКАЕВ А. И., ФЕОКТИСТОВА Н. А. ВЫДЕЛЕНИЕ, ИЗУЧЕНИЕ ОСНОВНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БАКТЕРИОФАГОВ BACILLUS CEREUS И РАЗРАБОТКА ПАРАМЕТРОВ ИХ ПРАКТИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ / KALDYRKAEV A. I., FEOKTISTOVA N. A. THE DETACHMENT, STUDY OF THE BASIC BIOLOGICAL PROPERTIES OF BACILLUS CEREUS BACTERIOPHAGE AND DEVELOPMENT OF PARAMETERS OF THEIR APPLICATION.	37
---	----

ФЕОКТИСТОВА Н.А., МАКЕЕВ В.А. ВЫДЕЛЕНИЕ, ИЗУЧЕНИЕ ОСНОВНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БАКТЕРИОФАГОВ BACILLUS MYCOIDES И РАЗРАБОТКА ПАРАМЕТРОВ ИХ ПРАКТИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ / FEOKTOSTOVA N.A., MAKEEV V.A. THE DETACHMENT, STUDY OF THE BASIC BIOLOGICAL PROPERTIES OF BACILLUS MYCOIDES BACTERIOPHAGE AND DEVELOPMENT OF PARAMETERS OF THEIR APPLICATION.	45
---	----

ФЕОКТИСТОВА Н. А., ПЕТРУКОВА Н. А. ВЫДЕЛЕНИЕ, ИЗУЧЕНИЕ ОСНОВНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БАКТЕРИОФАГОВ BACILLUS MEGATERIUM И РАЗРАБОТКА ПАРАМЕТРОВ ИХ ПРАКТИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ / FEOKTISTOVA N.A., PETRUKOVA N.A. THE DETACHMENT, STUDY OF THE BASIC BIOLOGICAL PROPERTIES OF BACILLUS MEGATERIUM BACTERIOPHAGE AND DEVELOPMENT OF PARAMETERS OF THEIR APPLICATION.	52
---	----

ИССЛЕДОВАНИЯ 2012-2014 гг.	52
---------------------------------	----

ФЕОКТИСТОВА Н. А., КЛИМУШКИН Е. И. ВЫДЕЛЕНИЕ, ИЗУЧЕНИЕ ОСНОВНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БАКТЕРИОФАГОВ BACILLUS ANTHRACIS И РАЗРАБОТКА ПАРАМЕТРОВ ИХ ПРАКТИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ / FEOKTOSTOVA N.A., KLIMUSHIN E.I. THE DETACHMENT, STUDY OF THE BASIC BIOLOGICAL PROPERTIES OF BACILLUS ANTHRACIS BACTERIOPHAGE AND DEVELOPMENT OF PARAMETERS OF THEIR APPLICATION.	58
---	----

РАЗДЕЛ 3. БАКТЕРИОФАГИ РОДА BRONCHISEPTICA / CHAPTER 3. BACTERIOPHAGES OF BRONCHISEPTICA GENUS.....	65
СЕМАНИНА Е.Н., ВАСИЛЬЕВА Ю.Б. ВЫДЕЛЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЯ ОСНОВНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ФАГОВ БАКТЕРИЙ ВИДА BORDETELLA BRONCHISEPTICA / SEMANINA E.N., VASYLYEVA U.B. ISOLATION AND STUDY OF THE MAIN QUALITIES OF BORDETELLA BRONCHISEPTICA PHAGES	65
РАЗДЕЛ 4 БАКТЕРИОФАГИ РОДА LISTERIA / CHAPTER 4. BACTERIOPHAGES OF LISTERIA GENUS.....	70
СУЛЬДИНА Е.В. ВЫДЕЛЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ ОСНОВНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БАКТЕРИОФАГОВ РОДА LISTERIA / SULDINA E.V. ISOLATION AND STUDY OF THE MAIN QUALITIES OF LISTERIA GENUS PHAGES.....	70
РАЗДЕЛ 5. БАКТЕРИОФАГИ МИКРООРГАНИЗМОВ РОДА ENTEROCOCCUS / CHAPTER 5. BACTERIOPHAGES OF ENTEROCOCCUS GENUS	76
КОВАЛЁВА Е.Н. ВЫДЕЛЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЯ ОСНОВНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ФАГОВ БАКТЕРИЙ ВИДА ENTEROCOCCUS FAECALIS / KOVALEVA E.N. ISOLATION AND STUDY OF THE MAIN QUALITIES OF ENTEROCOCCUS FAECALIS SP. PHAGES.....	76
РАЗДЕЛ 6. БАКТЕРИОФАГИ БАКТЕРИЙ СЕМЕЙСТВА ENTEROBACTERIACEAE / CHAPTER 6. BACTERIOPHAGES OF THE ENTEROBACTERIACEAE FAMILY.....	82
БАРТ Н.Г. ВЫДЕЛЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ ОСНОВНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БАКТЕРИОФАГОВ РОДА PROVIDENCIA / BART N.G. ISOLATION AND STUDY OF THE MAIN QUALITIES OF PROVIDENCIA GENUS PHAGES	82
ЛЯШЕНКО Е.А. ВЫДЕЛЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ ОСНОВНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БАКТЕРИОФАГОВ БАКТЕРИЙ РОДА KLEBSIELLA / LYASHENKO E.A. ISOLATION AND STUDY OF THE MAIN QUALITIES OF KLEBSILLA GENUS PHAGES.....	87
САДРТДИНОВА Г.Р. УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ СХЕМЫ ИНДИКАЦИИ И ИДЕНТИФИКАЦИИ БАКТЕРИЙ ВИДА KLEBSIELLA OXYTOCA С ПОМОЩЬЮ ФАГОВОГО БИОПРЕПАРАТА / SADRTDINOVA G.R. IMPROVEMENT OF THE SCHEME OF INDICATION AND IDENTIFICATION OF BACTERIA OF KLEBSIELLA OXYTOCA TYPE WITH THE USE OF STAGE BIOPREPARATION	93
КОРИТНЯК Б.М. ВЫДЕЛЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ ОСНОВНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БАКТЕРИОФАГОВ БАКТЕРИЙ YERSINIA ENTEROCOLITICA / KORYTNYAK B.M. ISOLATION AND STUDY OF THE MAIN QUALITIES OF YERSINIA ENTEROCOLITICA SP. PHAGES	98
ЖУРАВСКАЯ (КАТМАКОВА) Н. П. ВЫДЕЛЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ ОСНОВНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БАКТЕРИОФАГОВ БАКТЕРИЙ ВИДА YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS / GHURAVSKAYA (KATMAKOVA) N. P. ISOLATION AND STUDY OF THE MAIN QUALITIES OF YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS SP. PHAGES	104
ЗОЛУХИН Д.С. ВЫДЕЛЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ ОСНОВНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БАКТЕРИОФАГОВ БАКТЕРИЙ HAFNIA ALVEI / ZOLOTUKHIN D.S. OF THE MAIN QUALITIES OF HAFNIA ALVEI PHAGES.	110
КУЗНЕЦОВ А.Ю. ВЫДЕЛЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ ОСНОВНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БАКТЕРИОФАГОВ БАКТЕРИЙ ВИДА MORGANELLA MORGANII / KUZNETSOV A.U. PHAGES OF MORGANELLA MORGANII SP. AND THEIR APPLICATION	115
МОЛОФЕЕВА Н. И. ВЫДЕЛЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ ОСНОВНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БАКТЕРИОФАГОВ БАКТЕРИЙ ESCHERICHIA COLI 0157 / MOLOFEYEVA N. I. ISOLATION AND STUDY OF THE MAIN QUALITIES OF ESCHERICHIA COLI 0157 PHAGES.....	118
ПОЖАРНИКОВА Е.Н. ВЫДЕЛЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ ОСНОВНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БАКТЕРИОФАГОВ БАКТЕРИЙ РОДА ENTEROBACTER / POZHARNIKOVA E.N. ISOLATION AND STUDY OF THE MAIN QUALITIES OF ENTEROBACTER PHAGES	124

ПУЛЬЧЕРОВСКАЯ Л. П. ВЫДЕЛЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ ОСНОВНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БАКТЕРИОФАГОВ БАКТЕРИЙ CITROBACTER / PULTCHEROVSKAYA L. P. ISOLATION AND STUDY OF THE MAIN QUALITIES OF CITROBACTER GENUS PHAGES.	131
ФЕОКТИСТОВА Н. А. ВЫДЕЛЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ ОСНОВНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БАКТЕРИОФАГОВ БАКТЕРИЙ РОДА PROTEUS / FEOKTISTOVA N. A. ISOLATION AND STUDY OF THE MAIN QUALITIES OF PROTEUS GENUS PHAGES	137
 РАЗДЕЛ 7. БАКТЕРИОФАГИ БАКТЕРИЙ РОДА PSEUDOMONAS / CHAPTER 7. BACTERIOPHAGES OF PSEUDOMONAS GENUS	
ШЕСТАКОВ А. Г. ВЫДЕЛЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЯ ОСНОВНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ФАГОВ БАКТЕРИЙ ВИДА PSEUDOMONAS AERUGINOSA / SHESTAKOV A. G. ISOLATION AND STUDY OF THE MAIN QUALITIES OF PSEUDOMONAS AERUGINOSA SP. PHAGES ...	146
ВИКТОРОВ Д.А. ВЫДЕЛЕНИЕ, ИЗУЧЕНИЕ ОСНОВНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БАКТЕРИОФАГОВ PSEUDOMONAS PUTIDA И РАЗРАБОТКА ПАРАМЕТРОВ ИХ ПРАКТИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ / VICTOROV D.A. THE DETACHMENT, STUDY OF THE BASIC BIOLOGICAL PROPERTIES OF PSEUDOMONAS PUTIDA BACTERIOPHAGE AND DEVELOPMENT OF PARAMETERS OF THEIR APPLICATION.	150
ВИКТОРОВ Д.А. ВЫДЕЛЕНИЕ, ИЗУЧЕНИЕ ОСНОВНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БАКТЕРИОФАГОВ PSEUDOMONAS FLUORESCENS И РАЗРАБОТКА ПАРАМЕТРОВ ИХ ПРАКТИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ / VICTOROV D.A. THE DETACHMENT, STUDY OF THE BASIC BIOLOGICAL PROPERTIES OF PSEUDOMONAS FLUORESCENS BACTERIOPHAGE AND DEVELOPMENT OF PARAMETERS OF THEIR APPLICATION.	154
БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК.	159

БАКТЕРИОФАГИ ЗООАНТРОПОНОЗНЫХ И ФИТОПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ

Результаты научных исследований сотрудников кафедры микробиологии,
вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы
ФГБОУ ВО Ульяновского государственного аграрного университета им. П.А. Столыпина
и Научно-исследовательского инновационного центра микробиологии и биотехнологии.

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

Печатается в авторской редакции.
Тираж 300 экз.

ИЗДАННЫЕ НАУЧНЫЕ МОНОГРАФИИ И ЛЕКЦИИ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО ИННОВАЦИОННОГО ЦЕНТРА МИКРОБИОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ



Д. Р. Шапирова, Е. В. Макарова, Л. Ю. Данилова, Ю. Б. Васильева,
Е. Н. Фролова, П. М. Седова, С. М. Шапирова

АНИМАЛОТЕРАПИЯ

Учебно-методическое пособие.

Данное учебно-методическое пособие предназначено для освоения учебного плана 36.05.01 Ветеринария (специалитет) и 36.02.01 Ветеринария (СПО). В пособии рассматриваются основные направления терапевтического воздействия животных на детей, описана история возникновения, методы реабилитации, профилактики и лечения, взаимодействия ребенка с кошками, собаками, лошадьми, кроликами и другими животными.

Изложенный материал по основным видам анималотерапии входит в проект «Детский реабилитационный центр КРЕПЫШ».

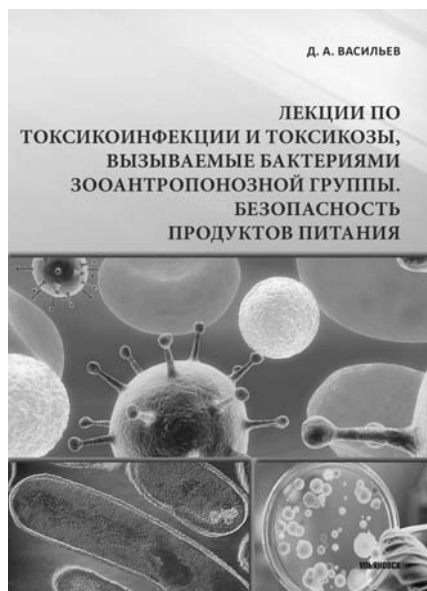


Д. А. Васильев, И. Г. Швиденко, С. Н. Золотухин

УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКОЕ ПОСОБИЕ ПО МЕТОДАМ ОБЩЕЙ БАКТЕРИОЛОГИИ

Предназначено для студентов и аспирантов обучающихся на кафедре микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ, факультета ветеринарной медицины и биотехнологии.

Предлагаемое учебно-методическое пособие не может заменить практическую работу в лаборатории кафедры, и это не лабораторный практикум в его классическом понимании, но оно позволит студентам лучше подготовиться к экзаменам как по первому модулю, так и по всему курсу микробиологии, а аспирантам быстрее вникнуть в работу с микроорганизмами. Данное учебно-методическое пособие подготовлено применительно к вузовскому курсу для студентов факультета ветеринарной медицины и биотехнологии.

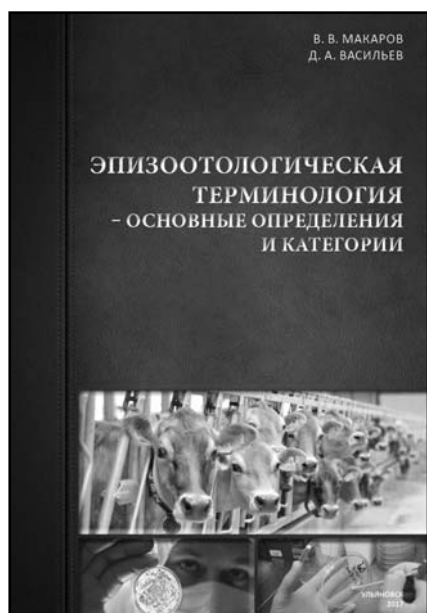


Д. А. Васильев

ЛЕКЦИИ ПО «ТОКСИКОИНФЕКЦИИ И ТОКСИКОЗЫ, ВЫЗЫВАЕМЫЕ БАКТЕРИЯМИ ЗООАНТРОПОЗНОЙ ГРУППЫ. БЕЗОПАСНОСТЬ ПРОДУКТОВ ПИТАНИЯ»

Учебное пособие для студентов обучающихся: на специалитете, бакалавриате, магистратуре и аспирантуре на факультете ветеринарной медицины и биотехнологии УлГСХА.

Предлагаемое учебное пособие издается кафедрой микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы согласно ее плану (протокол заседания кафедры № 6 от 02.02.94 г.), целью которого является оперативный выпуск отдельных изданий. Это позволяет дать студенту либо новую научную или инструктивную информацию, либо более подробно разъяснить ключевые положения разделов учебных дисциплин, преподаваемых на кафедре.



В. В. Макаров, Д. А. Васильев

ЭПИЗОТОЛОГИЧЕСКАЯ ТЕРМИНОЛОГИЯ – ОСНОВНЫЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ И КАТЕГОРИИ

В данном учебном пособии освещены наиболее употребляемые определения и категории, составляющие основу понятийного аппарата общей эпизоотологии и инфектологии. Приводимые трактовки базируются на современных представлениях и достижениях отечественной и зарубежной науки.

Учебное пособие подготовлено кафедрой ветеринарной патологии РУДН и кафедрой микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ УГСХА на основе читаемого для студентов специальности *ветеринария* курса *эпизоотология и инфекционные болезни*.



Д. А. Васильев, Н. А. Феокистова

БИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИВЕРСИЯ И РОЛЬ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ В ЕЁ РАСПРОСТРАНЕНИИ

Учебное пособие

В учебном пособии приводится обзор литературы по биологической диверсии и роль пищевых продуктов в её распространении, написанный на материалах научных публикаций.

Пособие включает две лекции: первая лекция «Генетическое (биологическое) оружие» и вторая – «Правда о нашем хлебе».



Д. А. Васильев, Н. А. Феокистова
ЯДОВИТЫЕ РАСТЕНИЯ УЛЬЯНОВСКОЙ ОБЛАСТИ

Учебное пособие.

Учебное пособие предназначено для освоения учебного плана 36.03.01 – Ветеринарно-санитарная экспертиза (бакалавриат), 19.03.04 – Технология продукции и организация общественного питания (бакалавриат), 36.04.01 – Ветеринарно-санитарная экспертиза (магистерская программа), 36.04.02 – Зоотехния (магистерская программа).



Д. А. Васильев
ЛЕКЦИИ ПО ВЕТЕРИНАРНО-САНИТАРНОЙ ЭКСПЕРТИЗЕ МОЛОКА И МОЛОКОПРОДУКТОВ. БЕЗОПАСНОСТЬ ПРОДУКТОВ ПИТАНИЯ (ТОВАРОВЕДЕНИЕ).

Для бакалавров, магистров, аспирантов по направлениям и профилям – ветеринарный врач, ветеринарно-санитарная экспертиза, товароведение, технология производства и переработки продукции сельского хозяйства, технология продукции и организация общественного питания.

Предлагаемое учебное пособие издается кафедрой микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы согласно ее плану (протокол заседания кафедры № 6 от 02.02.94 г.), целью которого является оперативный выпуск отдельных изданий. Это позволяет дать студенту либо новую научную или инструктивную информацию, либо более подробно разъяснить ключевые положения разделов учебных дисциплин, преподаваемых на кафедре.



Д. А. Васильев, Н. А. Феокистова, А. А. Нафеев,
 Е. И. Климушкин, С. Н. Золотухин, Н. И. Пелевина
СОЗДАНИЕ КАДАСТРА СИБИРЕЯЗВЕННЫХ ОЧАГОВ НА ТЕРРИТОРИИ УЛЬЯНОВСКОЙ ОБЛАСТИ

Учебное пособие предназначено освоения для учебного плана 36.04.01 Ветеринарно-санитарная экспертиза, 06.04.01 Биология, 36.04.02 Зоотехния (магистерские программы) и 03.01.06 Биотехнология (в том числе бионанотехнологии), 03.02.03 Микробиология, 06.02.02 Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология (аспирантура).

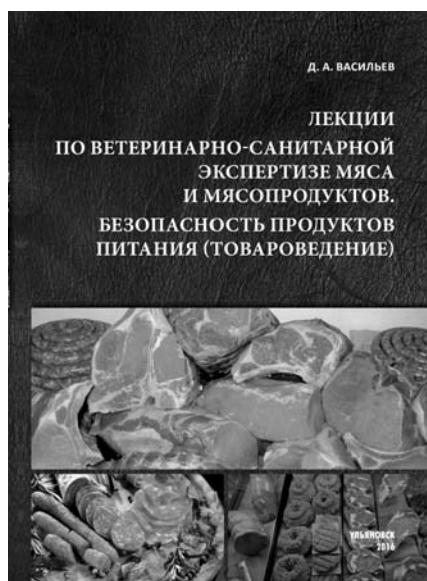


Д. А. Васильев

ЛЕКЦИИ ПО ВЕТЕРИНАРНО-САНИТАРНОЙ ЭКСПЕРТИЗЕ ПРИ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЯХ С/Х ЖИВОТНЫХ. БЕЗОПАСНОСТЬ ПОЛУЧАЕМОГО ПИЩЕВОГО СЫРЬЯ

Для бакалавров, магистров, аспирантов по направлениям и профилям – ветеринарный врач, ветеринарно-санитарная экспертиза, товароведение, технология производства и переработки продукции сельского хозяйства

Предлагаемое учебное пособие издается кафедрой микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы согласно ее плану (протокол заседания кафедры № 6 от 02.02.94 г.), целью которого является оперативный выпуск отдельных изданий. Это позволяет дать студенту либо новую научную или инструктивную информацию, либо более подробно разъяснить ключевые положения разделов учебных дисциплин, преподаваемых на кафедре.



Д. А. Васильев

ЛЕКЦИИ ПО ВЕТЕРИНАРНО-САНИТАРНОЙ ЭКСПЕРТИЗЕ МЯСА И МЯСОПРОДУКТОВ. БЕЗОПАСНОСТЬ ПРОДУКТОВ ПИТАНИЯ (ТОВАРОВЕДЕНИЕ).

Для студентов, бакалавров, магистров, аспирантов факультета ветеринарной медицины и биотехнологии.

Предлагаемое учебное пособие издается кафедрой микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы согласно ее плану (протокол заседания кафедры № 6 от 02.02.94 г.), целью которого является оперативный выпуск отдельных изданий. Это позволяет дать студенту либо новую научную или инструктивную информацию, либо более подробно разъяснить ключевые положения разделов учебных дисциплин, преподаваемых на кафедре.

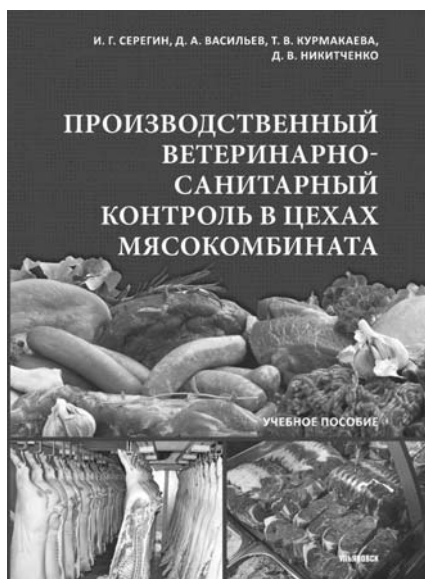


А. В. Алешкин

ЛЕКЦИИ ПО ИССЛЕДОВАНИЮ И ПРИМЕНЕНИЮ БАКТЕРИОФАГОВ

Для студентов и аспирантов факультета ветеринарной медицины и биотехнологии Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии.

Предлагаемое учебное пособие издается кафедрой микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы согласно ее плану (протокол заседания кафедры № 6 от 02.02.94 г.), целью которого является оперативный выпуск отдельных изданий. Это позволяет дать студенту либо новую научную или инструктивную информацию, либо более подробно разъяснить ключевые положения разделов учебных дисциплин, преподаваемых на кафедре.



И. Г. Серегин, Д. А. Васильев, Т. В. Курмакаева, Д. В. Никитченко.
**ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ВЕТЕРИНАРНО-САНИТАРНЫЙ
 КОНТРОЛЬ В ЦЕХАХ МЯСОКОМБИНАТА**
 Учебное пособие.

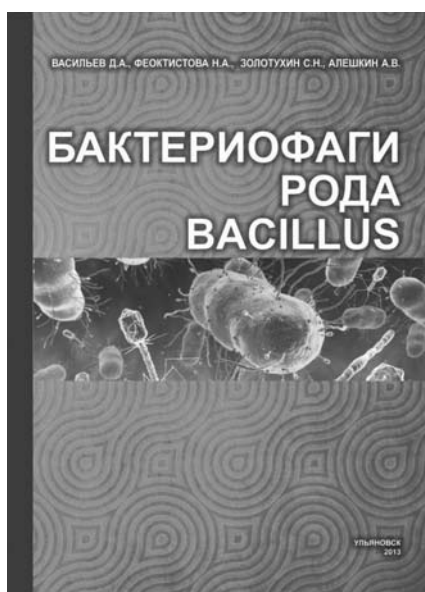
Данное учебное пособие предназначено для студентов высших учебных заведений, обучающихся по специальности 36.05.01 — Ветеринария (квалификация «ветеринарный врач»), и по направлению подготовки 36.03.01 — Ветеринарно-санитарная экспертиза (квалификация (степень) — «бакалавр», а также слушателей курса повышения квалификации практических ветеринарных врачей.



БЕЗОПАСНОСТЬ ПРОДОВОЛЬСТВЕННОГО СЫРЬЯ И ПРОДУКТОВ ПИТАНИЯ

Для студентов, бакалавров, магистров, аспирантов факультета ветеринарной медицины и биотехнологии.

Предлагаемое учебное пособие издается кафедрой микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы согласно ее плану (протокол заседания кафедры № 6 от 02.02.94 г.), целью которого является оперативный выпуск отдельных изданий. Это позволяет дать студенту либо новую научную или инструктивную информацию, либо более подробно разъяснить ключевые положения разделов учебных дисциплин, преподаваемых на кафедре.



Д. А. Васильев, Н. А. Феокистова, С. Н. Золотухин, А. В. Алешкин
БАКТЕРИОФАГИ РОДА BACILLUS
 Научное издание.

В книге приводится анализ литературы по бактериофагам рода *Bacillus*, включая фаги *Bacillus anthracis*, написанный на материалах научных публикаций в полувековом разрезе. Описана морфология и ультраструктура бациллярных вирусов, дана характеристика наиболее изученным бактериофагам, приведены данные по распространению и применению фагов *Bacillus*.

Книга рассчитана на вирусологов, микробиологов, биологов, биофизиков, биохимиков, работающих с бактериальными вирусами, а также на студентов и аспирантов, биологических и медицинских специальностей.



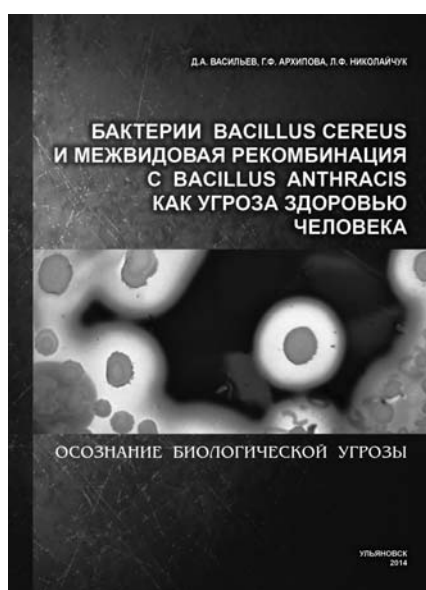
Д. А. Васильев, Е. Н. Ковалева, С. Н. Золотухин

ЛИСТЕРИОЗНЫЕ БАКТЕРИОФАГИ

Научное издание.

В книге приводится обзор отечественных и иностранных публикаций по тематике бактериофагов бактерий рода *Listeria*. Описаны методики выделения и изучения основных биологических свойств листерийных бактериофагов, дана характеристика изученным фагам, приведены данные по практическому применению фагов рода *Listeria*.

Книга рассчитана на вирусологов, микробиологов, биологов, биофизиков, биохимиков, работающих с бактериальными вирусами, а также студентов и аспирантов, биологических и медицинских специальностей.



Д. А. Васильев, Г. Ф. Архипова, Л. Ф. Николайчук

БАКТЕРИИ *BACILLUS CEREUS* И МЕЖВИДОВАЯ РЕКОМБИНАЦИЯ С *BACILLUS ANTHRACIS* КАК УГРОЗА ЗДОРОВЬЮ ЧЕЛОВЕКА

Научное издание.

В течение нескольких лет на кафедре Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии проводятся исследования по выяснению возможной степени опасности для животных и человека бактерий вида *Bacillus cereus*, как инфекционного агента, способного вызывать отравление бактериальным токсином, схожим по патогенезу действия с сибиреязвенным. Эта тема НИР является продолжением исследований проводимых в НИИ ВВиМ. В монографии представлены материалы по распространению *Bacillus cereus* в пищевых продуктах, а также результаты получения межвидовых рекомбинантных штаммов рода *Bacillus*, в частности *Bacillus cereus* и *Bacillus anthracis*, что в естественных условиях может привести к возникновению бактерий-«химер» и создавать трудности при установлении диагноза. Наличие механизма рекомбинации у бактерий создаёт предпосылки для передачи некоторых биологических свойств от сибиреязвенного микроорганизма к бациллам других видов, в частности, *Bacillus cereus*, что может значительно усложнять диагностику и лечение заболеваний (пищевых отравлений) у человека.



БАКТЕРИОФАГИ МИКРООРГАНИЗМОВ ЗНАЧИМЫХ, ДЛЯ ЖИВОТНЫХ, РАСТЕНИЙ И ЧЕЛОВЕКА

Научное издание.

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.



Н. А. Феокистова, Д. А. Васильев
**ЛЕКЦИИ ПО ТОВАРОВЕДЕНИЮ
 ПРОДОВОЛЬСТВЕННЫХ ТОВАРОВ**

Курс лекций предназначен для освоения программы по дисциплине «Товароведение продовольственных товаров» обучающимися по направлению подготовки 19.03.04 - Технология продукции и организация общественного питания.

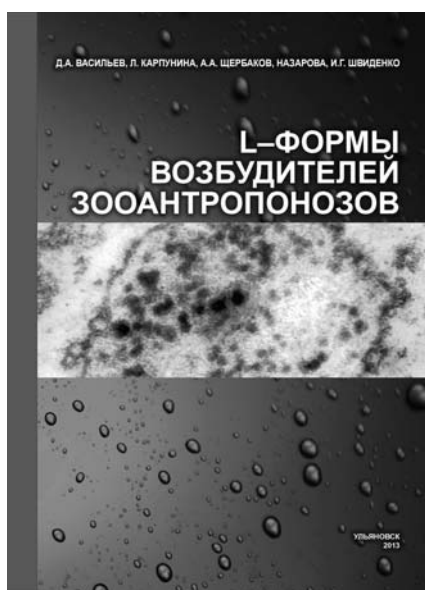


Д. А. Васильев, А. И. Калдыркаев, Н. А. Феокистова,
 А. В. Алёшкин
**ИДЕНТИФИКАЦИЯ БАКТЕРИЙ *BACILLUS CEREUS*
 НА ОСНОВЕ ИХ ФЕНОТИПИЧЕСКОЙ
 ХАРАКТЕРИСТИКИ**

Научное издание.

Книга «Идентификация бактерий *Bacillus cereus* на основе их фенотипической характеристики» является иллюстративным источником бактериологических тестов используемых для идентификации бактерий *Bacillus cereus*, позволяющим внести ясность в схему таксономической систематики бактерий данного вида. Достоинства книги – подробное описание и иллюстративное сопровождение классических бактериологических тестов, воспроизводимых в условиях стандартной бактериологической лаборатории.

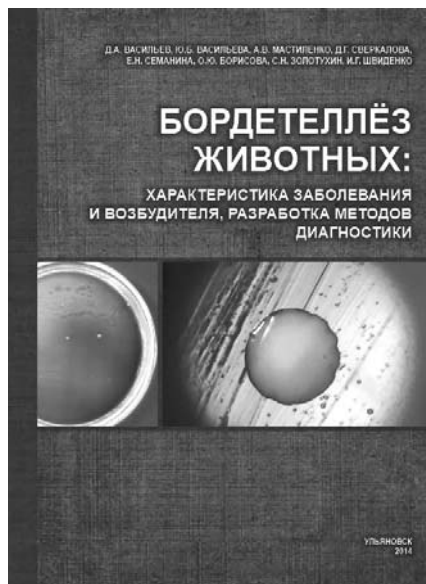
Книга может служить практическим справочным пособием для специалистов-бактериологов, работающих в области биологии, медицины, ветеринарии, биотехнологии, агрономии и пищевой промышленности.



Д. А. Васильев, Л. Карпунина, А. А. Щербаков, Назарова,
 И. Г. Швиденко
L-ФОРМЫ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ЗООАНТРОПОЗОВ

В предлагаемой монографии приводятся данные об L-форме микроорганизмов: их структура на светооптическом и электронномикроскопическом уровнях, условиях культивирования, методах диагностики. Подробно описываются L-формы микроорганизмов, играющих важную роль в патологии сельскохозяйственных животных и человека: бруцеллы, микобактерии туберкулеза, листерии, возбудитель рожи свиней, энтеробактерии, бацилл, чумной микроб.

Включены материалы, полученные с помощью новых методов: полимеразной цепной реакции, иммуноферментного и радиоиммунного анализа и др. Описываются так называемые некультивируемые микроорганизмы. В книге представлены и оригинальные результаты исследований в данном направлении.



Д. А. Васильев, Ю. Б. Васильева, А. В. Мاستиленко,
Д. Г. Сверкалова, Е. Н. Семанина, О. Ю. Борисова, С. Н. Золотухин,
И. Г. Швиденко
**БОРДЕТЕЛЛЁЗ ЖИВОТНЫХ:
ХАРАКТЕРИСТИКА ЗАБОЛЕВАНИЯ
И ВОЗБУДИТЕЛЯ, РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ
ДИАГНОСТИКИ**
Научное издание.

Издание знакомит с эпизоотологией, диагностикой и профилактикой бордетеллёза. В работе приведены результаты исследований по изучению биологии бактерий *Bordetella bronchiseptica*, методам их индикации и идентификации полученные исследовательской группой по бордетеллёзу кафедры микробиологии.

Книга ориентирована на работников бактериологических лабораторий, ветеринарных специалистов, преподавателей, аспирантов, студентов ветеринарных факультетов, а также владельцев домашних животных.

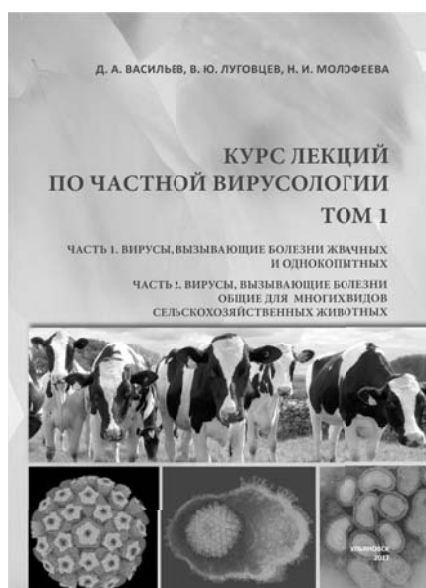


И. А. Бакулов, Д. А. Васильев, Е. Н. Ковалева, И. Ю. Егорова,
Ю. О. Селянинов

ЛИСТЕРИИ И ЛИСТЕРИОЗ

Монография.

В монографии представлены результаты исследований по листериозу более чем за полвека, полученные коллективом научной школы академика РАСХН И. А. Бакулова, а также материалы зарубежных исследователей.



Д. А. Васильев, В. Ю. Луговцев, Н. И. Молофеева.

КУРС ЛЕКЦИЙ ПО ЧАСТНОЙ ВИРУСОЛОГИИ.

В двух томах.

Часть 1. Вирусы, вызывающие болезни жвачных и однокопытных. Часть 2. Вирусы, вызывающие болезни общие для многих видов сельскохозяйственных животных

Учебное пособие.



**Кафедра микробиологии, вирусологии, эпизоотологии, ветеринарно-санитарной экспертизы
УГСХА им. П. А. Столыпина**

В монографии представлены результаты научных исследований сотрудников кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы ФГБОУ ВО Ульяновского государственного аграрного университета имени П.А. Столыпина и НИИЦМиБ по бактериофагам, проведенным за период с 2000 по 2017 года. 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 для целей индикации микроорганизмов в пат материале и объектах окружающей среды

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.