

УДК 578.2:579.62

ПОДБОР СПОСОБА ВЫДЕЛЕНИЯ БАКТЕРИОФАГОВ *PASTEURELLA MULTOCIDA* ИЗ ОБЪЕКТОВ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ

**Хайсанова В.С., ассистент, тел. 8(8422) 55-95-47,
vlada240535@mail.ru**

**Феоктистова Н.А., кандидат биологических наук, доцент,
тел. 8(8422) 55-95-47, feokna@yandex.ru
ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ**

Ключевые слова: *Pasteurellaceae*, бактериофаги, *Pasteurella multocida*, выделение, специфичность.

Работа посвящена подбору способа выделения бактериофагов, специфичных для штаммов *Pasteurella multocida* из объектов внешней среды. На наличие бактериофагов было происследовано 2 объединенных образца фекалий диких и с/х животных. Способ выделения фагов - обогащение «с подсевом» с последующими вариантами обработки суспензии. Выявлены зоны лизиса на газоне трех индикаторных культур при двух способах воздействия на центрифугат, полученный из пробы фекальных масс диких животных: введение трихлорметана в соотношении 1:10 при постоянном встряхивании во временном диапазоне 30 мин и прогревание при температуре 50°C в течении 30 минут.

Исследования проводятся в соответствии с Тематическим планом научно-исследовательских работ, выполняемых по заданию МСХ РФ в 2022 году.

Введение. Микроорганизмы вида *Pasteurella multocida* являются широко распространенными патогенами животных и птицы [1-2]. Лабораторная диагностика вышеназванных бактерий включает целый спектр методологических приемов и способов индикации и идентификации [3]. В литературных источниках ранее сообщалось о нескольких бактериофагах, специфичных для бактерий *Pasteurella multocida*, которые применялись на практике [4]. Бактериофаги - это бактериальные вирусы, которые заражают бактерии, чтобы побудить бактерии к лизису, нарушая бактериальный метаболизм. Они имеют ряд преимуществ в качестве альтернативного лечения животных, птицы и человека, что позволяет уменьшить в схеме лечения количество антибиотиков и избежать их побочных эффектов, поскольку фаговые биопрепараты обладают высокой специфичностью и нетоксичны [5].

Цель исследования - подбор способа выделения вирулентных бактериофагов, специфичных для штаммов *Pasteurella multocida*, из объектов внешней среды.

Материалы и методы исследований. В работе использовали 9 полевых штаммов бактерий *Pasteurella multocida*. Объект выделения фагов - объединенная проба фекалий лесных животных (леса Чердаклинского района Ульяновской области) и объединенная проба фекальных масс домашних сельскохозяйственных животных (коров, свиней, лошадей, овец) (личные подсобные хозяйства Чердаклинского района Ульяновской области). Методология исследований по Э. Каттер [5] и С.Н. Золотухина [6].

Метод выделения фагов обогащения «с подсевом». На первом этапе работы готовили суспензии: смешивали 100 мл стерильного МПБ с 10 г объекта исследований и 1 мл каждой чистой бульонной культуры бактерий гомологичных выделяемому фагу (*Pasteurella multocida*). Колбы с суспензиями термостатировали в течение 7 дней при 37°C. На втором этапе исследований центрифугировали суспензии при 3000 об/мин в течение 30 минут, затем надосадов обрабатывали по следующим методикам:

- фильтровали с помощью бактериальных фильтров (0,22 мкм);
- обрабатывали трихлорметаном (в соотношении 1:10) – время экспозиции 15 минут при постоянном встряхивании;
- обрабатывали трихлорметаном (в соотношении 1:10) – время экспозиции 30 минут при постоянном встряхивании;
- прогревали на водяной бане 20 минут при 48°C;
- прогревали на водяной бане 30 минут при 48°C;
- прогревали на водяной бане 20 мин при 50°C;
- прогревали на водяной бане 30мин при 50°C;
- фильтрование через мембранный фильтр (диаметр пор 0, 22 мкм).

Обработанные фильтраты проверяли на наличие фагов методом «стекающей капли» на газоне бактериальной культуры *Pasteurella multocida* в чашках Петри. Для этого 1,5% МПА разливали в чашки Петри, засекали 24 ч бульонной культурой вышеназванных бактерий, через 15 минут на подсушенную поверхность наносили на одну сторону чашки Петри 1 каплю фильтрата, на другую – одну каплю стерильного МПБ (в качестве контроля). Термостатировали посева в течение 24 часов при t=37°C.

Результаты и их обсуждение. Результаты исследований по выявлению наличия фагов *Pasteurella multocida* из объединенной пробы фекалий с/х животных свидетельствуют об отрицательном результате эксперимента. В таблице 1 представлены данные поиска бактериофагов в пробе из фекальных масс диких животных.

Таблица 1 - Результаты эксперимента по выделению бактериофагов *Pasteurella multocida* из объединенной пробы фекалий диких животных

Режим обработки фильтрата	Номер штаммов								
	P.m-7	P.m-58	P.m-32	P.m-44	P.m-37	P.m-79	P.m-98	P.m-63	P.m-81
Трихлорметан в соотношении 1:10 в течении 15 мин	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Трихлорметан в соотношении 1:10 в течении 30 мин	+	-	-	-	+	-	+	-	-
Температурой 48С в течении 20 мин	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Температурой 48С в течении 30 мин	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Температурой 50С в течении 20 мин	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Температурой 50С в течении 30 мин	+	-	-	-	-	-	+	-	-
Фильтрование через мембранный фильтр	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Примечание: - отсутствие зон лизиса на газоне индикаторной бактериальной культуры; + наличие стерильных пятен или зон лизиса на газоне индикаторной бактериальной культуры.

Установлено, что на газонах 9 культур *Pasteurella multocida* зоны лизиса были выявлены на 3 бактериальных штаммах P.m-7, P.m-37, P.m-98 при применении следующих способов обработки центрифугата: обработка трихлорметаном в соотношении 1:10 в течении 30 мин; прогревание в течении 30 минут t=50С (рисунок 1).

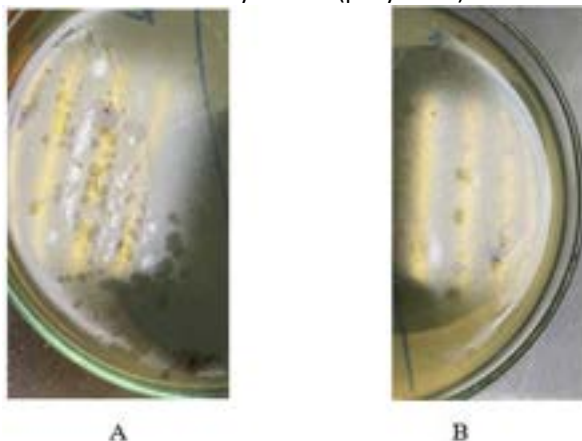


Рисунок 1 - Наличие зон лизиса на газоне бактериального штамма *Pasteurella multocida* P.m-7 с режимом обработки: А) трихлорметан в

соотношении 1:10 в течении 30 мин; В) прогревание при температуре 50С в течении 30 минут

Заключение. В результате проведенной экспериментальной работы было исследовано 2 объединенных образца фекалий диких и с/х животных (источники - лес и личные подсобные хозяйства Чердаклинского района Ульяновской области), которые были обработаны 7 способами и проверены на наличие бактериофагов на 9 штаммах культур. Зоны лизиса были зафиксированы на 3 штаммах *Pasteurella multocida* P.m-7, P.m-37, P.m-98, при способах обработки центрифугата, заключающихся в экспозиции в течение 30 минут надосадочной жидкости в соотношении с трихлорметаном 10:1 и ее прогревания при температуре 50С в течении 30 минут.

Дальнейшая работа будет направлена на селекцию и подбор параметров культивирования выделенных бактериофагов.

Библиографический список

1. *Pasteurella multocida* isolates associated with ovine pneumonia are toxigenic / D. Cid, A. García-Alvarez, L. Domínguez, J.F. Fernández-Garayzábal, A.I. Vela // Veterinary Microbiology. – 2019. – Vol. 232. – P. 70-73,
2. Таубаев У. Б. Изучение некоторых свойств эпизоотических штаммов пастереллы мультотцида // Аграрный вестник Урала. - 2008. - №11. - URL:<https://cyberleninka.ru/article/n/izuchenie-nekotoryh-svoystv-epizooticheskikh-shtammov-pasterella-multotsida> (дата обращения: 15.02.2022).
3. Изучение биологических свойств бактерий вида *P. multocida* / В.С. Хайсанова, Д.А. Васильев, З.Х. Межиева, Б.И. Шморгун // Современная наука: актуальные проблемы теории и практики. Серия: Естественные и технические науки. – 2021. – №. 6. – С. 50-54.
4. New bacteriophage pas-mup-1 *Pasteurella multocida* and its application for inhibition of *Pasteurella multocida* reproduction / Eon Son Dzhun, Dzhun Soo Eun, Paik Kheun Rok, Son Dzhee Soo, Kan Don Min, Kan San Kheon // C12N 7/00. A23K 20/195. A61Q 19/10. RU 2704864 C1 Патентное ведомство: Россия. Год публикации: 2019. Номер заявки: 2018121548. Дата регистрации: 10.11.2016. Дата публикации: 31.10.2019. Патентообладатели: Интрон Байотекнолоджи, ИНК.
5. Летаров А.В. Современные концепции биологии бактериофагов. - М.: ТД ДеЛи, 2019. - 384с.
6. Kutter E. Bacteriophages: biology and applications / E. Kutter, A. Sulakvelidze. - Boca Raton, FL: CRC Press, 2005. - 510p.

7. Золотухин С.Н. Создание и разработка схем применения диагностических биопрепаратов на основе выделенных и изученных бактериофагов энтеробактерий: дис. ... докт. биол. наук. - Ульяновск, 2007. – 341 с.

SELECTION OF A METHOD FOR ISOLATING BACTERIOPHAGES PASTEURELLA MULTOCIDA FROM ENVIRONMENTAL OBJECTS

Khaisanova V.S., Feoktistova N.A.

Keywords: *Pasteurellaceae, bacteriophages, Pasteurella multocida, isolation, specificity.*

The work is devoted to the selection of a method for isolating bacteriophages specific to Pasteurella multocida strains from environmental objects. 2 samples of feces of wild and agricultural animals were examined for the presence of bacteriophages. The method of phage isolation is enrichment «with subseeding» with subsequent suspension treatment options. Lysis zones of the indicator culture were identified with two methods of influencing the dilution of the sample: the introduction of trichloromethane in a ratio of 1:10 with constant shaking in the time range of 30 minutes and warming up at a temperature of 50 ° C for 30 minutes.