DOI <https://doi.org/10.18551/rjoas.2016-10.19>

**САНИТАРНАЯ ОЦЕНКА ОБЪЕКТОВ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ МЕТОДОМ
ВЫДЕЛЕНИЯ ИЗ НИХ ВИРУЛЕНТНЫХ ФАГОВ**
SANITARY ASSESSMENT OF ENVIRONMENTAL OBJECTS BY ISOLATION
OF VIRULENT PHAGES

Садртдинова Г.Р.*, ассистент
Sadrtidinova G.R., Assistant

Пульчеровская Л.П., кандидат биологических наук
Pulcherovskaya L.P., Candidate of Biological Sciences

Васильев Д.А., Золотухин С.Н., доктора биологических наук
Vasiliev D.A., Zolotuhin S.N., Doctors of Biological Sciences

ФГБОУ ВО Ульяновская ГСХА имени П.А. Столыпина, Ульяновск, Россия
Ulyanovsk State Agricultural Academy named after P.A. Stolypin, Ulyanovsk, Russia

*E-mail: sadrtidinova-guzlik@rambler.ru

АННОТАЦИЯ

В статье представлены результаты исследования вирулентных фагов, активных в отношении бактерий, входящих в трибу *Klebsiellae*, для целей санитарной оценки определенных территорий. Бактерии, входящие данную таксономическую категорию имеют один и тот же ареал распространения и очень часто выделяются вместе. Представители трибы - это возбудители урогенитальных, кожных и кишечных инфекций. Объектом исследования служили пробы песка, отобранные из различных мест активного пребывания человека. Получение фагов методом выделения из окружающей среды изучаемого ареала распространения позволило выделить четыре фага, активных в отношении представителей трибы: *K.oxytoca* ATCC 8724, *K.oxytoca* 26, *S.marcescens* ATCC 13800, *S.liquefaciens* 16, *E.cloaceae* 397, *E.aerogenes* 654.

ABSTRACT

The article presents the results of a study of virulent phages active against bacteria belonging to the *Klebsiellae*, for the purposes of sanitary assessment of certain areas. Bacteria of this taxonomic category have the same area of distribution. Given representatives – the pathogens which cause urogenital, skin and intestinal infections. The study objects were taken from sand on different locations of human activity. Phage isolation from the environment allows us to identify four phages which active against *K.oxytoca* ATSS 8724, *K.oxytoca* 26, *S.marcessens* ATSS 13800, *S.liquefaciens* 16, *E.cloaceae* 397, *E.aerogenes* 654.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА

Klebsiellae, бактерии, бактериофаги, ареал распространения, фекальное загрязнение.

KEY WORDS

Klebsiellae, bacteria, bacteriophages, area of distribution, fecal contamination.

Микроорганизмы семейства *Enterobacteriaceae* являются представителями естественной микрофлоры кишечника человека, животных, насекомых и попадают в окружающую среду вместе с продуктами их жизнедеятельности. Они обладают высокой адаптационной устойчивостью, являясь частыми контаминантами воды открытых водоемов, почвы, продуктов питания. Их обнаружение во внешней среде используют как индикатор фекального загрязнения (санитарно-показательные микроорганизмы) [3, 10].

Бактерии семейства *Enterobacteriaceae*, согласно системе таксономии, предложенной Э.Юингом и П.Эдварсом (объединение по сходству биохимических и

культуральных признаков), делят на 8 триб [1,7]. Бактерии рода *Klebsiella* относят к V трибе - *Klebsiellae*. К данной таксономической группе также относят бактерии родов: *Enterobacter*, *Hafnia*, *Serratia*. Данные бактерии, достаточно часто имеют один и тот же ареал распространения, и, следовательно, выделяются совместно. Необходимо учитывать, что они являются возбудителями смешанных инфекций, поэтому быстрый санитарный контроль таких мест крайне необходим [2].

Благодаря своему разрушающему (литическому) действию и высокой специфичности фаги давно используются с лечебно - профилактической целью при различных заболеваниях (дизентерия, холера, различные гнойно-воспалительные заболевания) [11]. Выделение специфических фагов и разработка на их основе диагностического препарата - является одним из путей решения задачи по предотвращению вспышек кишечных инфекций, вызванных микроорганизмами данной группы.

Использование в практике препаратов бактериофагов, активных в отношении только одного рода- не всегда эффективно, так как причиной многих заболеваний является смешанная инфекция. Различия в литической активности бактериофага по отношению к одному лишь бактериальному роду или совокупности («коктейля») фагов показывают необходимость расширения пула фагов, входящих в состав препарата, с целью повышения его спектра действия [12].

Цель исследования заключалась в освоении метода выделения и селекции бактериофагов, активных в отношении бактерий, входящих в трибу *Klebsiellae* и являющихся возбудителями заболеваний кишечной этиологии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования служили пробы песка, отобранные из различных биотопов. Особое внимание уделяли пробам песка, расположенных в местах активного пребывания человека (песочницы на детских площадках- 7 проб, песок с действующих пляжей- 3 пробы). Штаммы, использованные в исследованиях, были получены из музея кафедры МВЭиВСЭ Ульяновской ГСХА - *K.oxytoca* ATCC 8724, *K.oxytoca* 26, *S.marcescens* ATCC 13800, *S. liquefaciens* 16, *E.cloaceae* 397, *E.aerogenes* 654. При проведении работ применяли методы выделения бактериофагов (с нашими дополнениями для изучаемых микроорганизмов)- методы выделения фагов из объектов внешней среды, разработанные: Золотухин С.Н., Пульчеровская Л.П., Пожарникова Е.Н., Катмакова Н.П., Ляшенко Е.А., Садртдинова Г.Р.) [5, 8].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Отбор проб осуществляли в стерильные флаконы. В условиях лаборатории навеску в 10 г суспензировали стерильным физиологическим раствором.

В колбу, содержащую стерильный мясopептонный бульон в количестве 50 мл, вносили 10 мл исследуемого материала и по 0,5 мл всех изучаемых штаммов - *K.oxytoca* ATCC 8724, *K.oxytoca* 26, *S.marcescens* ATCC 13800, *S. liquefaciens* 16, *E.cloaceae* 397, *E.aerogenes* 654. Таким образом, каждая проба испытывалась на наличие фагов ко всем имеющимся культурам бактерий: *K.oxytoca* ATCC 8724, *K.oxytoca* 26, *S.marcescens* ATCC 13800, *S. liquefaciens* 16, *E.cloaceae* 397, *E.aerogenes* 654. Данную колбу помещали в термостат и инкубировали в течение 5 суток при 37 °C [4, 8].

После этого содержимое колбы разливали в стерильные пробирки, центрифугировали при 3000 об/мин (2-3 минуты). Полученные пробы исследовали методом агаровых слоев по Грациа. Чашки ставили в термостат на 18-20 часов при 37°C. По истечению времени инкубации чашки просматривали на наличие видимых зон лизиса (рис. 1).

Наличие негативных колоний или зон лизиса на газоне роста индикаторной культуры свидетельствовало о присутствии в исследуемом материале бактериофага.

Рисунок 1 – Образование негативных колоний (проба №3):
1) *K. oxytoca* ATCC 8724; 2) *S. marcescens* ATCC 13800, 3) *E. cloacae* 397

В таблице 1 указаны пробы, исследование которых выявило наличие фагов.

Таблица 1 – Выделение бактериофагов трибы *Klebsiellae* из объектов внешней среды

№ п/п	Исследуемый штамм	Исследуемая проба									
		№1	№2	№3	№4	№5	№6	№7	№8	№9	№10
1	<i>K. oxytoca</i> ATCC 8724	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
2	<i>K. oxytoca</i> 26	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+
3	<i>S. marcescens</i> ATCC 13800	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+
4	<i>S. liquefaciens</i> 16	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+
5	<i>E. cloacae</i> 397	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+
6	<i>E. aerogenes</i> 654	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-

Примечание:
+ наличие негативных колоний
- отсутствие негативных колоний

В результате исследований было выделено 7 бактериофагов (название фагов дано по номеру пробы, TV-бактериофаг, активный в отношении трибы V):

- TV-1-2-УГСХА - бактериофаг активный в отношении штамма *K. oxytoca* 26;
- TV-1-3-УГСХА - бактериофаг активный в отношении штамма *S. marcescens* ATCC 13800;
- TV-1-4-УГСХА - бактериофаг активный в отношении штамма *S. liquefaciens* 16;
- TV-1-5-УГСХА - бактериофаг активный в отношении штамма *E. cloacae* 397;
- TV-2-3-УГСХА - бактериофаг активный в отношении штамма *S. marcescens* ATCC 13800;
- TV -2-6-УГСХА - бактериофаг активный в отношении штамма *E. aerogenes* 654;
- TV-3-1-УГСХА - бактериофаг активный в отношении штамма *K. oxytoca* ATCC 8724;
- TV-3-2-УГСХА - бактериофаг активный в отношении штамма *K. oxytoca* 26;
- TV-3-3-УГСХА - бактериофаг активный в отношении штамма *S. marcescens* ATCC 13800;
- TV-3-4-УГСХА - бактериофаг активный в отношении штамма *S. liquefaciens* 16;
- TV-3-5УГСХА - бактериофаг активный в отношении штамма *E. cloacae* 39;
- Т -3-6УГСХА - бактериофаг активный в отношении штамма *E. aerogenes* 654;
- TV-5-УГСХА - бактериофаг активный в отношении штамма *S. marcescens* ATCC 13800;
- TV-7-3-УГСХА - бактериофаг активный в отношении штамма *S. marcescens* ATCC 13800;
- TV-7-4-УГСХА - бактериофаг активный в отношении штамма *S. liquefaciens* 16;
- TV-7-6-УГСХА - бактериофаг активный в отношении штамма *E. aerogenes* 654;
- TV-8-2-УГСХА - бактериофаг активный в отношении штамма *K. oxytoca* 26;
- TV-8-4-УГСХА - бактериофаг активный в отношении штамма *S. liquefaciens* 16;
- TV-8-5-УГСХА - бактериофаг активный в отношении штамма *E. cloacae* 397;
- TV -10-2-УГСХА - бактериофаг активный в отношении штамма *K. oxytoca* 26;
- TV-10-3-УГСХА - бактериофаг активный в отношении штамма *S. marcescens* ATCC 13800;
- TV-10-4-УГСХА - бактериофаг активный в отношении штамма *S. liquefaciens* 16;
- TV-10-5-УГСХА - бактериофаг активный в отношении штамма *E. cloacae* 397.

Таким образом из одной и той же пробы (№1, №2, №3, №5, №7, №8, №10) были выделены фаги, активные в отношении различных видов бактерий. Определение видовой специфичности бактериофагов проводили нанесением капли на газон культуры [14]. Для этого на поверхность МПА в чашках Петри наносили 0,4 мл 18-ти часовой исследуемой культуры: *K.oxytoca* ATCC 8724, *K.oxytoca* 26, *S.marcescens* ATCC 13800, *S. liquefaciens* 16, *E.cloaceae* 397, *E.aerogenes* 654. Бактериальную культуру растирали равномерно шпателем по поверхности среды для получения газона. На дне чашек отмечали сектора. После подсушивания газона культуры в термостате на поверхность среды наносили капли изучаемых бактериофагов (по каждой пробе) и наклоняли чашки, чтобы капли стекли. Каждый сектор используется для одного фага. В качестве контроля наносили каплю стерильного МПБ [13]. Было выявлено 4 фага- TV-1-УГСХА, TV-3-УГСХА, TV-8-УГСХА, TV-10-УГСХА. Отобранные фаги проявили активность в отношении всех видов бактерий, входящих в трибу: *K.oxytoca* ATCC 8724, *K.oxytoca* 26, *S.marcescens* ATCC 13800, *S. liquefaciens* 16, *E.cloaceae* 397, *E.aerogenes* 654.

Дальнейшее изучение способности лизиса бактерий под действием фагов, уже с учетом устойчивости к тому или другому фактору, было связано с 4-мя фагами (TV-1-УГСХА, TV-3-УГСХА, TV-8-УГСХА, TV-10-УГСХА). Для этого изучаемые штаммы сплошным газоном высевали на 1,5%-ый мясопептонный агар. Каждая из чашек была разделена на два сектора, на которых, соответственно, проверялась устойчивость фага к хлороформу или температуре [6]. На каждый из секторов с края чашки капнули фагом и дали стечь капли, тем самым образуя своего рода дорожку, которая в случае лизогении культуры образует прозрачную область по всей длине стекания. Результаты исследования представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Результаты определения лизиса у штаммов бактерий трибы *Klebsielleae* под действием хлороформа и температуры

Исследуемый штамм	Изучаемый бактериофаг							
	TV-1-УГСХА		TV-3-УГСХА		TV-8-УГСХА		TV-10-УГСХА	
	t (60°C)	хл (10%)	t (60°C)	хл (10%)	t (60°C)	хл (10%)	t (60°C)	хл (10%)
<i>K.oxytoca</i> ATCC 8724	+	-	+	-	+	-	+	-
<i>K.oxytoca</i> 26	+	-	+	-	+	-	+	-
<i>S.marcescens</i> ATCC 13800	-	+	-	+	-	+	-	+
<i>S. liquefaciens</i> 16	-	+	-	+	-	+	-	+
<i>E.cloaceae</i> 397	+	-	+	-	+	-	+	-
<i>E.aerogenes</i> 654	+	-	+	-	+	-	+	-
Примечание: + наличие зон лизиса - отсутствие зон лизиса								

Дальнейшие исследования были связаны с селекцией бактериофагов и повышением их литической активности. Для этого проводили 4-кратное пассирование изолятов фагов с индикаторной культурой, засеянных методом агаровых слоев, с периодическим пересевом типичных для данного изолята негативных колоний до получения популяции вирусов, имеющих однородные негативные колонии и стабильно высокий титр (по методике предложенной Габриловичем И.М. (1992), Пульчеровской Л.П. (2004), Золотухиным С.Н. (2007), Ляшенко Е.А (2014)) [9].

Готовили разведение выделенного фага в МПБ от 10^{-6} - 10^{-9} . После 20-ти часового инкубирования, отвивали бактериологической петлей одну негативную колонию, расположенную изолированно от других и помещали в пробирку с МПБ, туда же вносили 20-ти часовую бульонную культуру индикаторных штаммов в количестве 0,2 мл [14]. Одновременно ставили МПБ с индикаторной культурой без фага (контроль). Пробирки культивировали при 37°C в течение 4 часов (с наблюдением за изменениями каждый час). В случае появления изменений (просветление опытной пробирки по сравнению с контрольной), полученный фаголизат обрабатывали хлороформом (фаги активные в отношении штаммов *S.marcescens* ATCC 13800, *S. liquefaciens* 16) и

температурой (фаги активные в отношении *K.oxytoca* ATCC 8724, *K.oxytoca* 26, *E.cloaceae* 397, *E.aerogenes* 654) в течение 30 минут и исследовали методом агаровых слоев (рис. 2).

Рисунок 2 – Пассирование фага, активного в отношении *K.oxytoca* ATCC 8724 (слева направо: I, II, III, IV)

В ходе исследования, в каждом случае отбирали идентичную исходной негативную колонию и пассировали. Проводили до четырех пассирований, после чего селекцию считали законченной.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мы утверждаем, что в результате проведенных исследований из изученных объектов окружающей среды (пробы песка с песочниц детских площадок- 7 проб, песок с действующих пляжей- 3 пробы) нами была выделена ассоциация вирулентных штаммов фагов TV-1-УГСХА, TV-3-УГСХА, TV-8-УГСХА, TV-10-УГСХА, активных в отношении различных видов, входящих в трибу *Klebsiellae*: *K.oxytoca*, *S.marcescens*, *S.liquefaciens*, *E.cloaceae*, *E.aerogenes*. Результаты исследования позволяют подтвердить первоначальное предположение о частом совместном распространении бактерий родов *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* в однотипных природных ареалах. Данные исследования указывают на возможность использования предполагаемого метода работы с родственными бактериофагами для целей быстрой санитарной оценки изучаемых объектов по искомым бактериям одной трибы.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Васильев Д.А. и др. Биохимическая активность бактерий вида *Klebsiella oxytoca* // Материалы VII Международной научно-практической конференции «Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения» / - Ульяновск: УГСХА, 2016. Т. III. – С.261-265.
2. Евтеева Н.И. Экологические аспекты существования энтеробактерий / Евтеева Н. И., Речкин А. И. // Материалы Всероссийской научной конференции «Современные проблемы медицинской микробиологии»/ Под ред. А.П. Щербо, В.Д. Бадикова, В.Г. Кубася. СПб.: ГНУ ИОВ РАО, 2007. С.188-189.
3. Евтеева Н.И. Энтеробактерии в ближайшем окружении человека / Евтеева Н.И., Речкин А.И. // Популяции в пространстве и во времени. Сборник материалов VIII Всеросс. популяцион. семинара. Н. Новгород, 2005. С.89-91.
4. Журавская Н.П. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов бактерий вида *Yersinia pseudotuberculosis*//В книге: Бактериофаги

- микроорганизмов значимых для животных, растений и человека Ульяновск, 2013. С. 89-100.
5. Золотухин С.Н. Выделение бактериофага бактерий *Klebsiella oxytoca* под действием рентгеновского облучения/ Г.Р. Садртдинова, Д.А.Васильев, С.Н.Золотухин // Вестник Ульяновской сельскохозяйственной академии.-№1 (33).- С.76-81.
 6. Ляшенко Е.А., Садртдинова Г.Р., Васильев Д.А. Селекция выделенных клонов бактериофагов, активных к *Klebsiella pneumoniae*// Инфекция и иммунитет.2014.№5.С.95.
 7. Поздеев, О.К. Энтеробактерии: руководство для врачей. / О.К Поздеев, Р.В.Федоров-М.:ГЭОТАР-Медиа, 2007.-720с.
 8. Пульчеровская, Л.П. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов *Citrobacter* и их применение в диагностике / Лидия Петровна Пульчеровская // Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук. - Саратов, 2004. - С. 88-89.
 9. Пульчеровская, Л.П. Выделение и селекция бактериофагов рода *Citrobacter*. // Л.П.Пульчеровская, С.Н.Золотухин, Д.А.Васильев. Вестник ветеринарии. Выпуск V., Оренбург, - 2002. - С. 85-88.
 10. Речкин А.И. Микроорганизмы семейства *Enterobacteriaceae* в природных сообществах / Речкин А.И., Евтеева Н.И. // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2008, Т. 1. С. 222-225.
 11. Садртдинова Г.Р. Агрегация бактерий *Klebsiella oxytoca* и *Klebsiella pneumoniae* под влиянием химического фактора// Инфекция и иммунитет.-т.5 (№.4)-С.377-381.
 12. Садртдинова Г.Р. Бактериофаги клебсиелл: их роль и значение // Материалы IV Международной научно-практической конференции молодых ученых «Молодежь и наука XXI века». - Ульяновск: Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина, 2014,Т.1 - С. 115-121.
 13. Садртдинова Г.Р. Селекция выделенных клонов бактериофагов, активных к *Klebsiella oxytoca* // Материалы VII Международной научно-практической конференции «Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения» / - Ульяновск: УГСХА, 2016. Т. III. – С.266-269.
 14. Садртдинова Г.Р. Сравнительная эффективность методов выделения бактериофагов *Klebsiella oxytoca* / С.Н. Золотухин, Д.А. Васильев, Г.Р. Садртдинова // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2015. - № 4 (32).-С.68-72.