

УДК 619:616.9

ВЫДЕЛЕНИЕ, СЕЛЕКЦИЯ И ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БАКТЕРИОФАГОВ *HAFNIA ALVEI*Д.С. ЗОЛОТУХИН, Д.А. ВАСИЛЬЕВ,
С.Н. ЗОЛОТУХИН, А.М. СЕМЕНОВ, Е.М. РОМАНОВА

Ключевые слова: *энтеробактерии, бактериофаги, Hafnia alvei, гафниоз пчел, селекция штаммов, фаги, литическая активность, специфичность, диапазон литической активности.*

Бактериофаги *Hafnia alvei* выделяли из сточных вод животноводческих ферм и мясокомбинатов, определяли их специфичность и литическую активность. Библ. 13.

В последние годы, благодаря работам отечественных и зарубежных исследователей, расширилось представление о роли энтеробактерий рода *Hafnia* в патологии животных и человека [5,7,9,12,13].

В большинстве случаев энтеробактерии *Hafnia alvei* вызывают заболевания у животных и людей с ослабленной иммунной системой. Однако эти бактерии могут самостоятельно вызывать инфекционное заболевание пчёл (гафниоз, паратиф), характеризующееся поражением кишечника и интенсивным размножением возбудителя в гемолимфе пчёл, нанося большой экономический ущерб пчеловодческим хозяйствам из-за гибели пчел, потери их продуктивности и затрат на мероприятия по ликвидации болезни. Кроме того, инфицированный мед и перга могут служить фактором передачи возбудителя животным и человеку [4,7,10].

В настоящее время лабораторная диагностика гафниоза основана на выделении чистой культуры возбудителя и изучении его биологических свойств (тинкториально-морфологических, культуральных, ферментативных). Процесс лабораторного анализа по указанной схеме продолжается не менее 4-6 суток и сопровождается затратами большого количества питательных сред, реактивов и посуды [1,6]. Поэтому существует необходимость в изыскании эффективных и недорогих средств и методов ускоренной лабораторной диагностики этого заболевания. Для выделения возбудителя гафниоза предложено использовать специфические бактериофаги [3,6,7,11,12].

Основным средством уничтожения возбудителя гафниоза являются антибиотики, отрицательное воздействие которых на организм человека и животных (дисбактериоз, аллергические реакции, снижение иммунитета, селекция антибиотико-резистентных штаммов и др.) подтверждены многими научными исследованиями [8-10].

Исходя из вышеизложенных фактов, перед микробиологами и биотехнологами стоит задача изыскания экологически безопасных и эффективных средств борьбы с этим заболеванием. Такими препаратами также являются бактериофаги, которые давно зарекомендовали себя как экологически безопасные, безвредные для макроорганизма и эффективные лечебно-профилактические биопрепараты [3,6,7].

Отсутствие в арсенале предприятий биологической промышленности страны производственных штаммов фагов, необходимых для изготовления диагностических и лечебно-профилактических гафниозных бактериофагов, и послужило поводом для наших исследований.

ЗОЛОТУХИН Дмитрий Сергеевич - аспирант кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы ФГБОУ ВПО "Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия имени П.А. Столыпина"

ВАСИЛЬЕВ Дмитрий Аркадьевич - заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ ФГБОУ ВПО "Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина", доктор биологических наук, профессор

ЗОЛОТУХИН Сергей Николаевич - профессор кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ ФГБОУ ВПО "Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина", доктор биологических наук

СЕМЕНОВ Александр Михайлович - ведущий научный сотрудник кафедры микробиологии МГУ им. М.В. Ломоносова, доктор биологических наук

РОМАНОВА Елена Михайловна - заведующая кафедрой биологии, ветеринарной генетики, паразитологии и экологии ФГБОУ ВПО "Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина", доктор биологических наук

Адрес: бульвар Новый Венец, д.1, г. Ульяновск, РФ, 432063. Тел. 8(8422)559547

E-mail: fvm.zol@yandex.ru

Целью исследований было изыскание гафниозных бактериофагов с заданными биологическими свойствами.

Для достижения поставленной цели нам необходимо было решить следующие задачи: выделить из объектов внешней среды изоляты фагов, активные в отношении энтеробактерии вида *Hafnia alvei*; селекционировать из них штаммы со стабильно-высокой литической активностью; изучить специфичность и диапазон литической активности селекционированных штаммов фагов.

Материалы и методы исследований. Для выделения гафниозных 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 – возбудители гафниоза пчел.

Сточные воды фильтровали через бумажный фильтр для освобождения от механических примесей. С целью инактивации посторонней микрофлоры материал центрифугировали при 3000 об/мин, надосадочную жидкость прогревали в водяной бане при 58-60 °С в течение 30 минут.

Прогретый материал засеивали методом агаровых слоев.

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 в питательный бульон с индикаторной культурой.

Селекцию бактериофагов и повышение их литической активности проводили 10-16-кратным пассированием 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 [2,8].

Литическую активность изучали по общепринятым методикам в жидких и на плотных и питательным средах (методы Аппельмана и Грация); специфичность и диапазон литической активности – методом «стекающая капля» на МПА, засеянном гомологичными и гетерологичными культурами микроорганизмов [2].

Результаты исследования и выводы. Из пяти отобранных проб материала было выделено и селекционировано 4 изолята фагов, лизирующих бактерии вида *Hafnia alvei*.

На газоне индикаторной культуры бактериофаги имели прозрачные негативные колонии диаметром 2-3 мм.

Литическая активность селекционированных штаммов по методу Аппельмана составила 10^{-5} - 10^{-7} , а по методу Грация $3,5 \times 10^8$ - $5,1 \times 10^9$ корпускул фага в 1мл среды.

Результаты изучения диапазона литической активности и специфичности селекционированных гафниозных бактериофагов отражены в таблице.

**Таблица - Диапазон литической активности
и специфичность гафниозных бактериофагов**

[illegible]

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 и 10^8 – в жидких питательных средах), строгую видовую специфичность (не лизирует микроорганизмы других родов и семейств) и обладает широким диапазоном литического действия (лизует 100% изученных культур вида *Hafnia alvei*).

ЛИТЕРАТУРА. 1. Инфекционные болезни животных / Б.Ф. Бессарабов [и др.]; под ред. Сидорчука А.А. М.: Колос, 2007. С. 525-527. 2. Ганюшкин В.Я. Бактериофаги сальмонелл и их применение в ветеринарии. Ульяновск, 1988. 3. Жумагельдина З.Т. Клинико-эпидемиологические особенности гафниоза человека. Алма-Ата, 2009. С. 4, 7, 13, 37-40, 45, 57, 58-64. 4. Золотухин Д.С., Васильев Д.А. Характеристика энтеробактерий рода *Hafnia*. Ульяновск, 2011. С. 73-75. 5. Бактериофаги малоизученных энтеробактерий и перспективы их применения в ветеринарии / С.Н. Золотухин [и др.] // Ветеринарная патология. 2006. № 3. С. 80-85. 6. Золотухин С.Н., Каврук Л.С., Васильев Д.А. Смешанная кишечная инфекция телят и поросят, вызываемая патогенными энтеробактериями. Ульяновск, 2005. С. 5-8. 7. Новиков В.Б. Пчелы, цветы и здоровье // Пчеловодство. 2005. №1. С. 12-15. 8. Пожарникова Е.Н., Золотухин С.Н. Выделение и изучение биологических свойств бактериофагов рода *Enterobacter*, конструирование на их основе биопрепарата и разработка параметров практического применения // Проблемы профилактики и борьбы с особо опасными, экзотическими и малоизученными инфекционными болезнями животных: матер. междунар. научно-практ. конф. ВНИИВВиМ. Том II. Покров, 2008. С. 228-230. 9. Пульчеровская Л.П., Золотухин С.Н., Васильев Д.А. Методы индикации и идентификации бактерий рода *Citrobacter* в воде открытых водоемов // Аграрная наука и образование на совр. этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения: матер. междунар. научно-практ. конф. Том IV. Ульяновск, 2009. С. 87-91. 10. Тарасова А.В., Феоктистова Н.А. Бактерии рода *Hafnia* - возбудители инфекционной болезни пчёл. ФГОУ ВПО "Ульяновская ГСХА", 2007. С. 172-174. 11. Чанишвили Т.Г., Чанишвили Н.А. Научные и методологические основы практического применения бактериофагов // Перспективы использования препаратов бактериофага для превенции и лечения инфекции, вызванных патогенными и условно-патогенными микроорганизмами: матер. междунар. семинара. Тбилиси, 2005. С. 9-10. 12. *Hafnia alvei*, a probable cause of diarrhea in humans / M.J. Albert [et al.] // Infect. Immun. 1991. Vol. 59. P. 1507-1513. 13. Sharing of virulence-associated properties at the phenotypic and genotypic levels between enter pathogenic *Escherichia coli* and *Hafnia alvei* / M.J. Albert [et al.] // J. Med. Microbiol. 1992. Vol. 37. P. 310 - 314.

UDC 619:616.9

THE ISOLATION, SELECTION AND OBSERVATION OF BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF HAFNIA ALVEI BACTERIOPHAGES

ZOLOTUKHIN, Dmitry S., postgraduate student, the Ulyanovsk State Agricultural Academy
VASILYEV, Dmitry A., head of the subdepartment, the Ulyanovsk State Agricultural Academy, Doctor of Biology, Professor

ZOLOTUKHIN, Sergey N., professor, the Ulyanovsk State Agricultural Academy, Doctor of Biology, Professor

SEменов, Aleksandr M., lead researcher, the Moscow State University, Doctor of Biology

ROMANOVA, Elena M., head of the subdepartment, the Ulyanovsk State Agricultural Academy, Doctor of Biology

Address: 1, Novy Venets, Ulyanovsk, Ulyanovsk Oblast, Russia, 432063. Tel. 8(8422)559547

E-mail: fym.zol@yandex.ru

Keywords: *enterobacterium, bacteriophages, Hafnia alvei, Hafniosis, strain selection, isolates of phages, lytic activity, specificity, range of lytic activity.*

Summary. *Hafnia alvei* bacteriophages were isolated from sewage of livestock farms and slaughterhouses. We selected 3 strains of specific phages having consistently high-lytic activity, a wide range of lytic activity and the strict species specificity. Ref. 13.

BIBLIOGRAPHIC REFERENCES 1. Infektsionnye bolezni zhivotnykh / B.F. Bessarabov [et al.]; pod red. Sidorchuka A.A. M.: Kolos, 2007. P. 525-527. 2. Ganyushkin V.Ya. Bakteriofagi salmonell i ikh primeneniye v veterinarii. Ulyanovsk, 1988. 3. Zhumageldina Z.T. Kliniko-epidemiologicheskie osobennosti gafnioza cheloveka. Alma-Ata, 2009. P. 4, 7, 13, 37-40, 45, 57, 58-64. 4. Zolotukhin D.S., Vasilev D.A. Kharakteristika enterobakteriy roda *Hafnia*. Ulyanovsk, 2011. P. 73-75. 5. Bakteriofagi maloizuchennykh enterobakteriy i perspektivy ikh primeneniya v veterinarii / S.N. Zolotukhin [et al.] // Veterinarnaya patologiya. 2006. N 3. P. 80-85. 6. Zolotukhin S.N., Kavruk L.S., Vasilev D.A. Smeshannaya kishchnaya infektsiya telyat i porosyat, vyzvaemaya patogennymi enterobakteriyami. Ulyanovsk, 2005. P. 5-8. 7. Novikov V.B. Pchely, tsvety i zdorove // Pchelovodstvo. 2005. N 1. P. 12-15. 8. Pozharnikova E.N., Zolotukhin S.N. Vydelenie i izuchenie biologicheskikh svoystv bakteriofagov roda *Enterobacter*, konstruirovaniye na ikh osnove biopreparata i razrabotka parametrov prakticheskogo primeneniya // Problemy profilaktiki i bor'by s osobopasnymi, ekzoticheskimi i maloizuchennymi infektsionnymi boleznyami zhivotnykh: mater. mezhdun. nauchno-praktich. konf. VNIIVViM. Vol. II. Pokrov, 2008. P. 228-230. 9. Pulcherovskaya L.P., Zolotukhin S.N., Vasilev D.A. Metody indikatsii i identifikatsii bakteriy roda *Citrobacter* v vode otkrytykh vodoemov // Agrarnaya nauka i obrazovanie na sovr. etape razvitiya: opyt, problemy i puti ikh resheniya: mater. mezhdun. nauchno-prakt. konf. Vol. IV. Ulyanovsk, 2009. P. 87-91. 10. Tarasova A.V., Feoktistova N.A. Bakterii roda *Hafnia* - vzbuditeli infektsionnoy bolezni pchel. FGOU VPO "Ulyanovskaya GSKHA", 2007. P. 172-174. 11. Chanishvili T.G., Chanishvili N.A. Nauchnye i metodologicheskie osnovy prakticheskogo primeneniya bakteriofagov // Perspektivy ispolzovaniya preparatov bakteriofaga dlya prevensii i lecheniya infektsii, vyzvannykh patogennymi i uslovno-patogennymi mikroorganizmami: mater. of International Seminar. Tbilisi, 2005. P. 9-10. 12. *Hafnia alvei*, a probable cause of diarrhea in humans / M.J. Albert [et al.] // Infect. Immun. 1991. Vol. 59. P. 1507-1513. 13. Sharing of virulence-associated properties at the phenotypic and genotypic levels between enter pathogenic *Escherichia coli* and *Hafnia alvei* / M.J. Albert [et al.] // J. Med. Microbiol. 1992. Vol. 37. P. 310 - 314.