

На правах рукописи

САДРТДИНОВА ГУЗЕЛИЯ РАФИКОВНА

**УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ СХЕМЫ ИНДИКАЦИИ И
ИДЕНТИФИКАЦИИ БАКТЕРИЙ ВИДА *KLEBSIELLA OXYTOSA* С
ПОМОЩЬЮ ФАГОВОГО БИОПРЕПАРАТА**

**06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология,
микология с микотоксикологией и иммунология**

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Уфа - 2017

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия имени П.А. Столыпина».

Научный руководитель: **Золотухин Сергей Николаевич,**
доктор биологических наук, профессор.

Официальные оппоненты: **Староверов Сергей Александрович,**
доктор биологических наук, профессор,
директор ФГБНУ «Саратовский научно-исследовательский ветеринарный институт»;

Капустин Андрей Владимирович,
кандидат ветеринарных наук,
заведующий лабораторией микологии и
антибиотиков имени А.Х Саркисова,
ФГБНУ «Всероссийский НИИ
экспериментальной ветеринарии
им. Я.Р. Коваленко».

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии - МВА имени К.И. Скрябина».

Защита диссертации состоится 11 ноября 2017 года в 10⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 220.003.03 при ФГБОУ ВО «Башкирский государственный аграрный университет» по адресу: 450001, Республика Башкортостан, г. Уфа, ул. 50-летия Октября, 34, ауд. 325/2. Тел./факс: +7 (347) 228-08-98.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБОУ ВО «Башкирский государственный аграрный университет» <http://www.bsau.ru>, а с авторефератом в сети Интернет на официальном сайте Министерства образования и науки Российской Федерации <http://www.vak.ed.gov.ru>.

Автореферат разослан «___» _____ 2017 года.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор сельскохозяйственных наук, профессор

Гиниятуллин
Марат Гиндуллинович

1 ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. 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).

Широкое распространение клебсиелл в окружающей среде обусловлено выработанной устойчивостью микроорганизма ко многим внешним факторам, в том числе и к антимикробным средствам (Меджидов М.М., 2008). В животноводстве неправильное применение подстилочных материалов в виде торфа или опилок, нарушение условий содержания животного, приводит к контаминации клебсиеллами кормов и воды (Sampimon O.C. et al., 2006). Выделение клебсиелл из различных природных источников, выражает значимость бактерий рода *Klebsiella* как микроорганизмов-индикаторов санитарного состояния внешней среды (Abbott S.L., 2007; Речкин А.И., 2006, 2007, 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. Использование для бактериологической идентификации микроорганизмов многокомпонентных питательных сред не решает проблемы из-за схожести многих ферментативных реакций у различных представителей семейства *Enterobacteriaceae* (Омарова С.М. с соавт., 2012; Саидова П.С., 2015). Использование в лабораторных исследованиях ПЦР является эффективным (Козыровская Н.А., 1994; Кулуев Б.Р., 2012), но, из-за сложности методик и высокой стоимости необходимого оборудования, является недоступным для большинства исследователей.

Решение проблемы ускорения идентификации и индикации возбудителей различных инфекций может обеспечить использование фаговых биопрепаратов (Leclerc H. et al., 2000; Алешкин А.В., 2013; Асланов Б.И., 2015). Работы Е.А. Булькановой с соавт. (2006) приводят данные о положительных результатах идентификации и индикации бактерий рода *Klebsiella* методом фагодиагностики.

Степень разработанности темы исследования. Попытки по созданию и применению клебсиеллезных бактериофагов проводились многими исследователями, как в медицинской, так и в ветеринарной практике. В 2011 году по решению Минздрава РФ в продаже появились биопрепараты

терапевтического назначения: «Бактериофаг клебсиелл поливалентный очищенный» (состоящий из смеси стерильных фильтратов фаголизатов бактерий *K. pneumoniae*, *K. ozaenae*, *K. rhinoscleromatis*), «Пиобактериофаг» (состоящий из смеси стерильных фильтратов фаголизатов *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Proteus* (*P. vulgaris*, *P. mirabilis*), *P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*), «Секстафаг» (состоящий из смеси стерильных фильтратов фаголизатов бактерий *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Proteus* (*P. vulgaris*, *P. mirabilis*), *P. aeruginosa*, энтеропатогенных *E. coli*, *K. pneumoniae*) (производитель ФГУП «НПО «Микроген»). В 2006 году Е.А. Булькановой с соавт. были разработаны биотехнологические параметры изготовления и контроля биопрепарата на основе бактериофагов К-10 УГСХА и К-81 УГСХА, для ускоренной индикации и идентификации энтеробактерий вида *K. pneumoniae* в патологическом материале, кормах, пищевом сырье и объектах внешней среды. Все современные исследования сосредоточены на изучении биологических характеристик клебсиеллезных фагов и анализе лишь терапевтической эффективности.

Цель и задачи исследования. Цель диссертационного исследования - усовершенствование схемы индикации и идентификации бактерий вида *K. oxytoca* с помощью фагового биопрепарата. Поставленная цель решалась следующими задачами:

1. Изучить основные биологические свойства бактерий вида *K. oxytoca* на примере референс-штамма *K. oxytoca* ATCC 8724. На основании полученных данных сконструировать дифференциально-диагностическую среду, подобрать систему бактериологических тестов и апробировать ускоренную схему выделения и идентификации бактерий вида *K. oxytoca*.

2. За счет оптимизации известных схем выделения бактериофагов, получить специфические бактериофаги активные в отношении *K. oxytoca*.

3. Изучить основные биологические свойства (морфологию негативных колоний, литическую активность и ее спектр, специфичность, температурную устойчивость, устойчивость к хлороформу) выделенных бактериофагов.

4. Селекционировать выделенные бактериофаги, отвечающие требованиям, предъявляемым к индикаторным биопрепаратам, и сконструировать специфический индикаторный биопрепарат из активных штаммов бактериофагов.

5. С использованием сконструированного биопрепарата, разработать и апробировать схему ускоренной индикации и идентификации бактерий вида *K. oxytoca*.

Научная новизна. Впервые предложена комплексная схема выделения и идентификации бактерий вида *K. oxytoca*, включающая использование дифференциально-диагностической среды KL-1 УГСХА, системы бактериологических тестов и сконструированного фагового биопрепарата. Получены новые штаммы бактериофагов, активные в отношении бактерий вида *K. oxytoca*, выделенные из объектов внешней среды. Подобраны оптимальные параметры схемы постановки реакции нарастания титра фага (РНФ) бактерий

вида *K. oxytoca*, позволяющие проводить ускоренную индикацию искомого микроорганизма в различном материале.

Теоретическая и практическая значимость работы. Сконструирована дифференциально-диагностическая среда KL-1 УГСХА и подобрана система бактериологических тестов, позволяющих выделить и типировать бактерии рода *Klebsiella* до вида *K. oxytoca* за 72 часа. Предложены новые штаммы бактериофагов (Кох-9 УГСХА и Кох-11 УГСХА) для конструирования индикаторного биопрепарата.

Разработаны методические рекомендации по выделению и идентификации бактерий вида *K. oxytoca* из объектов ветеринарно - санитарного надзора. Разработаны методические рекомендации по ускоренной индикации и идентификации бактерий вида *K. oxytoca* в объектах ветеринарно - санитарного надзора с применением специфических бактериофагов. Разработана временная инструкция по изготовлению и контролю лабораторной серии индикаторных бактериофагов *K. oxytoca*: Кох-9 УГСХА и Кох-11 УГСХА.

Материалы диссертационного исследования используются в учебном процессе при чтении лекций и проведении практических занятий Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия имени П.А. Столыпина» и Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Ульяновский государственный педагогический университет имени И.Н. Ульянова».

Методология и методы исследования. Методологическую основу работы составили анализ литературы по проблеме и традиционные общепринятые методики исследований (эксперимент). В работе использовали методы: микробиологические, биотехнологические, с последующей компьютерной статистической обработкой и научным анализом полученных данных.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Схема ускоренной идентификации бактерий вида *K. oxytoca* на основе дифференциально-диагностической среды KL-1 УГСХА с системой бактериологических тестов позволяет выделить и идентифицировать бактерии данного вида за 72 часа.

2. Схема выделения бактериофагов *K. oxytoca*, позволяющая выделить изоляты фагов, активных в отношении данного вида.

3. Биологические свойства селекционированных бактериофагов соответствуют свойствам, предъявляемым к свойствам индикаторного биопрепарата.

4. Схема ускоренной идентификации бактерий вида *K. oxytoca* на основе дифференциально-диагностической среды KL-1 УГСХА с использованием сконструированного фагового биопрепарата позволяет выделить и идентифицировать бактерии данного вида за 48 часов.

5. Схема ускоренной индикации бактерий вида *K. oxytoca* позволяет обнаружить в РНФ штаммы клебсиелл в минимальной концентрации 10^3 м.к./мл за 22 часа.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность полученных результатов обусловлена значительным объемом экспериментального материала, полученного за счет правильного подбора и применения методик исследований. Диссертационные исследования проведены при финансовой поддержке «Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере» (договор № 1636 ГУ1/2014 от 07.03.2014).

Материалы диссертации доложены и обсуждены на следующих конференциях: Международный молодежный научный аграрный форум «Наука, инновации и международное сотрудничество молодых ученых» (17-20 сентября 2014, Ульяновск), Вторая научно-практическая конференция с международным участием «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности» (22-24 сентября 2014, Санкт-Петербург), Международная научно-практическая конференция «Биотехнология: реальность и перспективы» (1-3 декабря 2014, Саратов), Международная научно-практическая конференция «Актуальные вопросы контроля инфекционных болезней животных» (11-12 декабря 2014, Покров), Международная научно-практическая конференция «Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения» (5-6 февраля 2015, Ульяновск), Международная научно-практическая конференция «Вклад молодых ученых в аграрную науку» (22-23 апреля 2015, Кинель), VII Международная научно-практическая конференция «Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения» (4-5 февраля 2016, Ульяновск), Международная научно-практическая Интернет-конференция «Современное экологическое состояние природной среды и научно-практические аспекты рационального природопользования» (29 февраля 2016, Астрахань), Третья научно-практическая конференция с международным участием «Бактериофаги. Теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности» (13-15 октября 2016, Москва), VIII Международная научно-практическая конференция «Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения» (7-8 февраля 2017, Ульяновск).

По теме диссертации опубликовано 23 работы, из них 3 в изданиях, рекомендованных ВАК РФ.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследований, результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов, практических предложений, списка сокращений и условных обозначений, списка использованной литературы, списка иллюстративного материала, приложений. Материалы диссертации изложены на 165 страницах, включают в себя 43 таблицы и 55 рисунков.

2 ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

2.1 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования были проведены в период 2013-2017 гг. на базе кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы ФГБОУ ВО Ульяновская ГСХА.

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*.

Изучение биологических свойств референс-штамма *K. oxytoca* ATCC 8724 проводили согласно методике А.С. Лабинской (1978), Ф. Герхарда (1984), Е.А. Булькановой (2006), также в дополнении использовали тесты, изложенные в определителе бактерий «Bergey's Manual of Systematic Bacteriology» (2005). Приготовление и стерилизация питательных сред, а также окраска мазков, приготовление разведений и суспензий, посев на питательные среды проводили согласно нормативным документам. Контроль разработанной питательной среды проводили согласно МУК 4.2.2316-08 «Методы контроля бактериологических питательных сред». Подготовительные этапы по выделению и идентификации бактерий рода *Klebsiella* проводили в соответствии с «Методическими указаниями по бактериологической диагностике смешанной кишечной инфекции молодняка животных, вызываемой патогенными энтеробактериями», утвержденными Департаментом ветеринарии МСХ и П РФ (1999).

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 Грациа (по Булькановой Е.А., 2006; Журавской Н.П., 2013, Феоктистовой Н.А., 2013). Литическую активность фагов определяли методами Аппельмана и Грациа (по Ревенко И.П., 1978). 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).

Статистическую обработку результатов исследований проводили общепринятыми методами с использованием специальных прикладных программ Microsoft Office Excel 2007 и STASTICA 12. Вычисляли значение средней арифметической (M), ошибки репрезентативности (m), доверительный коэффициент (по Стьюденту, t) и степени вероятности (P). Достоверным считали различия при $P \leq 0,05$. Общая схема научных исследований по теме диссертационной работы приведена на рисунке 1.

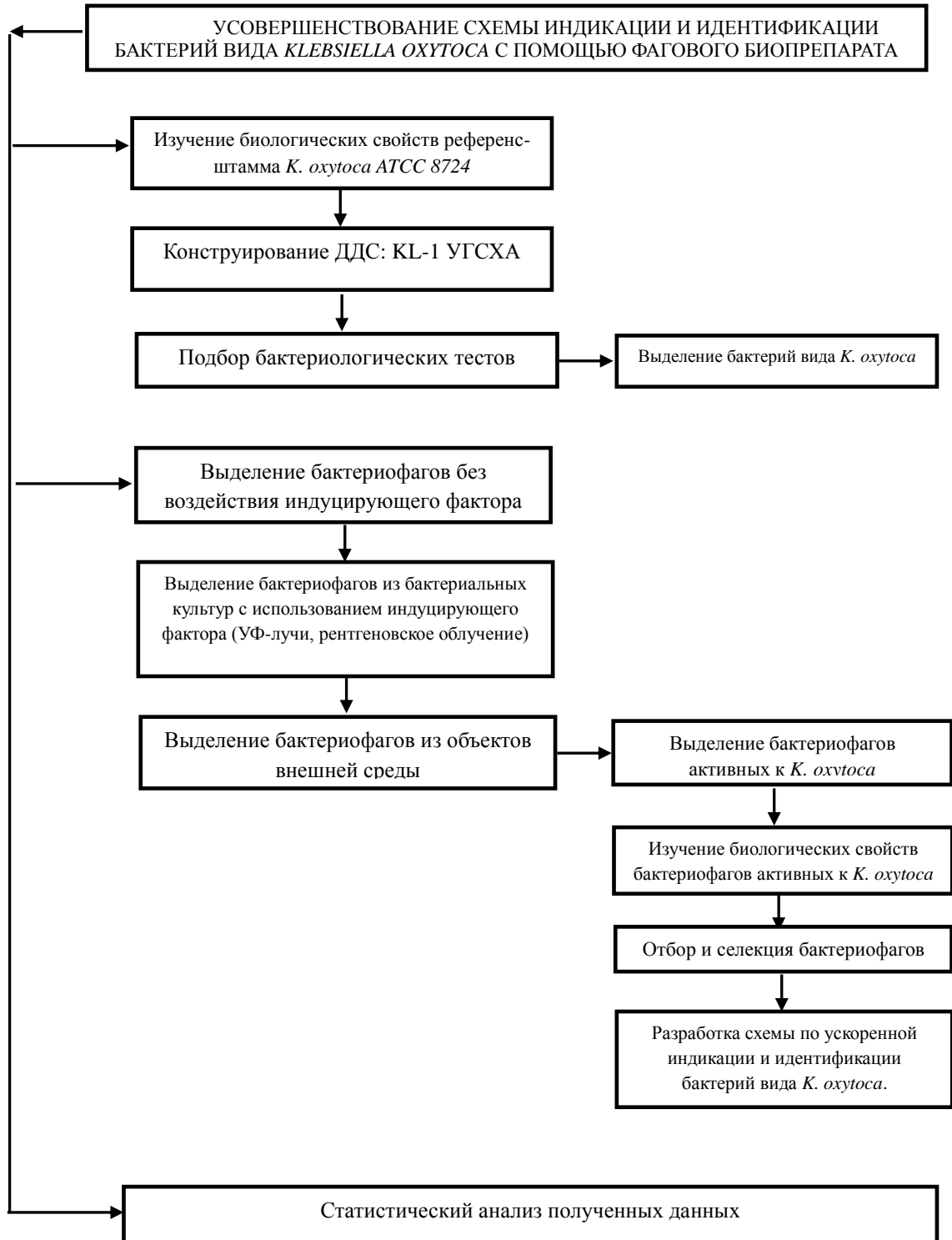


Рисунок 1 - Общая схема научных исследований

2.2 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.2.1 Изучение биологических свойств бактерий вида *K. oxytoca*

2.2.1.1 Изучение морфологических и тинкториальных свойств *K. oxytoca*

Для изучения морфологических и тинкториальных свойств *K. oxytoca* ATCC 8724 готовили мазки со скошенного мясопептонного агара и проводили окраску сложным методом (по Граму). Изучаемый штамм имеет вид коротких толстых грамотрицательных палочек неправильной овальной формы, расположенных отдельно друг от друга или небольшими цепочками. Возможность образование капсулы изучали по методу Бурри-Гинса. По Бурри-Гинсу штамм *K. oxytoca* ATCC 8724 образовывал четко выраженную капсулу.

2.2.1.2 Изучение культуральных свойств *K. oxytoca*

На МПА штамм *K. oxytoca* ATCC 8724 через 24 часа культивирования образовывал выпуклые, светло-бежевого цвета колонии слизистой консистенции, правильной округлой формы, с ровными краями, диаметр колоний 2,0-3,5 мм. Через 48 часов культивирования колонии увеличивались в размере и достигали в диаметре 4 мм. На среде Эндо - штамм *K. oxytoca* ATCC 8724 образовывал выпуклые ярко-розовые с более темной окраской в центре слизистые колонии, правильной округлой формы, с ровными краями, диаметр колоний 2,0-3,0 мм. Цвет среды под местом посева приобрел ярко-малиновый цвет (аналогичный цвету колоний), что говорит о ферментации микроорганизмом лактозы. На среде Левина - штамм *K. oxytoca* ATCC 8724 образовывал выпуклые сине-фиолетовые колонии, правильной округлой формы, с ровными краями, диаметром 1,0-3,0 мм. На среде Плоскирева - штамм *K. oxytoca* ATCC 8724 образовывал выпуклые бледно-желтые колонии, правильной округлой формы, с ровными краями, диаметром 2,0-3,0 мм. На среде Chromogenic Urine Agar II изучаемый штамм образовывал синие колонии с металлическим блеском, правильной округлой формы, с ровными краями, диаметром 2,0-2,5 мм. На среде CLED Agar штамм *K. oxytoca* ATCC 8724 образовывал колонии бледно-желтого цвета, правильной формы, диаметром 2,0 мм. На среде Лурия-Бертани (по Миллеру) отмечался обильный рост. Бактерии образовывали слизистые колонии правильной округлой формы от бежевого до светло-желтого цвета, диаметром 2,0-4,0 мм. Изучение ростовых свойств клебсиелл продолжали на соевом агаре. На соевом агаре отмечали формирование бежевых слизистых колоний правильной округлой формы, размером 2,0-3,0 мм.

2.2.1.3 Изучение биохимических свойств *K. oxytoca*

При изучении биохимических свойств референс-штамма *K. oxytoca* ATCC 8724 были отмечены особенности, характерные для данного вида микроорганизма: отсутствие подвижности (при посеве в 0,7% агар), положительная реакция на индол и редукцию нитратов, отсутствие протеолитической способности (разжижение желатины), отсутствие способности образовывать сероводород, утилизация цитратов, отмечена сахаролитическая активность.

2.2.2 Оптимизация схемы выделения и идентификации бактерий вида *K. oxytoca*

Оптимизация схемы выделения и идентификации заключалась в конструировании новой дифференциально-диагностической среды для одноэтапного выделения бактерий рода *Klebsiella* и подборе комплекса бактериологических тестов для идентификации микроорганизма до вида *K. oxytoca*. Питательную основу разрабатываемой среды, а также количественные соотношения подбирали экспериментально.

Агар-агар - загуститель, твердая основа разрабатываемой среды. Пептон содержит высокий уровень аминокислот. Дрожжевой экстракт - источник органического азота, углерода и витаминов.

При конструировании среды было решено использовать свойство бактерий рода *Klebsiella* ферментировать лактозу. Также лактоза выступает единственным источником углерода и может способствовать увеличению размеров колоний.

Для возможности дифференциации энтеробактерий на конструируемой среде, определяли предельную подавляющую концентрацию индикаторов-красителей. Совместное использование бромтимолового синего и фуксина в среде с лактозой составляет индикаторную рН-систему, назначение которой дифференциация бактерий - ассоциантов по разнице в цвете образываемых колоний и изменении окраски самой среды.

Из анализа литературных данных следует, что соли калия стимулируют синтез микробной клетки бактерий рода *Klebsiella* и являются источником необходимого азота, а для образования бактериальных белков используют соли содержащие серу. Изучение антибиотикочувствительности штаммов *K. oxytoca* ATCC 8724 и *K. pneumoniae* ATCC 13883, определило в качестве ингибитора посторонней микрофлоры антибиотик цефотаксим.

Состав среды KL-1 УГСХА: лактоза – 15,0-17 г, пептон – 15,0-20,0 г, дрожжевой экстракт- 4,0-5,0 г, цефотаксим – 0,0015 г, магний серноокислый – 0,15-0,20 г, азотнокислый калий- 1,8-2,0 г, бромтимоловый синий – 0,05-0,06 г,

фуксин основной- 0,05 г, агар-агар – 15,0-17,0 г, вода дистиллированная – 1000 мл.

Схема приготовления среды: агар-агар, дрожжевой экстракт и пептон вносили в 1000 мл дистиллированной воды. Последовательно вносили сульфат магния, нитрат калия. Полученную смесь прогревали (постоянно помешивая) до кипения. Устанавливали pH. Смесь стерилизовали при 1,1 атм., в течение 15 минут. После стерилизации и остывания среды (до 45-46 °С), в асептических условиях вносили бромтимоловый синий, фуксин основной, цефотаксим и навеску лактозы, разливали в чашки Петри. Цвет готовой среды: темно-зеленый.

Штамм *K. oxytoca* ATCC 8724 при росте на данной среде формировал слизистые колонии круглой формы, оранжевого цвета, диаметром 1,0-2,5 мм. Штамм *K. pneumoniae* ATCC 13883 образовывал колонии правильной формы оранжевого цвета, размером 2-3 мм. Проверка специфичности использования среды KL-1 УГСХА, заключалась в посеве на нее представителей семейства *Enterobacteriaceae* (*Escherichia*, *Proteus*, *Serratia*, *Yersinia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Hafnia*) (рисунок 2).

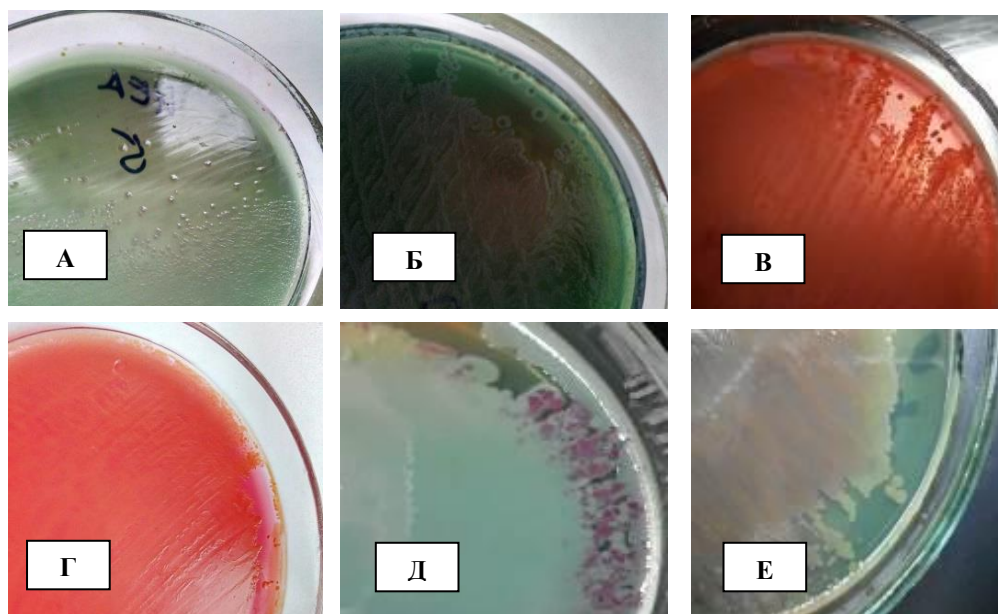


Рисунок 2 - Рост представителей семейства *Enterobacteriaceae* на среде KL-1 УГСХА (48 часов культивирования): А) *Yersinia*; Б) *Hafnia*; В) *Escherichia*; Г) *Citrobacter*; Д) *Serratia*; Е) *Enterobacter*

Использование данной среды значительно упрощает идентификацию клебсиелл, приобретающих при росте на среде специфическое окрашивание бактериальных колоний. Преимущество данной среды состоит: в выраженном отличии колоний бактерий рода *Klebsiella* по окраске (что облегчает идентификацию); меньшее количество компонентов (по сравнению с имеющимися в практике средами).

2.2.3 Выделение бактерий *K. oxytoca* из объектов ветеринарно-санитарного надзора, патологического материала и объектов внешней среды

Выделение бактерий *K. oxytoca* заключалось в анализе роста бактерий на среде KL-1 УГСХА, в оценке соответствия морфологическим признакам (окраска по Граму) и биохимическим показателям. В качестве объектов для исследования использовали пробы продуктов питания, пробы сточных вод, пробы воды открытых водоемов (озера, реки, пруды), пробы фекалий больных и здоровых животных (коровы, свиньи, лошади) и людей, патологический материал павших животных (содержимое кишечника), пробы почвы. Анализ результатов исследования (сравнение результатов биохимических реакций с показателями биохимической активности референс-штамма *K. oxytoca* ATCC 8724) позволил нам выделить 24 штамма искомого микроорганизма из 318 проанализированных проб.

2.2.4 Методы выделения и изучения биологических свойств бактериофагов *K. oxytoca*

При проведении исследований использовали наиболее часто 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, являющимся 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*.

Морфологию негативных колоний изучали в разведении фага (10^{-7} – 10^{-10}) с индикаторной культурой *K. oxytoca* методом агаровых слоев по Грациа (рисунок 3).

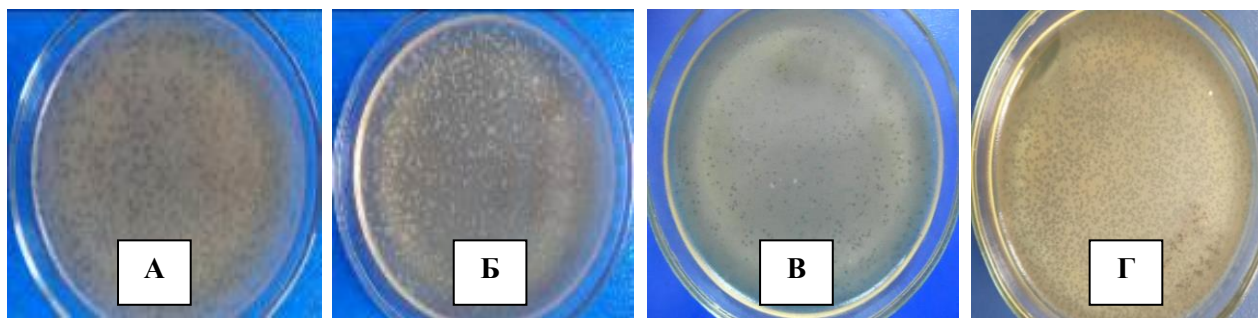


Рисунок 3 - Формирование негативных колоний выделенными фагами: А) Кох-9 УГСХА; Б) Кох-11 УГСХА; В) Кох-7 УГСХА; Г) Кох-8 УГСХА

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.

Литическая активность бактериофагов оценивали по его способности вызывать лизис бактериальной культуры в жидких и на плотных питательных средах. Величину литической активности по Аппельману выражали максимальным разведением, в котором испытуемый фаг проявил свое литическое действие. Наиболее точным в определении литической активности бактериофагов считается метод Грациа, который заключается в определении количества активных корпускул фага в единице объема. 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 Грациа.

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 изучаемых 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.

Изучение специфичности фагов заключалось 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 бактерий: *K. pneumoniae* ATCC 13883, *K. pneumoniae* 244, *K. pneumoniae* 81, *K. pneumoniae* 5006, *K. pneumoniae* 5007, *K. pneumoniae* 45, *K. pneumoniae* 76, *E. coli* 52, *E. coli* 383, *E. coli* ATCC 25922, *P. mirabilis* 16, *P. mirabilis* 4/2 3“II”, *C. freundii* 14, *C. freundii* 37, *S. marcescens* ATCC 13800, *S. liquefaciens* 16, *Y. pseudotuberculosis* № 19 ВИЭВ, *Y. pseudotuberculosis* 01 №7, *Y. pseudotuberculosis* 0630, *Y. pseudotuberculosis* ВИЭВ

III, *Y. pseudotuberculosis* РЯЗ, *E. cloacae* 397, *H. alvei* 10. 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).

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

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).

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

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*.

2.2.5 Оптимизация технологических параметров изготовления и контроля индикаторного биопрепарата на основе специфичных бактериофагов *K. oxytoca*

В качестве индикаторных культур для фага Кох-9 УГСХА использовали штамм *K. oxytoca* 86, для фага Кох-11 УГСХА – штамм *K. oxytoca* 124. Штаммы бактерий *K. oxytoca* 86 и *K. oxytoca* 124 обладают характерными для своего вида морфологическими, биохимическими и культуральными свойствами: являются неподвижными, грамотрицательными, образующими капсулу микроорганизмами, с выраженной ферментативной активностью. Для повышения активности индикаторных бактериофагов проводили пассажи. Оптимальное время пассажа бактериофагов Кох-9 УГСХА и Кох-11 УГСХА составляет 4 часа. Оптимальной температурой культивирования изучаемых фагов является 37°C. Оптимальным количественным соотношением фагов и индикаторных культур *K. oxytoca* является 0,2:0,2.

2.2.6 Подбор оптимальных условий постановки РНФ

Определение количественного показателя 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).

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

Длительность инкубирования исследуемого материала с бактериофагом, час	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

В результате проведенных исследований установлено, что РНФ с предварительным подращиванием материала является одинаково чувствительной по сравнению с РНФ без подращивания, 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)).

2.2.7 Подбор параметров РНФ для индикации бактерий вида *K. oxytoca* в объектах ветеринарно-санитарного надзора

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 4).

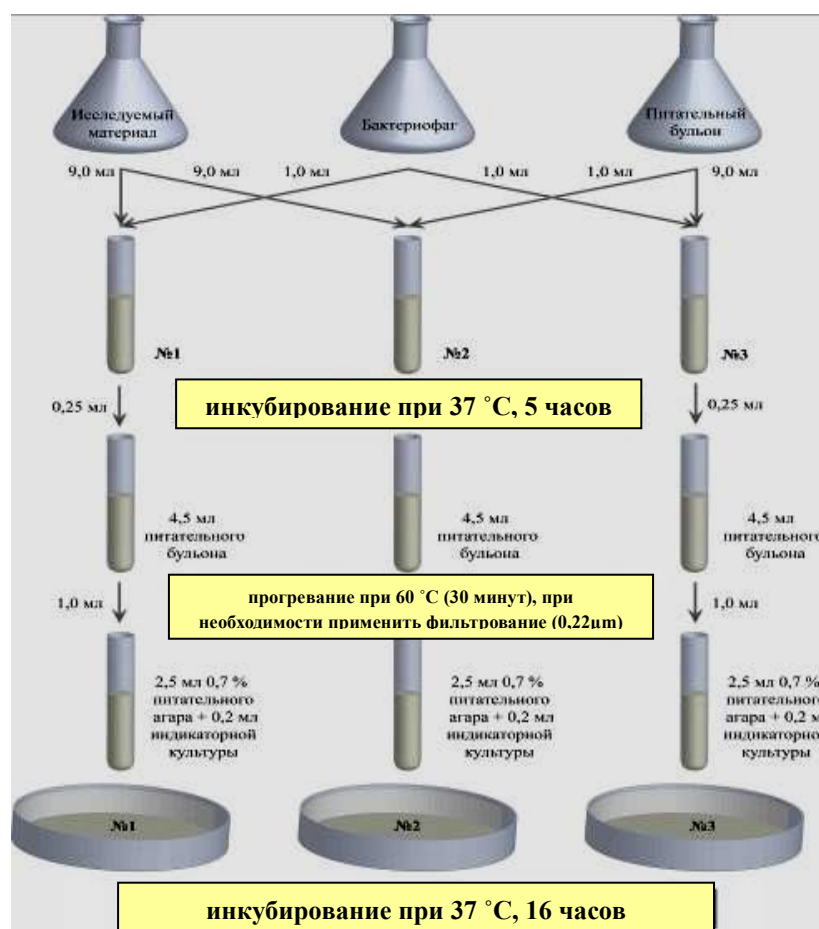


Рисунок 4 - Предлагаемая схема постановки реакции нарастания титра фага

Одновременно проводили исследования бактериологическим методом. Результаты проведенных исследований с помощью бактериофагов Кох-9 УГСХА и Кох-11 УГСХА мясопептонного бульона, водопроводной воды, фекалий, 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 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*.

3 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенных исследований и их анализ позволяют сделать следующие выводы:

1. Разработана схема ускоренной идентификации на основе дифференциально-диагностической среды KL-1 УГСХА, системы бактериологических тестов, позволяющая выделить и идентифицировать бактерии вида *K. oxytoca* за 72 часа. Из 318 происследованных проб, отобранных из объектов ветеринарно-санитарного надзора, патологического материала и объектов внешней среды нами было изолировано и идентифицировано 24 штамма бактерий вида *K. oxytoca*.

2. Адаптирована схема выделения бактериофагов, которая позволила выделить 15 изолятов фагов, активных в отношении бактерий вида *K. oxytoca*.

3. Изучены биологические свойства выделенных фагов: литическая активность фагов варьировала в пределах 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 Грациа. Фаги Кох-9 и Кох-11 лизировали 75,0% и 62,5% всех изучаемых штаммов соответственно. Совместный спектр их действия составил 79,2%. Установлено отсутствие активности выделенных фагов по отношению к гетерологичным родам и видам, что подтверждает специфичность селекционированных фагов. Бактериофаги устойчивы к воздействию температуры в диапазоне 54-68 °С (Кох-9 УГСХА) и

54-77 °С (Кох-11 УГСХА) в течении 30 минут и воздействию хлороформа в течении 20 минут при соотношении 1:10.

4. Для конструирования фагового биопрепарата по заданным параметрам селекционированы бактериофаги и подобраны параметры изготовления и контроля бактериофагов, которые позволяют получить специфический индикаторный биопрепарат фаговой природы с высокой литической активностью, состоящий из смеси штаммов бактериофагов Кох-9 УГСХА и Кох-11 УГСХА.

5. Предлагаемая схема ускоренной индикации бактерий вида *K. oxytoca* методом РНФ с использованием биопрепарата на основе выделенных и селекционированных фагов Кох-9 УГСХА и Кох-11 УГСХА позволяет идентифицировать штаммы бактерий вида *K. oxytoca* в минимальной концентрации 10^3 м.к./мл за 22 часа.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. Усовершенствованная бактериологическая схема выделения и идентификации бактерий вида *K. oxytoca*, основанная на дифференциально-диагностической среде, подобранных бактериологических тестах позволяет выделить бактерии искомого вида за 72 часа, а использование в схеме фагового биопрепарата сокращает время исследования до 48 часов. Данную схему предлагаем к использованию бактериологическим лабораториям при выделении бактерий вида *K. oxytoca*.

2. Предложен индикаторный биопрепарат, состоящий из смеси строго специфичных фагов Кох-9 УГСХА и Кох-11 УГСХА, для ускоренной индикации и идентификации бактерий вида *K. oxytoca* в объектах ветеринарно-санитарного надзора с помощью РНФ.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

В последние годы возросла роль условно-патогенных энтеробактерий в патологии животных и человека, в том числе представителей рода *Klebsiella* (в частности бактерий вида *K. oxytoca*). Бактерии вида *K. oxytoca* способны вызывать тяжело протекающие инфекционные заболевания, воспалительные процессы, пищевые и кормовые отравления. Проблема становится более актуальной на фоне возрастания множественной резистентности этого возбудителя к антибактериальным препаратам.

Успех борьбы с любым заболеванием зависит от своевременной диагностики, поэтому разработке новых методов индикации и идентификации клебсиелл уделяется большое внимание. Одним из эффективных методов обнаружения патогенных микроорганизмов, позволяющих ускорить процесс диагностики, является фагоиндикация и фагоидентификация.

Поскольку в арсенале врачей ветеринарных лабораторий отсутствуют диагностические фаговые биопрепараты, специфичные для энтеробактерий вида *K. oxytoca*, а полученные нами данные позволяют ускорить и удешевить процесс диагностики заболеваний вызванных этим микроорганизмом, то перспективным становится направление по разработке и утверждению в установленном порядке инструктивных документов по их изготовлению и применению, организации производства и широкому использованию индикаторных клебсиеллезных бактериофагов.

Выделенные и изученные изоляты бактериофагов, при условии их соответствия предъявляемым требованиям, могут быть использованы для конструирования лечебно-профилактических биопрепаратов, в том числе в комплексе с другими представителями энтеробактерий.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК РФ

1. Васильев, Д.А. Сравнительная эффективность методов выделения бактериофагов *Klebsiella oxytoca* / Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин, **Г.Р. Садртдинова** // Вестник Ульяновской сельскохозяйственной академии. - 2016. - № 4 (32). - С. 68-72.

2. Садртдинова, Г.Р. Выделение бактериофага бактерий *Klebsiella oxytoca* под действием рентгеновского облучения / **Г.Р. Садртдинова**, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин // Вестник Ульяновской сельскохозяйственной академии. - 2015.- № 1 (33). - С. 76-81.

3. Садртдинова, Г.Р. Sanitary assessment of environmental objects by isolation of virulent phages / **Г.Р. Садртдинова**, Л.П. Пульчеровская, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин // Russian journal of agricultural and socio-economic sciences. - 2016. - Т. 58, № 10. - С. 165-170.

Публикации в прочих изданиях

4. Садртдинова, Г.Р. Бактериофаги клебсиелл: их роль и значение // Молодежь и наука XXI века: Материалы IV международной научно-практической конференции молодых ученых. - Ульяновск: Ульяновская ГСХА, 2014. - Т. 1. - С. 115-121.

5. Садртдинова, Г.Р. Повышение селективных и дифференциально-диагностических свойств плотной агаровой среды, предназначенной для выделения бактерий рода *Klebsiella* // Молодежь и наука XXI века: Материалы IV международной научно-практической конференции молодых ученых. - Ульяновск: Ульяновская ГСХА, 2014. - Т. 1. - С. 122-127.

6. Садртдинова, Г.Р. Изучение культуральных свойств бактерий вида *Klebsiella oxytoca* / **Г.Р. Садртдинова, Е.А. Ляшенко, Д.А. Васильев** // Биотехнология: реальность и перспективы: Материалы международной научно-практической конференции. - Саратов: Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова, 2014. - С. 193-196.

7. Садртдинова, Г.Р. Биохимические тесты для ускоренной внутриродовой детекции бактерий *Klebsiella* / **Г.Р. Садртдинова, Д.А. Васильев** // Электронный периодический научный журнал «SCI-ARTICLE.RU». - 2015. - №17. - С. 11-15.

8. Садртдинова, Г.Р. Изучение резистентности бактерий рода *Klebsiella* к антибиотикам // Молодежь и инновации- 2015: Материалы международной научно-практической конференции. - Горки: Белорусская Государственная Сельскохозяйственная Академия, 2015. - С. 38-41.

9. Садртдинова, Г.Р. Влияние физических и химических факторов на ростовые показатели бактерий *Klebsiella oxytoca* и *Klebsiella pneumoniae* // Вклад молодых ученых в аграрную науку: Материалы международной научно-практической конференции. - Кинель: РИЦ СГСХА, 2015. - С. 131-136.

10. Садртдинова, Г.Р. Индукция профага *Klebsiella oxytoca* ультрафиолетовым облучением / **Г.Р. Садртдинова, Н.Н. Карамышева** // Современные аспекты инновационного развития отраслей АПК: Материалы международной научно-практической конференции. - Барнаул: РИО Алтайского ГАУ, 2015. - Т.1. - С. 293-296.

11. Садртдинова, Г.Р. Выделение бактериофага *Klebsiella oxytoca* методом индукции / **Г.Р. Садртдинова, Д.А. Васильев** // Актуальные проблемы биологии, биотехнологии, экологии и биобезопасности: Материалы международной научно-практической конференции, посвященной 80-летию заслуженного ученого, профессора В.Л. Зайцева. - Kiik-LTD, 2015. - С. 258-260.

12. Садртдинова, Г.Р. Изучение антибиотикочувствительности штаммов бактерии *Klebsiella oxytoca*, выделенных из трупов домашней птицы // Аграрная наука в условиях модернизации и инновационного развития АПК России: Материалы всероссийской научно-методической конференции с международным участием, посвященной 85-летию Ивановской государственной сельскохозяйственной академии имени Д.К. Беляева. - Иваново: Ивановская государственная сельскохозяйственная академия им. Д.К. Беляева, 2015. - Т.3. - С. 90-92.

13. Садртдинова, Г.Р. Агрегация бактерий *Klebsiella oxytoca* и *Klebsiella pneumoniae* под влиянием химического фактора // Инфекция и иммунитет. - 2015. - № 4. - С. 377-381.

14. Садртдинова, Г.Р. Биохимическая активность бактерий вида *Klebsiella oxytoca* / **Г.Р. Садртдинова, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин** // Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения: Материалы VII международной научно-практической конференции. - Ульяновск: УГСХА, 2016. - Т. III. - С. 261-265.

15. Садртдинова, Г.Р. Создание селективной среды для выделения, дифференцирования и идентификации бактерий рода *Klebsiella* / **Г.Р. Садртдинова, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин** // Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения: Материалы

VII международной научно-практической конференции. - Ульяновск: УГСХА, 2016. - Т. III. - С. 270-275.

16. Садртдинова, Г.Р. Селекция выделенных клонов бактериофагов, активных к *Klebsiella oxytoca* // Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения: Материалы VII международной научно-практической конференции. - Ульяновск: УГСХА, 2016. - Т. III. – С. 266-269.

17. Садртдинова, Г.Р. Изучение лизогении штаммов бактерий вида *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 3-й научно-практической конференции с международным участием. - Москва: Медицинское маркетинговое агентство, 2016. - С. 83.

18. 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 3-й научно-практической конференции с международным участием. - Москва: Медицинское маркетинговое агентство, 2016. - С. 82.

19. Садртдинова, Г.Р. Оценка качества внешней среды методом выделения из неё фагов / **Г.Р. Садртдинова**, Л.П. Пульчеровская, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин // Биодиагностика состояния природных и природно-техногенных систем: Материалы XIV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. - Киров: ООО «Издательство «Радуга-ПРЕСС», 2016. - С. 221-225.

20. Садртдинова, Г.Р. Эффективность использования гектоенового энтеро-агара идентификации бактерий *Klebsiella oxytoca* // Достижения молодых ученых в ветеринарную практику: Материалы IV Международной научной конференции, посвященной 55-летию аспирантуры ФГБУ «ВНИИЗЖ», 6 декабря 2016 г. / под редакцией Д.А. Лозового. - Владимир: ФГБУ «ВНИИЗЖ», 2016. - С. 134-137.

21. Садртдинова, Г.Р. Гемолитические свойства бактерий рода *Klebsiella* // Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения: Материалы VIII международной научно-практической конференции. - Ульяновск, УГСХА, 2017. - Ч. III. - С. 240-243.

22. Садртдинова, Г.Р. Хлороформустойчивость вирулентных бактериофагов *K. oxytoca* // Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения: Материалы VIII международной научно-практической конференции- Ульяновск, УГСХА, 2017. - Ч. III. - С. 251-254.

23. Садртдинова, Г.Р. Эффективность использования питательных сред при первичной диагностике бактерий вида *Klebsiella oxytoca* / **Г.Р. Садртдинова**, Д.А. Васильев // Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения: Материалы VIII международной научно-практической конференции. - Ульяновск, УГСХА, 2017. - Ч. III. - С. 255-260.

Отпечатано в типографии
Ульяновской ГСХА им. П.А. Столыпина
Подписано в печать Формат 60x841/16
Бумага офсетная. Печать цифровая.
Усл.печ.л. 1,0 Заказ . Тираж 100 экз.
432980, г. Ульяновск, бульвар Новый Венец, 1.