

На правах рукописи



Насибуллин Ильдар Равильевич

**ИНДИКАЦИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ *AEROMONAS HYDROPHILA*
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИОПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ
СПЕЦИФИЧЕСКОГО БАКТЕРИОФАГА**

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

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Саратов–2020

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Ульяновский государственный аграрный университет имени П.А. Столыпина»

Научный руководитель: доктор медицинских наук, профессор
Нафеев Александр Анатольевич

Официальные оппоненты: **Цыбанов Содном Жамьянович,**
доктор биологических наук, профессор,
ФГБНУ «Федеральный исследовательский
центр вирусологии и микробиологии»,
заведующий лабораторией генодиагностики

Куликов Евгений Евгеньевич
кандидат биологических наук, доцент,
ФГУ «Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук» Институт
микробиологии РАН им. С.Н. Виноградского,
старший научный сотрудник лаборатории
микроорганизмов

Ведущая организация: ФГБОУ ВО «Казанская государственная
академия ветеринарной медицины
имени Н.Э. Баумана»

Защита состоится «_____» _____ 2020 года в _____⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 220.061.07 на базе ФГБОУ ВО «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова», по адресу: 410005, г. Саратов, ул. Соколова, 335; УК № 3, диссертационный зал.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО «Саратовский ГАУ» и на сайте www.sgau.ru.

Отзывы направлять по адресу: 410012, г. Саратов, Театральная пл., 1, ученому секретарю диссертационного совета.

Автореферат разослан «_____» _____ 2020 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор биологических наук, профессор Карпунина Лидия Владимировна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Насчитывающая более 100 лет история изучения бактерий рода *Aeromonas* активно продолжается и в наши дни (Janda J.M. et al., 2010). За последние 30 – 40 лет данный род пополнился новыми видами и благодаря молекулярно-генетическим исследованиям был выделен в отдельное семейство (Figueras M.J., 2000; Janda J.M. et al., 2007). Бактерии рода *Aeromonas* широко распространены в биосфере (Hazen T.C., 1978; Janda J.M., et al., 1998). Их активно выделяют из речной и морской воды (Holmes P., 1996; Khardori N. et al., 1988), сточных вод (Edberg S.C., 2007), гидробионтов (Щедрина Н.А., 2004), продуктов питания (Garcia F., 2009), домашних животных (Gosling P.J., 1996), птиц (Shane S.M., 1985), почвы (Singh D.V., 1992), беспозвоночных (Agger W.A., 1985; Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2005), насекомых (Boillard J., 1984), растений (Khardori N., 1988). Данный микроорганизм обладает широким набором факторов вирулентности обеспечивающих его патогенность и способен вызывать опасные заболевания, как у человека, так и у животных (Петровская В.Г., 1967; Nishikawa Y., 1991; Singh D.V., 1992; Zhang Y.L., 2000; von Graevenitz A., 2007). Активно размножаясь при низких температурах и вызывая порчу продуктов, бактерии *A. hydrophila* являются возбудителями пищевой инфекции (Калина Г.П., 1982; Бухарин О.В., 2000). Вызываемый данной бактерией аэромоноз рыб приводит к массовой гибели рыб и наносит тем самым экономический ущерб рыбоводческим хозяйствам стран (Грищенко Л.И., 1999; Osborne J.A., 1989; Austin B. Et al., 1996).

Степень разработанности темы исследования. Широкая распространенность бактерий рода *Aeromonas*, полиморфизм клиники, внутривидовая схожесть требуют от лабораторий быстрой и точной индикации и идентификации данного микроорганизма (Покровский В.И., 1993, 1999). Существующие на данный момент методики индикации и идентификации бактерий *Aeromonas hydrophila* по разным причинам недостаточно решают эту проблему (Методические указания 1987, 1997, 1999; Покровский В.И. и соавт. 2001; Abbott S.L., 2003).

Одним из методов позволяющих за короткий срок без больших затрат материалов и времени произвести индикацию и идентификацию бактерий является метод фагодиагностики (Бакулов И.А. и др., 1998; Золотухин С.Н., 2007). В нашей стране проблема выделения бактериофагов активных в отношении бактерий *Aeromonas hydrophila* и применения их для индикации и идентификации этих микроорганизмов ранее не исследовалась, исходя из

этого, решение этой задачи является актуальной и представляет научный и практический интерес.

Цель работы – разработка метода индикации и идентификации бактерий *Aeromonas hydrophila* с использованием биопрепарата на основе специфического бактериофага.

Задачи исследования:

1. Выделить из объектов ветеринарного надзора бактерии *Aeromonas hydrophila* и изучить их основные биологические свойства.

2. Выделить бактериофаги бактерий *Aeromonas hydrophila*, изучить их основные биологические и генетические свойства.

3. Селекционировать и сконструировать фаговый биопрепарат на основе выделенных бактериофагов в соответствии с требованиями, предъявляемыми к индикаторным биопрепаратам.

4. Разработать схему ускоренной индикации и идентификации *Aeromonas hydrophila* в объектах ветеринарного надзора методом РНФ с помощью сконструированного биопрепарата.

5. Провести полногеномное секвенирование бактериофага F 43-УГСХА для определения наличия потенциальных генетических локусов патогенности.

6. Провести биоинформационный (протеомный) анализ данных секвенирования бактериофага F43-УГСХА.

7. Определить филогенетическое положение бактериофага F43-УГСХА в группе аннотированных в системе NCBI.

8. Разработать схему молекулярно-генетической индикации с использованием ПЦР автономных генетических элементов *hly* в геномах бактериофагов активных в отношении *Aeromonas hydrophila*.

Научная новизна. Выделены новые штаммы бактериофагов активные в отношении *Aeromonas hydrophila*. Изучены основные биологические и генетические свойства выделенных фагов. На основе отобранного бактериофага F43-УГСХА сконструирован биопрепарат для индикации и идентификации *Aeromonas hydrophila*. Предложена схема фаговой идентификации бактерий *Aeromonas hydrophila* из объектов ветеринарного надзора с применением созданного биопрепарата. Разработана и апробирована на объектах ветеринарного надзора схема РНФ для индикации бактерий *Aeromonas hydrophila* с использованием созданного фагового биопрепарата. Проведено полногеномное секвенирование бактериофага для определения наличия потенциальных генетических локусов патогенности, биоинформационный (протеомный) анализ данных секвенирования

бактериофага F43-УГСХА. Определены филогенетическое положение бактериофага F43-УГСХА в группе аннотированных в системе NCBI. Разработана схема молекулярно-генетической индикации с использованием ПЦР автономных генетических элементов *hly* в геномах бактериофагов активных в отношении *Aeromonas hydrophila*.

Теоретическая и практическая значимость работы

Сконструирован биопрепарат с определенными биотехнологическими параметрами для ускоренной индикации и идентификации бактерий *Aeromonas hydrophila* в объектах ветеринарного надзора. Разработанные схемы фагоиндикации и фагодиагностики позволяют сократить время исследований и снизить экономические затраты. Результаты исследований биологических и генетических свойств бактериофага F43-УГСХА, методология применения фагового биопрепарата в идентификации *Aeromonas hydrophila* и схеме реакции нарастания титра фага, подтверждены актами комиссионных испытаний в ФГБОУ ВО УлГАУ им. П. А. Столыпина от 29.09.2020 года.

По материалам диссертации разработана нормативно-техническая документация: «Методические рекомендации по изготовлению и контролю бактериофага F43-УГСХА», «Методические рекомендации по ускоренной индикации бактерий *Aeromonas hydrophila* методом реакции нарастания титра фага в объектах санитарного надзора», «Методические рекомендации по индикации и идентификации бактерий *Aeromonas hydrophila* из объектов внешней среды с помощью биопрепарата F43-УГСХА» (протокол № 3 от 29.09.2020 года). Штаммы полученных бактериофагов вошли в музейную коллекцию вирусных и бактериальных штаммов кафедры МВЭиВСЭ УлГАУ и используются в научно-исследовательской работе кафедры.

Материалы диссертационной работы используются в учебном процессе при чтении лекций, для практических занятий студентов, работы аспирантов на кафедре микробиологии, эпизоотологии, вирусологии и ветеринарно-санитарной экспертизе ФГБОУ ВО Ульяновского государственного аграрного университета имени П.А. Столыпина.

Методология и методы исследования. В методологии исследования использовали теоретико-методологический анализ литературы по теме работы. В ходе проведения работы над диссертацией использовали общепринятые экспериментальные, микробиологические, биотехнологические и молекулярно-генетические методы с последующей компьютерной обработкой данных с использованием методов статистического анализа.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Выделено и селекционировано 5 изолятов специфических бактериофагов *Aeromonas hydrophila*, изучены их основные биологические и молекулярно-генетические свойства.

2. Отобран бактериофаг F43-УГСХА, отвечающий всем требованиям для индикаторных биопрепаратов и на его основе сконструирован бактериофаговый препарат.

3. Схема фагоидентификации бактерий *Aeromonas hydrophila* с применением биопрепарата позволяет определить видовую принадлежность за 36-38 часов.

4. Схема фагоиндикации бактерий *Aeromonas hydrophila* с применением разработанного биопрепарата методом РНФ позволяет обнаружить данные бактерии за 19 – 24 часов в концентрации 10^3 м.к./мл.

5. Молекулярно-генетическими исследованиями бактериофага F 43-УГСХА установлено в геноме фага потенциальных локусов патогенности не выявлено, наиболее близким по филогенетическому положению полного генома и большинства потенциальных фаговых белков является аннотированный бактериофаг Aeh1, активный в отношении бактерий *Aeromonas hydrophila*.

Работа выполнена в ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный аграрный университет имени П.А. Столыпина».

Степень достоверности и апробация работы. Достоверность результатов обусловлена значительным объемом экспериментального материала, полученного с использованием высокоинформативных методов исследования с подтверждением данных математической статистикой.

Материалы диссертации были доложены и обсуждены на: Международных научно-практических конференциях Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии им. П. А. Столыпина (Ульяновск, 2005, 2006, 2008, 2009, 2011, 2013, 2014); Международной научно-практической конференции «Биотехнология. Вода и пищевые продукты» (Москва, 2008); Международной научно-практической конференции Курганской ГСХА (Курган, 2013); Международной научно-практической конференции «Бактериофаги: Теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности» (Ульяновск, 2013), Международной научной конференции «Достижения молодых ученых в ветеринарную практику» (Владимир, 2016).

Публикации. Материалы диссертации опубликованы в 15 работах, из

них 4 статьи в изданиях, рекомендованных ВАК РФ.

Личный вклад соискателя. Автор принимал непосредственное участие в планировании и проведении экспериментов, получении и систематизации данных, апробации результатов исследования. Соискателем лично проведен статистический анализ полученных данных, сформулированы основные положения диссертации, составляющие ее новизну и практическую значимость, подготовлены публикации.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, двух глав: обзора специальной литературы, собственных исследований, состоящих из объектов и методов исследований, обсуждения результатов; а также заключения, выводов, практических предложений, списка использованных литературных источников, приложений. Диссертация изложена на 176 страницах компьютерного текста, включает 34 таблицы, 23 рисунка. Список литературных источников содержит 121 отечественных и 130 зарубежных авторов.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты и материалы исследований

Объектом исследований явились: вода из открытых водоемов Ульяновской области (реки, озера, пруды), сточные воды, гидробионты. Штаммы бактерий полученные из музея кафедры МВЭиВСЭ при ФГБОУ ВО УлГАУ им. П.А. Столыпина»: референс-штамм бактерии *Aeromonas hydrophila* ATCC 49140; *Aeromonas sobria* ATCC9071, *Aeromonas salmonicida* ATCC 33658, *Aeromonas caveae* ATCC 12633; *Escherichia coli* №4, *Klebsiella pneumoniae* №4463, *Citrobacter freundii*, *Bacillus cereus* №2527, *Bacillus subtilis* №6633, *Enterobacter faecalis* №189, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis* №0630, *Pseudomonas aeruginosa* №128, *Providencia rettgeri* №175, *Pseudomonas putida* №12633, *Proteus mirabilis* №523. 14 штаммов *Aeromonas hydrophila*, 5 изолятов бактериофагов *Aeromonas hydrophila*, выделенных из объектов ветеринарно-санитарного надзора. Все перечисленные штаммы бактерий обладают типичными видовыми биологическими свойствами.

Методы

Выделение и идентификацию бактерий *Aeromonas hydrophila* проводили в соответствии с определителем бактерий «Bergey's Manual of Systematic Bacteriology» (2005), «Инструкция по выделению и идентификацией бактерий *Aeromonas hydrophila*», разработанной в ФГБОУ ВО УлГАУ им. П.А. Столыпина Д.А. Васильевым, Т.И. Канаевой (2009),

методическими рекомендациями «Методы исследований объектов окружающей среды и патологического материала на аэромонады», разработанные Московским НИИ гигиены им. Эрисмана (1980). Окраску мазков, приготовление и стерилизацию питательных сред проводили согласно ГОСТ ISO 1113-1-2011. Приготовление суспензий и разведений - ГОСТ Р 51426-99. Посев на питательные среды согласно ГОСТ Р 26670-91. Подготовку и отбор лабораторных проб проводили по ГОСТ Р 26669-85, ГОСТ 31861-2012, ГОСТ 31942-2012. Контроль питательных сред проводили согласно МУК 4.2.2316-08. Выделение бактериофагов и изучение их основных биологических и генетических свойств проводили с помощью методов предложенных Д.М. Гольдфарбом (1961), С.Э. Лурия и соавт. (1970), И.П. Ревенко (1978), В.Я. Ганюшкиным (1988), С.Н. Золотухиным (2006), Н.А. Феоктистовой (2006), Д.А. Викторовым (2011), Е.Н. Семаниной (2012), Э. Каттер (2012). Для получения полноразмерных нуклеотидных последовательностей геномов бактериофагов использовали полногеномное секвенирование ДНК бактериофагов второго поколения (Ion Torrent, Thermo Fisher Scientific, США). Каждый штамм бактериофага был секвенирован троекратно. Данные каждого раунда секвенирования были проанализированы методами биоинформатики. Фильтрация качества прочтений (ридов) позволила собрать геномы бактериофагов с высокой достоверностью. В исследованиях были использованы библиотеки баз данных GeneBank (США), EMBL (Европейская молекулярно-биологическая библиотека), DDBJ (Японская база данных нуклеотидных последовательностей). Для оптимизации протокола полимеразной цепной реакции использовали электрофорез. Статистическую обработку исследовательских результатов осуществляли по стандартным методикам с использованием специальных компьютерных программ *Statistica 12.0, Microsoft Office Excel 2010*.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Выделение и идентификация бактерий *Aeromonas hydrophila*

Первым этапом наших исследований стало выделение и идентификация бактерий *Aeromonas hydrophila* из объектов ветеринарного надзора. Было исследовано более 130 проб. В результате исследований нами было выделено и идентифицировано 14 штаммов *Aeromonas hydrophila*. Все выделенные бактерии прямые палочки с закругленными концами, располагаются поодиночке, парами, цепочками, подвижные, имеют капсулу, на МПА образуют блестящие, полупрозрачные с беловато-желтым оттенком колонии, на среде УГСХА-2 формируют округлые, выпуклые, светло-

бежевые, блестящие колонии 2 – 3 мм в диаметре, в МПБ вызывают равномерное помутнение бульона с образованием серовато-серебристой пленки и хлопьевидного белого осадка, грамотрицательные, оксидазоположительные, разжижают желатин, оптимальная температура роста 37°C.

Выделение бактериофагов *Aeromonas hydrophila*

Вторым этапом нашей работы было изучение 15 штаммов *Aeromonas hydrophila* как потенциально лизогенных по методике С.Э. Лурия и Д. Дарнелла (1970) в модификации А.Г. Шестакова (2009). В первой серии опытов выделение бактериофагов из бактерий проводили без воздействия на них индуцирующего фактора. Вторая серия опытов предусматривала воздействие на исследуемые штаммы *Aeromonas hydrophila* индуцирующих факторов: ультрафиолетовое излучение (воздействие бактерицидной лампы в течении 5-20 минут с расстояния 50 см, длина волны 253 нм (Калдыркаев А.И., 2011; Семанина Е.Н., 2012), трихлорэтан в соотношении 10:1 (Гольдфарб и др., 1961). Данные серии опытов показали, что исследуемые штаммы *Aeromonas hydrophila* не проявили естественную и искусственную лизогенность.

Следующим этапом исследовательской работы стало выделение бактериофагов *Aeromonas hydrophila* из объектов ветеринарно-санитарного надзора методом накопления предложенным Д.М. Гольдфарбом (1961) в модификации Д.А. Викторова (2011). Материалом для исследований были сточные воды, вода открытых водоемов (озера, реки, пруды) Ульяновской области. При исследовании более 130 проб нами выделено 5 изолятов фагов бактерий *Aeromonas hydrophila*. Селекцию бактериофагов проводили десятикратным пассированием изолированных БОЕ на МПА с перевиванием на МПБ (Золотухин С.Н., 2007). Очистку фагов от бактериальных клеток проводили методом вакуумной фильтрации на установке фирмы «Millipor», или использовали шприц - насадку типа «Swinnex» с диаметром пор 0,22 µm GV. Фильтраты укупоривали в стерильные флаконы и хранили при температуре 4-6°C без использования консервантов.

Характеристика основных биологических свойств выделенных бактериофагов *Aeromonas hydrophila*

Выделенные бактериофаги формировали схожие негативные колонии округлой формы с прозрачными центрами, без вторичного роста и зонами неполного лизиса, диаметром от 0,1 до 2,0 мм. Литическая активность изучаемых бактериофагов составила: по Аппельману от 10^{-5} до 10^{-8} ; по

Грация от $0,58(\pm 0,2) \times 10^6$ до $2,5(\pm 0,1) \times 10^8$ БОЕ/мл (Таблица 1). Спектр литической активности выделенных бактериофагов составил от 13,3 до 86,7 % из имеющихся у нас 15 штаммов *Aeromonas hydrophila* (Таблица 2).

Таблица 1 – Литическая активность бактериофагов бактерий *A. hydrophila*

№	Штамм фага	Титр по Appel'manu	Титр по Грация, БОЕ/мл
1	Фаг F43-УГСХА	10^{-8}	$2,5 \times 10^8 \pm 0,2 \times 10^8$
2	Фаг 1p-УГСХА	10^{-6}	$4,2 \times 10^6 \pm 0,3 \times 10^6$
3	Фаг F43g-УГСХА	10^{-7}	$3,7 \times 10^7 \pm 0,5 \times 10^7$
4	Фаг 13a-УГСХА	10^{-5}	$0,58 \times 10^6 \pm 0,7 \times 10^6$
5	Фаг AhD-УГСХА	10^{-8}	$1,5 \times 10^8 \pm 0,4 \times 10^8$

Таблица 2 – Спектр литической активности бактериофагов бактерий *A. hydrophila*

Бактериофаги <i>A. hydrophila</i>	Кол-во испытанных штаммов <i>A. hydrophila</i>	Количество лизируемых штаммов <i>A. hydrophila</i>	Процент лизируемых штаммов <i>A. hydrophila</i> ,
F43-УГСХА	15	13	86,7
1p-УГСХА	15	4	26,6
F43g-УГСХА	15	8	53,3
13a- УГСХА	15	5	33,3
AhD-УГСХА	15	2	13,3

Специфичность 5 выделенных изолятов бактериофагов *Aeromonas hydrophila* изучали на вышеуказанных видах и родах культур бактерий. Результаты исследований показали что выделенные бактериофаги строго специфичны по отношению к *Aeromonas hydrophila* и не лизируют бактерии других видов и родов (Таблица 3).

Таблица 3– Специфичность бактериофагов *A. hydrophila*

№ п/п	Вид бактерий	Бактериофаги <i>A. hydrophila</i>					Конт роль МПБ
		F43-УГСХА	1p-УГСХА	F43g-УГСХА	13a-УГСХА	AhD-УГСХА	
1	<i>Aeromonas salmonicida</i>	-	-	-	-	-	-
2	<i>Aeromonas sobria</i>	-	-	-	-	-	-
3	<i>Aeromonas caviae</i>	-	-	-	-	-	-
4	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-	-	-	-
5	<i>Proteus mirabilis</i>	-	-	-	-	-	-
6	<i>Citrobacter freundii</i>	-	-	-	-	-	-
7	<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-
8	<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	-	-	-
9	<i>Enterobacter faecalis</i>	-	-	-	-	-	-
10	<i>Yersinia enterocolitica</i>	-	-	-	-	-	-
11	<i>Yersinia pseudotuberc.</i>	-	-	-	-	-	-

12	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-
13	<i>Pseudomonas putida</i>	-	-	-	-	-	-
14	<i>Providencia rettgeri</i>	-	-	-	-	-	-
15	<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-	-	-	-
16	<i>A. hydrophila</i>	+	+	+	+	+	-

Примечание – «-» — отсутствие лизиса, «+» – лизис культуры.

Для изучения температурной устойчивости выделенных бактериофагов, фаголизаты прогревали в ультратермостате при температуре от 45°C до 57°C с интервалом 2°C в течении 30 минут (Таблица 4).

Таблица 4–Температурная устойчивость бактериофагов *A. hydrophila*

Температурный режим, °C	Активность штаммов, подвергнутых температурной обработке, БОЕ/мл					
	ИШ	F43-УГСХА	1p-УГСХА	F43g-УГСХА	13a-УГСХА	Ahd-УГСХА
45	2,0x10 ⁸ ±0,2x10 ⁸	2,0x10 ⁸ ±0,4x10 ⁸	3,0x10 ⁶ ±0,6x10 ⁶	2,0x10 ⁷ ±0,5x10 ⁷	4,0x10 ⁵ ±0,3x10 ⁵	3,0x10 ⁷ ±0,4x10 ⁷
47	1,0x10 ⁷ ±0,3x10 ⁷	1,0x10 ⁷ ±0,5x10 ⁷	1,0x10 ⁵ ±0,7x10 ⁵	1,0x10 ⁶ ±0,2x10 ⁶	1,0x10 ⁴ ±0,4x10 ⁴	1,0x10 ⁶ ±0,5x10 ⁶
49	1,0x10 ⁶ ±0,2x10 ⁶	3,0x10 ⁶ ±0,4x10 ⁶	1,0x10 ⁴ ±0,2x10 ⁴	2,0x10 ⁵ ±0,6x10 ⁵	2,0x10 ³ ±0,2x10 ³	2,0x10 ⁵ ±0,3x10 ⁵
51	1,0x10 ⁵ ±0,2x10 ⁵	2,0x10 ⁵ ±0,2x10 ⁵	2,0x10 ³ ±0,2x10 ³	1,0x10 ⁴ ±0,2x10 ⁴	-	1,0x10 ⁴ ±0,3x10 ⁴
53	2,0x10 ³ ±0,1x10 ³	1,0x10 ⁴ ±0,2x10 ⁴	-	2,0x10 ³ ±0,1x10 ³	-	2,0x10 ³ ±0,2x10 ³
55		1,0x10 ³ ±0,2x10 ³				
57	-	-	-	-	-	-
Контроль	4,0x10 ⁸ ±0,2x10 ⁸	2,5x10 ⁸ ±0,2x10 ⁸	4,2x10 ⁶ ±0,3x10 ⁶	3,7x10 ⁷ ±0,5x10 ⁷	0,58x10 ⁶ ±0,1x10 ⁶	1,5x10 ⁸ ±0,4x10 ⁸

Примечание – «иш» – индикаторный бактериальный штамм *A. hydrophila* №43-УГСХА.

Устойчивость изучаемых бактериофагов к трихлорметану определяли в соотношении 1:10 в течении 15, 30, 45 минут с обязательной постановкой контроля и определения количества БОЕ методом агаровых слоев по Грациа. Исходя из результатов опытов выделенные бактериофаги являются устойчивыми к воздействию трихлорметаном в соотношении 1:10 в течении до 45 минут (Таблица 5).

Таблица 5– Устойчивость бактериофагов к трихлорметану.

№ пп	Штаммы бактериофагов	Титр исследуемых бактериофагов по Грациа, БОЕ/мл			
		Контроль	Время обработки трихлорметаном, мин.		
			15	30	45
1	ФaгF43-УГСХА	2,0x10 ⁸ ±0,1x10 ⁸	4,0x10 ⁸ ±0,1x10 ⁸	3,0x10 ⁶ ±0,1x10 ⁶	1,0x10 ⁴ ±0,1x10 ⁴
2	Фaг1п-УГСХА	4,0x10 ⁶ ±0,2x10 ⁶	5,0x10 ⁶ ±0,1x10 ⁶	4,0x10 ⁴ ±0,2x10 ⁴	4,0x10 ³ ±0,2x10 ³

3	Фар43г-УГСХА	$3,0 \times 10^7 \pm 0,1 \times 10^7$	$5,0 \times 10^7 \pm 0,2 \times 10^7$	$4,0 \times 10^5 \pm 0,1 \times 10^5$	$3,0 \times 10^3 \pm 0,3 \times 10^3$
4	Фар13-УГСХА	$5,0 \times 10^5 \pm 0,2 \times 10^5$	$7,0 \times 10^5 \pm 0,1 \times 10^5$	$6,0 \times 10^4 \pm 0,1 \times 10^4$	$6,0 \times 10^3 \pm 0,1 \times 10^3$
5	ФарAhD-УГСХА	$1,0 \times 10^8 \pm 0,1 \times 10^8$	$3,0 \times 10^8 \pm 0,3 \times 10^8$	$3,0 \times 10^5 \pm 0,2 \times 10^5$	$1,0 \times 10^3 \pm 0,2 \times 10^3$

По результатам исследований основных биологических свойств выделенных бактериофагов для дальнейшего конструирования биопрепарата был выбран бактериофаг F-43УГСХА: титр по Грациа $2,5 \times 10^8 \pm 0,2 \times 10^8$ и 10^8 по Аппельману, спектр литической активности 86,7%, специфичность, температурную устойчивость до 55°C, устойчивость к трихлорметану до 45 минут воздействия в концентрации 1:10.

Разработка технологических параметров изготовления и контроля индикаторного биопрепарата на основе специфичных бактериофагов *Aeromonas hydrophila*

Для изготовления и контроля биопрепарата использовали фаг F43-УГСХА и индикаторную культуру *Aeromonas hydrophila* №43-УГСХА обладающие характерными морфологическими, биохимическими и культуральными свойствами и показателями литической активности и специфичности. Проведенными исследованиями установили что температура $37 \pm 1,0^\circ\text{C}$ является оптимальной для культивирования бактериофага F43-УГСХА; оптимум соотношения фага F43-УГСХА и бактерии *Aeromonas hydrophila* №43-УГСХА соотношение 1:2, или 0,2 мл фага к 0,4 мл культуры (Таблица 6); оптимум времени пассажа для фага F43-УГСХА 8 часов (Таблица 7). Литическая активность бактериофага F43-УГСХА сохраняется в течении 12 месяцев. Количество БОЕ в 1мл биопрепарата снизилось с $2,5 \times 10^8 \pm 0,2 \times 10^8$ на момент укупоривания до $3,5 \times 10^7 \pm 0,2 \times 10^7$ БОЕ (Таблица 8).

Таблица 6–Зависимость литической активности бактериофага F43-УГСХА от множественности инфекции

Количество, мл		Литическая активность фагов (БОЕ/1 мл)
Фага	Культуры	
0,2	0,2	$1,4 \times 10^8 \pm 0,3 \times 10^8$
0,2	0,4	$2,5 \times 10^8 \pm 0,2 \times 10^8$
0,2	0,6	$4,4 \times 10^7 \pm 0,2 \times 10^7$
0,2	0,8	$2,3 \times 10^6 \pm 0,4 \times 10^6$
0,2	1,0	$1,5 \times 10^5 \pm 0,5 \times 10^5$

Таблица 7–Зависимость литической активности бактериофага F43-УГСХА от времени пассажа

Название фага	Вариант опыта с фагом	Время пассажа, часы	Литическая активность фага F43-УГСХА по Грациа (БОЕ/мл)
F43-УГСХА	1	4	$1,5 \times 10^7 \pm 0,5 \times 10^7$

	2	6	$4,5 \times 10^7 \pm 0,4 \times 10^7$
	3	8	$2,5 \times 10^8 \pm 0,2 \times 10^8$
	4	10	$1,2 \times 10^7 \pm 0,3 \times 10^7$
	5	12	$1,1 \times 10^6 \pm 0,2 \times 10^6$

Таблица 8–Изменение литической активности бактериофага F43-УГСХА при хранении в течение 12 месяцев

Фаг	Срок хранения	Литическая активность, БОЕ/мл
F43-УГСХА	Момент укупоривания	$2,5 \times 10^8 \pm 0,2 \times 10^8$
	3 месяца	$2,5 \times 10^8 \pm 0,2 \times 10^8$
	6 месяцев	$4,5 \times 10^7 \pm 0,3 \times 10^7$
	9 месяцев	$3,7 \times 10^7 \pm 0,2 \times 10^7$
	12 месяцев	$3,5 \times 10^7 \pm 0,2 \times 10^7$
	24 месяца	$3,6 \times 10^6 \pm 0,2 \times 10^6$
	36 месяцев	$3,2 \times 10^5 \pm 0,2 \times 10^5$

Разработка схемы ускоренной идентификации бактерий *Aeromonas hydrophila*

Учитывая строгую специфичность биопрепарата нами была разработана схема идентификации данных бактерий. Подготовку и посев проб материала проводили в соответствии с ГОСТами указанными выше. Разработанная схема (Рисунок 1) позволяет идентифицировать бактерии *Aeromonas hydrophila* за 36-38 часов что значительно сокращает временные и финансовые затраты на диагностику. Для сравнения бактериологическая схема идентификации занимает 96 часов при значительных экономических затратах.

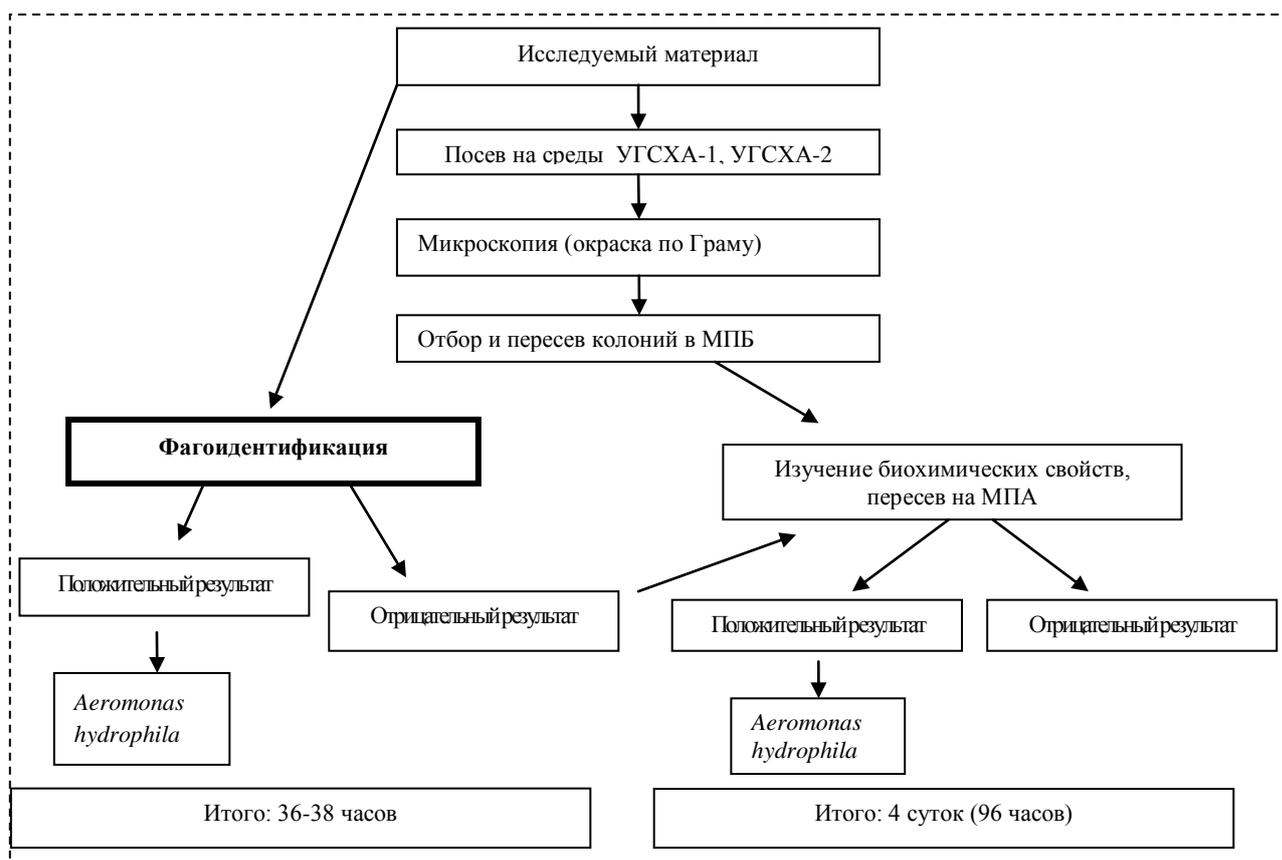


Рисунок 1 - Схема ускоренной идентификации *Aeromonas hydrophila* предложенная Т.И. Канаевой (2009), в модификации Насибуллина И.Р.

Определение количественного показателя реакции нарастания титра фага

Для разработки количественного показателя реакции нарастания титра фага (РНФ) исследование проводили по методике В.Я. Ганюшкина с использованием МПБ контаминированного 18-часовым штаммом *Aeromonas hydrophila* №43-УГСХА в концентрации от 10^1 до 10^5 м. кл./мл.. В результате установлено, что количество фаговых частиц в опыте более чем в 5 раз превышает количество фаговых корпускул в контрольных пробах, при контаминации МПБ бактериями *Aeromonas hydrophila* в концентрации 10^3 м.к./мл.

Определение оптимального времени постановки РНФ

Для решения технологической задачи по определению оптимального времени более эффективного взаимодействия бактериофага F43-УГСХА и *Aeromonas hydrophila* опыты проводились на тест-объекте с сохранением других параметров постановки РНФ (температурный режим, концентрация бактериальной культуры и БОЕ в 1мл). В результате проведенных исследований установили что оптимальным является режим РНФ при 7-часовой инкубации исследуемого материала с фагом без предварительного

подращивания позволяющий обнаружить *Aeromonas hydrophila* в концентрации 10^3 м.к./мл за 19-24 часа. Бактериологический метод потребовал 96 часов и обнаружил бактерии *Aeromonas hydrophila* в концентрации 10^4 м. к./мл.

Исследование с помощью РНФ озерной воды, контаминированной бактериями *Aeromonas hydrophila*

Пробы озерной воды в объеме 5,0 мл вносили в колбы со стерильным МПБ (50 мл) и контаминировали штаммом *Aeromonas hydrophila* в концентрации от 10^1 до 10^5 м. к./мл. Контроль – колба с озерной водой, не контаминированная бактериями *Aeromonas hydrophila*. Постановку РНФ проводили по схеме (Рисунок 2) для всех разведений культуры.

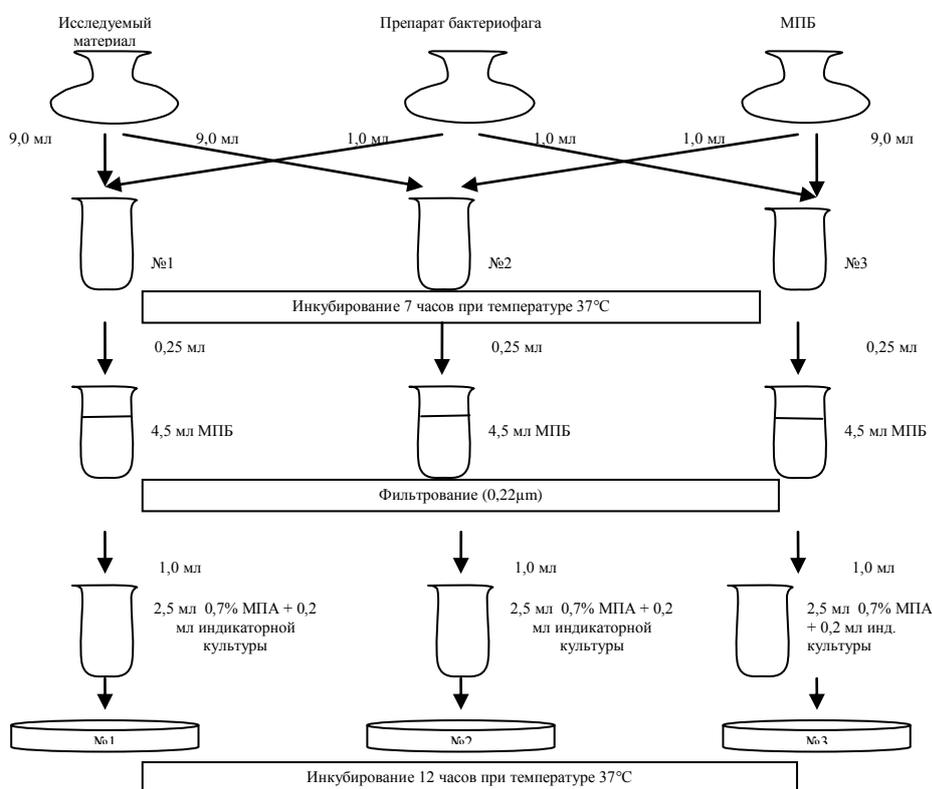


Рисунок 2—Схема индикации *Aeromonas hydrophila* при помощи РНФ

В результате исследования установили, что увеличение титра бактериофага F43-УГСХА более чем в 5 раз произошло при концентрации бактерий *Aeromonas hydrophila* 10^3 м. к./мл (Таблица 9).

Таблица 9–Результат РНФ бактериофага F43-УГСХА при исследовании озерной воды, контаминированной *Aeromonas hydrophila*

Концентрация индикаторной культуры, м. к./мл	Количество негативных колоний, штук			Наращение 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	-	-

Исследование с помощью РНФ тканевого материала и органокомплекса из рыб, контаминированных бактериями *Aeromonas hydrophila*

Пробы тканевого материала и органокомплекса из рыб весом 5 г растирали в фарфоровой ступке и помещали в колбы с 50 мл МПБ, контаминировали бактериями *Aeromonas hydrophila* в концентрации от 10^1 до 10^5 м. к./мл. Реакцию проводили по схеме (Рисунок 2). Результаты опыта в таблице 10.

Таблица 10–Результат РНФ бактериофага F43-УГСХА при изучении патологического материала из рыб, контаминированного бактериями *Aeromonas hydrophila*

Концентрация индикаторной культуры, м. к./мл	Количество негативных колоний, штук			Наращение 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	-	-

В ходе исследований установили, что в паренхиматозных органах рыб, контаминированных бактериями *Aeromonas hydrophila* при помощи реакции РНФ, получили положительный результат при концентрации бактерий в количестве 10^3 м. к./мл, без выделения чистой культуры, в присутствии посторонней микрофлоры.

Исследование при помощи РНФ сырого молока, контаминированного *Aeromonas hydrophila*

Пробы сырого молока в объеме 5 мл добавляли в колбы, содержащие 50 мл стерильного МПБ и контаминировали *Aeromonas hydrophila* в концентрации от 10^1 до 10^5 м. к./мл, тщательно перемешивали в течение 10 минут. Контролем служила колба с пробой сырого молока без контаминации *Aeromonas hydrophila*. Реакцию делали по схеме (Рисунок 2), для каждого разведения культуры. Результаты опыта в таблице 11.

Таблица 11–Результат РНФ бактериофага F43-УГСХА при изучении сырого молока, контаминированного *Aeromonas hydrophila*

Концентрация индикаторной культуры, м. к./мл	Количество негативных колоний, штук			Наращение 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	-	-

В результате экспериментов по изучению методом РНФ объектов ветеринарного надзора (озерная вода, сырое молоко, тканевой материал и органокомплекс рыб) при помощи бактериофага F43-УГСХА нами обнаружены бактерии *Aeromonas 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 ветеринарного надзора затрачивается не менее 4-х суток и индикация бактерий *Aeromonas hydrophila* в случае положительного результата составляет не менее 10^4 м. к./мл.

Молекулярно-генетическая характеристика бактериофага F-43 УГСХА

Следующим этапом работы с изолированным штаммом бактериофага явилась его молекулярно-генетическая характеристика, включающая в себя определение размера фагового генома, процента его идентичности с таксономически наиболее близкими бактериофагами, проверку отсутствия в составе ДНК генов, кодирующих токсины, интегразы, репрессоры транскрипции и других нежелательных локусов. Изучение данных характеристик позволяет подтвердить оригинальность и вирулентную

природу исследуемого бактериофага. Для получения полноразмерной нуклеотидной последовательности генома бактериофага было использовано полногеномное секвенирование ДНК второго поколения (Ion Torrent, Thermo Fisher Scientific, США). Исследуемый штамм бактериофага был секвенирован трижды. Данные каждого раунда секвенирования были проанализированы методами биоинформатики. Фильтрация качества прочтений (ридов) позволила собрать геномы бактериофагов с высокой достоверностью. Наиболее близким по филогенетическому положению является аннотированный бактериофаг Aeh1, активный в отношении бактерий *Aeromonas hydrophila*. В результате проведенных исследований была составлена карта линейных ДНК бактериофага. В соответствии с известными аналогами были определены продукты экспрессии генов. Качественный состав протеинов бактериофага соответствует таковому у аннотированных аналогов, имеет четкие гомологии нуклеотидного и аминокислотного наборов. В структуре протеинов наблюдается закономерность, присущая данным вирусным частицам – наличие структурных и неструктурных компонентов. Также выявлены продукты генов, не имеющие четко определенных функциональных характеристик, так называемые гипотетические белки, не имеющие аналогии в аннотированных геномах бактериофагов, активных в отношении изучаемого бактериального вида. В результате проведенных исследований была составлена карта линейных ДНК бактериофага. В соответствии с известными аналогами были определены продукты экспрессии генов. Качественный состав протеинов бактериофага соответствует таковому у аннотированных аналогов, имеет четкие гомологии нуклеотидного и аминокислотного наборов. В структуре протеинов наблюдается закономерность, присущая данным вирусным частицам – наличие структурных и неструктурных компонентов. Также выявлены продукты генов, не имеющие четко определенных функциональных характеристик, так называемые гипотетические белки, не имеющие аналогии в аннотированных геномах бактериофагов, активных в отношении изучаемого бактериального вида. Для целей быстрого выявления локусов патогенности в геномах выделяемых бактериофагов *Aeromonas hydrophila*, а также при невозможности проведения их сиквенсовых исследований в данной работе предложен метод их индикации с помощью ПЦР. На первом этапе в библиотеке баз данных GeneBank (США), EMBL (Европейская молекулярно-биологическая библиотека), DDBJ (Японская база данных нуклеотидных последовательностей) была определена уникальность гена-кандидата *hly*, кодирующего гемолизин (аэролизин) *Aeromonas hydrophila*.

После анализа в библиотеках баз данных GeneBank (США), EMBL (Европейская молекулярно–биологическая библиотека), DDBJ (Японская база данных нуклеотидных последовательностей) нуклеотидных последовательностей всех вышеуказанных генов, они были просканированы системой Blast базы данных GeneBank (США) на предмет совпадения с последовательностями ДНК известных микроорганизмов. Установлено, что данные генетические последовательности являются уникальными для *Aeromonas hydrophila* и не имеют совпадений с другими видами микроорганизмов. После выбора специфичного гена-кандидата для молекулярно-генетической идентификации «островка патогенности», носителем которого могут быть бактериофаги, активные в отношении *Aeromonas hydrophila*, были определены наиболее консервативные участки выбранных мишеней, путем их сравнения у различных штаммов *Aeromonas hydrophila* в базе данных GeneBank. На эти консервативные участки приложением Primer BLAST этой базы данных в режиме on-line были положены праймеры, отвечающие некоторым условиям, определенным нами: длина праймеров должна составлять 18–24 пары нуклеотидов, температура плавления праймера должна быть 60–70°C, размер фланкируемого праймерами участка гена должна составлять не менее 100 и не более 1000 п.о. После определения праймеров, они были выровнены программой Gene Runner Version 3.05, определены димеры, при возможном их некомплементарном связывании самими с собой или попарно. Для оптимизации ПЦР-протокола, в реакциях со штаммами *Aeromonas hydrophila*, выделенными из клинических образцов был использован электрофоретический метод детекции продуктов амплификации. В результате проведенных экспериментов разработана система молекулярно-генетической индикации (с использованием ПЦР) автономных генетических элементов (островков патогенности) в геномах бактериофагов, активных в отношении *Aeromonas hydrophila*

Заключение

В результаты проведенных исследований создан биопрепарат на основе специфичного бактериофага для ускоренной фагоиндикации и идентификации бактерий *Aeromonas hydrophila* в объектах внешней среды.

Выводы

1. Выделены и идентифицированы по культуральным, морфологическим и биохимическим свойствам 14 штаммов бактерий *Aeromonas hydrophila*.
2. Выделено 5 изолятов бактериофагов активных в отношении *Aeromonas*

hydrophila. Изучены их основные биологические свойства: они образуют однородные негативные колонии с ровными краями, диаметром от 0,1 до 2,0 мм; литическая активность бактериофагов варьировала в диапазоне: по методу Аппельмана от 10^{-5} до 10^{-8} , по методу Грациа от $0,58 \times 10^6$ до $2,5 \times 10^8$; спектр литической активности бактериофагов составил от 13,3 до 86,7%; все выделенные изоляты бактериофагов строго специфичны по отношению к *Aeromonas hydrophila* и не лизируют бактерии других видов и родов.

3. Отобран бактериофаг F43-УГСХА, имеющий наиболее оптимальные характеристики для создания биопрепарата (литическая активность по Аппельману – 10^{-8} , по Грациа $2,5 \times 10^8$; спектр литической активности 86,7%, строго специфичен для *Aeromonas hydrophila*). Установлены оптимальные технологические параметры изготовления специфического биопрепарата бактериофага F43-УГСХА: время инкубирования бактериофага F43-УГСХА в термостате при 37°C – 8 часов; соотношение количества бактериофага к количеству бактериальных клеток *Aeromonas hydrophila* 1:2.

4. Хранение готового биопрепарата бактериофага F43-УГСХА бактерий *Aeromonas hydrophila* в герметичных флаконах в объеме 5 мл до 2,5 лет при температуре $4 - 6^{\circ}\text{C}$ показало отсутствие снижения показателей его активности.

5. Определены параметры постановки РНФ с применением биопрепарата на основе бактериофага F43-УГСХА для ускоренной индикации бактерий *Aeromonas hydrophila* позволяющие обнаружить в опытном материале названные микроорганизмы в концентрации от 10^3 м. к./мл за 19 – 24 часа. Разработана схема идентификации *Aeromonas hydrophila* с помощью сконструированного биопрепарата позволяющая идентифицировать данную бактерию за 36-38 часа.

6. Полногеномным секвенированием бактериофага установлено, что размер исследуемого бактериофагового генома составляет – 36801 п.н., потенциальных локусов патогенности не выявлено.

7. Методом биоинформационного (протеомного) анализа секвенирования бактериофага F43-УГСХА выявлено 46 потенциальных белков с молекулярной массой 4,6-137,6 кДа, имеющих свое место локализации в фаговом геноме.

8. Определено филогенетическое положение бактериофага F43-УГСХА в группе аннотированных в системе NCBI - наиболее близким по филогенетическому положению полного генома и большинства потенциальных фаговых белков является аннотированный бактериофаг F43-УГСХА, активный в отношении бактерий *Aeromonas hydrophila*.

9. Разработана система молекулярно-генетической индикации (с использованием ПЦР) автономных генетических элементов (островков патогенности) - *hly* в геномах бактериофагов, активных в отношении *Aeromonas hydrophila*

Практические предложения

1. По результатам диссертационной работы предложен штамм бактериофага F43-УГСХА, данный фаг обладает высокой литической активностью, широким диапазоном литической активности, строгой видовой специфичностью.

2. Индикацию *Aeromonas hydrophila* в объектах ветеринарного надзора предлагаем проводить с помощью биопрепарата бактериофага F43-УГСХА, согласно «Методическим рекомендациям по ускоренной индикации методом РНФ *Aeromonas hydrophila* в объектах ветеринарного надзора».

3. Для фагоидентификации *Aeromonas hydrophila* с помощью биопрепарата на основе бактериофага F43-УГСХА рекомендовано использовать «Методические рекомендации по выделению и идентификации *Aeromonas hydrophila* из объектов ветеринарного надзора с применением диагностического бактериофага F43-УГСХА».

4. Контроль и изготовление диагностического бактериофага F43-УГСХА проводить согласно «Инструкции по изготовлению и контролю лабораторной серии бактериофага F43-УГСХА».

Перспективы дальнейшей разработки темы

В дальнейшем перспектива исследований будет направлена на конструирование диагностических биопрепаратов, в том числе с другими представителями бактерий рода *Aeromonas*, организацию производства и широкое применение данных бактериофаговых препаратов для диагностики заболеваний, терапии и биопроектирования.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных

Минобрнауки России

1. **Насибуллин, И.Р.** Выделение бактериофагов бактерий вида *Aeromonas hydrophila* и изучение их основных биологических свойств / И.Р. Насибуллин, Д.А. Викторов, Д.А. Васильев, А.А. Нафеев, И.Г. Щвиденко // Вестник ветеринарии. –2013.–№ 3(66).–С. 8-10.

2. **Насибуллин, И.Р.** Детекция *Aeromonas hydrophila* в пищевой продукции из гидробионтов с применением биосенсоров на основе гомологичных бактериофагов / И.Р. Насибуллин, Д.А. Васильев, Д.А.

Викторов, С.Н. Золотухин, А.А. Нафеев, И.Г. Горшков, Н.Г. Куклина, Н.Г. Барт // *Фундаментальные исследования*. –2014. – № 5, Ч. 1. – С. 50-54.

3. **Насибуллин, И.Р.** Влияние физических, химических факторов и режимов хранения на литическую активность аэромонадных бактериофагов / И.Р. Насибуллин, Д.А. Васильев, И.Г. Швиденко // *Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии им. П.А. Столыпина*. –2014. – № 3 (27). – С. 73-77.

4. **Насибуллин, И.Р.** Молекулярно-генетическая характеристика бактериофага F-43 УГСХА *Aeromonas hydrophila* / И.Р. Насибуллин, А.В. Мاستиленко, А.А. Нафеев // *Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии им. П. А. Столыпина*. – 2019. – № 4 (48). – С. 122-129.

Публикации в прочих изданиях

5. **Насибуллин, И.Р.** Тесты по идентификации *Pseudomonas aeruginosa* и *Aeromonas hydrophila* / И.Р.Насибуллин, Д.А. Васильев, Э.А. Афонин, Т.И. Елантьева // *Современное развитие АПК: региональный опыт, проблемы, перспективы: Материалы Всероссийской научно-практической конференции*. –Ульяновск, 26-28 апреля 2005.–Ч.5.– С.230-233.

6. **Насибуллин, И.Р.** Распространение бактерии *Aeromonas hydrophila* и ее роль в патологии человека / И.Р. Насибуллин, Т.И. Канаева // *Молодежь и наука XXI века: Материалы Международной научно-практической конференции*. 21-23 марта 2006. – Ульяновск, 2006. – С. 352-356.

7. **Насибуллин, И.Р.** Выделение и идентификация бактерий вида *Aeromonas hydrophila* / И.Р. Насибуллин, Т.И. Канаева // *Биотехнология, вода и пищевые продукты: Материалы Международной научно-практической конференции*. – Москва, 2008.– С. 124-125.

8. **Насибуллин, И.Р.** Бактериофаги *Aeromonas hydrophila* / И.Р. Насибуллин, Т.И. Канаева, Д.А. Васильев // *Молодежь и наука XXI века: Материалы Международной научно-практической конференции молодых ученых*.–Ульяновск, 2010.– С.-52-53.

9. **Насибуллин, И.Р.** Перспективы применения бактериофагов для индикации патогенных бактерий рода *Aeromonas* / И.Р. Насибуллин, И.Г. Горшков, Н.Г. Куклина, Д.А. Викторов, 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.–Т. 2– С. 5-7.

10. **Насибуллин, И.Р.** Исследование литической активности бактериофагов *Aeromonas hydrophila* / И.Р. Насибуллин, Н.Г. Куклина, И.Г. Горшков, Д.А. Викторов, Д.А. Васильев, А.А. Нафеев // Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности: Материалы международной научно-практической конференции.– Ульяновск, 2013.– Т. 2– С. 45-47.

11. **Насибуллин, И.Р.** Разработка инновационных подходов решения проблем аэромоназов в рыбоводстве / И.Р. Насибуллин, Н.Г. Куклина, И.Г. Горшков, Д.А. Викторов, Д.А. Васильев // Стратегия инновационного развития агропромышленного комплекса: Материалы международной научно-практической конференции.– Курган, 2013.– С. 243-247.

12. **Насибуллин, И.Р.** Применение реакции нарастания титра фага для индикации аэромонад в рыбной продукции / И.Р. Насибуллин, И.Г. Горшков, Н.Г. Куклина, Д.А. Викторов, Д.А. Васильев, А.А. Нафеев // Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности: Материалы международной научно-практической конференции.– Ульяновск, 2013. – Т. 2. – С. 158-161.

13. **Насибуллин, И.Р.** Литическая активность бактериофагов бактерий *Aeromonas hydrophila* / И.Р. Насибуллин, Д.А. Викторов, Д.А. Васильев, А.А. Нафеев, И.Г. Швиденко // Стратегия инновационного развития агропромышленного комплекса: Материалы международной научно-практической конференции.– Ульяновск, 2014. – Т 1.– С.89-93.

14. **Насибуллин, И.Р.** Разработка метода индикации и идентификации *Aeromonas hydrophila* методом РНФ/ И.Р. Насибуллин, Н.Г. Куклина // Достижения молодых ученых в ветеринарную практику» посвященной 55-летию аспирантуры ФГБУ ВНИИЗЖ: Материалы международной научной конференции.– Владимир, 2016.–Т.1.– С.117-123.

15. **Насибуллин, И.Р.** Разработка фагового биопрепарата *Aeromonas hydrophila* для деконтаминации рыбного, мясного сырья и готовых продуктов питания из них / И.Р. Насибуллин, Д.А. Васильев, А.В. Алешкин, С.Н. Золотухин, Н.А. Феоктистова, Н.В. Мартынова, П.С. Майоров, Е.В. Сульдина, А.В. Мاستиленко, А.Г. Шестаков, И.Г. Швиденко, И.Л. Обухов // Естественные и технические науки. – 2018. –№ 1(115).– С.-21-26.