

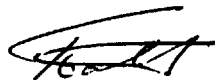
На правах рукописи

ПАВЛОВ АЛЕКСАНДР ВАЛЕРЬЕВИЧ

ИЗМЕНЧИВОСТЬ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ  
ЗОЛОТИСТОГО СТАФИЛОКОККА ПОД ВЛИЯНИЕМ  
ОПТИЧЕСКОГО ИЗЛУЧЕНИЯ

16.00.03 — ветеринарная микробиология, вирусология,  
эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук



Новосибирск — 2005

Работа выполнена в Государственном научном учреждении Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока СО РАСХН

Научный руководитель: кандидат ветеринарных наук,  
старший научный сотрудник  
Смертина Елена Юрьевна

Официальные оппоненты: доктор ветеринарных наук,  
профессор  
Самоловов Андрей Артемьевич,  
  
кандидат биологических наук  
Алексеев Александр Юрьевич

Ведущая организация: Институт ветеринарной медицины  
Омского государственного аграрного университета

Защита состоится "1" июня 2005г. в 9<sup>00</sup> ч. на заседании диссертационного совета Д.006.045.01 в ГНУ Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока СО РАСХН по адресу: 630501, Новосибирская обл., Новосибирский р-н, п. Краснообск, ГНУ ИЭВСиДВ

С диссертацией можно ознакомиться в ЦНСХБ СО РАСХН

Автореферат разослан "23" июня 2005 г.

Ученый секретарь  
диссертационного  
совета



СИ. Логинов

## 1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Применение современных химиотерапевтических средств часто сопровождается побочными эффектами: иммунодепрессивным и токсическим для различных органов и систем действием, индивидуальной непереносимостью, несочетаемостью с другими лекарственными препаратами. Кроме того, применение химиотерапевтических препаратов сопровождается повышением резистентности к антибиотикам большей части патогенных и условно-патогенных микроорганизмов (В.И. Рубцов, 1999; Э.И. Веримей, М.Л. Жолнерович, 1999; Е.А. Денисова, 2000; В.Г.Гавриш, А.В. Егунова, 2000; и др) и ведет к загрязнению продукции животноводства продуктами метаболизма химиопрепаратов.

По большей части, именно этими обстоятельствами обусловлен интерес практикующих врачей к немедикаментозным методам терапии. В частности, к фототерапии, которая все шире применяется в медицине и ветеринарии. Фототерапия — это новый перспективный метод лечения и профилактики заболеваний, в основе которого лежит воздействие лучами видимого и невидимого света на ткани организма. Свет — один из наиболее доступных и распространенных лечебных факторов. Он достаточно эффективен при многих распространенных заболеваниях. В современной медицине используется не только видимая часть лучистой энергии, но и не воспринимаемые человеческим глазом лучи — инфракрасные и ультрафиолетовые. Особо в светолечении стоит лазерная терапия — использование с лечебными целями когерентного монохроматического светового излучения

В настоящее время изучено действие оптического излучения с различной длиной волны на физиологические и патологические процессы в макроорганизме. В тоже время недостаточно изучено взаимодействие оптического излучения с микрофлорой, являющейся важным фактором в этиологии заболеваний сельскохозяйственных животных. Не изучены вопросы совместного применения оптического излучения с химиотерапевтическими препаратами при терапии заболеваний, обусловленных условно — патогенной микрофлорой. На данный момент не существует единой теории, объясняющей механизмы действия оптического излучения с различными характеристиками на физиологию микроорганизмов. Соответственно, нет четкого научного обоснования для выбора оптимальных параметров оптического излучения при проведении фототерапевтических процедур. Использование большого количества фототерапевтических приборов, генерирующих оптическое излучение с разнообразными характеристиками, в терапии заболева-

ний, обусловленных условно— патогенной микрофлорой, приводит к получению таких же разнообразных результатов, часто противоречивых. Все это негативно сказывается на внедрении фототерапии в практическую деятельность ветеринарных специалистов, как нового перспективного способа физиотерапии.

Одним из основных представителей условно-патогенной микрофлоры является золотистый стафилококк, который часто выделяется как самостоятельный возбудитель или в ассоциациях при заболеваниях сельскохозяйственных животных.

В связи с этим, актуальна проблема получения экспериментальных данных о влиянии оптического излучения с разными параметрами на возбудителей неспецифических инфекций, на примере золотистого стафилококка, как наиболее характерного представителя условно — патогенной микрофлоры.

Цель исследований. Изучить влияние оптического излучения с различными характеристиками на биологические свойства условно — патогенной микрофлоры на примере золотистого стафилококка.

#### **Задачи исследований:**

- разработать методику изучения влияния оптического излучения с различными характеристиками: инфракрасного 940 нм, красного 660 нм, желтого 590 нм, зеленого 570 нм, синего 430 нм, при модуляции их частотами: 0 Гц, 5, 50, 100, 250, 500, 1000, 3000, 5000, 10000, 25000 Гц на микроорганизмы.

- изучить влияние оптического излучения с различными характеристиками на биологические свойства золотистого стафилококка, и обосновать оптимальные сочетания оптического излучения и антибиотиков, оказывающие бактериостатическое действие на микроорганизм и повышающие его чувствительность к антибиотикам.

**Научная новизна.** Изучены биологические свойства золотистого стафилококка при воздействии оптического излучения с широким диапазоном характеристик. Определены параметры оптического излучения, оказывающие бактериостатическое действие и стимулирующие рост золотистого стафилококка, повышающие и понижающие чувствительность золотистого стафилококка к антибиотикам. Установлено, что применение инфракрасного излучения с частотой модуляции 3000 Гц и красного с частотой модуляции 1000 Гц, вызывает подавление роста золотистого стафилококка, повышает его чувствительность к антибиотикам, не влияет на показатели патогенности. Разработана методика изучения влияния оптического излучения с широким диапазоном характеристик на микроорганизмы (Патент. РФ RU 42430 U1 от 07.08.2004).

**Практическое значение работы.** Экспериментально обоснована методика изучения влияния оптического излучения с широким диапазоном характеристик на микроорганизмы. Материалы диссертации включены в методические рекомендации "Приборное обеспечение стимуляции репродуктивных функций, физиотерапии и физиопрофилактики гинекологических болезней у коров" (утверждены ученым советом ГНУ ИЭВС и ДВ прот. №6 от 30.09.2003г. и подсекцией "Инфекционная патология животных в регионе Сибири и Дальнего Востока" прот. № 18 от 30.09.2003г.).

**Основные положения, выносимые на защиту:**

— методика изучения влияния оптического излучения с широким диапазоном характеристик: 940 нм, 660, 590, 570, 430 нм, при модуляции их частотами: 0 Гц, 5, 50, 100, 250, 500, 1000, 3000, 5000, 10000, 25000 Гц на микроорганизмы.

— новые научные данные по влиянию различных характеристик оптического излучения на биологические свойства золотистого стафилококка, и оптимальные сочетания оптического излучения и антибиотиков, оказывающие бактериостатическое действие на микроорганизм и повышающие его чувствительность к антибиотикам.

**Апробация работы.** Материалы исследований доложены и обсуждены на заседаниях методического и ученого совета ГНУ ИЭВС и ДВ (2001-2004); Конференции молодых ученых "Актуальные проблемы патологии свиней, крупного и мелкого рогатого скота" (Владимир, 2002); Международной научно-практической конференции "Информационные технологии, информационные измерительные системы и приборы в исследовании сельскохозяйственных процессов. Агроинфо— 2003." (Новосибирск, 2003); Международной научно-практической конференции "Актуальные вопросы зоотехнической науки и практики как основа улучшения продуктивных качеств и здоровья животных" (Ставрополь, 2003); Годичном собрании СО РАСХН 2003 года (Новосибирск, 2003); Международной научно-практической конференции "Аграрная наука Сибири, Монголии, Казахстана и Башкортостана— Сельскому хозяйству" (Павлодар, 2003); Международной научно-практической конференции "Новейшие направления развития аграрной науки в работах молодых ученых." (Новосибирск, 2004); Сибирской международной научно-практической конференции "Актуальные вопросы ветеринарной медицины" (Новосибирск, 2004).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 7 научных работ.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 137 страницах и включает: введение, обзор литературы, заключение по обзору литературы, материалы и методы, собственные исследования,

обсуждение результатов собственных исследований, выводы, практические предложения, список литературы и приложение. Работа иллюстрирована 7 таблицами и 26 рисунками. Список литературы содержит 143 источника, из них 48 зарубежных авторов.

## **2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ**

### **2.1 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ**

Исследования проведены в 2001-2004 годах в лаборатории воспроизводства и технических средств в ветеринарии ГНУ Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока СО РАСХН. Основные задачи решали в 15-ти лабораторных опытах. Схема исследований представлена на рис. 1.

В опытах использовали музейный штамм Золотистого стафилококка ATCC 6538 Р ВКПМ-6646.

Для облучения микроорганизмов применяли фототерапевтический аппарат "Старт", разработанный в лаборатории воспроизводства и технических средств в ветеринарии ГНУ ИЭВС и ДВ, при участии специалистов Института лазерной физики СО РАН и СибФТИ СО РАСХН. Ветеринарный физиотерапевтический аппарат "Старт" предназначен для проведения научных исследований по изучению влияния оптического монохромного излучения с различной длиной волны и частотой модуляции на условно-патогенную микрофлору в лабораторных условиях и изучения лечебно — профилактической эффективности этих излучений при акушерско-гинекологических заболеваниях животных. Прибор генерирует монохромное не лазерное оптическое излучение со следующими длинами волн 940 нм, 660, 590, 570, 430 нм и позволяет модулировать любое из этих излучений частотой 0 Гц, 5, 50, 100, 250, 500, 1000, 3000, 5000, 10000, 25000 Гц. Прибор представляет собой генератор импульсов специальной формы с возможностью выбора любой из перечисленных фиксированных частот, имеет в своем составе сетевой источник питания, стабилизатор напряжения (для питания от сети 220 В), встроенную аккумуляторную батарею (для питания прибора в полевых условиях), автоматическое зарядное устройство, устройство управления, выходной усилитель мощности. Благодаря модульному принципу конструкции прибор позволяет проводить терапевтические процедуры, а также опыты по изучению влияния света с различными волновыми характеристиками на микроорганизмы. Для проведения фототерапии к выходу прибора подключается

сканирующая или полостная насадка, выбирается длина волны излучения, частота модуляции и мощность. Сканирующая насадка предназначена для лечения поверхностных патологий и характеризуется направленным излучением в виде расходящегося конуса. Полостная насадка предназначена для ректального или вагинального применения и характеризуется направленным краниально излучением, сфокусированным в три расходящихся пучка: два внешних под углом 35-45 градусов и центральный между ними. Для проведения облучения микроорганизмов применяется облучатель специальной конструкции, представляющий собой пластиковый иммунологический планшет с смонтированными в него светодиодами (5 рядов по 5 светодиодов каждого цвета), согласующее устройство с питанием от внешнего дополнительного стабилизатора напряжения. Такая конструкция позволяет проводить одновременное облучение светом с различной длиной волны, но одной частотой, при репрезентативной выборке пяти измерений ( $n=5$ ), при максимально одинаковых внешних условиях.

### Схема исследовании

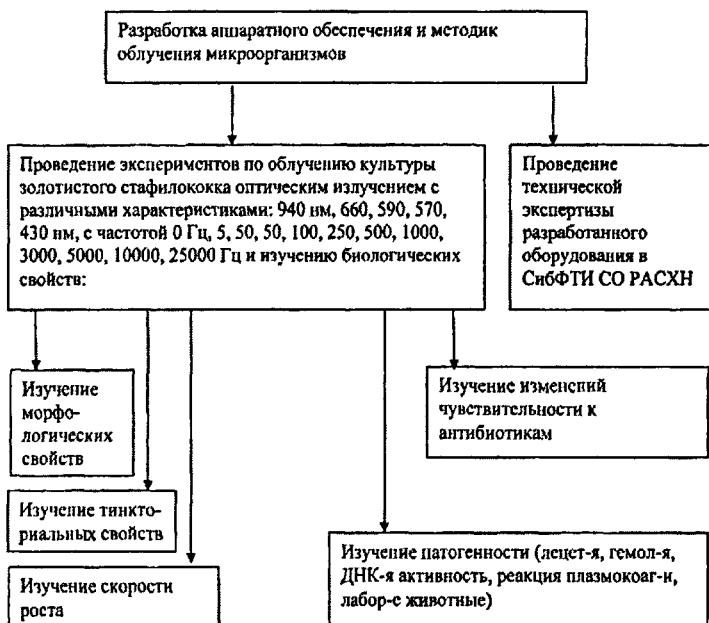


Рисунок 1 - Схема исследований

Облучение микроорганизмов проводили по разработанной методике. Дальнейшее культивирование проводили согласно "Рекомендациям по индикации и идентификации стафилококков и стрептококков" (1976), в нашей модификации с использованием пластиковых иммунологических планшетов, и последующим учетом скорости роста золотистого стафилококка по изменению оптической плотности, измеряемой на фотоэлектрокалориметре "Диагност".

Для определения морфологических, культуральных, тинкториальных свойств, а также патогенности и чувствительности к антибиотикам, облученные микроорганизмы высевали на общие и элективные питательные среды.

Морфологические и тинкториальные свойства изучали с помощью стандартных методов в мазках — препаратах, окрашенных по Граму, с последующей микроскопией.

Культуральные свойства микроорганизмов изучали при посеве на МПА. Учитывали характер роста, форму, размер, края колоний, рельеф, поверхность, структуру колоний, прозрачность и блеск, консистенцию и пигментообразование на плотных средах.

Резистентность облученных культур микроорганизмов к химиотерапевтическим средствам изучали дискоинфузионным методом согласно инструкции по применению дисков для определения чувствительности к антибиотикам, утвержденной Управлением по внедрению новых лекарственных средств и медицинской техники (МЗ СССР 08.07.1986).

Патогенность облученных культур микроорганизмов определяли согласно "Рекомендациям по индикации и идентификации стафилококков и стрептококков" (1976) в реакциях плазмокоагуляции, гемолиза и определения дезоксирибонуклеазной активности, а также 45 белых беспородных мышам методом внутрибрюшинного введения чистых односуточных агаровых культур в дозе  $1,0 \times 10^9$  КОЕ по ОСМ ГИСК им. Л.А. Тарасевича и на 6 кроликах породы Шиншилла в дермoneкротической пробе по общепринятой методике.

Лецитиназную и каталазную активность определяли по общепринятым методикам.

Статистическую обработку, полученных в опытах количественных показателей проводили с помощью пакета программ "Microsoft Office 2000".

Автор глубоко признателен и выражает искреннюю благодарность кандидату ветеринарных наук Юшкову Ю.Г. за методическую и практическую помощь при выполнении работы.



## 2.2. РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ОБЛУЧЕНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Разработанная методика, позволяет культивировать микроорганизмы в малом объеме жидкой питательной среды, при фиксации показателей с помощью фотоэлектрокалориметра и периодическом облучении при максимально одинаковых внешних условиях с помощью нового усовершенствованного комплекта облучателей.

Облучатель представляет собой пластиковый иммунологический планшет с диаметром гнезда 6 мм, в который встроены светоизлучающие диоды со следующими длинами волн: 940 нм, 660, 590, 570, 430 нм, расположенные параллельными рядами по 5 соединенных параллельно диодов с излучением одинаковой длины волны в каждом ряду. Второй планшет используется для культивирования микроорганизмов в жидкой питательной среде и измерения их концентрации с использованием вертикального фотоэлектроколориметра. В рабочем состоянии планшет с излучающими диодами помещается поверх планшета с питательной средой, так, чтобы излучение диодов было направлено на поверхность жидкой питательной среды, с содержащимися в ней микроорганизмами. Конструкция для облучения и культивирования микроорганизмов представлена на рис. 2, где 1 — верхний планшет со встроенными излучающими диодами (по 5 диодов каждого спектра излучения); 2, 3, 4, 5, 6 — ряды излучающих диодов инфракрасного (940 нм), красного (660 нм), желтого (590 нм), зеленого (570 нм), синего (430 нм) спектров излучения; 7 — нижний планшет с лунками для жидкой питательной среды; 8 — лунки с жидкой питательной средой и содержащимися в ней микроорганизмами, подвергаемые облучению; 9 — не подвергаемые облучению лунки с жидкой питательной средой и содержащимися в ней микроорганизмами (контроль).

Для проведения эксперимента в лунки стерильного планшета (7) вносили дозатором по 0,2 мл стерильного МПБ, так, чтобы заполнить 6 рядов по 5 лунок в каждом, которые учитывались как 5 повторов. Затем в каждую лунку дозатором вносили по 0,02 мл взвеси микробных тел *Staphylococcus aureus* (штамм АТСС 6538 Р ВКПМ-6646) с концентрацией 1 млрд. КОЕ/мл. Измерение оптической плотности проводили сразу после посева и через 2, 4, 6, 8, 11, 16 часов от начала опыта. Облучение проводили сразу после посева и измерения оптической плотности, а затем через каждые 2 часа после начала опыта, то есть было проведено пятикратное облучение культуры. Облучали одновременно 5 рядов лунок в течение 10 минут в соответствии с конструкцией облучателя при одинаковой частоте модуляции всех видов излучения, которая в первом опыте составила 0 Гц. В последующих

опытах облучение микроорганизмов проводилось по аналогичной схеме, но с изменением частоты модуляции всех видов излучения согласно следующему ряду 5 Гц, 50, 100, 250, 500, 1000, 3000, 5000, 10000, 25000 Гц. Для исключения ошибки, возможной из-за изменения внешних условий, в каждом опыте был свой контроль.

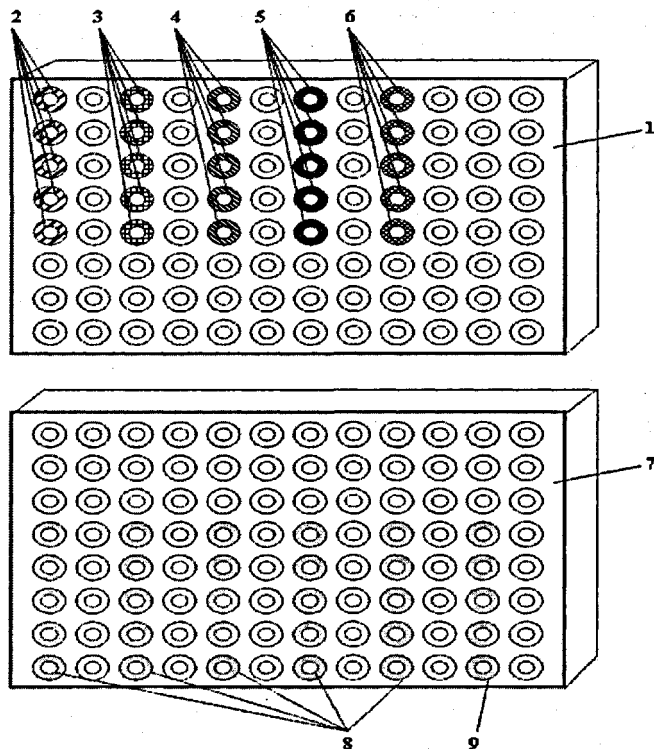


Рисунок 2 — Конструкция для облучения и культивирования микроорганизмов

Конструкция облучателя позволила проводить одновременное и равномерное облучение культуры золотистого стафилококка светом с различной длиной волны, но одной частотой, при репрезентативной выборке пяти измерений ( $n=5$ ), при максимально одинаковых внешних условиях. За счет малого количества питательной среды в лунке, во время роста микроорганизмов наблюдаются выраженные изменения оптической плотности, что позволяет фиксировать минимальные изменения в характере роста микроорганизмов. Методика не требует большого количества лабораторной посуды, питательных сред и затрат

рабочего времени и позволяет достичь высокой точности измерений в исследованиях.

Устройство для облучения биологических объектов и методика защищены патентом РФ RU 42430 U1 от 07.08.2004.

### 2.3. БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЗОЛОТИСТОГО СТАФИЛОКОККА (ШТАММ АТСС 6538 Р ВКПМ-6646)

Биологические свойства золотистого стафилококка были изучены при стандартных условиях культивирования.

**Морфологические свойства.** Рост стафилококков в МПБ характеризовался равномерным помутнением среды и выпадением через 20-24 часа на дно пробирки рыхлого хлопьевидного осадка, бело-желтого цвета, который при встряхивании поднимался в виде мелких хлопьев или коротких тонких нитей. На плотных питательных средах (МГЛА, кровяном агаре) через 18-24 часа культивирования образовывались колонии диаметром 2-5 мм, округлой формы, выпуклые, гладкие, блестящие, с ровными краями, непрозрачные, желтого цвета. Кроме того, рост колоний на кровяном агаре (КА) сопровождался образованием зоны  $\alpha$  — гемолиза диаметром 9-11 мм, имеющей зеленоватый оттенок. На желточном агаре (ЖА) вокруг колоний образовывалась зона радужного цвета диаметром 6-8 мм. На ДНК — агаре зона просветления (зона деполимеризации ДНК вокруг колоний) становилась заметной после обработки 1Н соляной кислотой и имела диаметр 17-20 мм. В реакции плазмокоагуляции наблюдали образование свободноплавающего сгустка через 3 часа, после внесения в разведенную плазму крови кролика 18 часовой бульонной культуры золотистого стафилококка и культивирования в термостате. В тесте на каталазную активность всегда наблюдали образование пузырьков газа после смешивания испытуемой культуры стафилококка и 3 %-й перекиси водорода.

В мазках, приготовленных из односуточных агаровых культур, стафилококки имели округлую форму, диаметр 0,5-1,5 мкм, располагались в виде скоплений неправильной формы парами или одиночно. По Граму окрашивались положительно.

**Скорость роста.** С помощью фотоэлектрокалориметра проводили замеры оптической плотности жидкой питательной среды во время роста микроорганизмов. Скорость роста увеличивалась равномерно, показатели оптической плотности в разных контрольных группах находились в следующих пределах: через 2 часа —  $0,529 \pm 0,149$ , 4 часа —  $0,636 \pm 0,138$ , 6 часов —  $0,693 \pm 0,141$ , 8 часов —  $0,746 \pm 0,138$ , 11 часов —  $0,805 \pm 0,155$ , 16 часов —  $0,867 \pm 0,207$ , и графически

представляли собой классическую кривую роста микроорганизмов, на которой видны первые четыре фазы роста: стационарная, лаг-фаза, фаза логарифмического роста, фаза отрицательного ускорения.

**Патогенность.** Показатели патогенности золотистого стафилококка на протяжении всех экспериментов оставались стабильными. Время коагуляции плазмы не изменялось и всегда составляло 3 часа. Реакция на каталазу всегда была положительной.

**Чувствительность к антибиотикам.** Чувствительность золотистого стафилококка к антибиотикам незначительно варьировала под влиянием условий окружающей среды и находилась в следующих пределах: к тетрациклину —  $25,58 \pm 2,75$  мм, левомицетину —  $23,165 \pm 2,5$  мм, эритромицину —  $24,835 \pm 3,165$  мм, стрептомицину —  $18,165 \pm 2,665$  мм, пенициллину —  $38,835 \pm 2,835$  мм, ципрофлоксацину —  $21,995 \pm 1,665$  мм, неомицину —  $17,42 \pm 1,25$  мм, гентамицину —  $20,83 \pm 2,0$  мм, канамицину —  $19,5 \pm 2,0$  мм.

#### **2.4. ВЛИЯНИЕ ОПТИЧЕСКОГО ИЗЛУЧЕНИЯ С РАЗЛИЧНЫМИ ХАРАКТЕРИСТИКАМИ НА МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И ПАТОГЕННОСТЬ ЗОЛОТИСТОГО СТАФИЛОКОККА**

Влияние оптического излучения на биологические свойства золотистого стафилококка изучено в 11 опытах в соответствии с разработанной методикой.

Морфологические и тинкториальные свойства золотистого стафилококка после всех видов облучения не изменялись и были идентичны биологическим свойствам золотистого стафилококка, наблюдаемым в контрольной группе, независимо от характеристик оптического излучения (длины волны и частоты модуляции).

Патогенность золотистого стафилококка, изученная по комплексу реакций плазмокоагуляции, определения дезоксирибонуклеазной, лецитиназной, гемолитической и каталазной активности не изменялась по сравнению с контролем. Время коагуляции плазмы крови кролика составляло 3 часа во всех экспериментах. Реакция на каталазу во всех случаях была положительной. Достоверными были только увеличения показателей лецитиназной активности золотистого стафилококка под действием зеленого и синего излучения при частоте модуляции 25000 Гц на 40,6 % и 27,88 % соответственно.

## 2.5. ВЛИЯНИЕ ОПТИЧЕСКОГО ИЗЛУЧЕНИЯ С РАЗЛИЧНЫМИ ХАРАКТЕРИСТИКАМИ НА СКОРОСТЬ РОСТА ЗОЛОТИСТОГО СТАФИЛОКОККА И ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К АНТИБИОТИКАМ

Скорость роста культуры золотистого стафилококка изменялась относительно контроля при всех характеристиках оптического излучения (табл.1).

Значения получены путем вычисления среднего арифметического суммы разностей с контролем показателей опытных групп, выраженных в процентах. Отрицательное значение:"-" свидетельствует о снижении показателя чувствительности золотистого стафилококка к антибиотикам, положительное:"+" — о повышении.

Бактериостатическое действие на культуру золотистого стафилококка оказывают инфракрасное (длина волны 940 нм) и красное (длина волны 660 нм) оптические излучения, генерируемые с частотой модуляции 0 Гц, 5, 50, 100, 250, 500, 1000, 3000, 5000, 25000 Гц. Однако, аналогичные по длине волны виды излучений, при частоте модуляции 10000 Гц стимулируют рост золотистого стафилококка на 0,97-1,39%.

Желтое излучение (длина волны 590 нм) задерживает скорость роста культуры золотистого стафилококка на 0,66-3,29% при частоте модуляции 0 Гц, 5, 50, 250, 1000, 3000, 5000, 25000 Гц, но при частоте модуляции 10000 и 25000 Гц стимулирует рост по сравнению с контролем на 3,42 и 1,02%, соответственно.

Зеленое излучение (длина волны 570 нм) оказывает бактериостатический эффект при частоте модуляции 0 Гц, 5, 50, 250, 1000, 3000, 5000 Гц, замедляя скорость роста золотистого стафилококка на 1,07-2,86%. При изменении частоты модуляции до 500, 10000 и 25000 Гц, зеленое излучение оказывает ростостимулирующее действие (0,9-2,32%).

Синий свет (длина волны 430 нм), излучаемый с частотой 0 Гц, 5, 50, 250, 500, 1000, 3000, 5000 Гц замедляет скорость роста золотистого стафилококка на 0,1-9,68%. Ростостимулирующим эффектом обладает синий свет при частоте модуляции 10000 и 25000 Гц.

Все характеристики оптических излучений оказывают влияние на чувствительность золотистого стафилококка к антибиотикам.

Анализируя результаты опытов, приведенные в таблице 1, можно отметить, что чувствительность культуры золотистого стафилококка к антибиотикам повышается при использовании оптических излучений с характеристиками: 940 нм (50 Гц, 250, 1000, 3000, 10000 Гц), 660 нм (5 Гц, 50, 3000, 10000 Гц), 590 нм (250 Гц, 3000, 10000 Гц), 570 нм

(50 Гц, 100, 250, 3000, 5000, 10000 Гц), 430 нм (5 Гц, 100, 1000, 3000, 5000, 10000 Гц).

Однако оптические излучения с характеристиками 940 нм (0 Гц, 500, 25000 Гц), 660 нм (0 Гц, 250, 500, 25000 Гц), 590 нм (0 Гц, 500, 1000 Гц), 570 нм (500 Гц, 100, 25000 Гц), 430 нм (0 Гц, 500 Гц) снижают чувствительность культуры золотистого стафилококка к антибиотикам.

В опытах наблюдали снижение чувствительности золотистого стафилококка к макролидным антибиотикам (эритромицин) при частоте модуляции излучений 0 Гц, к тетрациклинам — 25000 Гц, к аминогликозидным (стрептомицин, гентамицин, канамицин, неомцин) и  $\beta$ -лактамным антибиотикам (пенициллин, ципрофлоксацин) — 500 Гц.

Чувствительность золотистого стафилококка увеличивается к тетрациклинам при частоте модуляции излучений 250 Гц, аминогликозидным антибиотикам — при частоте 10000 Гц.

Частота модуляции излучений 3000 Гц, способствует повышению чувствительности золотистого стафилококка к максимальному количеству антибиотиков (макролидам, производным хлорамфеникола,  $\beta$ -лактамным антибиотикам). Можно предполагать, что подобная закономерность сохранится и для других антибиотиков из этих рядов, не применявшихся в ходе экспериментов.

**Таблица 1 — Средние значения изменений показателей скорости роста и чувствительности к антибиотикам культуры золотистого стафилококка**

Длина волны	Динамика скорости роста золотистого стафилококка относительно контроля. Ср. знач. (+ /- %)										
	Частота модуляции (Гц)										
	0	5	50	100	250	500	1000	3000	5000	10000	25000
(940 нм) Инфракрасное	<u>-2,42</u> -	<u>-1,67</u> -	<u>-2,85</u> +	<u>-0,16</u> -	<u>-3,85</u> +	<u>-9,68</u> -	<u>-3,6</u> +	<u>-5,49</u> +	<u>-7,37</u> -	<u>0,97</u> +	<u>-3,41</u> -
(660 нм) Красное	<u>-1,19</u> -	<u>-3,4</u> +	<u>-3,23</u> +	<u>-1,24</u> -	<u>-3,83</u> -	<u>-1,69</u> -	<u>-3,69</u> +	<u>-3,54</u> +	<u>-2,13</u> -	<u>1,39</u> +	<u>-0,44</u> -
(590 нм) Желтое	<u>-3,02</u> -	<u>-0,66</u> +	<u>-0,66</u> -	<u>0,5</u> +	<u>-2,3</u> +	<u>-1,53</u> -	<u>-2,58</u> +	<u>-3,29</u> +	<u>-2,79</u> +	<u>3,42</u> +	<u>1,02</u> +
(570 нм) Зеленое	<u>-1,53</u> -	<u>-1,07</u> -	<u>-1,93</u> +	<u>1,99</u> +	<u>-1,68</u> +	<u>0,9</u> -	<u>-1,98</u> +	<u>-2,86</u> +	<u>-2,66</u> +	<u>2,32</u> +	<u>2,27</u> -
(430 нм) Синее	<u>-1,75</u> -	<u>-2,06</u> +	<u>-2,44</u> -	<u>0,77</u> +	<u>-4,01</u> -	<u>-0,1</u> -	<u>-3,41</u> +	<u>-2,22</u> +	<u>-1,81</u> +	<u>0,14</u> +	<u>0,02</u> +

15

Примечание: в числителе – изменение скорости роста в %  
в знаменателе – изменение чувствительности  
к антибиотикам: "+" показатель повышается  
"-" показатель понижается

## 2.6. ВЫБОР ОПТИМАЛЬНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК ОПТИЧЕСКОГО ИЗЛУЧЕНИЯ

При анализе результатов исследований было отмечено, что чувствительность золотистого стафилококка к антибиотикам в большей степени зависит от частоты модуляции излучения, чем длины волны.

Все изученные характеристики оптического излучения по совокупному влиянию на скорость роста золотистого стафилококка и чувствительность к антибиотикам были разделены на 3 группы, с учетом частоты модуляции излучения.

В первую группу были включены излучения, оказывающие бактериостатический эффект и повышающие чувствительность золотистого стафилококка к антибиотикам. Этим требованиям соответствовали излучения с частотой модуляции 1000 Гц и 3000 Гц.

Во вторую группу были включены оптические излучения с частотами модуляции 0 Гц, 500, 10000, 25000 Гц, которые стимулируют рост золотистого стафилококка или понижают его чувствительность к антибиотикам.

К третьей группе были отнесены излучения с частотой 5 Гц, 50, 100, 250, 5000 Гц, применение которых не вызывало достоверных изменений биологических свойств золотистого стафилококка.

В группе излучений с частотой модуляции 1000 Гц наблюдалось уменьшение скорости роста золотистого стафилококка под действием инфракрасного излучения на 3,6 %, красного — на 3,69%, желтого — на 2,58%, зеленого — на 1,98 %, синего — на 3,41% (рис. 3).



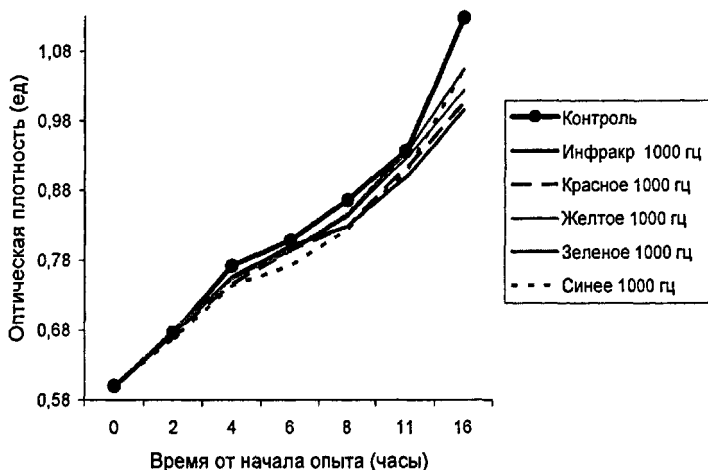


Рисунок 3 — Динамика скорости роста золотистого стафилококка при воздействии оптических излучений с частотой модуляции 1000 Гц/

Повышение чувствительности к левомицетину, пенициллину и ципрофлоксацину наблюдалось под действием инфракрасного, синего, желтого, зеленого излучений (рис. 4).

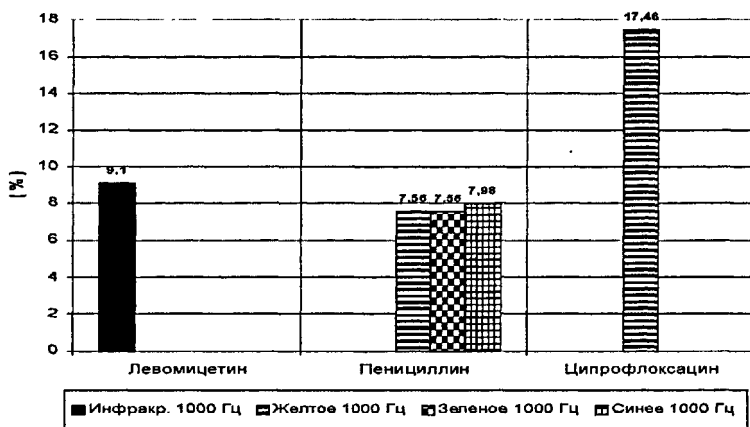
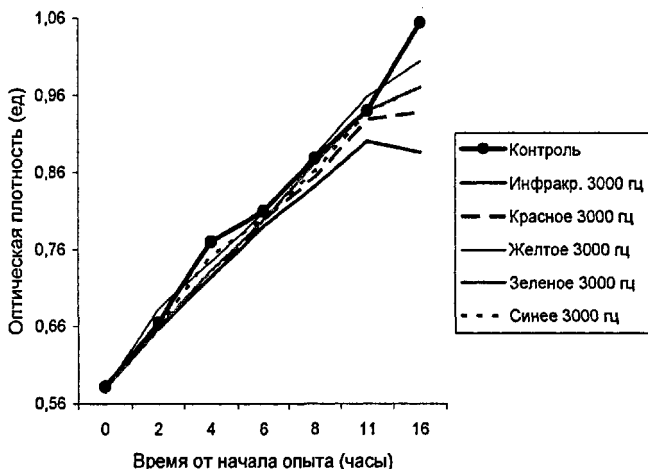


Рисунок 4 — Антибиотикорезистентность золотистого стафилококка при облучении с частотой модуляции 1000 Гц

В группе излучений с частотой модуляции 3000 Гц наблюдалось понижение скорости роста золотистого стафилококка под действием инфракрасного излучения на 5,49%, красного — на 3,54%, желтого —

на 3,29%, зеленого — на 2,86%, синего — на 2,22%. Бактериостатический эффект возрастал при увеличении длины волны (рис. 5).



рисунк 5 — Динамика скорости роста золотистого стафилококка при воздействии оптических излучений с частотой модуляции 3000 Гц.

Повышение чувствительности золотистого стафилококка к тетрациклину, левомицетину, эритромицину, ципрофлоксацину, неомицину и канамицину наблюдалось при всех длинах волн в пределах частоты модуляции 3000 Гц (рис.6).

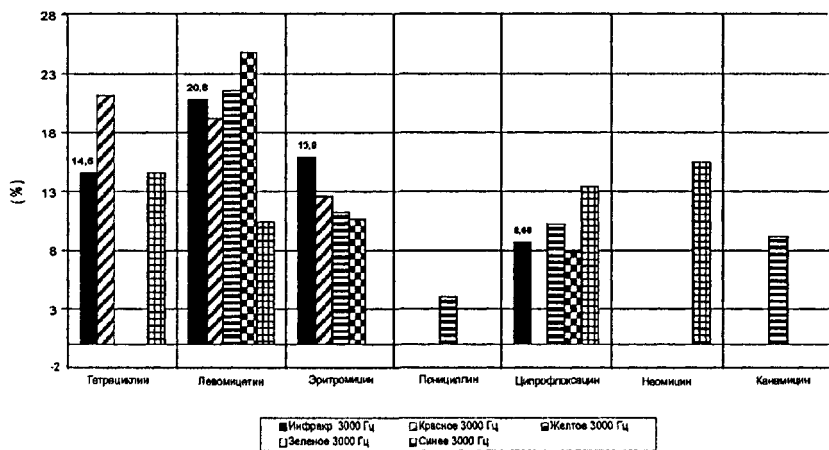


Рисунок 6 — Антибиотикорезистентность золотистого стафилококка при облучении с частотой модуляции 3000 Гц

Наиболее высокую эффективность имели красное излучение с частотой 1000 Гц, инфракрасное, желтое и синее излучения при частоте модуляции 3000 Гц, что характеризовалось достоверным повышением чувствительности золотистого стафилококка к антибиотикам и понижением скорости роста через 16 часов от начала опыта в фазе логарифмического роста на 10,81 %, 15,94, 4,74 и 7,97 %, соответственно.

Кроме этих результатов при выборе наиболее эффективных характеристик оптического излучения учитывались характер кривой скорости роста золотистого стафилококка под влиянием данного излучения (предпочтение отдавалось тем излучениям, кривая скорости роста которых наиболее удалена от кривой скорости роста в контрольной группе и имеет наибольшую равномерность) и проникающая способность оптического излучения в биологических тканях.

Наиболее эффективными и оптимальными для применения являются красное (длина волны 660 нм) с частотой модуляции 1000 Гц и инфракрасное (длина волны 940 нм) излучения с частотой модуляции 3000 Гц.

## 2.7. ИЗУЧЕНИЕ ПАТОГЕННОСТИ ЗЛОТИСТОГО СТАФИЛОКОККА НА ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ.

В двух опытах изучена патогенность золотистого стафилококка после облучения.

Белых мышей контрольной группы заражали взвесью суточной агаровой культуры музейного штамма золотистого стафилококка в физиологическом растворе, в концентрации  $1,0 \times 10^9$  КОЕ/мл внутривенно в количестве 1 мл.

В опытных группах заражение белых мышей проводили взвесью в физиологическом растворе суточной агаровой культуры золотистого стафилококка, подвергавшегося воздействию инфракрасного излучения с частотой модуляции 3000 Гц (1-я группа) и красного излучения с частотой модуляции 1000 Гц (2-я группа). Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2 — Патогенность золотистого стафилококка после облучения

	Контроль		I Опытная (Инфракрасное 3000 Гц)		II Опытная (Красное 1000 Гц.)	
	(голов)	(%)	(голов)	(%)	(голов)	(%)
Всего животных	15	100	15	100	15	100
Погибло животных	9	60	8	53,33	9	60

Как видно из таблицы 2, в контрольной группе через три дня погибли 9 животных из 15 (60,0%), в первой опытной группе — 8 животных (53,33 %), во второй опытной группе. — 9 животных (60,0 %). При патологоанатомическом вскрытии погибших животных обнаруживали точечные кровоизлияния в подкожной клетчатке, увеличение селезенки и печени, острое расширение сердца. Установлено наличие множества мелких абсцессов в селезенке, печени, легких, почках. При посеве проб из паренхиматозных органов (легкие, печень, селезенка) и сердца была выделена культура *Staphylococcus aureus*.

Второй опыт проведен на 6 кроликах. Кроликов контрольной группы заражали взвесью суточной агаровой культуры музейного штамма золотистого стафилококка в физиологическом растворе, в концентрации  $2,0 \times 10^9$  КОЕ/мл внутрикожно в выстриженный участок кожи в количестве 0,2 мл.

В опытных группах заражение кроликов проводили взвесью в физиологическом растворе суточной агаровой культуры золотистого стафилококка, подвергавшегося воздействию инфракрасного излучения с частотой модуляции 3000 Гц (1-я группа) и красного излучения с частотой модуляции 1000 Гц.

В контрольной и опытных группах у животных на месте инъекции наблюдали наличие инфильтрата, местной гиперемии и отсутствие каких-либо признаков некроза.

### 3. ВЫВОДЫ

1. Экспериментально обоснована методика применения прибора "Старт", имеющего модульный тип конструкции и широкий диапазон генерируемых монохромных излучений (940 нм, 660, 590, 570, 430 нм, с возможностью модуляции их следующими частотами: 0 Гц, 5, 50, 100, 250, 500, 1000, 3000, 5000, 10000, 25000 Гц) для лабораторных исследований по изучению влияния оптического излучения с широким диапазоном характеристик на микроорганизмы.

2. Изученные характеристики оптических излучений изменяют скорость роста культуры золотистого стафилококка и его чувствительность к антибиотикам, что зависит как от длины волны, так и от частоты модуляции, и не оказывают влияния на морфологические, тинкториальные свойства и патогенность.

3. Бактериостатическое действие на культуру золотистого стафилококка оказывают оптические излучения с характеристиками: 940 нм, 660 нм (0 Гц, 5, 50, 100, 250, 500, 1000, 3000, 5000, 25000 Гц), 590 нм

(0 Гц, 5, 50, 250, 1000, 3000, 5000, 25000 Гц), 570 нм (0 Гц, 5, 50, 250, 1000, 3000, 5000 Гц), 430 нм (0 Гц, 5, 50, 250, 500, 1000, 3000, 5000 Гц), снижая скорость роста на 0,1 — 9,68%.

4. Ростостимулирующее действие на культуру золотистого стафилококка в диапазоне 0,02-2,27% оказывают оптические излучения: 940, 660 нм (10000 Гц), 590, 430 нм (10000, 25000 Гц), 570 нм (500, 10000, 25000 Гц).

5. Чувствительность культуры золотистого стафилококка к антибиотикам достоверно повышается на 3,6-24,8 % при использовании следующих оптических излучений: 940 нм (50 Гц, 250, 1000, 3000, 10000 Гц), 660 нм (5 Гц, 50, 3000, 10000 Гц), 590 нм (250, 3000, 10000 Гц), 570 нм (50 Гц, 100, 250, 3000, 5000, 10000 Гц), 430 нм (5 Гц, 100, 1000, 3000, 5000, 10000 Гц).

6. Оптические излучения с характеристиками 940 нм (0, 500, 25000 Гц), 660 нм (0, 250, 500, 25000 Гц), 590 нм (0, 500, 1000 Гц), 570 нм (500, 100, 25000 Гц), 430 нм (0, 500 Гц) достоверно снижают чувствительность культуры золотистого стафилококка к антибиотикам на 3,2-27,8%.

7. Красное излучение с частотой модуляции 1000 Гц и излучения всех изучаемых длин волн с частотой модуляции 3000 Гц достоверно снижают скорость роста культуры золотистого стафилококка на 1,98-5,49%, причем при частоте модуляции 3000 Гц бактериостатический эффект закономерно возрастает с увеличением длины волны и повышается чувствительность микроорганизма к левомецитину на 10,4-24,8%, ципрофлоксацину— на 7,87-13,4%, тетрациклину— на 14,6-21,2% и эритромицину — на 10,6-15,9%.

#### **4. ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ**

Для изучения влияния оптического излучения с широким диапазоном характеристик на микроорганизмы применять методику и аппарат для фототерапии "Старт", согласно рекомендациям "Приборное обеспечение стимуляции репродуктивных функций, физиотерапии и физиопрофилактики гинекологических болезней у коров" (утв. ученым советом ГНУ ИЭВСиДВ СО РАСХН, прот. № 6 от 30.09.2003 и подсекцией "Инфекционная патология животных в регионе Сибири и Дальнего Востока", прот. № 18 от 30.09.2003).

## 5. СПИСОК РАБОТ, ОТРАЖАЮЩИХ ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Разработка экспериментального образца фототерапевтического прибора для изучения влияния различных видов излучения на биологические свойства *St. aureus* / Соавт.: Е.Ю. Смертина, Ю.Г. Юшков // Актуальные проблемы патологии свиней, крупного и мелкого рогатого скота: Материалы конференции молодых ученых— Владимир, 2001 — С. 143-146.

2. Влияние оптического излучения на некоторые биологические свойства золотистого стафилококка / Соавт.: Ю.Г. Юшков, Е.Ю. Смертина, Н.В. Старчак//Актуальные проблемы инфекционной патологии животных: Материалы междунар. науч.-практ. конф. посвящ. 45-летию ФГУ ВНИИЗЖ. — Владимир, 2003. — С. 473-476.

3. Изменение чувствительности золотистого стафилококка к антибиотикам под влиянием оптического излучения / Соавт.: Е.Ю. Смертина, Ю.Г. Юшков // Аграрная наука Сибири, Монголии, Казахстана и Башкортостана — сельскому хозяйству: Труды 6-й Междунар. науч.-практ. конф. (Павлодар, 9-10 июля 2003 г.).— Новосибирск, 2003.— С. 130-131.

4. Влияние оптического излучения на свойства золотистого стафилококка/ Соавт.: Е.Ю. Смертина, Ю.Г. Юшков // Актуальные вопросы зоотехнической науки и практики как основа улучшения продуктивных качеств и здоровья сельскохозяйственных животных: Материалы междунар. науч.-практ. конф. (г. Ставрополь, 22-24 октября 2003 г.). — Ставрополь, 2003. — С. 382-383.

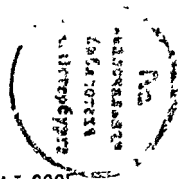
5. Разработка ветеринарного фототерапевтического лечебно-экспериментального аппарата "Старт" / Соавт.: Е.Ю. Смертина, Ю.Г. Юшков // Информационные технологии, информационные измерительные системы и приборы в исследовании сельскохозяйственных процессов. Агроинфо — 2003: Материалы междунар. науч.-практ. конф. (Новосибирск, 22-23 октября 2003 г.) — Новосибирск, 2003. — С. 227-229.

6. Аппараты для фототерапии / Соавт.: Е.Ю. Смертина, Ю.Г. Юшков, Н.В. Старчак // Актуальные вопросы ветеринарной медицины: Материалы Сибирской междунар. науч.-практ. конф. (Новосибирск, 12-13 февраля 2004 г.). — Новосибирск, 2004. — С. 271-272.

7. Обоснование применения оптического излучения при послеродовых патологиях у коров // Новейшие направления развития аграрной науки в работах молодых ученых: Труды конф. мол. ученых СО РАСХН (15-16 ноября 2004 г., пос. Краснообск).— Новосибирск, 2004. — С.259-264.

Подписано в печать 21.04.2005 г. Формат 60 x 84 /16  
Объем 1 п.л. Заказ № 136. Тираж 100 экз.

Отпечатано в ИПЦ «Юпитер»  
630501, НСО, п. Краснообск



07 МАЙ 2005

712