

ПОИСК И СЕЛЕКЦИЯ БАКТЕРИОФАГОВ *PROVIDENCIA*

Барт Н. Г., ассистент, тел. 8(8422) 55-95-47, E-mail: bart1967@mail.ru

Золотухин С. Н., доктор биологических наук, профессор

тел. 8(8422) 55-95-47, E-mail: fvm.zol@yandex.ru

Васильев Д. А., доктор биологических наук, профессор

тел. 8(8422) 55-95-47, E-mail: dav_ul@mail.ru

ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А.Столыпина»

Ключевые слова: Бактериофаги, бактерии рода *Providencia*, выделение, селекция, пассирование, методики, индукция.

В данной статье представлены результаты работы по выделению бактериофагов *Providencia*, используя методики по выявлению профага и выделению фагов из объектов внешней среды. Профаги методом индукции не выделены. Из объектов внешней среды выделено 16 фагов.

Актуальность исследования. Бактерии рода *Providencia* ранее относились к одному из видов рода *Proteus* семейства *Enterobacteriaceae*. Самостоятельное название род *Providencia* он получил лишь в 1963 году на основе Международной классификации *Enterobacteriaceae*. В 9-ом издании «Определителя бактерий Берджи» (1997) род *Providencia* представлен 5 видами: *P.agalifaciens*, *P.prettgeri*, *P.stuartii*, *P.heimbachae*, *P.rustiginii*, отличающиеся друг от друга некоторыми биохимическими свойствами [2].

Бактерии рода *Providencia* широко распространены в природе, их выделяют из воды, почвы, фекалий и мочи животных и человека. Некоторые штаммы входят в состав нормальной микрофлоры кишечника, однако среди них встречаются и варианты, способные вызывать вспышки гастроэнтеритов, токсикоинфекций мочевых инфекций у детей и взрослых людей, желудочно-кишечных заболеваний у молодняка животных [1, 3].

При постановке диагноза бактериологическим методом на заболевания, причиной которых являются представители рода *Providencia*, существует ряд трудностей. Одна из них состоит в том, что основой идентификации этих бактерий являются их культуральные и биохимические свойства, сходные с бактериями рода *Proteus*. Трудоемкость и материалоемкость делают бактериологический метод неэффективным в современных условиях. В связи с этим возникла необходимость в поиске ускоренного метода индикации и идентификации *Providencia* с использованием специфических бактериофагов [4, 5]. Исходя из этого, цель наших исследований – выделение и селекция фагов *Providencia*.

Материалы и методы. Индикаторными культурами при выделении изолятов фагов служили штаммы *Providencia*. Исследование материала на присутствие фагов и изучение их биологических свойств проводили по методикам: М. Адамс [1], Д.М. Гольдфарба [2], С.Н. Золотухиным [4], И.П. Ревенко [5].

Результаты исследований. Выделение фагов бактерий рода *Providencia* из исследуемого материала проводили, используя несколько методик. В первой серии опытов использовали методику выделения фагов из бактерий без воздействия на них индуцирующего фактора. Во второй серии опытов на культуры *Providencia*, исследуемые как «лизогенные», мы воздействовали индуцирующим фактором. Использовалась методика Гольдфарба (1962). На подсушенный газон 18-ти часовой культуры воздействовали ультрафиолетовыми лучами в течение 5-23 минут (интервал составил 2 минуты) при помощи бактерицидной лампы, 80 % энергии которой приходится на длину волны 2537 Å, на расстоянии 50 см между лампой и объектом). Затем делали смыв культуры *Providencia* стерильным физиологическим раствором, смыв фильтрова-

ли и полученный фильтрат исследовали на наличие фага на индикаторной культуре *Providencia* методом агаровых слоев по Грациа. Поиск профага в исследуемых культурах *Providencia* методом индукции не привел к положительным результатам.

Поэтому, третьим этапом наших исследований было использование методики по выявлению фагов из объектов внешней среды по Адамсу (1961). Первоначально готовили смесь мясо-пептонного бульона с исследуемым объектом (почва, сточные воды, фекалии) в соотношении 10:1, добавляли индикаторные культуры и термостатировали посеvy 2-3 суток при температуре 37 °С. Затем смесь очищали от механических примесей фильтрованием, центрифугировали при 3000 об./мин, прогревали при 60 °С в течение 30 минут и исследовали на наличие фага методом «стекающая капля».

На поверхность 1,5 % мясо-пептонного агара в чашках Петри наносили пипеткой 3–4 капли 18–ти часовой бульонной культуры *Providencia*, которую стерильным шпателем растирали по поверхности среды. Чашки ставили в термостат при 37 °С для подсушивания газона на 20-30 минут. Чашку делили на два сектора при помощи маркера. На поверхность засеянной среды наносили исследуемый на наличие бактериофага субстрат и наклоняли чашку Петри так, чтобы капля стекла, на вторую половину таким же образом наносили мясо-пептонный бульон (для контроля). Посевы ставили в термостат (температура 37 °С), учет результатов проводили через 18 часов. Наличие зон лизиса на газоне роста свидетельствовало о присутствии в исследуемом материале бактериофага *Providencia*.

Выделение чистых линий фага и их селекцию проводили путем последовательных десяти пассажей морфологически однотипных негативных колоний на плотных питательных средах на индикаторной культуре *Providencia* в соответствии с методикой, описанной и использованной Золотухиным [5].

В результате проведенных исследований по выявлению специфичных бактериофагов рода *Providencia*, было установлено, что имеющиеся у нас 28 штаммов культур рода *Providencia* не проявляли лизогенных свойств. Феномен профага выявлен не был. Используя методику выделения фагов из объектов внешней среды, нами было выделено 16 специфичных для рода *Providencia* фагов, являющихся заведомо вирулентными. «Чистые линии» выделенных фагов *Providencia* мы десятикратно пассировали на индикаторных культурах, что значительно повышало титр их литической активности.

Библиографический список

1. Адамс М. Бактериофаги (перевод с английского) М., 1961. С. 521.
2. Гольдфарб Д.М. Бактериофагия. М.: Медгиз, 1961. С.297.
3. Золотухин С.Н. Малоизученные энтеробактерии и их роль в патологии животных. Ульяновск, 2004. С. 125.
4. Золотухин С.Н., Каврук Л.С., Васильев Д.А. Смешанная кишечная инфекция телят и поросят, вызываемая патогенными энтеробактериями. Ульяновск, 2005. С.48-51.
5. Ревенко И.П. Бактериофаги и их использование в ветеринарной практике. Киев: «Урожай», 1978. С.20-21.

SEARCH AND SELECTION OF BACTERIOPHAGES PROVIDENCIA

Bart N.G., Zolotukhin S.N., Vasilev D.A.

Key words: *bacteriophages, bacteria of genus Providencia, allocation, selection, passaging, methods, induction.*

This article presents the results of the work on the allocation of bacteriophages Providencia, using the methods of identification of the prophage and the allocation of phages from the objects

of the environment. The prophages weren't highlighted by the method of induction. 16 phages were allocated from environmental objects.

УДК 619:576

ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРИОФАГОВ РОДА *PROVIDENCIA*

Барт Н. Г., ассистент, тел. 8(8422) 55-95-47, E-mail: bart_1967@mail.ru

Золотухин С. Н., доктор биологических наук, профессор
тел. 8(8422) 55-95-47, E-mail: fym.zol@yandex.ru

Васильев Д. А., доктор биологических наук, профессор
тел. 8(8422) 55-95-47, E-mail: dav_ul@mail.ru

ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А.Столыпина»

Ключевые слова: Бактериофаги, *Providencia*, литическая активность, терморезистентность, специфичность.

В данной статье представлены результаты работы по выделению и изучению некоторых биологических свойств бактериофагов Providencia. В результате исследований были изучены: литическая активность, терморезистентность и специфичность.

Бактерии рода *Providencia* широко распространены в природе, их выделяют из воды, почвы, фекалий и мочи животных и человека [4].

Некоторые штаммы, вероятно, входят в состав нормальной микрофлоры кишечника, однако среди них встречаются и патогенные варианты, способные вызывать вспышки гастроэнтеритов, токсикоинфекций мочевых инфекций у детей и взрослых людей, раневые послеоперационных инфекций, желудочно-кишечных заболеваний у молодняка животных [5].

Эффективность лечебных мероприятий во многом зависит от своевременности диагностики болезни, поэтому совершенствованию методов лабораторной диагностики заболеваний, вызываемых указанными микроорганизмами, является актуальной проблемой.

При постановке диагноза бактериологическим методом на заболевания, причиной которых являются представители рода *Providencia*, существует ряд трудностей. Одна из них состоит в том, что основой идентификации этих бактерий являются их биохимические свойства. Трудоемкость и длительность изучения ферментативных свойств не позволяют быстро и точно идентифицировать названные микроорганизмы.

В связи с этим возникла необходимость в поиске альтернативных методов лабораторной диагностики, которые были бы менее трудоемкими, более быстрыми и доступными для лабораторий любого уровня. Одним из таких методов является фагодиагностика [1- 3, 5-8].

Поэтому **целью** наших исследований явилось изыскание активных бактериофагов, лизирующих патогенные штаммы бактерий рода *Providencia*.

Материал и методы исследования.

Источником для выделения бактериофагов служили сточные воды взятые из животноводческих помещений разных хозяйств Ульяновской и Самарской областей и больниц города Ульяновска.

В качестве индикаторных культур были использованы 26 патогенных штаммов рода *Providencia*, полученные из музея кафедры и выделенные нами из патологического материала и объектов внешней среды.

В основу метода для поиска фагов положена схема, предложенная Грация [1-3]. Ис-