

ФАГИ PROVIDENCIA ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ И ПРОФИЛАКТИКИ ЗАБОЛЕВАНИЙ МОЛОДНЯКА СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

Н.Г. Барт, кандидат биологических наук., ст.преподаватель
тел. 8(8422) 55-95-47, bart1967@mail.ru

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

Д.А. Васильев, 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 биологических свойств бактериофагов *Providencia*. В результате исследований были изучены: литическая активность, терморезистентность и специфичность.

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

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.

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 лабо-

раторий любого уровня. Одним из таких методов является фагодиагностика.

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

Методика исследований. 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 Грациа. Исследуемый материал (сточные воды) засевают с бактериями *Providencia* на МПБ. Бульон инкубировали при 37°C в течение 14-18 часов, затем фильтровали через бумажные фильтры. Полученный фильтрат подогревали при 60°C в течение 30 минут для инактивации сопутствующей микрофлоры. Наличие фага в фильтрате выявляли при его посевах на плотные питательные среды (1,5% мясопептонный агар) методом агаровых слоев.

Селекцию штаммов фагов производили методом пассирования штаммов на индикаторных культурах с последующим клонированием однородных негативных колоний, типичной для каждого изолята.

Таблица 1 - Литическая активность бактериофагов рода *Providencia*

№ пп	Название фага	Индикаторная культура	Активность фагов	
			по Аппельману	по Грациа
1	F-67 УГСХА	<i>P.rettgeri</i> H67	10^{-9}	1×10^{11}
2	F-87 УГСХА	<i>P.rettgeri</i> C87	10^{-8}	$1,5 \times 10^{10}$
3	F-3 УГСХА	<i>P.rettgeri</i> H67	10^{-8}	7×10^9
4	F-4 УГСХА	<i>P.rettgeri</i> C87	10^{-7}	5×10^8
5	F-5 УГСХА	<i>P.rettgeri</i> M45	10^{-8}	1×10^9
6	F-6 УГСХА	<i>P.rettgeri</i> H67	10^{-8}	$1,1 \times 10^9$
7	F-7 УГСХА	<i>P.rettgeri</i> C87	10^{-8}	1×10^9
8	F-8 УГСХА	<i>P.rettgeri</i> C87	10^{-8}	7×10^9
9	F-9 УГСХА	<i>P.rettgeri</i> M45	10^{-8}	2×10^9
10	F-10 УГСХА	<i>P.rettgeri</i> H67	10^{-6}	4×10^7
11	F-11 УГСХА	<i>P.rettgeri</i> H67	10^{-8}	1×10^9
12	F-12 УГСХА	<i>P.rettgeri</i> Д1	10^{-8}	2×10^9
13	F-13 УГСХА	<i>P.rettgeri</i> K1	10^{-8}	$2,5 \times 10^9$
14	F-14 УГСХА	<i>P.rettgeri</i> K1	10^{-8}	$2,5 \times 10^9$
15	F-15 УГСХА	<i>P.rettgeri</i> H67	10^{-8}	8×10^9
16	F-16 УГСХА	<i>P.rettgeri</i> M45	10^{-8}	5×10^9

Активность выделенных фагов определяли по методам Грациа и Аппельмана.

Результаты исследований. В результате проведенных исследований нами было выделено 16 термостабильных изолята бактериофагов, образующих прозрачные колонии различного диаметра от 1,0 до 5,0 мм или стерильные пятна в виде зон лизиса, диаметром от 5,0 до 9,0 мм. Литическая активность выделенных фагов по методу Аппельмана составляет от 10^{-6} до 10^{-9} , по методу Грациа – от $2,1 \times 10^8$ до $1,2 \times 10^{11}$ фаговых корпускул в 1 мл среды.

Изучение специфичности двух бактериофагов (F-67 УГСХА, F-87 УГСХА), имеющих высокую активность и широкий диапазон литического действия проводили по отношению к представителям других родов семейства *Enterobacteriaceae*: *Escherichia spp.*, *Proteus spp.*, *Morganella spp.*, *Citrobacter spp.*, *Salmonella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Yersinia enterocolitica*, а также родов других семейств: *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Pseudomonas spp.* на плотном питательном агаре методом нанесения капель фагов на газон исследуемой культуры.

Для этого на поверхность МПА в чашках Петри пипеткой наносили 3 – 4 капли 18 часовой бульонной культуры исследуемых микроорганизмов. Затем равномерно распределяли

по поверхности среды стерильным шпателем. Чашки ставили в термостат для подсушивания на 15 – 20 минут. После чего, дно чашки маркером разделили на два сектора: на первый сектор засеянного агара, пипеткой легким прикосновением капли, наносили исследуемый фаг; на второй - по центру в качестве контроля наносили стерильный МПБ. Чашку наклоняли, чтобы капли стекли, а затем инкубировали при температуре 37°C, оценку результатов проводили через 24 часа.

В результате проведенных исследований было установлено, что селекционированные фаги неактивны по отношению к представителям бактерий других родов и семейств, то есть явились специфичными для бактерий гомологичного рода.

Таким образом, нами было выделено и селекционировано 16 термостабильных изолятов фагов, активных в отношении бактерий вида *Providencia rettgeri* (табл.1).

Выводы. Были отобраны два специфичных штамма фагов F-67 УГСХА и F-87 УГСХА с наиболее выраженными биологическими свойствами (литическая активность, спектр литической активности, специфичность, устойчивость), которые позволяют использовать их для изготовления диагностических и лечебных биопрепаратов.

Библиографический список:

1. Адамс М. Бактериофаги (перевод с английского) // - М., - 1961. -521С.
2. Барт Н.Г. Биологические свойства бактериофагов Providencia / Н.Г. Барт, С.Н. Золотухин, Д.А. Васильев // Актуальные вопросы аграрной науки и образования: Материалы Международной научно-практической конференции. – Ульяновск, 2009. – С. 6-8.
3. Барт Н.Г. Спектр литической активности бактериофагов Providencia / Н.Г. Барт, С.Н. Золотухин, Д.А. Васильев // Актуальные вопросы аграрной науки и образования: Материалы Международной научно-практической конференции. – Ульяновск, 2013. – С. 12-15.
4. Васильев, Д.А. Характеристика биологических свойств бактериофагов вида *Bacillus subtilis* / Д.А. Васильев Д.А., Н.А. Феоктистова М.А. Юдина [и др.] // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2011. - № 1. - С. 79-83.
5. Ганюшкин В.Я. Бактериофаги сальмонелл и их применение в ветеринарии // Учебное пособие – Ульяновск. – 1988. – С.45.
6. Гольдфарб Д.М. Бактериофагия.// -М.: Медгиз. -1961. – С.297.
7. Золотухин С.Н. Малоизученные энтеробактерии и их роль в патологии животных. - 125 с., Ульяновск., -2004.
8. Золотухин С.Н., Каврук Л.С., Васильев Д.А. Смешанная кишечная инфекция телят и поросят, вызываемая патогенными энтеробактериями. – Ульяновск. – 2005. – С.48-51.
9. Калдыркаев, А.И. Разработка системы фаговаров бактерий *Bacillus cereus* для идентификации и мониторинга данного микроорганизма / А.И. Калдыркаев, Н.А. Феоктистова, А.В. Алешкин // В книге: «Бактериофаги микроорганизмов значимых для животных, растений и человека». - Ульяновск, 2013. - С. 211-225.
10. Ревенко И.П. Бактериофаги и их использование в ветеринарной практике. – Киев: «Урожай», 1978. –С.20-21.
11. Садеева, Н.Т. Выделение фагов бактерий вида *Bacillus cereus* / Н.Т. Садеева, Н.А. Феоктистова, М.А. Юдина [и др.] // В сборнике: Актуальные проблемы инфекционной патологии и биотехнологии: материалы V-й Всероссийской (с международным участием) студенческой научной конференции. – Ульяновск: ГСХА, 2012. - С. 14-17.
12. Феоктистова, Н.А. Методы выделения бактериофагов рода *Bacillus* / Н.А. Феоктистова, В.А. Макеев, М.А. Юдина [и др.] // Вестник ветеринарии. - 2011. - Т. 59. - № 4. - С. 88-89.
13. Феоктистова, Н.А. Выделение и изучение биологических свойств бактериофагов рода *Proteus*, конструирование на их основе биопрепарата и разработка параметров практического применения / автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова. Саратов, 2006. – С. 9-12.
14. Феоктистова, Н.А. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов бактерий *Bacillus subtilis* / Н.А. Феоктистова // В книге: «Бактериофаги микроорганизмов значимых для животных, растений и человека». - Ульяновск, 2013. - С. 186-197.

PROVIDENCIA FAGI FOR TREATMENT AND PREVENTION OF DISEASES OF YOUNG GROWTH OF FARM ANIMALS

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

Keywords: *Bacteriophages, Providencia, lytic activity, thermoresistance, specificity.*

Results of work on allocation and studying of biological properties of bacteriophages of Providencia are presented in this article. As a result of researches were studied: lytic activity, thermoresistance and specificity.