

## АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ БАКТЕРИЙ ВИДА *PROVIDENCIA RETTGERI*

**Барт Наталья Геннадьевна**, канд. биол. наук, доцент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза», ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ.

433431, Ульяновская область, Чердаклинский район, п.Октябрьский, ул.Студенческая, 12-75.

E-mail: [bart1967@mail.ru](mailto:bart1967@mail.ru)

**Евхутч Никита Валерьевич**, соискатель кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза», ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ.

433970, Ульяновская область, р.п. Павловка, ул.50 лет Октября, 22.

E-mail: [nikita\\_3456@mail.ru](mailto:nikita_3456@mail.ru)

**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.*

**Введение.** 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].

**Материалы и методы 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 [1-3]. Исследуемый материал (сточные воды) засеивали 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 посеве 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. Активность выделенных фагов определяли по методам Грациа и Аппельмана [3].

**Результаты исследований и их обсуждение.** В результате проведенных исследований нами было выделено 16 термостабильных изолята бактериофагов, образующих прозрачные колонии различного

диаметра от 1,0 до 5,0 мм (рис.1) или стерильные пятна в виде зон лизиса, диаметром от 5,0 до 9,0 мм (рис.2). 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 [2].

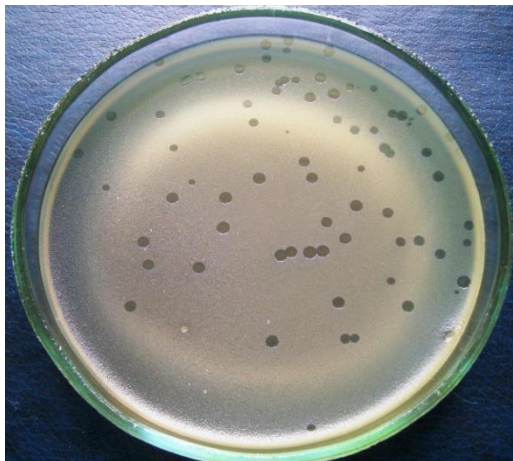


Рис.1 Негативные колонии бактериофагов рода *Providencia* (штамм фага F-67 УГСХА)

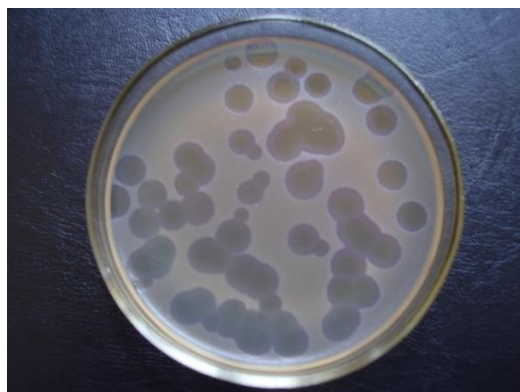


Рис.2 Негативные колонии бактериофагов рода *Providencia*

(штамм фага F-87 УГСХА)

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.

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 <sup>-9</sup>	1 x 10 <sup>11</sup>
2	F-87 УГСХА	<i>P.rettgeri</i> C87	10 <sup>-8</sup>	1,5 x 10 <sup>10</sup>
3	F-3 УГСХА	<i>P.rettgeri</i> H67	10 <sup>-8</sup>	7 x 10 <sup>9</sup>
4	F-4 УГСХА	<i>P.rettgeri</i> C87	10 <sup>-7</sup>	5 x 10 <sup>8</sup>
5	F-5 УГСХА	<i>P.rettgeri</i> M45	10 <sup>-8</sup>	1 x 10 <sup>9</sup>
6	F-6 УГСХА	<i>P.rettgeri</i> H67	10 <sup>-8</sup>	1,1 x 10 <sup>9</sup>
7	F-7 УГСХА	<i>P.rettgeri</i> C87	10 <sup>-8</sup>	1 x 10 <sup>9</sup>
8	F-8 УГСХА	<i>P.rettgeri</i> C87	10 <sup>-8</sup>	7 x 10 <sup>9</sup>
9	F-9 УГСХА	<i>P.rettgeri</i> M45	10 <sup>-8</sup>	2 x 10 <sup>9</sup>
10	F-10 УГСХА	<i>P.rettgeri</i> H67	10 <sup>-6</sup>	4 x 10 <sup>7</sup>
11	F-11 УГСХА	<i>P.rettgeri</i> H67	10 <sup>-8</sup>	1 x 10 <sup>9</sup>
12	F-12 УГСХА	<i>P.rettgeri</i> Д1	10 <sup>-8</sup>	2 x 10 <sup>9</sup>
13	F-13 УГСХА	<i>P.rettgeri</i> K1	10 <sup>-8</sup>	2,5 x 10 <sup>9</sup>
14	F-14 УГСХА	<i>P.rettgeri</i> K1	10 <sup>-8</sup>	2,5 x 10 <sup>9</sup>
15	F-15 УГСХА	<i>P.rettgeri</i> H67	10 <sup>-8</sup>	8 x 10 <sup>9</sup>
16	F-16 УГСХА	<i>P.rettgeri</i> M45	10 <sup>-8</sup>	5 x 10 <sup>9</sup>

**Заключение.** 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). Были отобраны два специфичных штамма фагов с наиболее выраженными биологическими свойствами, которые позволяют использовать их для изготовления диагностических биопрепаратов.

#### **Библиографический список:**

1.Барт Н.Г. Исследование бактерий рода *Providencia* на наличие в составе их генетического аппарата профага / Н.Г. Барт, С.Н. Золотухин, Д.А. Васильев // Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения. Материалы VII Международной научно-практической конференции. – 2016. – С.170-173.

2.Барт Н.Г. Спектр литической активности бактериофагов *Providencia*, используемых для создания биопрепарата по деконтаминации пищевых продуктов. / Н.Г. Барт, С.Н. Золотухин, Д.А. Васильев // Актуальные проблемы биологии, биотехнологии, экологии и биобезопасности. Материалы Международной научно-практической конференции посвященной 80-летию заслуженного ученого, профессора В.А. Зайцева. – 2015. – С.69-73.

3.Барт Н.Г. Выделение бактериофагов рода *Providencia* / Н.Г. Барт, С.Н. Золотухин, Д.А. Васильев // Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения. Материалы VII Международной научно-практической конференции. – 2012. Т.1.– С.236-239.

4. Барт, Н.Г. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов бактерии рода *Providencia* / Н.Г.Барт, Д.А.Васильев, С.Н.Золотухин // Бактериофаги микроорганизмов значимых для животных, растений и человека. – Ульяновск, 2013.

5. Барт, Н.Г. Биотехнологические аспекты разработки фагового препарата для индикации и идентификации бактерий рода *Providencia* / Н.Г.Барт // Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук. – Ульяновск, 2013.

# **ALTERNATIVE METHODS FOR LABORATORY DIAGNOSTICS OF VACCIA RETTGERI BACTERIA**

**Bart N.G., Evhutić N.V.**

***Keywords:*** Bacteriophages, Providencia, lytic activity, thermal resistance, specificity.

This article presents the results of work on the isolation and study of some biological properties of Providencia bacteriophages. As a result of the studies, lytic activity, thermal resistance and specificity were studied.