

## ИНДИКАЦИЯ БАКТЕРИЙ *PSEUDOMONAS FLUORESCENS* МЕТОДОМ РЕАКЦИИ НАРАСТАНИЯ ТИТРА ФАГА

*Викторов Д.А., к.б.н., старший научный сотрудник, т. 8-908-477-55-73,*

*e-mail: viktorov\_da@mail.ru*

*Васильев Д.А., д.б.н., профессор, тел. 8(8422) 55-95-47, dav\_ul@mail.ru*

*Артамонов А.М., соискатель*

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

**Ключевые слова:** псевдомонозы рыб, *Pseudomonas*, бактериофаги, реакция нарастания титра фага, фагодиагностика.

Применяемые в настоящее время методы диагностики, лечения и профилактики псевдомонозов рыб имеют существенные недостатки. Авторами предложены усовершенствованные методы.

### **Актуальность.**

*Pseudomonas fluorescens* выделяют главным образом из недоброкачественных пищевых продуктов (яйца, мясо, рыба, молоко), что указывает на роль данных бактерий в порче пищевых продовольственных товаров и сырья. Могут быть выделены из клинического материала [5]. Наряду с другими видами бактерий неферментирующей группы, способны к биодеградации различных углеводов, что придаёт *Pseudomonas fluorescens* важное практическое значение при очистке почвы, воды и сточных вод промышленных предприятий от загрязнений нефтепродуктами. Особенно актуально применение психрофильной бактерии *Pseudomonas fluorescens* с этой целью в северных регионах страны при температуре 3-15 °С [5]. Широко населяет ризосферу и способствует значительному улучшению роста и развития растений, являясь потенциальным объектом агробιοтехнологии для разработки на их основе биологических средств защиты растений от фитопатогенов, а так же биопрепаратов, стимулирующих рост и повышающих продуктивность растений [5].

*Pseudomonas fluorescens* является возбудителем псевдомоноза – заболевания карповых рыб, распространенного в хозяйствах, применяющих индустриальные методы рыбоводства [2].

Последствия энзоотий наносят ощутимый экономический ущерб рыбоводческим хозяйствам [2].

В целях ликвидации псевдомонозов проводят ряд сложных и затратных мероприятий [1, 2, 5]. Хозяйство объявляют неблагополучным и вводят ограничения на перевозки рыб [2]. Для лечения применяют дорогостоящие, малоэффективные в экономическом отношении курсы антибиотиков: дибхиомицина, экмолина, сульгина, левомецетина [2], которые накапливаются в тканях рыбы, попадая в дальнейшем в пищевое сырьё и продукцию. Использование антибиотиков вызывает гибель полезной сапрофитной микрофлоры прудов, микрофлоры кишечника рыб, а бессистемное применение антибиотиков приводит к появлению антибиотико-резистентных бактерий.

Меры профилактики, применяемые в настоящее время, также обуславливают значительные затраты, связанные с дезинфекцией бассейнов и инвентаря, созданием оптимальных зоогигиенических, гидрологических и гидрохимических условий, применением особой технологии посадки молоди рыб в бассейны, поддержанием оптимального температурного режима [2].

Применяемые на сегодня методы диагностики псевдомоназов далеко не совершенны. Диагноз ставят на основании результатов бактериологического исследования с учетом эпизоотологических данных, клинических признаков и патологоанатомических изменений [3]. При типировании возбудителей заболевания до рода *Pseudomonas* применяется узкий ряд тестов (оксидазная активность, тест окисления-ферментации, определение подвижности, реакция на среде Клиглера), что обуславливает большую долю недостоверности исследования, которое, кроме того, затрачивает от 84 до 126 часов [3]. Для определения видовой принадлежности возбудителей, проводимой крайне редко, используются методы высевов на среды Гисса с маннитом, сахарозой, мальтозой, лактозой. По данным ряда исследователей, видовая дифференциация псевдомонад посредством определения сахаролитической активности не может давать достоверных результатов [3].

Перечисленные причины обуславливают необходимость использования новых методов диагностики, обладающих следующими критериями: простота в применении, кратчайшие сроки исследования, высокая чувствительность и специфичность.

**Цель исследования:** разработка биопрепарата на основе выделенного и изученного бактериофага *Pseudomonas fluorescens* и параметры его применения в схеме реакции нарастания титра фага (РНФ) для индикации указанных бактерий.

### **Материалы и методы исследования.**

Выделение и изучение биологических свойств фагов проводили по методам Д.М. Гольдфарба (1961), И.П. Ревенко (1978), И.М. Габриловича (1973), С.Н. Золотухина (2007).

Материалом исследования при выделении бактериофагов являлись 76 образцов прудовой воды и патологического материала. В качестве индикаторных культур использовали штамм *P. fluorescens* ATCC 13525. Посевы инкубировали при температуре 28 °С в течение 24 часов.

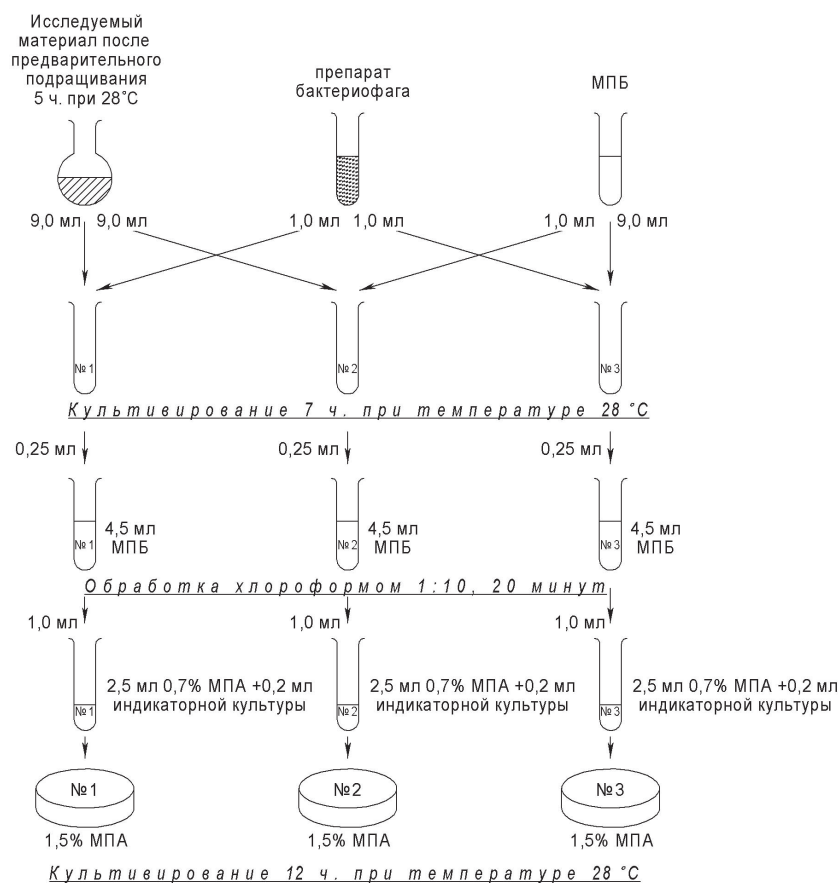
Для получения негативных колоний бактериофагов использовали метод агаровых слоев по Грациа (Гольдфарб, 1961). Повышение литической активности проводили пассированием на индикаторных культурах. Литическую активность определяли по Аппельману и Грациа (Гольдфарб, 1961). Для определения спектра литической активности использовали референс-штамм *P. fluorescens* ATCC 13525 и выделенные нами ранее 28 полевых штаммов. Для определения специфичности использовали 2 референс-штамма бактерии *P. putida* №901 IV-89; ATCC 12633 IV-87, полученные из музея ГИСК им. Л.А. Тарасевича, 33 «полевых» штамма *P. putida*, выделенные из объектов окружающей среды, 3 референс-штамма бактерии *P. aeruginosa* №128, №381, №1677, 14 штаммов бактерий других родов: *Aeromonas hydrophila*, *Proteus mirabilis*, *Morganella morganii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp.*, *Bacillus cereus*, *E. coli*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Yersinia enterocolitica*, *Stenotrophomonas maltophilia*, полученные из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ при ФГБОУ ВПО Ульяновской ГСХА. Все штаммы обладали типичными биологическими свойствами.

Реакцию нарастания титра фага проводили по методам В.Д. Тимакова и Д.М. Гольдфарба (1962), а также В.Я. Ганюшкина (1984).

### **Результаты исследований.**

Препарат бактериофага Pf01F1-УГСХА обладает всеми необходимыми для проведения РНФ свойствами: титр бактериофага  $0,7 \times 10^8$ , спектр литической активности 86,2 %, строгая специфичность по отношению к бактерии *P. fluorescens*.

В результате серии исследований была разработана схема постановки РНФ с использованием биопрепарата бактериофага Pf01F1-УГСХА, представленная на рисунке 1.



**Рис. 1 - Схема реакции нарастания титра фага для индикации *P. fluorescens*.**

Исследуемый материал весом 5 г растирается в фарфоровой ступке и вносится в колбы, содержащие по 50 мл питательного бульона (МПБ). Содержимое колб культивируется в течение 5 часов при 28 °С для предварительного подращивания бактерий. На каждую исследуемую пробу отводится три пробирки: №1 предназначена для опытной пробы, №2 является контролем на свободный фаг, №3 – контроль титра индикаторного фага. Исследуемый материал разливается по 9 мл в пробирки №1 и №2, пробирки №3 содержат 9 мл МПБ. В пробирки №1 и №3 добавляется по 1 мл препарата бактериофага Pf01F1-УГСХА в рабочем разведении (титр бактериофага  $10^4$ ), а пробирки №2 – 1 мл МПБ. Все пробы инкубируются в термостате при температуре 28 °С 7 часов. Параллельно ставится контроль стерильности сред. После инкубации из пробирок берутся пробы по 0,25 мл, вносятся в пробирки с 4,5 мл МПБ и обрабатываются фильтрованием через бактериальные фильтры. Далее содержимое пробирок исследуется методом агаровых слоев по Грациа. Чашки инкубируются 12 часов при 28 °С.

Реакция считается положительной при нарастании титра бактериофага Pf01F1-УГСХА в 5 и более раз.

**Выводы:** разработанная нами схема РНФ с использованием биопрепарата бактериофага Pf01F1-УГСХА позволяет проводить индикацию *P. fluorescens* в различных объектах количестве от  $10^3$  м.к./мл в течение 24 часов. Преимущества метода РНФ: время на исследование сокращается до 24 часов, реакция обладает высокой чувствительностью – метод позволяет проводить индикацию возбудителя при содержании его в исследуемых образцах от  $10^3$  м.к./мл., высокой специфичностью, не требуется выделение чистой культуры возбудителя, методика проста, не требует использования дорогостоящего оборудования и материалов, высококвалифицированных специалистов [4]. Перечисленные достоинства позволяют судить о

высокой экономической эффективности метода РНФ в сравнении с существующими методами диагностики псевдомоноза рыб [4].

#### **Библиографический список**

1. Вялова Г.П. Методы борьбы и профилактики псевдомоноза молоди горбуши / Г.П. Вялова, А.В. Полтева, З.К. Шкурина // Информ. листок СахЦНТИ. – 1995. – № 38-95. – С. 4.
2. Инструкция о мероприятиях по профилактике и ликвидации псевдомоноза рыб, Минсельхозпрод России, Департамент ветеринарии, 1998.
3. Методические указания по лабораторной диагностике псевдомонозов рыб, Минсельхозпрод России, Департамент ветеринарии, 1998.
4. Ревенко И.П. Бактериофаги и их использование в ветеринарной практике. К., «Урожай», 1978.
5. Смирнов В.В., Киприанова Е.А. Бактерии рода *Pseudomonas*. Киев. Наукова думка, 1990, с. 176-187.

### **INDICATION OF BACTERIA OF THE *PSEUDOMONAS FLUORESCENS* BY METHOD OF REACTION OF RISE OF TITRE OF THE PHAGE**

*Viktorov D.A., Vasilev D.A., Artamonov A.M.*

**Keywords:** *pseudomonosis fish, Pseudomonas, bacteriophages, phage titer rise reaction, fagodiagnostika.*

*The authors proposed a new method of indicating Pseudomonas fluorescens (diagnostics pseudomonosis of fish) with the use of the reaction of rise of titre of the phage. The appropriate bacteriophages were allocated, their properties were studied and diagnostic biopreparation was developed.*

УДК 619:579

### **УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ ПСЕВДОМОНОЗОВ РЫБ**

*Викторов Д.А. , кандидат биологических наук,  
старший научный сотрудник, тел. 9084775573, viktorov\_da@mail.ru  
Гринева Т.А., соискатель, тел. 9033201410, e-mail: tag78@mail.ru  
Васильев Д.А., доктор биологических наук, профессор,  
тел. 8(8422) 55-95-47, dav\_ul@mail.ru  
Артамонов А. М., соискатель  
Золотухин С.Н., доктор биологических наук, профессор,  
тел. 9272703480, fym.zol@yandex.ru  
ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А.Столыпина»*

**Ключевые слова:** *псевдомонозы рыб, Pseudomonas, бактериофаги, реакция нарастания титра фага, фагодиагностика.*