

**ВЫДЕЛЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ
БАКТЕРИОФАГОВ, АКТИВНЫХ В ОТНОШЕНИИ БАКТЕРИИ
*PSEUDOMONAS FLUORESCENS***

Семенов А.Д., ученик 9Б класса МОУ СОШ №31 им. «ГЕРОЕВ СВИРИ»

Научный руководитель: научный сотрудник Горшков И.Г.
ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина»

Ключевые слова: бактериофаги, *Pseudomonas fluorescens*, биотехнология, микробиология, фагология.

В результате проведенных исследований из объектов внешней среды (водные источники) был выделен штаммов бактериофага, специфичных для *Pseudomonas fluorescens*, исследованы его основные биологические свойства: Морфология негативных колоний межвидовая и внутривидовая специфичность, литическая активность.

Актуальность исследования

Бактерия *Pseudomonas fluorescens* – распространенные сапротрофные микроорганизмы, они заселяют ризосферу как естественные регуляторы фитопатогенных микроорганизмов. Бактерии характеризуются активным ростом, хорошо усваивают различные органические субстраты, продуцируют сидерофоры, бактериоцины и антибиотики, а также стимуляторы роста. Так же *P. fluorescens* играют значительную роль в порче пищевого сырья и продовольственных товаров (особенно яиц, мяса, рыбы, молока) [1,4].

Выше перечисленные причины обуславливают необходимость в разработке эффективной, быстрой и точной методике индикации и идентификации *Pseudomonas fluorescens* из объектов окружающей среды и объектов санитарного объекта. Первым этапом разработки метода, является выделение бактериофага активного по отношению к *P. fluorescens*.

Цель исследования: выделение бактериофага бактерии *Pseudomonas fluorescens*, и изучение его биологических свойств; Литическая активность, морфология образуемых негативных колоний, активность по отношению к другим изучение её активности в отношении к другим рода бактерий рода *Pseudomonas* и другим родам бактерий.

Задачи: 1. Выделение бактериофагов, активных в отношении *Pseudomonas fluorescens*. 2. Изучение морфологических признаков негативных колоний бактериофага. 3. Исследование видовой и родовой специфичности выделенных бактериофагов. 4. Установление литической активности выделенных бактериофагов.

Объект исследования

В качестве источников для выделения бактериофагов из окружающей среды использовались образцы воды из источников: Черное море(вблизи железнодорожной станции Лоо и р.Свияга в черте города Ульяновска.

При выделении бактериофагов в качестве индикаторных бактериальных культур использовались полевой штамм *Pseudomonas fluorescens*, полученные из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы Ульяновской ГСХА им. П.А. Столыпина. Для определения видовой и родовой специфичности выделенных бактериофагов использовали культуры бактерий следующих видов: *Aeromonas sobria*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*.

Материалы: ГРМ-бульон (производства ГНЦ ПМБ, п. Оболенск), агар бактериологический (производства ГНЦ ПМБ, п. Оболенск), дистиллированная вода, физиологический раствор хлорида натрия (0.9%) стандартный набор посуды для микробиологических исследований.

Оборудование: Термостат лабораторный ТС-180, центрифуга лабораторная MULTI CENTRIFUGE CM 6 M, мембранные фильтры с диаметром пор 0,2 мкм (Millipore - Millivac).

Методы: Выделение бактериофагов, активных в отношении *Pseudomonas fluorescens*, проводили методом накопления по схемам, описанным в работах Викторова Д.А. [1,2], Васильева С.Н. [1,2], и оптимизированным нами с учётом биологических особенностей *Pseudomonas fluorescens* и их бактериофагов.

В 2 колбы на 200 мл с 50 мл стерильного концентрированного (концентрация бульона увеличена в два раза) мясопептонного бульона добавлялось по 50 мл исследуемых образцов воды, взятых из различных источников. В каждую из колб добавлялось по 0,5 мл суточных индикаторных культур полевых штаммов бактерии *Pseudomonas fluorescens* после чего полученная смесь перемешивалась и помещалась в термостат на 24 часа при 27 °С.

После инкубации из полученной в колбах суспензии отбиралось по 10 мл бульона в стерильные пластиковые пробирки для центрифугирования. Отобранные образцы центрифугировались 20 минут при 3000 об/мин (700 g). По окончании центрифугирования надосадочная жидкость фильтровалась через мембранные фильтры с диаметром пор 0,2 мкм, после чего фильтрат помечался в стерильные пробирки для хранения и дальнейших исследований.

Определение наличия фагов, активных в отношении бактерий *Pseudomonas fluorescens* и определение внутри родовой и межродовой активности бактериофагов проводили методом спот-теста [2,3]. Для этого на чашки Петри, засеянные суточной культурой следующих бактериальных культур: *Aeromonas sobria*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens* и подсушенные в термостате в течение 20 минут при 37°С по каплям пипеткой наносился исследуемый фильтрат. После чего чашки Петри помечались в термостат на 24 часа при температуре 27 °С. Литическую активность бактериофагов определяли по методу Грациа.

Результаты исследований

В результате исследования проб воды на наличие в них бактериофагов, активных по отношению к индикаторным штаммам *Pseudomonas fluorescens*, было выделено 1 штамм бактериофага.

Морфология негативных колоний выделенного бактериофага *Pseudomonas fluorescens*. Негативные колонии диаметром от 1мм до 1,5мм с прозрачным центром и зоной вторичного лизиса по периферии.

В ходе исследования межвидовой активности было установлено, что выделенные бактериофаги не активны по отношению к бактериям *Aeromonas sobria*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*.

При изучении литической активности был установлен титр полученного нами бактериофага, который составил $3,0(\pm 0,3) \times 10^6$ БОЕ/МЛ³.

Выводы:

1. В результате проведённых исследований нами был выделен 1 штамм бактериофага, активного по отношению к *Pseudomonas fluorescens*.
2. Установлена литическая активность бактериофагов по методу Грациа, составившая $3,0(\pm 0,3) \times 10^6$ БОЕ/МЛ³
3. Изучена морфология негативных колоний бактериофага.
4. Установлено, что выделенный бактериофаг обладает видовой специфичностью по отношению к *Pseudomonas fluorescens*.

Библиографический список

1. Васильев, Д.А. Выделение бактериофагов бактерий *Pseudomonas putida* и их селекция в целях создания биопрепарата для диагностики псевдомоноза рыб / Д.А. Васильев, Д.А. Викторов, И.И. Богданов // Естественные и технические науки. – 2011. – №2(52). – С. 79-82.
2. Викторов, Д.А. Выделение и изучение биологических свойств бактериофагов *Pseudomonas fluorescens* / Д.А. Викторов, А.М. Артамонов, Д.А. Васильев // Ветеринария и кормление. – Москва: «ВЕТКОРМ», 2012. – №5. – С. 8-9.
3. Викторов Д.А. Усовершенствование методов диагностики псевдомонозов рыб / Д.А. Викторов, Т.А. Гринева, Д.А. Васильев, А.М. Артамонов, С.Н. Золотухин // Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности: Материалы международной научно-практической конференции, Ульяновск, ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина», 23-25 апреля 2013. – Т. 1. – Ульяновск, 2013. – С. 162-164.
4. Артамонов А.М. Спектр литической активности и специфичность бактериофагов *Pseudomonas fluorescens* / А.М. Артамонов, Д.А. Викторов, Д.А. Васильев // Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения: Материалы V Международной научно-практической конференции, Ульяновск, 11 июня 2013. – Т. 2. – С. 3-6.
5. Бактериофаги микроорганизмов значимых для животных, растений и человека / Васильев Д.А., Золотухин С.Н., Алёшкин А.В., Барт Н.Г., Богданов И.И., Васильева Ю.Б., Викторов Д.А., Золотухин Д.С., Журавская Н.П., Калдыркаев А.И., Карамышева Н.Н., Ковалева Е.Н., Коритняк Б.М., Ляшенко Е.А., Молофеева Н.И., Пожарникова Е.Н., Пульчеровская Л.П., Семанина Е.Н., Феоктистова Н.А., Шестаков А.Г. и др. - Ульяновск, 2013.
6. Васильев Д.А. Листерийные бактериофаги / Д.А. Васильев, Е.Н. Ковалева, С.Н. Золотухин / Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия. Ульяновск, 2013.

7. Васильев Д.А. Бактериофаги рода *Bacillus* / Васильев Д.А., Феоктистова Н.А., Золотухин С.Н., Алешкин А.В. / Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия; НИИЦМиБ. Ульяновск, 2013.
8. Васильева Ю.Б. Разработка методов фагодиагностики бордетеллёза // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2013. - №2 (22). – С.51-56.
9. Шестаков А.Г. Соотношение бактериофагов в биопрепарате полифага / А.Г. Шестаков, Н.И. Молофеева, Л.П. Пульчеровская, С.Н. Золотухин, Д.А. Васильев, Е.Н. Семанина, Е.Г. Семанин / Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения. Материалы V Международной научно-практической конференции. Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия. - 2013. - С. 205-210.
10. Васильев Д.А. Биоиндикация бактерий *Bacillus mycoides* в объектах санитарного надзора / Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин, Н.А. Феоктистова, М.А. Лыдина, А.И. Калдыркаев, В.А. Макеев, И.Г. Швиденко / Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. 2013. № 3 (23). С. 52-56.

MOLECULAR GENETIC ANALYSIS OF THE GENOME OF THE NEW BACTERIOPHAGES

Gorshkov I. G.

Keywords: Bacteriophages, *Pseudomonas fluorescens*, microbiology.

The studies of objects in the environment (water sources) was isolated strains of bacteriophage specific for *Pseudomonas fluorescens*, investigated its basic biological properties: negative colonies morphology and intrapartum interspecies specificity, lytic activity.