

УДК 579.64

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВРЕМЕННЫХ ПАРАМЕТРОВ ПОСТАНОВКИ РЕАКЦИИ НАРАСТАНИЯ ТИТРА ФАГА С ФАГАМИ Вр- 10 И Вs-13 СЕРИИ УГСХА

*К.В. Кудряшова, аспирант
тел. 8(8422)55-95-47, kudryashova_91@list.ru*
*Н.А. Феоктистова, кандидат биологических наук, доцент
тел. 8(8422)55-95-47, feokna@yandex.ru*
*М.А. Лыдина, кандидат биологических наук, ст. преподаватель
тел. 8(8422)55-95-47, feokna@yandex.ru*
*Д.А. Васильев, доктор биологических наук, профессор
тел. 8(8422)55-95-47, dav_ul@mail.ru*
*С.Н. Золотухин, доктор биологических наук, профессор
тел. 8(8422)55-95-47, fvt.zol@yandex.ru*
*И.М. Абдурахманов, студент 4 курса
тел. 8(8422)55-95-47, abdrahmanov.ilnur@yandex.ru*
*В.Г. Захарова, Е.Г. Логинова, А.А. Щербина, Ю.А. Райчинец, аспиранты
email: feokna@yandex.ru*
ФГБОУ ВО Ульяновская ГСХА

Ключевые слова: реакция нарастания титра фага, фаги, параметры, *Vacillus mesentericus*, *Vacillus subtilis*, временные параметры, показатель реакции.

Работа посвящена разработке оптимальных условий постановки реакции нарастания титра фага – определению временных параметров постановки реакции нарастания титра фага, обеспечивающих наиболее полноценное взаимодействие фага с бактериями. Установлено, что наиболее эффективными являются режимы РНФ при 6 часовой экспозиции исследуемого материала с фагом, когда удается провести индикацию бактерий *Vacillus subtilis* и *Vacillus mesentericus* в количестве 100 м.к. в 1 миллилитре исследуемого субстрата, на исследование затрачивается 25 часов.

Введение. Чтобы установить оптимальное время, обеспечивающего наиболее полноценное взаимодействие фага с бактериями необходимо проведение экспериментов на тест-объекте по выявлению наиболее эффективного временного показателя взаимодействия фага и индикаторной культуры при сохранении остальных параметров (тем-

пературный режим, концентрация бактериальной культуры и бляшкообразующих единиц в 1 мл) постановки реакции нарастания титра фага (РНФ) [3,6,9,14-15].

Материалы и методы. Использовали методику, предложенную В.Я. Ганюшкиным (1988), опробованную Васильевым Д.А. и Золотухиным С.Н. [1,3], для проведения эксперимента постановки РНФ на мясо-пептонном бульоне (МПБ), искусственно контаминированном 18 часовыми культурами бактерий *Bacillus mesentericus* 32 для фага Вр–10 УГСХА и *Bacillus subtilis* 12 для фага Bs–13 УГСХА в количестве от 10 до 100000 микробных клеток. Бактериофаги были выделены и селекционированы по методикам, опробованным сотрудниками ФГБОУ ВО Ульяновская ГСХА [2,4,7-8, 10-13].

В качестве контроля был использован интактный МПБ. Рабочее разведение бактериофагов Вр–10 УГСХА и Bs–13 УГСХА содержало 10000 бляшкообразующих единиц (БОЕ) в миллилитре МПБ (мл). Бактериологическая схема выделения бактерий рода *Bacillus* по методике Gordon [5, 15].

Результаты исследований и их обсуждение. Оптимальное время экспозиции выбирали из шести следующих параметров:

- при предварительном подращивании исследуемого материала в течение 6 часов при температуре 37 °С, после добавления фагов смесь выдерживали в течение 6 часов при температуре 37 °С;
- при предварительном подращивании исследуемого материала в течение 16 часов при температуре 37 °С, после добавления фагов смесь выдерживали в течение 6 часов при температуре 37 °С;
- при предварительном подращивании исследуемого материала в течение 24 часов при температуре 37 °С, после добавления фагов смесь выдерживали в течение 6 часов при температуре 37 °С;
- при увеличении времени контакта исследуемого материала с фагом до 10 часов при температуре 37 °С
- при увеличении времени контакта исследуемого материала с фагом до 16 часов при температуре 37 °С;
- при увеличении времени контакта исследуемого материала с фагом до 24 часов при температуре 37 °С.

Методика предварительного подращивания исследуемого материала: брали три комплекта колб с МПБ (по 50 мл) и контаминировали бактериями вида *Bacillus subtilis* (*Bacillus mesentericus*) в концентрации от 10 до 100000 м.к./мл. Смеси в течение 10 минут встряхивали в шуттель-аппарате и ставили в термостат при температуре 37 °С: первый комплект на 6 часов, второй комплект на 16 часов, третий комплект на 24 часа.

После культивирования в термостате содержимое колб разливали по пробиркам. На каждую исследуемую пробу брали 3 пробирки: № 1 для опытной пробы; № 2 для контроля на свободный фаг; № 3 для контроля титра индикаторного фага. Контроль титра индикаторного фага ставили один на группу анализов, проводимых одновременно. Исследуемый материал разливали по 9 мл в пробирки № 1 и № 2. Пробирка № 3 содержала 9 мл МПБ. В пробирки № 1 и № 3 добавляли по 1 мл индикаторного фага в рабочем разведении, содержащем 10000 бляшкообразующих единиц в 1 мл. В пробирку № 2 вносили 1 мл МПБ. Пробирки встряхивали и ставили в термостат при температуре 37 °С на 6 часов. По окончании инкубации из каждой пробирки брали по 0,25 мл материала и вносили в пробирки с 4,5 мл МПБ (для получения в контроле на индикаторный фаг сосчитываемого количества бляшкообразующих единиц). Все пробирки прогревали при 64 °С в течение 45 минут и подвергали дальнейшему исследованию методом агаровых слоев по Грациа [6-7]. Результаты учитывали через 18 часов.

Так же исследовали изучаемый материал бактериологическим методом (методика Gordon) [5, 15], часы культивирования в термостате аналогичны с методикой установления оптимального времени, обеспечивающего наиболее полноценное взаимодействие фага с бактериями) для сравнения с РНФ. В результате проведенных исследований получили следующие результаты: бактерии видов *Bacillus subtilis* (*Bacillus mesentericus*) обнаруживались в концентрации 100 м.к./мл, при этом на эксперимент затрачивалось 96 часов. Результаты этих исследований приведены в таблицах 1-4.

Опытным путем было установлено, что подращивание материала в течение 6 часов позволяет обнаружить бактерий *Bacillus subtilis* и *Bacillus mesentericus* с помощью РНФ в концентрации 100 м.к./мл для фага Вр-10 УГСХА и 100 м.к./мл для фага Bs-13 УГСХА. При подращивании исследуемого материала в течение 16 и 24 часов чувствительность реакции не повышается и также позволяет обнаружить бактерии *Bacillus subtilis* и *Bacillus mesentericus* в количестве 100 м.к./мл для фагов Вр-10 и Bs-13 серии УГСХА.

На проведение исследования затрачивается 40 часов. Бактериологическим методом это же количество бактерий *Bacillus subtilis* и *Bacillus mesentericus* обнаружить удалось обнаружить через 24 часа подращивания материала, но на постановку реакции было затрачено 96 часов.

Таблица 1 – Результаты РНФ (в контаминированном *Bacillus mesentericus* 32 МПБ) с бактериофагом Вр–10 УГСХА

Объект исследования - контаминированный бактериями <i>Bacillus mesentericus</i> МПБ в концентрации: (м.к. в 1 г)	Контроль индикаторного фага	Контроль свободного фага	Опыт
	Количество негативных колоний фага		
100000	31 ± 1,2	Полный лизис	Более 10
10000	31 ± 1,2	Полный лизис	Более 10
1000	31 ± 1,2	Полный лизис	Более 10
100	31 ± 1,2	186±3	6
10	31 ± 1,2	62±1	2

Таблица 2 – Результаты РНФ (в контаминированном *Bacillus subtilis* 12 МПБ) с бактериофагом Vs-13 УГСХА

Объект исследования - контаминированный бактериями <i>Bacillus subtilis</i> МПБ в концентрации: (м.к. в 1 г)	Контроль индикаторного фага	Контроль свободного фага	Опыт	Увеличение (раз)
	Количество негативных колоний фага			
100000	24 ± 1,4	-	Полный лизис	Более 10
10000	24 ± 1,4	-	Полный лизис	Более 10
1000	24 ± 1,4	-	Полный лизис	Более 10
100	24 ± 1,4	-	132 ± 5	5,5
10	24 ± 1,4	-	48 ± 3	2,0

Во втором варианте опыта МПБ, контаминированный бактериями *Bacillus mesentericus* 32 (для фага Вр–10 УГСХА) и *Bacillus subtilis* 12 для фага Vs–13 УГСХА в концентрациях от 10 до 100000 м.к./мл, не подращивали, а сразу же после встряхивания колб в шуттель-аппарате вносили в пробирки. Для каждого опыта использовали по три комплекта из 3 пробирок. В пробирки № 1 и № 2 вносили исследуемый материал из колб в количестве 9 мл. В пробирку № 3 вносили 9

Таблица 3 – Чувствительность РНФ в зависимости от времени подращивания исследуемого материала, контаминированного *Bacillus mesentericus* 32 (Вр–10 УГСХА)

№ п.п.	Варианты исследований	Минимальное количество бактерий, обнаруживаемое с помощью		Время, затраченное на проведение исследований (в часах)	
	Длительность подращивания исследуемого материала, ч	РНФ	бактериологическим методом	РНФ	бактериологическим методом
1.	6	100	1000	30	79
2.	16	100	100	40	88
3.	24	100	100	48	96

Таблица 4 – Чувствительность РНФ в зависимости от времени подращивания исследуемого материала, контаминированного *Bacillus subtilis* 12 (Bs–13 УГСХА)

№ п.п.	Варианты исследований	Минимальное количество бактерий, обнаруживаемое с помощью		Время, затраченное на проведение исследований (в часах)	
	Длительность подращивания исследуемого материала, ч	РНФ	Бактериологический метод	РНФ	Бактериологический метод
1.	6	100	1000	30	79
2.	16	100	100	40	88
3.	24	100	100	48	96

мл стерильного МПБ. Затем в пробирки № 1 и № 3 добавляли по 1 мл индикаторного фага в концентрации 10000 бляшкообразующих единиц в миллилитре, в пробирку № 2 вносили 1 мл стерильного МПБ и помещали в термостат при температуре 37 °С: первый комплект на

Таблица 6 – Чувствительность РНФ в зависимости от времени инкубирования исследуемого материала с фагом Вр–10 УГСХА

№ п.п.	Варианты исследований	Минимальное количество <i>Bacillus mesentericus</i> 32, обнаруживаемое с помощью		Время, затраченное на проведение исследований (в часах)	
		РНФ	Бактериологический метод	РНФ	Бактериологический метод
1.	6	100	10000	25	79
2.	10	100	1000	29	82
3.	16	100	100	35	88
4.	24	100	100	43	96

Таблица 6 – Чувствительность РНФ в зависимости от времени инкубирования исследуемого материала с фагом Bs-13 УГСХА

№ п.п.	Варианты исследований	Минимальное количество <i>Bacillus subtilis</i> 12, обнаруживаемое с помощью		Время, затраченное на проведение исследований (в часах)	
		РНФ	бактериологический метод	РНФ	бактериологический метод
1.	6	100	10000	25	79
2.	10	100	1000	29	82
3.	16	100	100	35	88
4.	24	100	100	43	96

6 часов, второй – на 10 часов, третий – на 16 часов, четвертый – на 24 часа.

По завершению инкубации из каждой пробирки брали по 0,25 мл материала и вносили в пробирку с 4,5 мл МПБ (для получения в контроле на индикаторный фаг сосчитываемого количества негативных колоний). Содержимое всех пробирок фильтровали через мембранные фильтры фирмы Millipore (filter type: 0,22 μm GV) и подвер-

гали дальнейшему исследованию методом агаровых слоев по Грациа. Через 18 часов учитывали результаты, которые отражены в таблицах 5-6.

По результатам изучения чувствительности РНФ в зависимости от времени инкубирования исследуемого материала с фагом установлено, что культивирование исследуемого материала в течение 6 и 10 часов позволяет обнаружить бактерии *Bacillus subtilis* и *Bacillus mesentericus* с помощью РНФ в концентрации 100 м.к./мл для фагов Вр-10 и Вs-13 УГСХА.

При инкубировании исследуемого материала с фагом в течение 16 часов чувствительность реакции не повышается, что позволяет обнаружить бактерии *Bacillus subtilis* и *Bacillus mesentericus* при помощи бактериофагов в количестве 100 м.к./мл.

На проведение исследования затрачивается 35 часов. Бактериологическим методом это же количество бактерий видов *Bacillus subtilis* и *Bacillus mesentericus* обнаружить удалось при инкубировании исследуемого материала в условиях термостата в течение 16 часов, но на проведение опыта было затрачено 88 часов. При инкубировании исследуемого материала с бактериофагами Вр-10 и Вs-13 УГСХА в течение 24 часов чувствительность реакции не увеличивалась и позволяла обнаруживать бактерии *Bacillus subtilis* и *Bacillus mesentericus* в количестве 100 м.к./мл. На проведение этого варианта реакции было затрачено 43 часа. В количестве 100 м.к./мл бактерии *Bacillus subtilis* и *Bacillus mesentericus* были обнаружены в исследуемом материале также и бактериологическим методом, но на проведение опыта было затрачено 96 часов.

Заключение. На основании полученных данных, считаем, что наиболее эффективными являются режимы РНФ при 6 часовой экспозиции исследуемого материала с фагом, когда удастся провести индикацию бактерий *Bacillus subtilis* и *Bacillus mesentericus* в количестве 100 м.к. в 1 миллилитре исследуемого субстрата, на исследование затрачивается 25 часов, поэтому данный режим используем в дальнейших исследованиях. Результаты проведенных исследований свидетельствуют, методика подращивания не уступает по чувствительности методу экспозиции исследуемого материала с фагом в течение 10, 16, 24 часов, но недостаток в том, что при этом затрачивается больше времени при аналогичных результатах.

Научные исследования проводятся при финансовой поддержке государства в лице Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере (программа «УМНИК»).

Библиографический список

1. Васильев, Д.А. Разработка параметров постановки реакции нарастания титра фага для индикации бактерий *Bacillus mesentericus* в объектах санитарного надзора / Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин, Н.А. Феоктистова [и др.] // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2012. - № 3. - С. 69-73.
2. 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.
3. Васильев, Д.А. Биосенсорная детекция бактерий рода *Bacillus* в молоке и молочных продуктах для предупреждения их порчи / Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин, Н.А. Феоктистова [и др.] // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2013. - № 4 (24). - С. 36-43.
4. Калдыркаев, А.И. Разработка системы фаговаров *Bacillus cereus* / А.И. Калдыркаев, Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев [и др.] // В сборнике: Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения: материалы V Международной научно-практической конференции. – Ульяновск, ГСХА. 2013. - С. 178-185.
5. Калдыркаев, А.И. Биохимические свойства бактерий *Bacillus cereus* / А.И. Калдыркаев, А.В. Алешкин, Н.А. Феоктистова / В сборнике: Биотехнология: реальность и перспективы в сельском хозяйстве. – 2013. – С. 186-188.
6. Петрукова, Н.А. Биоиндикация содержания бактерий *Bacillus megaterium* в молоке и молочных продуктах / Н.А. Петрукова, Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев [и др.] // «Экология родного края: проблемы и пути их решения»: материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. – Киров, 2014. - С. 375-377.
7. Романова, Н.А. Сравнительная эффективность методов выделения фагов бактерий *Bacillus megaterium* / Н.А. Романова, Н.А. Феоктистова, С.Н. Золотухин [и др.] // Вестник ветеринарии. - 2013. - № 1 (64). - С. 26-27.
8. 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.
9. Феоктистова, Н.А. Перспективы применения бактериофагов рода *Bacillus* / Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев, М.А. Юдина [и др.] // В сборнике: Настоящее и будущее биотехнологии в решении проблем экологии, медицины, сельского, лесного хозяйства и промышленности Научно-практический семинар с международным участием. – Ульяновск: УлГУ, 2011. - С. 136-139.
 10. Феоктистова, Н.А. Разработка схемы исследования материала с целью выделения и ускоренной идентификации бактерий видов *Bacillus subtilis* и *Bacillus cereus* / Н.А. Феоктистова, А.И. Калдыркаев, А.Х. Мустафин // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. - 2011. - Т. 4. - № 32-1. - С. 288-290.
 11. Феоктистова, Н.А. Выделение и изучение биологических свойств бактериофагов рода *Proteus*, конструирование на их основе био-препарата 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. 6.
 12. Феоктистова, Н.А. Распространение *Bacillus cereus* и *Bacillus mycoides* в объектах санитарного надзора / Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин [и др.] // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2014. - № 1 (25). - С. 68-76.
 13. 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.
 14. Феоктистов, Н.А. Разработка методов фагоиндикации *Bacillus megaterium* в мясных и рыбных товарах / Н.А. Феоктистова, Н.А. Петрукова, Д.А. Васильев [и др.] / Инфекция и иммунитет. – 2014. - № 5. – С. 119.
 15. Юдина, М.А. Разработка фагового препарата *Bacillus mesentericus* и область его практического применения/ автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова. Саратов, 2012. – С. 5.

OPREDENIYE OF TEMPORARY PARAMETERS OF STATEMENT OF REACTION OF INCREASE OF THE CAPTION OF THE PHAGE WITH PHAGES OF BP-10 I ÉS-13 OF THE UGSKH SERIES

*Kudryashova K.V., Feoktistova N. A., Lydina M. A., Vasilyev D. A.,
Zolotukhin S. N. , Abdurakhmanov I.M., Zakharova V. G., Loginova E. G.,
Scherbina A. A., Raichynets Y. A.*

Keywords: reaction of increase of a caption of a phage, phage, parameters, *Bacillus mesentericus*, *Bacillus subtilis*, temporary parameters, reaction indicator.

Work is devoted to development of optimum conditions of statement of reaction of increase of a caption of a phage – to determination of the temporary parameters of statement of reaction of increase of a caption of a phage providing the fullest interaction of a phage with bacteria. It is established that the most effective are the RNF modes at the 6th hour exposition of the studied material with a phage when it is possible to carry out indication of bacteria of *Bacillus subtilis* and *Bacillus mesentericus* in number of 100 m to. in 1 milliliter of the studied substratum, 25 hours are spent for research.