

УДК 57: 579.2

## ВЫБОР ВРЕМЕННЫХ ПАРАМЕТРОВ ПОСТАНОВКИ РНФ ДЛЯ ИНДИКАЦИИ БАКТЕРИЙ ВИДА *KLEBSIELLA OXYTOSA*

*Садртдинова Г.Р., ассистент кафедры микробиологии,  
вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ  
ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ, г. Ульяновск, Россия*

**Ключевые слова:** бактериофаг, реакция, увеличение, метод, материал.

*В статье представлены результаты исследований, связанные с подбором оптимальных временных параметров постановки реакции нарастания титра фага. Определение оптимальных временных параметров постановки реакции нарастания титра фага обеспечивает наиболее полноценное взаимодействие фагов Кох-9, Кох-11 с бактериями вида *K. oxytosa*. Установлено, что наиболее эффективными являются режимы РНФ при 5 часовой экспозиции исследуемого материала с фагом, когда удается провести индикацию бактерий в количестве  $10^3$  м.к./мл исследуемого субстрата, на исследование затрачивается 22 часа.*

**Введение.** Выделение и идентификацию бактерий вида *K. oxytosa* проводят бактериологическим методом с использованием целого ряда дифференциально-диагностических питательных сред и коммерческих тест-систем для биохимической идентификации, что требует значительных затрат времени. Использование в лабораторных исследованиях ПЦР является эффективным, но, из-за сложности методик и высокой стоимости необходимого оборудования, является недоступным для большинства исследователей [1, 2].

Решение проблемы ускорения идентификации и индикации возбудителей различных инфекций может обеспечить использование фаговых биопрепаратов. Работы Е.А. Булькановой с соавт. (2006) приводят данные о положительных результатах идентификации и индикации бактерий рода *Klebsiella* методом фагодиагностики [3, 4].

Цель исследования заключалась в определении оптимальных временных параметров постановки РНФ для индикации бактерий вида *K. oxytosa*.

**Материалы и методы.** В проводимых исследованиях использовали бактериофаги, строго специфичные в отношении бактерий искомого вида. Выделение и селекцию бактериофагов проводили согласно методикам Е.А. Ляшенко, С.Н. Золотухина. Проведение эксперимента постановки РНФ основывалось на методике, предложенной В.Я. Ганюшкиным, Д.А. Васильевым, С.Н. Золотухиным, Е.А. Ляшенко [5].

В качестве исследуемого материала использовали мясопептонный бульон, контаминированный индикаторными штаммами *K. oxytoca*. Индикаторной культурой для фага Кох-9 УГСХА является штамм *K. oxytoca* 86, для фага Кох-11 УГСХА – штамм *K. oxytoca* 124.

**Результаты исследований и их обсуждение.** Оптимальным временем реакции нарастания титра фага считали время экспозиции материала с фагом, которое позволяло обеспечить индикацию  $10^3$  микробных клеток в 1 мл. Чтобы установить временной параметр реакции, обеспечивающий оптимальное взаимодействие корпускул фага с бактериями, применяли метод предварительного подращивания исследуемого материала при температуре 37 °С в течение 5, 6, 10, 16 и 24 часов, а во второй серии опытов увеличивали время контакта исследуемого материала с бактериофагом до 5, 6, 10, 16 и 24 часов.

Колбы с МПБ, контаминированным бактериями *K. oxytoca* в концентрации  $10^1$  –  $10^5$ , ставили в термостат при температуре 37 °С на 5, 6, 10, 16, 24 часа. Ставили реакцию по схеме, предложенной в предыдущих исследованиях, со всеми разведениями культуры. Все пробирки выдерживали в термостате в течение 5 часов, после чего содержимое пробирок разводили в стерильном МПБ для возможности подсчета негативных колоний бактериофага (из расчета 0,25 мл смеси к 4,5 мл МПБ). Пробирки прогревали на водяной бане 60 °С в течение 30 минут и высевали на чашки методом агаровых слоев. Чашки с посевами культивировали в термостате при температуре 37 °С в течение 16 часов (таблица 1).

В результате исследований установлено, что метод РНФ с предварительным подращиванием исследуемого материала в течение 5 часов позволяет обнаружить бактерии вида *K. oxytoca* в количестве  $10^3$  м.к./мл, время проведения исследований составляет 26 часов. Увеличение времени подращивания исследуемого материала до 16 часов позволяет обнаружить бактерии вида *K. oxytoca* в количестве  $10^2$  м.к./мл с увеличением сроков исследования до 37 часов. Подращивание материала в течение 24 часов существенно не повлияло на результаты РНФ.

**Таблица 1 - Чувствительность РНФ в зависимости от времени подращивания исследуемого материала**

Длительность подращивания исследуемого материала, час	Инкубация опытных пробирок, час	Инкубация опытных чашек в термостате, час	Концентрация бактерий <i>K. oxytoca</i> , обнаруживаемая методом РНФ		Общее время исследований, час
			Кох-9 УГСХА	Кох-11 УГСХА	
5	5	16	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	26
6	5	16	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	27
10	5	16	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	31
16	5	16	10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>	37
24	5	16	10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>	45

Отметим, что бактериологическим методом бактерии вида *K. oxytoca* обнаруживались в концентрации 10<sup>4</sup> - 10<sup>5</sup> м.к./мл, при этом на исследование затрачивалось 72 часа. Из которых на выделение - 24 часа, на идентификацию и дифференциацию по биохимическим тестам- 48 часов.

Вторая серия опытов включала: в колбы с 50 мл стерильного МПБ вносили 1,0 мл индикаторных штаммов *K. oxytoca* в концентрации 10<sup>1</sup> – 10<sup>5</sup> м.к./мл, содержимое перемешивали в течение 10 мин. Для каждого разведения в колбах готовили ряд из трех пробирок. Ставили реакцию по указанной выше схеме. Опытные пробирки ставили в термостат при 37 °С на 5, 6, 10, 16, 24 часа. Через выбранный период инкубации, пробирки вынимали из термостата, содержимое в количестве 0,25 мл вносили в пробирки с 4,5 мл МПБ для получения сосчитываемого числа негативных колоний. Все опытные пробирки прогревали на водяной бане при 60 °С в течение 30 минут, затем исследовали методом агаровых слоев (16 часов) (таблица 2).

Инкубация исследуемого материала с фагом Кох-9 УГСХА и Кох-11 УГСХА в течение 5 часов позволяет обнаружить бактерии изучаемого вида в концентрации 10<sup>3</sup> м.к./мл за общее затрачиваемое время 21 час, инкубация материала в течении 6 часов позволяет обнаружить бактерии изучаемого вида в концентрации 10<sup>3</sup> м.к./мл за общее затрачиваемое время 22 часа, 16-часовая экспозиция материала с фагами характе-

**Таблица 2 - Чувствительность РНФ в зависимости от времени инкубирования исследуемого материала с исследуемыми бактериофагами**

Длительность инкубирования исследуемого материала с бактериофагом, час	Инкубация опытных чашек в термостате, час	Концентрация бактерий <i>K. oxytoca</i> , обнаруживаемая методом РНФ		Время исследований, час
		Кох-9 УГСХА	Кох-11 УГСХА	
5	16	$10^3$	$10^3$	21
6	16	$10^3$	$10^3$	22
10	16	$10^2$	$10^3$	26
16	16	$10^2$	$10^2$	32
24	16	$10^2$	$10^2$	40

ризуется одинаково высокой чувствительностью реакции ( $10^2$  м.к./мл) с увеличением сроков исследования до 32 часов. Стоит также учесть расход времени на процесс постановки эксперимента (+1 час).

**Заключение.** В результате проведенных исследований установлено, что РНФ с предварительным подрачиванием материала является одинаково чувствительной по сравнению с РНФ без подрачивания, но более продолжительной по времени. Таким образом, наиболее оптимальным является режим РНФ при инкубации исследуемого материала с фагом в течение 5 часов, поскольку позволяет обнаружить бактерии вида *K. oxytoca* в количестве  $10^3$  м.к./мл за 22 часа (21 час (время исследований) + 1 час (на постановку эксперимента)).

*Библиографический список:*

1. Васильев, Д.А. Сравнительная эффективность методов выделения бактериофагов *Klebsiella oxytoca* / Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин, Г.Р. Садртдинова // Вестник Ульяновской сельскохозяйственной академии. - 2016. - № 4 (32). - С. 68-72.
2. Садртдинова, Г.Р. Выделение бактериофагов бактерий *Klebsiella oxytoca* под действием рентгеновского облучения / Г.Р. Садртдинова, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин // Вестник Ульяновской сельскохозяйственной академии. - 2015.- № 1 (33). - С. 76-81.
3. Садртдинова, Г.Р. Sanitary assessment of environmental objects by iso-

- lation of virulent phages / Г.Р. Садртдинова, Л.П. Пульчеровская, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин // Russian journal of agricultural and socio-economic sciences. - 2016. - Т. 58, № 10. - С. 165-170.
4. Садртдинова, Г.Р. Селекция выделенных клонов бактериофагов, активных к *Klebsiella oxytoca* // Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения: Материалы VII международной научно-практической конференции. - Ульяновск: УГСХА, 2016. - Т. III. – С. 266-269.
  5. Булькинова, Е.А. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов *Klebsiella*, конструирование на их основе биопрепарата: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.07, 03.00.23 / Булькинова Елена Анатольевна. – Саратов, - 2006. - 21 с.
  6. Булькинова, Е.А. Фагоидентификация бактерий рода *Klebsiella* / Е.А. Булькинова, С.Н. Золотухин, Д.А. Васильев // Роль молодых ученых в реализации национального проекта «Развитие АПК»: Материалы международной научно-практической конференции. - Москва: Московский государственный агроинженерный университет им. В.П. Горячкина, 2007. - С. 222-225.

## **CHOICE OF TEMPORARY PARAMETERS OF THE FORMATION OF THE REACTION OF FAGA TITER GROWTH FOR THE INDICATION OF BACTERIA KLEBSIELLA OXYTOCA**

***Sadrtdinova G.R.***

**Key words:** *bacteriophage, reaction, increase, method, material.*

*The article presents the results of studies related to the selection of optimal timing parameters for the reaction of phage titer growth. Determination of optimal timing parameters for the reaction of phage titer growth provides the most complete interaction of phages Kox-9, Kox-11 with bacteria of the species K. oxytoca. It was found that the most effective are the RNF regimes at a 5-hour exposure of the material under study with phage, when it is possible to carry out an indication of bacteria in the amount of  $10^3$  m.k.s / ml of the test substrate, the study is spent for 22 hours.*