

ПОДБОР ОПТИМАЛЬНЫХ ПАРАМЕТРОВ ПОСТАНОВКИ РНФ ДЛЯ ИНДИКАЦИИ БАКТЕРИЙ ВИДА *K. OXYTOSA*

Садртдинова Гузелия Рафиковна, ассистент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

Золотухин Сергей Николаевич, доктор биологических наук, профессор, кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

Васильев Дмитрий Аркадьевич, доктор биологических наук, профессор, заведующей кафедрой «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ

432017, г. Ульяновск, бульвар Новый Венец, 1; 8(8422)55-95-47;

e-mail: sadrtdinova-guzlik@rambler.ru

Ключевые слова: бактерии, бактериофаги, условия, метод, индикация.

В статье представлены результаты исследований, связанных с подбором оптимальных условий постановки реакции нарастания титра фага с бактериофагами активными в отношении бактерий вида *K. oxytosa*. При использовании метода реакции нарастания титра фага применяли бактериофаги Кох-9 УГСХА и Кох-11 УГСХА, обладающие строгой специфичностью и достаточной литической активностью в отношении бактерий вида *K. oxytosa* (*K. oxytosa* 86 - индикаторная культура для бактериофага Кох-9 УГСХА, *K. oxytosa* 124 - индикаторная культура для бактериофага Кох-11 УГСХА). Проведенные исследования заключались в определении количественного показателя реакции (имеющего диагностическое значение) и установлении оптимального временного параметра, обеспечивающего наиболее полное взаимодействие корпускул фага с бактериями. Заражающая концентрация культур варьировала в пределах 10^1 - 10^5 м.к./мл. При подборе временного параметра реакции, обеспечивающего оптимальное взаимодействие фага с бактериями, применяли метод предварительного подрачивания исследуемого материала и увеличивали время контакта исследуемого материала с бактериофагом. Установлено, что наиболее эффективным для постановки данной реакции является режим, где заражающая концентрация бактериями вида *K. oxytosa* равна 10^3 м.к./мл, при 5 часовой инкубации исследуемого материала с фагом. Анализ полученных результатов позволил заключить об отсутствии необходимости в предварительном подрачивании материала исследования при температуре 37 °C в течение 5, 6, 10, 16 и 24 часов. Общее время исследований составило 22 часа. Увеличение времени подрачивания исследуемого материала до 16 часов позволяет обнаружить бактерии вида *K. oxytosa* в количестве 10^2 м.к./мл, но при увеличении сроков исследования до 37 часов.

Введение

Для разработки мер борьбы и профилактики заболеваний животных и человека, вызываемых бактериями вида *K. oxytosa* или протекающих с их участием, остаются актуальными вопросы индикации и идентификации данного микроорганизма в разных субстратах [1, 2]. Для сокращения времени исследований, связанных с индикацией бактерий в различных объектах внешней среды, в практике широко используют метод реакции нарастания титра фага (РНФ) [3, 4]. В 2006 году Е.А. Булькановой с соавт. были разработаны биотехнологические параметры изготовления и контроля биопрепарата на основе бактериофагов К-10 УГСХА и К-81 УГСХА, для ускоренной индикации и идентификации энтеробактерий вида *K. pneumoniae* в патологическом материале, кормах, пищевом сырье и объектах внешней среды. Диагностическая чувствительность данного биопрепарата позволяет обнаруживать бактерии рода *Klebsiella* в минимальной концентрации 10^3 – 10^4 м.к./мл за 18 – 22 часа [5, 6].

При использовании метода РНФ применяется специальный индикаторный фаг, обладаю-

щий строгой специфичностью, высоким титром, высокой адсорбционной способностью, урожайностью и коротким скрытым периодом [7].

Цель исследования заключалась в подборе оптимальных параметров постановки реакции нарастания титра фага с помощью специфического бактериофага для индикации бактерий вида *K. oxytosa*.

Объекты и методы исследований

В работе использовали штаммы бактериофагов: Кох-9 УГСХА, Кох-11 УГСХА. В качестве исследуемого материала использовали мясопептонный бульон, контаминированный 18-часовыми индикаторными культурами *K. oxytosa* в разных заражающих концентрациях. Индикаторной культурой для фага Кох-9 УГСХА является штамм *K. oxytosa* 86, для фага Кох-11 УГСХА – штамм *K. oxytosa* 124. Постановку и оценку результатов реакции нарастания титра фага для индикации бактерий вида *K. oxytosa* проводили согласно методикам В.Я. Ганюшкина (1988), С.Н. Золотухина (2006), Е.А. Булькановой (2006) [8, 9, 10, 11].

Результаты исследований

Определение количественного показате-

Таблица 1

Показатели диагностического значения РНФ фага Кох-9 УГСХА

Концентрация культуры, м.к./мл	Количество негативных колоний, шт			Нарастание титра, раз	Результат РНФ
	Чашка № 1	Чашка № 2	Чашка № 3		
10 ¹	3	–	8	–	–
10 ²	25	–	11	2,3	–
10 ³	106	–	18	5,9	+
10 ⁴	полный лизис	–	31	более 20	+
10 ⁵	полный лизис	–	22	более 20	+

Таблица 2

Показатели диагностического значения РНФ фага Кох-11 УГСХА

Концентрация культуры, м.к./мл	Количество негативных колоний, шт			Нарастание титра, раз	Результат РНФ
	Чашка № 1	Чашка № 2	Чашка № 3		
10 ¹	8	–	11	–	–
10 ²	46	–	24	1,92	–
10 ³	174	–	26	6,7	+
10 ⁴	полный лизис	–	30	более 20	+
10 ⁵	полный лизис	–	20	более 20	+

ля - это установление уровня нарастания титра фага по сравнению с контролем. Для этого в колбы с 50 мл стерильного мясopептонного бульона вносили 1 мл индикаторных штаммов *K. oxytoca* в концентрации 10¹, 10², 10³, 10⁴, 10⁵ м.к./мл, содержимое перемешивали в течение 10 мин. Для каждого разведения в колбах готовили ряд из трех пробирок: пробирка № 1 являлась опытной, где присутствовал фаг в смеси с исследуемым материалом. Пробирка № 2 являлась контролем на присутствие «свободного» фага, содержала только исследуемый материал. Пробирка №3 служила контролем титра индикаторного фага. Для работы использовали бактериофаги в рабочем разведении (10⁴ фаговых корпускул в 1 мл). Для определения количественного показателя реакции пробирки выдерживали в термостате при температуре 37°C в течение 5 часов. После этого содержимое пробирок разводили мясopептонным бульоном (из расчета 0,25 мл смеси к 4,5 мл МПБ) для получения сосчитываемого числа негативных колоний, прогревали на водяной бане в течение 30 минут (60 °C), затем исследовали методом агаровых слоев. Чашки с посевами культивировали в термостате при температуре 37 °C в течение 16 часов. Для учета результатов подсчитывали количество негативных колоний бактериофага, выросших на плотной питательной среде. На рисунке 1 представлена предлагаемая схема постановки реакции нарастания титра фага.

Критерии оценки показателей РНФ:

- увеличение количества корпускул индикаторного фага в сравнении с контролем в 2,5

раза - сомнительная оценка РНФ;

- увеличение количества корпускул индикаторного фага в сравнении с контролем от 3 до 5 раз - слабopоложительная оценка РНФ;

- увеличение количества корпускул индикаторного фага в сравнении с контролем свыше 5 раз - положительная оценка РНФ;

- увеличение количества корпускул индикаторного фага в сравнении с контролем более чем в 10 раз - резко положительная оценка РНФ.

Расчет нарастания титра фага производили путем сравнения числа колоний на чашке № 1 (опытная) и № 3 (контроль титра фага). В случае обнаружения в исследуемом материале «свободного» фага (лизис индикаторной культуры в чашке № 2) реакцию не учитывали (таблица 1-2).

В результате проведенных исследований нами было установлено, что количество фаговых частиц более чем в 5 раз превышает количество фаговых корпускул в контрольных пробах, при контаминации МПБ бактериями вида *K. oxytoca* в концентрации 10³ м.к./мл для фага.

Оптимальным временем реакции нарастания титра фага будем считать время экспозиции материала с фагом, которое позволит обеспечить индикацию 10³ микробных клеток в 1 мл. Чтобы установить временной параметр реакции, обеспечивающий оптимальное взаимодействие корпускул фага с бактериями, применяли метод предварительного подрачивания исследуемого материала при температуре 37 °C в течение 5, 6, 10, 16 и 24 часов, а во второй серии опытов увеличивали время контакта исследуемого материала

ла с бактериофагом до 5, 6, 10, 16 и 24 часов.

Первая серия опытов включала: колбы с МПБ, контаминированные 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 указанной выше схеме (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 3).

В результате исследований установлено, что метод РНФ с предварительным подрачиванием 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 подрачивания 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. Подрачивание материала в течение 24 часов существенно не повлияло на результаты РНФ.

Отметим, что в предыдущих исследованиях бактериологическим методом бактерии вида *K. oxytoca* обнаруживались в концентрации $10^4 - 10^5$ 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: в колбы с 50 мл стерильного МПБ вносили 1,0 мл индикаторных штаммов *K. oxytoca* в концентрации $10^1 - 10^5$ м.к./мл, содержимое перемешивали в течение 10 мин. Опытные пробирки ставили в термостат

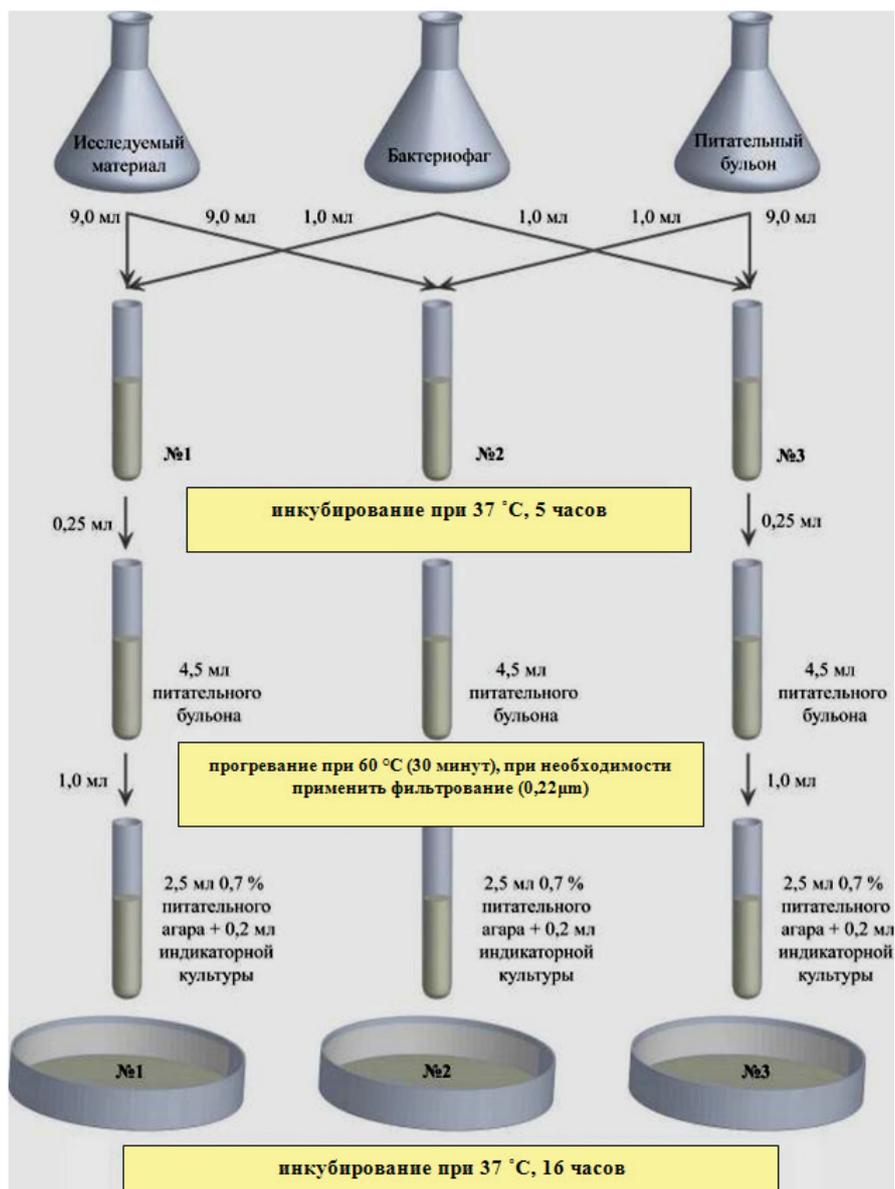


Рис. 1- Предлагаемая схема постановки реакции нарастания титра фага

при 37 °С на 5, 6, 10, 16, 24 часа. Ставили реакцию по указанной выше схеме. Все опытные пробирки прогревали на водяной бане при 60 °С в течение 30 минут, затем исследовали методом агаровых слоев (16 часов) (таблица 4).

Инкубация исследуемого материала с фагами Кох-9 УГСХА и Кох-11 УГСХА в течение 5 часов позволяет обнаружить бактерии изучаемого вида в концентрации 10^3 м.к./мл за общее затрачиваемое время 21 час, инкубация материала в течение 6 часов позволяет обнаружить бактерии изучаемого вида в концентрации 10^3 м.к./мл за общее затрачиваемое время 22 часа, 16-часовая экспозиция материала с фагами характеризуется одинаково высокой чувствительностью реакции (10^2 м.к./мл) с увеличением сроков исследования до 32 часов. Стоит также учесть расход времени

Таблица 3

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 ³	10 ³	26
6	5	16	10 ³	10 ³	27
10	5	16	10 ³	10 ³	31
16	5	16	10 ²	10 ²	37
24	5	16	10 ²	10 ²	45

Таблица 4

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

на процесс постановки эксперимента (1 час).

Выводы

В результате проведенных исследований установлено, что РНФ с предварительным подращиванием материала является одинаково чувствительной по сравнению с РНФ без подращивания, но более продолжительной по времени. Наиболее оптимальным является режим РНФ при инкубации исследуемого материала с фагом в течение 5 часов, поскольку позволяет обнаружить бактерии *K. oxytoca* в количестве 10³ м.к./мл, общее время исследований при этом составляет 22 часа. Таким образом, установленные параметры постановки РНФ позволяют обнаружить бактерии вида *K. oxytoca* в исследуемом материале за более короткий период времени в сравнении с бактериологическими исследованиями.

Библиографический список

1. Ляшенко, Е.А. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов бактерий рода *Klebsiella* / Е.А. Ляшенко // Бактериофаги микроорганизмов значимых для животных, растений и человека. – Ульяновск, 2013.- С. 61-74.
2. Sanitary assessment of environmental objects by isolation of virulent phages / Г.Р. Садртдинова, Л.П. Пульчеровская, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин // Russian journal of agricultural and socio-economic sciences. -2016. -Том 58, № 10. - С.165-170.
3. Журавская, Н.П. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов бактерий вида *Yersinia pseudotuberculosis* / Н.П. Журав-

кая // Бактериофаги микроорганизмов значимых для животных, растений и человека. - Ульяновск, 2013. - С. 89-100.

4. Ефрейторова, Е.О. Indication of *Citrobacter* bacteria in the environment using bacteriophages in the phage titer increase reaction / Е.О. Ефрейторова, Л.П. Пульчеровская // Russian journal of agricultural and socio-economic sciences. -2016. -Том 58, № 10. - С. 190-193.

5. Ляшенко, Е.А. Индикация бактерий рода *Klebsiella* с помощью специфических бактериофагов, в объектах ветеринарного надзора / Е.А. Ляшенко, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин // Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности. Материалы Международной научно-практической конференции. - 2013. - С.36-40.

6. Ляшенко, Е.А. Разработка и применение фагового биопрепарата для диагностики клебсиллезной инфекции / Е.А. Ляшенко, С.Н. Золотухин, Д.А. Васильев // Вестник ветеринарии. - 2011. - № 4 (59). - С. 90-92.

7. Бульканова, Е.А. Фагоидентификация бактерий рода *Klebsiella* / Е.А. Бульканова, С.Н. Золотухин, Д.А. Васильев // Роль молодых ученых в реализации национального проекта «Развитие АПК». Материалы международной научно-практической конференции. – М.: Московский государственный агроинженерный университет им. В.П. Горячкина, 2007. - С. 222-225.

8. Бульканова, Елена Анатольевна. Выделение и изучение основных биологических свойств

бактериофагов *Klebsiella*, конструирование на их основе биопрепарата: автореф. дис. ... канд. биологических наук: 03.00.07, 03.00.23 / Е.А. Бульканова. – Саратов, 2006. – 21с.

9. Пульчеровская, Лидия Петровна. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов *Citrobacter* и их применение в диагностике: автореф. дис. ... канд. биологических наук: 03.00.07, 03.00.23 / Л. П. Пульчеровская. – Саратов, 2004. – 89с.

10. Золотухин, Сергей Николаевич. Создание

и разработка схем применения диагностических биопрепаратов на основе выделенных и изученных бактериофагов энтеробактерий: автореф. дис. ... д-ра биологических наук: 03.00.23, 03.00.07 / С.Н. Золотухин.- Ульяновск, 2007. – 39с.

11. Катмакова, Н.П. Разработка оптимальных технологических параметров постановки РНФ с биопрепаратом УР - 09 УГСХА / Н.П. Катмакова, С.Н. Золотухин, Д.А. Васильев // Естественные и технические науки. – 2009. – № 6 (44). – С. 202-204.

SELECTION OF SUITABLE PARAMETER OF PHAGE TITER GROWTH REACTION SETUP FOR INDICATION OF *K.OXYTOCA* BACTERIA

Sadrtidinova G.R., Zolotukhin S.N., Vasilyev D.A.
FSBEI HE Ulyanovsk SAU
432017, Ulyanovsk, Novyy Venets bld., 1;
8 (8422) 55-95-47; E-mail: sadrtidinova-guzlik@rambler.ru

Key words: bacteria, bacteriophages, conditions, method, indication.

The article presents the results of studies related to the selection of appropriate conditions for reaction setup of phage titer growth with bacteriophages active against bacteria of *K. oxytoca* species. When using the phage titer growth reaction method, the bacteriophages Kokh-9 UGSKHA and Kokh-11 UGSKHA were used, which had strict specificity and sufficient lytic activity against bacteria of *K. oxytoca* species (*K. oxytoca* 86 - indicator culture for the bacteriophage Kokh-9 UGSKHA, *K. Oxytoca* 124 is indicator culture for the bacteriophage Kokh-11 UGSKHA). The conducted research consisted in specification of reaction quantitative parameter (which has diagnostic value) and specification of appropriate time parameter, which provides the best interaction of corpuscles of a phage with bacteria. The infectious concentration of cultures varied within the limits of 10^1 - 10^5 m.c. / ml. When selecting the time parameter of the reaction, which ensures appropriate interaction of the phage with bacteria, the method of preliminary growth of the studied material was used and the contact time of the studied material with the bacteriophage was increased. It was found that the most effective for this reaction is the regime where the infecting bacterial concentration of *K. oxytoca* species is equal to 10^3 m.c. / ml, with a 5-hour incubation of the test material with the phage. The analysis of the obtained results made it possible to conclude that there was no need in preliminary growth of the research material at 37 ° C for 5, 6, 10, 16 and 24 hours. The total research time was 22 hours. An increase of the growth time of the studied material to 16 hours allows to detect bacteria of *K. oxytoca* species in the amount of 10^2 m.c. / ml, provided that there is an increase of the research period to 37 hours.

Bibliography

1. Lyashenko, E.A. Isolation and study of the primary biological properties of bacteriophages of *Klebsiella* genus bacteria / E.A. Lyashenko // In the book: Bacteriophages of microorganisms significant for animals, plants and humans. - Ulyanovsk, 2013. - P. 61-74.
2. Sadrtidinova, G.R. Sanitary assessment of environmental objects by isolation of virulent phages / G.R. Sadrtidinova, L.P. Pulcherovskaya, D.A. Vasilyev, S.N. Zolotukhin // Russian journal of agricultural and socio-economic sciences. -2016. -V. 58.- № 10. - P. 165-170.
3. Zhuravskaya, N.P. Isolation and study of the primary biological properties of bacteriophages of *Yersinia pseudotuberculosis* species bacteria // In the book: Bacteriophages of microorganisms significant for animals, plants and humans. - Ulyanovsk, 2013. - P. 89-100.
4. Efreitorova, E.O. Indication of *Citrobacter* bacteria in the environment using bacteriophages in the phage titer increase reaction / E.O. Efreitorova, L.P. Pulcherovskaya // Russian journal of agricultural and socio-economic sciences. -2016. -V. 58, № 10.-P. 190-193.
5. Lyashenko, E.A. Indication of *Klebsiella* genus bacteria with the help of specific bacteriophages, in the objects of veterinary supervision / E.A. Lyashenko, D.A. Vasilyev, S.N. Zolotukhin // In the digest: Bacteriophages: theoretical and practical aspects of application in medicine, veterinary medicine and food industry Materials of the International Scientific and Practical Conference. - 2013. - P.36-40.
6. Lyashenko, E.A. Development and application of a phage biopreparation for diagnosis of *klebsiella* infection / E.A. Lyashenko, S.N. Zolotukhin, D.A. Vasilyev // Vestnik of veterinary medicine. - 2011. - № 4 (59). - P. 90-92.
7. Bulkanova, E.A. Phage identification of *Klebsiella* genus bacteria / E.A. Bulkanova, S.N. Zolotukhin, D.A. Vasilyev // The role of young scientists in the implementation of the national project «Development of the AIC»: Materials of the International Scientific and Practical Conference. - Moscow: Moscow State Agroengineering University named after V.P. Goryachkin, 2007. - P. 222-225.
8. Bulkanova Elena Anatolyevna. Isolation and study of the primary biological properties of *Klebsiella* bacteriophages, elaboration of a biological compound on their basis: author's abstract of dissertation of Candidate of Biology: 03.00.07, 03.00.23 / E.A. Bulkanova. - Saratov, - 2006. - 21 p.
9. Pulcherovskaya, Lidiya Petrovna. Isolation and study of the primary biological properties of *Citrobacter* bacteriophages and their application in diagnostics: author's abstract of dissertation of Candidate of Biology: 03.00.07, 03.00.23 / L. P. Pulcherovskaya. - Saratov, 2004. - P. 88-89.
10. Zolotukhin Sergey Nikolaevich. Creation and development of application schemes for diagnostic biocompounds on the basis of isolated and studied bacteriophages of enterobacteria: author's abstract of the dissertation of Doctor of Biology: 03.00.23, 03.00.07 / S.N. Zolotukhin. - Ulyanovsk, 2007. - 39 p.
11. Katmakova, N.P. Development of suitable technological parameters for phage titer growth reaction with biocompound УР-09 UGSKHA / N.P. Katmakova, S.N. Zolotukhin, D.A. Vasilyev // Natural and technical sciences. - 2009. - № 6 (44). - P. 202-204.