

Kaldyrkaev A.I., Feoktistova N.A., Vasiliev D.A., Alyoshkin A.V.,
Merchina S.V.

Keywords: *Bacillus cereus*, monitoring, bacteriophages fagovarov system, identification, biological properties, phage typing.

The work is devoted to development of fagovarov B. cereus. The scheme of phage-typing strains of B. cereus dividing all the studied strains of the pathogen by 18 fagovarov. Allocated 57 phages B. cereus. Studied the basic biological properties of 57 isolates of phage B. cereus: defined four types of negative colonies isolated phage lytic activity ranged from 10-5 to 10-10 by the method of Appelman and $1,8 \times 10^7 \pm 0,4 \times 4 \times 10^7$ to $10^{12} \pm 1,8 \times 10^{12}$ method Grazia all isolated phages showed their lytic activity only against species B.cereus, wherein two of them FBc-FBc-7, and 28 had maximum spectrum lysing 12.4% of tested strains of bacilli.

УДК 602.3:579.8

Научные исследования проводятся при финансовой поддержке государства в лице Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках реализации федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы (соглашение от №8267 от 10.08.2012).

ПАРАМЕТРЫ ПОСТАНОВКИ РЕАКЦИИ НАРАСТАНИЯ ТИТРА ФАГА ДЛЯ ИНДИКАЦИИ БАКТЕРИЙ РОДА PROTEUS В ОБЪЕКТАХ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Н.А. Феоктистова, кандидат биологических наук, доцент

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

тел. 8(8422) 55-95-47, feokna@yandex.ru

М.А. Юдина, ассистент

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

тел. 8(8422) 55-95-47, feokna@yandex.ru

Д.А. Васильев, доктор биологических наук, профессор

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

8(8422) 55-95-47, dav_ul@mail.ru

С.Н. Золотухин, доктор биологических наук, профессор

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

8(8422) 55-95-47, fvm.zol@yandex.ru

Ключевые слова: индикация, бактерий рода *Proteus*, объекты ветеринарно-са-

нитарного надзора

*В статье описаны результаты исследований по подбору параметров постановки реакции нарастания титра фага для индикации бактерий рода *Proteus* в объектах окружающей среды. С помощью РНФ выявляли бактерии *Proteus* в фекалиях и мясе в концентрации 10^3 м.к./г. На обнаружение бактерий рода *Proteus* бактериологическим методом требовалась их более высокая концентрация, исчисляемая 10^4 м.к./г. и выше. Время же исследования увеличивалось с 22 часов до 96 часов.*

Введение

Согласно литературным данным, заражение людей бактериями рода происходит при употреблении воды и пищевых продуктов, в том числе мясных *Proteus*. Причем, значение и роль микроорганизмов в развитии заболеваний не дооценивается, поэтому разработка методов идентификации протеев в мясе и в других продуктах питания имеет актуальное значение [1].

Возможность использования фагов для обнаружения патогенных бактерий без выделения их в чистом виде независимо друг от друга использовал Ф.И. Сергиенко, он пытался применить этот метод путем посева материала в определенные разведения фага с последующим учетом нарастания его титра для обнаружения дизентерийных и брюшнотифозных бактерий) [3].

Н. Katznelson, M. Sutton использовали фаг для выявления фитопатогенных бактерий в семенах бобов. Но перечисленные выше работы носили чисто эмпирический характер, так как в них отсутствовало надлежащее теоретическое обоснование принципа [6]. В.Д. Тимаков и Д.М. Гольдфарб, основываясь на специфичности действия бактериофага и сравнительной простоте количественного его учета, теоретически обосновали и экспериментально разработали принципиально новый метод для обнаружения дизентерийных и брюшнотифозных бактерий, который назвали реакцией нарастания титра фага (РНФ), отличавшийся от существующих методов фагодиагностики, так как позволяет выявлять возбудителя непосредственно в исследуемом материале без выделения чистой культуры [4].

Цель — разработать схему ускоренной индикации бактерий рода *Proteus* с помощью специфических бактериофагов П-6 УГСХА и П-61 УГСХА. Достижение цели достигалось решением следующих задач:

- определить концентрации протейных бактериофагов, имеющих диагностическое значение;
- разработать режимы постановки РНФ;
- провели исследования по выяснению возможности использования РНФ для обнаружения бактерий рода *Proteus* в патологическом материале, объектах внешней среды и пищевом сырье.

Материал и методы исследования

Реакцию нарастания титра фага ставили по методике В.Д. Тимакова, Д.М. Гольдфарба [5], В.Я. Ганюшкина [2]. В работе были использованы 2 штамма из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы Ульяновской ГСХА: *P. vulgaris* 3, *P. vulgaris* 261. Бактериофаг П-61 УГСХА. Бактериофаг выделен из сточных вод с. Новая Беденьга Ульяновской области.

Индикаторная культура *P. vulgaris* 216. Титр фага $1,8 \times 10^9$ фаговых корпускул в 1 миллилитре, титр по Апфельману 10^8 . Размер негативных колоний 6,0 - 8,0 мм. Бактериофаг П-6 УГСХА. Бактериофаг выделен из сточных вод п. Октябрьский Ульяновской области. Индикаторная культура *P. vulgaris* 3. Титр фага $2,0 \times 10^9$ фаговых корпускул в 1 миллилитре, титр по Апфельману 10^8 . Размер негативных колоний 2,0-3,0 мм. В качестве объектов ветеринарно-санитарного надзора использовали интактные: фекалии животных и комбикорм, контаминированное бактериями рода *Proteus* мясо. В исследованиях использовали мясопептонный бульон, мясо-пептонный агар, 0,04% спиртовой раствор генцианвиолета.

Результаты исследований и их обсуждение

В первую очередь для постановки РНФ определяли концентрации протейных бактериофагов, имеющих диагностическое значение. По данным В.Д. Тимакова и Д.М. Гольдфарба (1962) известно, что при обнаружении бактерий в РНФ считается отрицательным, если увеличение количества фага в опытной пробе по сравнению с контрольной составляет до 3 раз. Увеличение количества фага от 3 до 5 учитывается как слабо положительная реакция, от 5 до 10 раз – положительная [5]. Для определения количества фага, имеющего диагностическое значение при обнаружении бактерий рода *Proteus*, нами проведены эксперименты на МПБ контаминированном культурами *P. vulgaris* 3 и *P. vulgaris* 261 в концентрации от 10^1 до 10^5 м.к./мл. Выбранный критерий гарантировал достоверность результатов, поскольку он позволял исключить технические погрешности при титровании, при которых возможно выявление невысокой степени увеличения количества фага. Достоверность РНФ подтверждали выделением бактерий рода *Proteus* бактериологическим методом исследования.

Определив количество фага, имеющее диагностическое значение при обнаружении бактерий рода *Proteus* в исследуемом тест-объекте, мы приступили к разработке режимов постановки РНФ. Для решения указанной задачи необходимо было провести эксперименты на тест-объекте по выявлению наиболее эффективного временного показателя взаимодействия фага и индикаторной культуры при сохранении остальных параметров (температурный режим, концентрация бактериальной культуры и фаговых корпускул в 1 мл) постановки РНФ. Оптимальное время экспозиции выбирали из шести следующих параметров: в предварительном подращивании исследуемого материала в течение 5 часов при температуре 37 °С, после добавления фагов смесь выдерживали в течение 5 часов при температуре 37 °С; в предварительном подращивании исследуемого материала в течение 16 часов при температуре 37 °С, после добавления фагов смесь выдерживали в течение 5 часов при температуре 37 °С; в предварительном подращивании исследуемого материала в течение 24 часов при температуре 37 °С, после добавления фагов смесь выдерживали в течение 5 часов при температуре 37 °С; в увеличении времени контакта исследуемого материала с фагом до 10 часов при температуре 37 °С; в увеличении времени контакта исследуемого материала с фагом до 16 часов при температуре 37 °С; в увеличении времени контакта исследуемого материала с фагом до 24 часов при температуре 37 °С.

В результате этих исследований было установлено, что при подращивании исследуемого материала в течение 24 часов чувствительность не повышалась по сравнению с чувствительностью РНФ при подращивании материала в течение 16 часов и позволяла обнаруживать протеи 10^2 м.к./мл. При подращивании исследуемого

материала в течение 5 часов при температуре 37 °С, нам удалось обнаруживать данные бактерии в концентрации 10² м.к./мл. При этом режиме подращивания чувствительность РНФ не снижается, но сокращается время исследования до 18 часов. Поэтому, это время подращивания мы считаем оптимальным.

Экспериментальным путем установлено, что при увеличении контакта исследуемого субстрата с фагом в течение 10 часов при температуре 37 °С заметное нарастание количества фагов бактерии рода *Proteus* не наблюдается при концентрации гомологичных бактерий не менее 10² м.к./мл. Удлинение сроков инкубации (16-24 часа) также не дают возможности получить увеличение количества фага. Исходя из этого, можно предположить, что значение инкубации в течение 5 часов при температуре 37 °С сводится к тому, что за это время бактерии, находящиеся в исследуемом субстрате в очень малых количествах, размножаются. В результате этого между добавленным индикаторным фагом и бактериями устанавливаются такие количественные соотношения, при которых вероятность встреч между ними повышается, и бактерии инфицируются фагом. Отсюда вытекает, что исход реакции зависит не только от свойств индикаторного фага, но и от биологических особенностей данного возбудителя, обнаруживаемого с помощью РНФ. Таким образом, из числа испытанных режимов наиболее быстрым и чувствительным является подращивание исследуемого материала с фагом в течение 5 часов при температуре 37 °С. Учет результатов в этом случае проводят через 16 часов. Бактерии рода *Proteus* удается обнаружить в количестве 10² м.к./г. При сопоставлении результатов бактериологического исследования и РНФ позволили подтвердить специфичность РНФ и высокую чувствительность, которые согласуются с работами многих авторов. Бактериологическое исследование проводили в соответствии с правилами, указанными в «Методических указаниях по бактериологической диагностике смешанной кишечной инфекции молодняка животных, вызываемой патогенными энтеробактериями», утвержденными Департаментом ветеринарии МСХ и П РФ 11.10.1999 г.

Сведений о применении РНФ для обнаружения бактерий рода *Proteus* в объектах внешней среды мы не встречали. Поэтому необходимо было изучить возможность использования РНФ для обнаружения данных микроорганизмов в объектах ветеринарного надзора. Для этого мы провели исследования по выяснению возможности использования РНФ для обнаружения бактерий рода *Proteus* в патологическом материале, объектах внешней среды и пищевом сырье. Прежде всего, мы провели опыты с фекалиями, содержащую постороннюю микрофлору, контаминировали различным количеством бактерий рода *Proteus* - от 10¹ до 10⁵ м.к./г.

Пробы объектов санитарного надзора в количестве 10 г вносили в колбы и контаминировали *P. vulgaris* 3 и *P. vulgaris* 261 в концентрации 10⁵; 10⁴; 10³; 10²; 10¹ м.к./мл, заливали МПБ из расчета 10 мл бульона на 1 г объекта исследования. Брали колбу с пробой воды, не контаминированной бактериями рода *Proteus*. Содержимое всех колб встряхивали в шуттель-аппарате в течение 15 минут, затем в течение 10 минут отстаивали. Готовили для опытной и контрольной проб по 6 широких пробирок (диаметр 20 мм) и номеровали их (1, 2, 3 и соответственно 1к, 2к и 3к – для каждого разведения культуры). В пробирки № 1, 2 и 1к, 2к вносили по 9 мл исследуемого материала, в пробирки № 3 и 3к – 9 мл МПБ. Затем в пробирки № 1, 3 и 1к и 3к добавляли по 1 мл индикаторного фага в рабочем разведении 10⁴ (для обоих штаммов фагов). Экспериментальным путем

установлено, что рабочее разведение фага должно содержать 1×10^4 корпускул в 1 мл. При титре фага, равном 10^8 частиц в 1 мл, фаг разводили 1:10000. В пробирки № 2 и 2к вносили по 1 мл стерильного МПБ (контроль на присутствие свободного фага). Пробирки № 1 и 1к, в которых находились взвеси воды и индикаторный фаг, являлись опытными. Пробирки № 2 и 2к - без фага - были контрольными, то есть служили для выявления в пробах воды свободного фага. Пробирки № 3 и 3к - контроль на титр индикаторного фага. После культивирования в термостате при температуре 37 °С в течение 5 часов содержимое каждой пробирки разводили МПБ (рН 7,4-7,6) так, чтобы при высеве 1 мл содержимого из пробирки № 3 и 3к (контроль на титр фага) на чашках образовалось несколько десятков негативных колоний (зон лизиса) фага. В пробирке № 3 и 3к индикаторный фаг находился в концентрации нескольких тысяч корпускул в 1 мл, и для того, чтобы получить в конечном разведении несколько десятков корпускул в 1 мл, содержимое пробирки № 3 разводили в 20 раз, т.е. 0,25 мл исследуемой смеси вносили в 4,5 мл МПБ. Содержимое опытных пробирок № 1, 1к и № 2, 2к разводили аналогично. Ввиду того, что селекционированные нами фаги являются термостабильными, то инактивацию микрофлоры разведенных смесей пробирок № 1 и 1к, № 2 и 2к, № 3 и 3к проводили путем прогревания в водяной бане при температуре 60 °С в течение 30 минут. После этого содержимое пробирок исследовали на определение количества корпускул бактериофага методом агаровых слоев по Грациа.

Заключение

На основании полученных данных при исследовании фекалий, РНФ оказалась эффективнее бактериологического метода исследования. С помощью РНФ выявляли бактерии *Proteus* в фекалиях в концентрации 10^3 м.к./г. На обнаружение бактерий рода *Proteus* в фекалиях бактериологическим методом требовалась более высокая концентрация протеев, исчисляемая 10^4 м.к./г. и выше. Время же исследования увеличивалось до 96 часов. При исследовании мяса, содержащего постороннюю микрофлору в количестве от 10^1 до 10^5 м.к./мл, нами было обнаружено явное преимущество РНФ перед бактериологическим методом исследования. С помощью РНФ за 22 часа исследования можно обнаружить протеев в мясе в количестве 10^3 м.к./г.

Библиографический список

1. Бакулов, И.А. Токсикоинфекции и токсикозы. Вопросы профилактики / И.А. Бакулов, А.М. Смирнов, Д.А. Васильев. – Ульяновск: УГСХА, 2003. – С. 28
2. Ганюшкин, В.Я. Бактериофаги сальмонелл и их применение в ветеринарии / В.Я. Ганюшкин. – Ульяновск, УГСХА, 1988. – С. 45.
3. Сергиенко, Ф.Е. Новый метод бактериологично діагностики за допомогою бактеріофага / Ф.Е. Сергиенко // Мікробіол. журн. АН УССР. – 1936. – №1. – С. 85.
4. Тимаков, В.Д. Об условиях взаимодействия фага и бактериальной клетки / В.Д. Тимаков, Д.М. Гольдфарб // Вестник АМН СССР. – 1958. – № 2. – С. 37.
5. Тимаков, В.Д. Реакция нарастания титра фага (РНФ) / В.Д. Тимаков, Д.М. Гольдфарб. – М., 1962. – С. 68,71.
6. Katzheson, H. Rapid phage plague count method for the detection of bacteria as applied to the demonsration of internalug borne bacterial infections of seed / H. Katzheson, M. Sutton // J. Bact. – 1951. – №1. – P. 689.

PARAMETERS OF STATEMENT OF REACTION PHAGE TITER RISE TO DISPLAY BACTERIA OF THE GENUS PROTEUS IN ENVIRONMENTAL OBJECTS

N.A. Feoktistova, M.A. Yudina, D.A. Vasiliev, S.N. Zolotukhin

Keywords: Display, bacteria of the genus *Proteus*, objects veterinary sanitary inspection

*The paper describes the results of studies on the selection of parameters setting reaction phage titer rise to indicate the kind of *Proteus* bacteria in the environment. With RNF *Proteus* bacteria were detected in the feces and meat at a concentration of 103 microbial cells / g. The detection of bacteria of the genus *Proteus* bacteriological method required a higher concentration of them, estimated 104 microbial cells / g above. While the same study increased from 22 hours to 96 hours.*

УДК 602.3:579.8

Научные исследования проводятся при финансовой поддержке государства в лице Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках реализации федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы (соглашение от №8267 от 10.08.2012).

МОНИТОНИНГ ПШЕНИЧНОЙ МУКИ НА НАЛИЧИЕ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ КАРТОФЕЛЬНОЙ БОЛЕЗНИ ХЛЕБА

М.А. Юдина, ассистент

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

тел. 8(8422) 55-95-47, feokna@yandex.ru

Н.А. Феоктистова, кандидат биологических наук, доцент

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

тел. 8(8422) 55-95-47, feokna@yandex.ru

Д.А. Васильев, доктор биологических наук, профессор

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

8(8422) 55-95-47, dav_ul@mail.ru

Ключевые слова: идентификация, бактериофаги, *Bacillus subtilis*, *Bacillus mesentericus*, картофельная болезнь хлеба, пшеничная мука.

*В работе описаны результаты мониторинга проб пшеничной муки на наличие возбудителей картофельной болезни хлеба с использованием специфичных бактериофагов *Bacillus subtilis*, *Bacillus mesentericus* методом «стекающая капля».*

Введение. В настоящее время индикация и идентификация бактерий *B. subtilis* и