

МЕТОДИКА ПОСТАНОВКИ РЕАКЦИИ НАРАСТАНИЯ ТИТРА ФАГА *BACILLUS ANTHRACIS*

Феоктистова Наталья Александровна, кандидат биологических наук, доцент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

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

Климушкин Евгений Иванович, аспирант кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

ФГБОУ ВО Ульяновская ГСХА

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

e-mail: feokna@yandex.ru

Ключевые слова: методы (технические приемы), бактериофаги, культура микроорганизмов, *Bacillus anthracis*, эксперимент.

В статье описаны результаты исследований по подбору оптимальных параметров постановки реакции нарастания титра фага с сибиреязвенным бактериофагом (количественный показатель реакции, имеющий диагностическое значение, и оптимальное время, обеспечивающее полноценное взаимодействие фага с бактериями). Установлено, что наиболее эффективными для постановки РНФ с целью индикации бактерий *Bacillus anthracis* в объектах санитарного надзора являются следующие параметры: концентрация индикаторной культуры *Bacillus anthracis*, обнаруживаемая при постановке реакции – 10^3 м.к./мл, рабочее разведение бактериофага – 10^5 БОЕ/мл; оптимальное время экспозиции – 5 часов культивирования без предварительного подращивания исследуемого материала.

Введение

В специальной литературе описано несколько методов по индикации *Bacillus anthracis*, основанных на применении специфических бактериофагов. Для выявления возбудителя сибирской язвы используют следующие методы фагоиндикации: реакция нарастания титра фага (РНФ), реакция адсорбции фага (РАФ), фаготетразоловый метод (ФТМ) и люминесцентно-серологический метод (ЛЮМ) [1].

Реакция нарастания титра фага – это метод, который позволяет выявлять бактериальный агент непосредственно в исследуемом материале без выделения чистой культуры. Сущность методики заключается в следующем: если в исследуемом материале присутствует искомый вид бактерий, то искусственно введенный в него гомологичный бактериофаг в определенной концентрации с коротким циклом внутриклеточного развития адсорбируется на нем, затем размножится. Таким образом, последующее уве-

личение концентрации (повышение титра) свободного внеклеточного фага, по сравнению с контролем, указывает на присутствие в исследуемом материале гомологичного возбудителя [2, 3].

Реакция адсорбции фага – в основу реакции положен специфический процесс адсорбции фага на бактериальных клетках, который легко регистрируется с помощью антифаговой сыворотки или раствора н-взмбихина в дистиллированной воде. Реакция обладает сравнительно высокой чувствительностью и дает возможность исследования смывов, загрязненных посторонними бактериями или не бактериальными примесями [1].

Фаготетразоловый метод основан на использовании выраженной избирательности литического действия бактериофагов в отношении гомологичных культур микробов, которое регистрируется по изменению активности дегидраз с помощью солей тетразолия. Реакцию учитывают косвенным

путем по изменению цвета индикатора метилтиазолилтетразолия, указывающего на наличие окислительно-восстановительных ферментов типа дегидрогеназ, образующихся в процессе роста клеток бактерий, и отсутствие их в результате лизиса клеток специфическим бактериофагом. Метод предусматривает использование фага с коротким циклом развития [3].

Люминесцентно-серологический метод с использованием системы фаг – флуоресцентный антифаг (непрямой метод) – основан на использовании явления специфической адсорбции частиц сибиреязвенного фага на клетках чувствительного гомологичного микроба, специфической реакции их антифаговой флуоресцирующей сывороткой и последующим выявлением возбудителя путем люминесцентной микроскопии. Специфическое свечение бактериальных клеток в препаратах, обработанных системой фаг – люминесцирующий антифаг, указывает на наличие в исследуемом материале возбудителя сибирской язвы. Этот тест обладает высокой чувствительностью и специфичностью [1, 2].

Все вышеописанные методики, кроме РНФ, требуют определенных материальных затрат (химические реактивы, дополнительное оборудование), поэтому с целью фагоиндикации возбудителя сибирской язвы в объектах окружающей среды мы планируем разработать параметры постановки именно этой реакции (количественный показатель реакции, имеющий диагностическое значение, и оптимальное время, обеспечивающее полноценное взаимодействие фага с бактериями).

Целью наших исследований был подбор оптимальных параметров постановки реакции нарастания титра фага для индикации возбудителя сибирской язвы с применением специфического бактериофага.

Задачи исследований:

определить количественный показатель реакции, имеющий диагностическое значение, в том числе:

- концентрацию микробных клеток,
- рабочее разведение бактериофага;
- определить оптимальное время экспо-

зиции, обеспечивающее полноценное взаимодействие фага с бактериями при следующих параметрах:

- без предварительного подращивания исследуемого материала после добавления фагов смесь выдерживали в течение 5,10,15 и 24 часов при температуре $(36\pm1)^\circ\text{C}$,
- при предварительном подращивании исследуемого материала в течение 5, 15, 24 часов при температуре $(36\pm1)^\circ\text{C}$, после добавления фагов смесь выдерживали в течение 5,10,15 и 24 часов при температуре $(36\pm1)^\circ\text{C}$.

Объекты и методы исследований

Авирулентный штамм *Bacillus anthracis*, полученный из музея НИИЦМиБ Ульяновской ГСХА.

Сибиреязвенный бактериофаг, выделенный и селекционированный авторами в 2015 году [5-7].

Постановка реакции нарастания титра фага проводилась с использованием методик, апробированных сотрудниками кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ ФГБОУ ВО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина» [8-12].

Результаты исследований

Для определения параметров постановки РНФ и разработки количественных показателей реакции, имеющих диагностическое значение, были проведены исследования с использованием стерильного мясопептонного бульона (МПБ), инкубированного совместно с 18-часовой индикаторной культурой *Bacillus anthracis* в концентрации от 10^3 до 10^8 м.к./мл при температуре $(36\pm1)^\circ\text{C}$. В качестве контроля был использован интактный МПБ. Рабочее разведение бактериофага содержало $10^2 - 10^5$ бляшкообразующих единиц (БОЕ) в миллилитре МПБ.

Методика постановки эксперимента: в опытные колбы с 50 мл стерильного МПБ вносили индикаторную культуру в концентрации $10^3 - 10^8$ м.к./мл. Содержимое колб встряхивали в шуттель-аппарате в течение 10 минут.

Чтобы установить оптимальное время, обеспечивающее наиболее полноценное взаимодействие фага с бактериями, необходимо было провести эксперименты на тест-

Оценка реакции нарастания титра фага (РНФ)

Увеличение количества корпускул индикаторного фага в опытной пробе (пробирка №1) в отношении к количеству корпускул в контроле (пробирка №3)	Оценка
Увеличение в 2,5 раза	Сомнительная
Увеличение от 3 до 5 раз	Слабо положительная
Увеличение свыше 5 раз	Положительная
Увеличение более 10 раз	Резко положительная

объекте (МПБ) при сохранении остальных параметров (температурный режим, концентрация бактериальной культуры и количество бляшкообразующих единиц в 1 мл) постановки РНФ.

Оптимальное время экспозиции выбирали из шести следующих параметров:

- предварительное подращивание исследуемого материала не предусматривалось, после добавления бактериофага термостатирование посевов в течение 5, 10, 16, 24 часов при температуре $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$;

- предварительное подращивание исследуемого материала в течение 5 часов при температуре $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$, после добавления бактериофага термостатирование посевов в течение 5, 10, 16, 24 часов при температуре $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$;

- предварительное подращивание исследуемого материала в течение 15 часов при температуре $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$, после добавления бактериофага термостатирование посевов в течение 5, 10, 16, 24 часов при температуре $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$;

- предварительное подращивание исследуемого материала в течение 24 часов при температуре $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$, после добавления бактериофага термостатирование посевов в течение 5, 10, 16, 24 часов при температуре $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$.

После проведения подготовки материала для исследований с учетом вышеописанных параметров осуществляли работу по следующему алгоритму: 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 вносили по 9 мл МПБ с культурой, а в пробирки 1к, 2к вносили по 9 мл стерильно-

го МПБ (контроль), в пробирки № 3 и 3к – 9 мл стерильного МПБ. Затем в пробирки № 1, 3, 1к и 3к добавляли 1 мл индикаторного фага в рабочем разведении, а в пробирки № 2 и 2к вносили по 1 мл МПБ (контроль на присутствие свободного фага). Пробирки № 1 и 1к, в которых находились МПБ (контаминированный бактериями *Bacillus anthracis* и стерильный) и индикаторный фаг, являлись опытными. Пробирки № 2 (МПБ+ бактерии *Bacillus anthracis*) и 2к – без фага были контрольными для выявления в пробах МПБ свободного фага. Пробирки № 3 и 3к – контроль на титр индикаторного фага. Посевы ставили в термостат при температуре $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ на то количество часов, которое предусматривает вариант эксперимента.

После культивирования посевов в условиях термостата содержимое каждой пробирки разводили МПБ (рН 7,4 – 7,6) так, чтобы при высеве 1 мл содержимого из пробирок №3 и 3к (контроль на титр фага) на чашках образовалось несколько десятков негативных колоний фага. В пробирках № 3 и 3к индикаторный фаг находился в концентрации 10^2 – 10^5 БОЕ/мл, и для того, чтобы получить в конечном разведении несколько десятков БОЕ/мл, содержимое пробирок № 3 и 3к 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. Далее содержимое пробирок исследовали на определение числа корпускул бактериофага методом агаровых слоев по Грациа [9]. Учет результатов проводили через 18 часов инкубирования в условиях термостата при температуре $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$. Для этого подсчитывали количество бляшкообразующих единиц, выросших на плотной питательной среде в

Таблица 2

Результаты РНФ (тест-объект МПБ+ *Bacillus anthracis*) с сибиреязвенным с бактериофа-

гом

Объект исследования - контаминированный бактериями <i>Bacillus anthracis</i> МПБ в концентрации: (м.к./ мл)	Контроль индикаторного фага (M±m)	Контроль свободного фага (M±m)	Опыт (M±m)	Увеличение (раз)
	Количество негативных колоний фага			
Предварительное подращивание не предусматривалось, время культивирования в условиях термостата 5 часов при температуре (36±1) °C				
10 ³	240 ± 13	-	1296±35	5,4
10 ⁴	240± 13	-	лизис	-
10 ⁵	240 ± 13	-	лизис	-
10 ⁶	240 ± 13	-	лизис	-
10 ⁷	240 ± 13	-	лизис	-

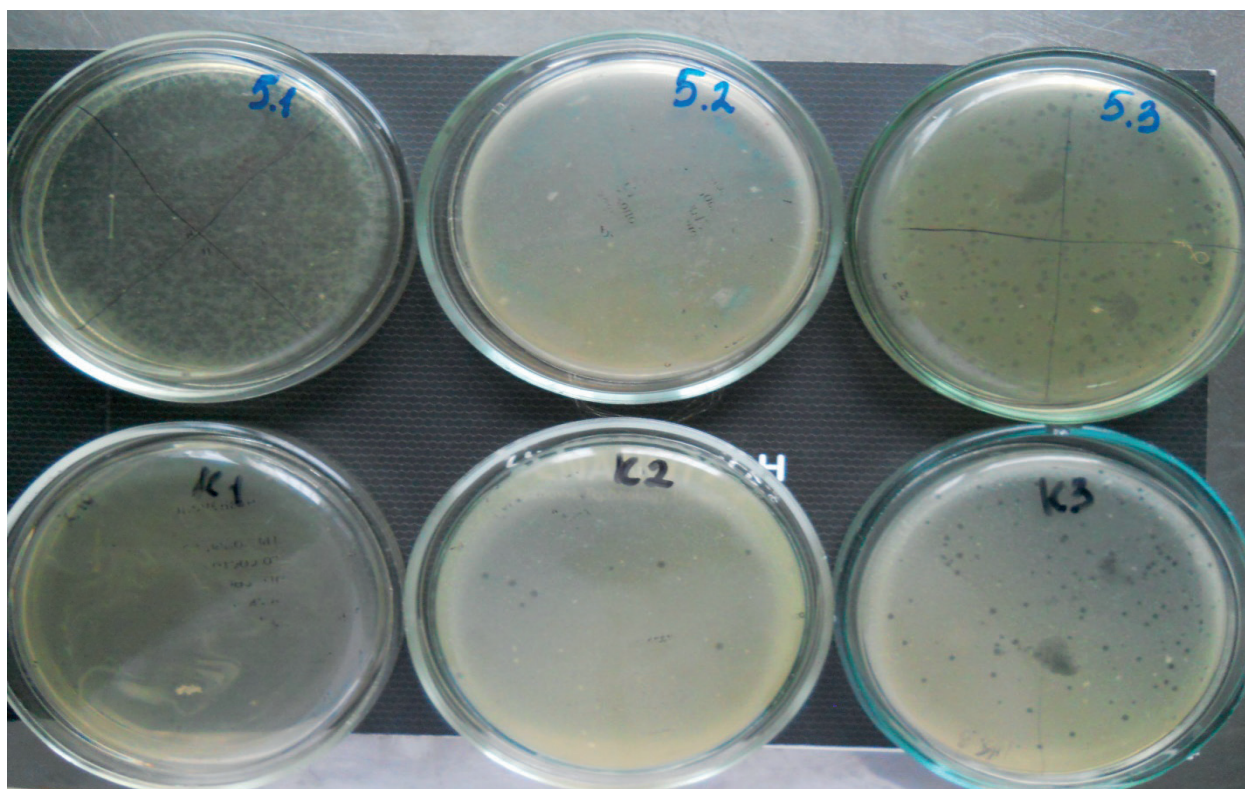


Рис. 1 – Результаты эксперимента (предварительное подращивание не предусматривалось, время культивирования в условиях термостата 5 часов при температуре (36±1) °C)

опытной пробе и в контроле (контроль титра фага). Результаты исследований (они представлены в таблице 1) оценивали согласно оценке, предложенной В.Я. Ганюшкиным и апробированной Пульчеровской Л.П. [13].

Экспериментальным путем нами было установлено, что количество БОЕ/мл в опыте более чем в 5 раз превышало количество БОЕ/мл в контроле при концентрации бак-

териальной массы *Bacillus anthracis* в МПБ 10³ м.к./мл. Данные показатели, согласно оценке, предложенной В.Я. Ганюшкиным, (1988) являются диагностическими.

Опытным путем нами было установлено, что предварительное подращивание материала во временной экспозиции (5, 16, 24 ч) и культивирование посевов в условиях термостата при температуре (36±1) °C в

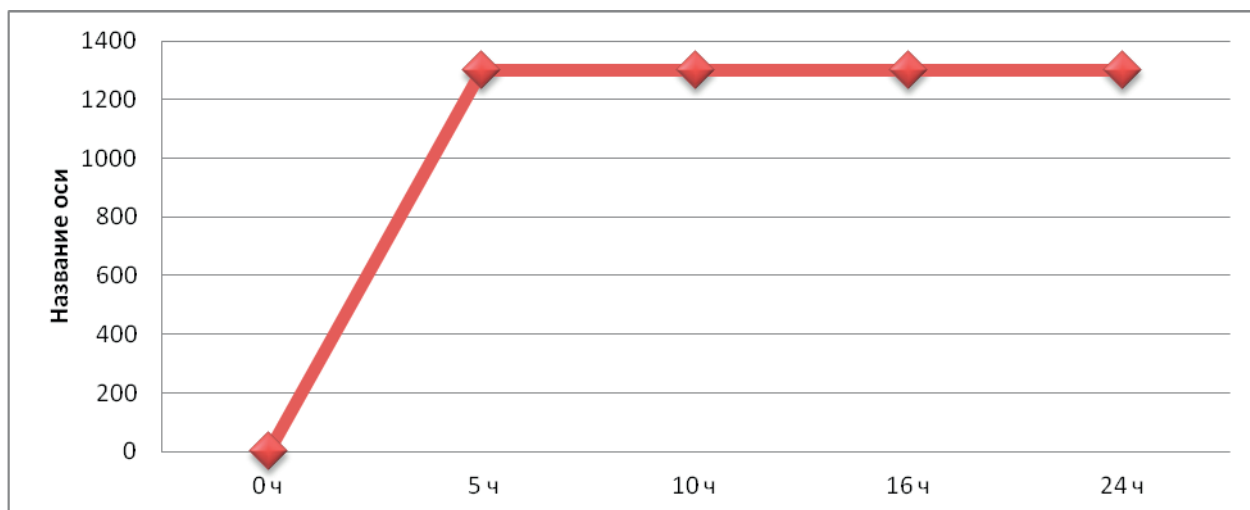


Рис. 2 – Результаты применения предварительного подращивания исследуемого материала в течение 5 часов

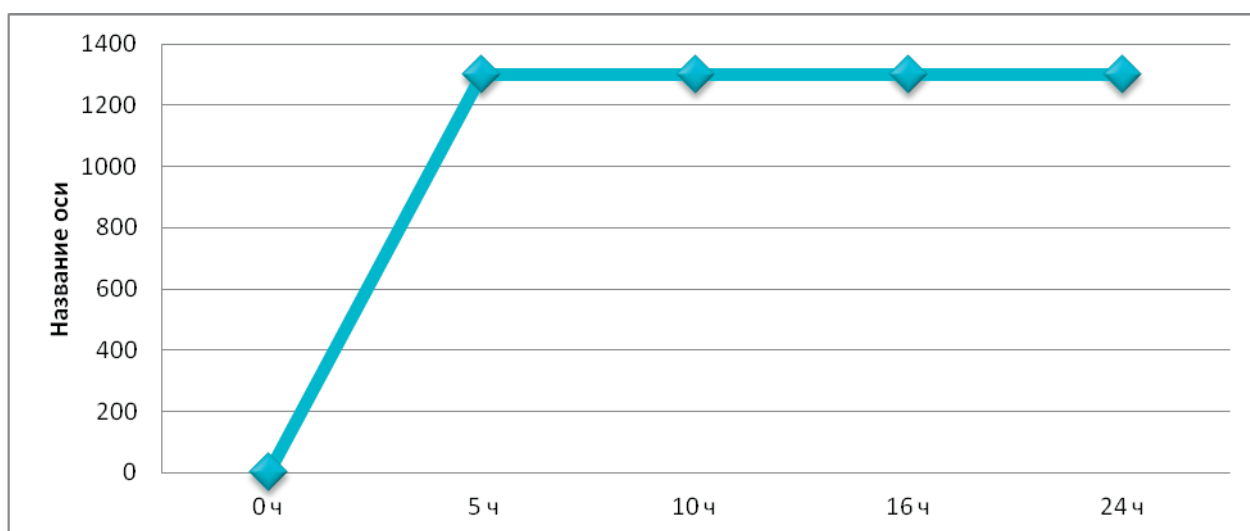


Рис. 3 – Результаты применения предварительного подращивания исследуемого материала в течение 15 часов

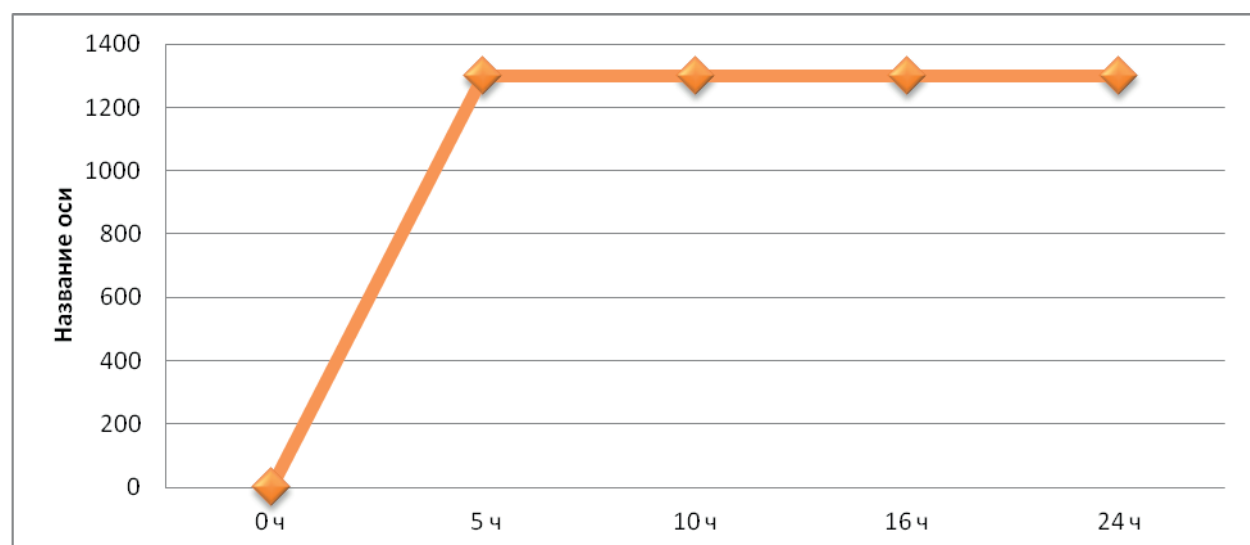


Рис. 4 – Результаты применения предварительного подращивания исследуемого материала в течение 24 часов

промежутке времени (5, 10, 15, 24 ч) позволяет обнаружить бактерий *Bacillus anthracis* при постановке РНФ в концентрации 10^3 м.к./мл (табл. 2, рис. 1). Аналогичную концентрацию бактерий возможно выявить при постановке РНФ без предварительного подращивания исследуемого материала при временной экспозиции культивирования (фаг+индикаторная культура) равной 5 часам. Таким образом, временной интервал, затрачиваемый на постановку РНФ составляет: 30 мин (закладка опыта) + 5 часов (время культивирования посевов) + 30 мин (посев методом Грация) + 18 часов (время культивирования посевов) = 24 часа. Подращивание исследуемого материала не повышает чувствительность реакции, поэтому использовать его не рекомендуется (рис. 2-4).

Выводы

На основании полученных в ходе эксперимента данных считаем, что наиболее эффективными для постановки РНФ с целью индикации бактерий *Bacillus anthracis* в объектах санитарного надзора являются следующие параметры:

- количественный показатель реакции нарастания титра фага для сибиреязвенного бактериофага, выделенного и селекционированного авторами в 2015 году, имеющий диагностическое значение, - это концентрация микробных клеток индикаторной культуры *Bacillus anthracis*, обнаруживаемая при постановке реакции – 10^3 м.к./мл, рабочее разведение бактериофага - 10^5 БОЕ/мл;

- оптимальное время экспозиции, обеспечивающее наиболее полноценное взаимодействие исследуемого бактериофага с индикаторной культурой, - это 5 часов культивирования без предварительного подращивания исследуемого материала.

Полученные экспериментальным путем данные позволяют утверждать, что при заданных параметрах происходит увеличение количества бляшкообразующих единиц в 5 раз, что имеет диагностическое значение при индикации возбудителя сибирской язвы методом постановки реакции нарастания титра фага.

Научные исследования проводятся при финансовой поддержке государства в

лице Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере (программа «УМНИК»).

Библиографический список

1. Головинская, Т.М. Биотехнологические и микробиологические аспекты совершенствования фагодиагностики сибирской язвы / Татьяна Михайловна Головинская // Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук. - Ставрополь, 2014. - С. 91-92.

2. Бакулов, И.А. Сибирская язва (антракс). Новые страницы в изучении «старой» болезни / И.А. Бакулов, В.А. Гаврилов, В.В. Селиверстов. - Владимир, Изд-во. «Посад», 2001. - С. 140-141.

3. Феоктистова, Н.А. Перспективы применения бактериофагов рода *Bacillus* / Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев, А.В. Меркулов [и др.] // Настоящее и будущее биотехнологии в решении проблем экологии, медицины, сельского, лесного хозяйства и промышленности: сборник научно-практического семинара с международным участием. - Ульяновск, 2011. - С. 136-139.

4. Васильев Д.А. Биоиндикация бактерий *Bacillus mycoides* в объектах санитарного надзора / Д.А. Васильев Д.А., С.Н. Золотухин, Н.А. Феоктистова, М.А. Лыдина [и др.] // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2013. - № 3 (23). - С. 52-56.

5. Климушкин, Е.И. Выделение бактериофагов, специфичных к *Bacillus anthracis* / Е.И. Климушкин, Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев [и др.] // БиоКиров-2015: сборник материалов III Международного форума. [Электронный ресурс]. - 2015. - С. 10-12.

6. Феоктистова, Н.А. Биологические свойства сибиреязвенного бактериофага / Н.А. Феоктистова, Е.И. Климушкин, Д.А. Васильев, К.В. Белова // Вестник ветеринарии. 2015. №3 (74). С. 46-49.

7. Феоктистова, Н.А. Подбор перспективного производственного штамма *Bacillus anthracis* для конструирования фагового биопрепарата / Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев, Е.И. Климушкин // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйствен-

ной академии. - 2015. - № 3 (31). - С. 69-76.

8. Васильев, Д.А. Биосенсорная детекция бактерий рода *Bacillus* в молоке и молочных продуктах для предупреждения их порчи / Д.А. Васильев Д.А., С.Н. Золотухин, Н.А. Феоктистова, А.В. Алешкин // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2013. - № 4 (24). - С. 36-43.

9. 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.

10. 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, А.В. Алешкин,

Н.А. Феоктистова [и др.] // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2012. - № 4 (20). - С. 69-73.

11. Феоктистова, Н.А. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов бактерий *Bacillus subtilis* / Н.А. Феоктистова // В книге: «Бактериофаги микроорганизмов значимых для животных, растений и человека». - Ульяновск, 2013. - С. 186-197.

12. Юдина, М.А. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов бактерий вида *Bacillus mesentericus* / М.А. Юдина, Н.А. Феоктистова // В книге: «Бактериофаги микроорганизмов значимых для животных, растений и человека». - Ульяновск, 2013. - С. 197-211.

13. Пульчеровская, Л.П. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов *Citrobacter* и их применение в диагностике / Лидия Петровна Пульчеровская // Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук. - Саратов, 2004. - С. 88-89.