

УДК 579.64

ПОДБОР ПАРАМЕТРОВ ПОСТАНОВКИ РЕАКЦИИ НАРАСТАНИЯ ТИТРА ФАГА С ФАГАМИ *BACILLUS MYCOIDES*, *BACILLUS* *MEGATERIUM*, *BACILLUS MESENTERICUS*

Е.О. Ефрейторова, соискатель
тел. 8(8422)55-95-47, *pulcherovskaya.lidia@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, *fvm.zol@yandex.ru*
ФГБОУ ВО Ульяновская ГСХА
Б.И. Шморгун, кандидат ветеринарных наук
ФГБУ «ВГНКИ»,
тел. 7 (499) 253-14-68, *dav_ul@mail.ru*
И.М. Абдурахманов, студент 4 курса
тел. 8(8422)55-95-47, *abdrahmanov.ilnur@yandex.ru*

Ключевые слова: реакция нарастания титра фага, фаги, параметры, *Bacillus mesentericus*, *Bacillus mycooides*, *Bacillus megaterium*, временные параметры, показатель реакции.

Работа посвящена разработке оптимальных условий постановки реакции нарастания титра фага с фагами *Bacillus mesentericus*, *Bacillus mycooides*, *Bacillus megaterium*. Установлено, что наиболее эффективными являются режимы РНФ при 6 часовой экспозиции исследуемого материала с фагом, когда удастся провести индикацию бактерий *Bacillus mesentericus*, *Bacillus mycooides*, *Bacillus megaterium* в количестве 100 м.к. в 1 миллилитре исследуемого субстрата, на исследование затрачивается 25 часов.

Введение. При нарушении санитарно-технического режима хранения зерна, муки, выпечки и реализации хлеба создаются условия для размножения картофельной палочки. Болезнь вызывают штаммы бактерий видов *Bacillus mesentericus*, *Bacillus mycooides*, *Bacillus megaterium*, обладающие высокой протеолитической и амилолитической активностью. Под действием высокоактивных ферментов – амилаз в хлебе увеличивается

количество декстринов, придающих мякишу хлеба излишнюю липкость. Продукты распада белков, образующиеся в результате действия протеолитических ферментов, обладают резким специфическим запахом. Внешне картофельная болезнь хлеба характеризуется очаговым, влажным ослизнением мякиша с желтовато-коричневым цветом и гнилостным запахом. При разламывании хлеба видны тонкие тягучие нити. Употребление такого хлеба может привести к пищевому отравлению [3-5, 13].

В настоящее время лабораторная диагностика пищевых отравлений, вызываемых вышеперечисленными бактериями, основана на выделении чистой культуры микроорганизмов и их идентификации по общепринятым тестам. Этот метод трудоемок и требует затрат времени, питательных сред и реактивов [8, 11]. Поэтому перед исследователями стоит задача изыскания более простого и доступного для лабораторий любого уровня метода индикации и идентификации названных микроорганизмов. Предлагаемый нами метод использования комплекта фаговых биопрепаратов позволяет в лаборатории «районного уровня» в течение 18 часов определить наличие бактерий вида *Bacillus mycoides*, *Bacillus mesentericus*, *Bacillus megaterium*.

Материалы и методы. Использовали методику, предложенную В.Я. Ганюшкиным (1988), опробованную Васильевым Д.А. и Золотухиным С.Н. [1,2], 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, *Bacillus megaterium* 182 для фага В meg-13 УГСХА в количестве от 10^1 до 10^5 микробных клеток. Бактериофаги были выделены и селекционированы по методикам, опробованным сотрудниками ФГБОУ ВО Ульяновская ГСХА [6-7,9-10, 12].

В качестве контроля был использован интактный МПБ. Рабочее разведение бактериофагов Вр-10 УГСХА, В meg-13 УГСХА и Bs-13 УГСХА содержало 10^4 бляшкообразующих единиц (БОЕ) в миллилитре МПБ (мл). Бактериологическая схема выделения бактерий рода *Bacillus* по методике Gordon [5, 15].

Результаты исследований и их обсуждение. По результатам проведенных опытов было установлено, что количество фаговых частиц более чем в 5 раз превышало количество фаговых частиц в контрольных пробах при контаминации МПБ бактериями *Bacillus mesentericus* (*Bacillus mycoides*, *Bacillus megaterium*) в концентрации 100 м.к./мл для фагов Вm-8 УГСХА, В. meg-13 УГСХА и В. мус-4 УГСХА. Данные показатели, согласно оценке, предложенной В.Я. Ганюшкиным (1988) [1-3] являются диагностическими.

Чтобы установить оптимальное время, обеспечивающего наиболее полноценное взаимодействие фага с бактериями 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 бляшкообразующих единиц (БОЕ) в 1 мл) постановки РНФ.

В качестве тест-объекта использовали МПБ, контаминированный бактериями *Bacillus mesentericus* (*Bacillus mycoides*, *Bacillus megaterium*). Оптимальное время экспозиции выбирали из шести следующих параметров:

- при предварительном подращивании исследуемого материала в течение 6, 16, 24 часа 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, 16, 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 mesentericus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus megaterium* в концентрации от 10^1 до 10^4 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 - на 16 часов, третий - 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 10^4 бляшкообразующих единиц (БОЕ) 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 негативных колоний). Содержимое всех пробирок фильтровали через мембранные фильтры фирмы Millipore (filter type: 0,22 μ m GV) и подвергали дальнейшему исследованию методом агаровых слоев по Грациа. Результаты учитывали через 18 часов.

Так же исследовали изучаемый материал бактериологическим методом, 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 mesentericus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus megaterium* обнаруживались в концентрации 100 м.к./мл, при этом на эксперимент затрачивалось 96 часов. Опытным путем было установлено, что подраживание материала в течение 6 часов позволяет обнаружить бактерий *Bacillus mesentericus*, *Bacillus megaterium* и *Bacillus mycoides* с помощью РНФ в концентрации 100 м.к./мл для фага Вm-8 УГСХА, 100 м.к./мл для фага В.meg-13 УГСХА и 100 м.к./мл для фага В.мус-4 УГСХА. При подраживании исследуемого материала в течение 16 и 24 часов чувствительность реакции не повышается и также позволяет обнаружить бактерии *Bacillus mesentericus*, *Bacillus megaterium* и *Bacillus mycoides* в количестве 100 м.к./мл для фагов Вm-8 и В.мус-4 серии УГСХА. На проведение исследования затрачивается 40 часов. Бактериологическим методом это же количество бактерий *Bacillus mesentericus*, *Bacillus megaterium* и *Bacillus mycoides* обнаружить удалось обнаружить через 24 часа подраживания материала, но на постановку реакции было затрачено 96 часов.

Во втором варианте опыта МПБ, контаминированный бактериями *Bacillus mesentericus* 66 (для фага Вm-8 УГСХА), *Bacillus megaterium* 182 (В.meg-13 УГСХА) и *Bacillus mycoides* 2 для фага В.мус-4 УГСХА в концентрациях от 10 до 100000 м.к./мл, не подраживали, 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 мл стерильного МПБ. Затем в пробирки № 1 и № 3 добавляли по 1 мл индикаторного фага в концентрации 10⁴БОЕ/мл, в пробирку № 2 вносили 1 мл стерильного МПБ и помещали в термостат при температуре 37°C: первый комплект на 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 подвергали дальнейшему исследованию методом агаровых слоев по Грациа. Через 18 часов учитывали результаты.

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 mesentericus*, *Bacillus megaterium* и *Bacillus mycooides* с помощью РНФ в концентрации 100 м.к./мл для фагов Вm-8 и В.мус-4 УГСХА, В.мег-13 УГСХА. При инкубировании исследуемого материала с фагом в течение 16 часов чувствительность реакции не повышается, что позволяет обнаружить бактерии *Bacillus mesentericus*, *Bacillus megaterium* и *Bacillus mycooides* при помощи бактериофагов в количестве 100 м.к./мл. На проведение исследования затрачивается 35 часов. Бактериологическим методом это же количество бактерий видов *Bacillus mesentericus*, *Bacillus megaterium* и *Bacillus mycooides* 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 Вm-8, В.мег-13 УГСХА и В.мус-4 УГСХА в течение 24 часов чувствительность реакции не увеличивалась и позволяла обнаруживать бактерии *Bacillus mesentericus*, *Bacillus megaterium* и *Bacillus mycooides* в количестве 100 м.к./мл. На проведение этого варианта реакции было затрачено 43 часа. В количестве 100 м.к./мл бактерии *Bacillus mesentericus*, *Bacillus megaterium* и *Bacillus mycooides* 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 mesentericus*, *Bacillus megaterium* и *Bacillus mycooides* 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 подрачивания 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. 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.
 3. Трусова, О.А. Бактерии вида *Bacillus megaterium* - возбудители порчи продуктов питания / О.А. Трусова, Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин // В сборнике: Молодежь и наука XXI века: материалы III-й Международной научно-практической конференции молодых ученых. – Ульяновск, 2010. – С.62-64.
 4. Феоктистова, Н.А. Бактерии вида *Bacillus mesentericus* – возбудители пищевых отравлений / Н.А. Феоктистова, М.А. Юдина, Д.А. Васильев, И.Р. Хусаинов // В сборнике: Молодежь и наука XXI века: материалы III-й Международной научно-практической конференции молодых ученых. – Ульяновск, 2010. – С.78-82.
 5. 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.
 6. 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.
 7. 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.
 8. 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.
 9. 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.

10. Феоктистова, 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.
11. Феоктистова, Н.А. Теоретические основы товароведения и экспертизы: учебно-методический комплекс / Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев, О.М. Ягфаров. – Ульяновск, 2008. – Т.2. - С. 58.
12. Феоктистова, Н.А. Выделение и изучение биологических свойств бактериофагов рода *Proteus*, конструирование на их основе биопрепарата и разработка параметров практического применения/ диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова. - Саратов, 2006. – С. 53.
13. Юдина, М.А. Диагностика картофельной болезни хлеба, вызываемой бактериями видов *Bacillus subtilis* и *Bacillus mesentericus* / М.А. Юдина, А.Х. Мустафин, Н.А. Феоктистова [и др.] // В сборнике: Ветеринарная медицина XXI века: инновации, опыт, проблемы и пути их решения: Международная научно-практическая конференция, посвященная Всемирному году ветеринарии в ознаменование 250-летия профессии ветеринарного врача. – Ульяновск, 2011. - С. 191-197.

SELECTION OF PARAMETERS OF STATEMENT OF REACTION OF INCREASE OF THE CAPTION OF THE PHAGE WITH PHAGES OF BACILLUS MYCOIDES, BACILLUS MEGATERIUM, BACILLUS MESENTERICUS

Efreytorova E.O., Lydina M.A., Vasilyev D.A., Zolotukhin S.N., Shmorgun B. I.

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

Work is devoted to development of optimum conditions of statement of reaction of increase of a caption of a phage with phages of *Bacillus mesentericus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus megaterium*. 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 mesentericus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus megaterium* in number of 100 m to. in 1 milliliter of the studied substratum, 25 hours are spent for research.