

УДК 579.64

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ПОКАЗАТЕЛЯ РЕАКЦИИ НАРАСТАНИЯ ТИТРА ФАГА С ФАГАМИ Вр-10 И Vs-13 СЕРИИ УГСХА

*К.В. Кудряшова, аспирант*

*тел. 8(8422)55-95-47, kudryashova\_91@list.ru*

*Н.А. Феоктистова, кандидат биологических наук, доцент*

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

*В.Г. Захарова, Е.Г. Логинова, А.А. Щербина, Ю.А. Райчинец, аспиранты*

*email: feokna@yandex.ru*

*ФГБОУ ВО Ульяновская ГСХА*

**Ключевые слова:** реакция нарастания титра фага, фаги, параметры, *Bacillus mesentericus*, *Bacillus subtilis*, количественный показатель реакции, концентрация.

Работа посвящена разработке оптимальных условий постановки реакции нарастания титра фага - определению количественного показателя реакции, имеющего диагностическое значение. 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 subtilis* (*Bacillus mesentericus*) в концентрации 100 м.к./мл для фагов Вр-10 УГСХА и Vs-13 УГСХА.

**Введение.** Реакция нарастания титра фага основана на способности видового бактериофага реплицироваться только в клетках бактерий «своего» вида. Осуществляется она по следующему принципу. К исследуемому материалу добавляют определенное количество видового бактериофага, инкубируют его в термостате, а потом вновь определяют количество фага. Если оно возросло, значит, бактериофаг «нашел» для репликации клетки «своего» вида, следовательно

– в исследуемом материале присутствуют бактерии искомого вида [3,5,8].

При разработке оптимальных условий постановки РНФ (реакции нарастания титра фага) необходимо определить количественный показатель реакции, имеющий диагностическое значение [13-14].

**Материалы и методы.** Использовали методику, предложенную В.Я. Ганюшкиным (1988), опробированную Васильевым Д.А. и Золотухиным С.Н. [1,3], 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 в количестве от 10 до 100000 микробных клеток. Бактериофаги были выделены и селекционированы по методикам, опробированным сотрудниками ФГБОУ ВО Ульяновская ГСХА [2,4,6-7, 9-12].

В качестве контроля был использован интактный МПБ. Рабочее разведение бактериофагов Вр–10 УГСХА и Bs–13 УГСХА содержало 10000 бляшкообразующих единиц (БОЕ) в миллилитре МПБ (мл).

**Результаты исследований и их обсуждение.** Методика постановки эксперимента: в опытные колбы с 50 мл МПБ вносили индикаторные культуры бактерий *Bacillus subtilis* (*Bacillus mesentericus*) в концентрации 10-100000 м.к./мл. В качестве контроля служил стерильный МПБ. Содержимое колб встряхивали в шуттель-аппарате в течение 10 минут. Далее готовили для опытной и контрольной проб 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 стерильного 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 subtilis* (*Bacillus mesentericus*) и стерильный) и индикаторный фаг, являлись опытными. Пробирки № 2 (МПБ+ бактерии *Bacillus subtilis* (*Bacillus mesentericus*)) 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 на 5 часов. После культивирования при температуре 37 °С содержимое каждой пробирки разводили МПБ (рН 7,4 – 7,6) так, чтобы при высеве 1 мл содержимого из пробирок №3 и 3к (контроль на

**Таблица 1–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 Увеличение от 3 до 5 раз Увеличение свыше 5 раз Увеличение более 10 раз	Сомнительная Слабо положительная Положительная Резко положительная

титр фага) на чашках образовалось несколько десятков негативных колоний фага. В пробирках № 3 и 3к индикаторный фаг находился в концентрации нескольких тысяч БОЕ в 1 мл, и для того, чтобы получить в конечном разведении несколько десятков БОЕ в 1 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 также. Ввиду того, что селекционированные фаги являлись термостабильными, инактивацию микрофлоры разведенных смесей пробирок № 1 и 1к, № 2 и 2к, № 3 и 3к проводили путем прогревания в водяной бане при температуре 64 °С в течение 45 минут. После этого, содержимое пробирок исследовали на определение числа корпускул бактериофага методом агаровых слоев по Грациа []. Учет результатов проводили через 18 часов инкубирования в условиях термостата при температуре 37 °С. С этой целью подсчитывали число негативных колоний фага, выросших на плотной питательной среде в опытной пробе и в контроле (контроль титра фага). Результаты исследований оценивали согласно оценке, предложенной В.Я. Ганюшкиным и опробованной на фагах бактерий рода *Bacillus* [], представленной в таблице 1.

В случае наличия в исследуемом материале свободного фага, число корпускул фага на чашке подсчитывали и вычитали из числа корпускул индикаторного фага в опытных чашках. Разницу сравнивали с контролем. При высоком титре свободного фага (сплошной лизис индикаторной культуры) реакция не учитывалась. РНФ, которая была оценена как сомнительная, не имела диагностического значения.

**Закключение.** 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 subtilis* (*Bacillus mesentericus*) в концентрации 100 м.к./мл для фагов Вр-10 УГСХА и Вs-13 УГСХА. Данные показатели, согласно оценке, предложенной В.Я. Ганюшкиным (1988) являются диагностическими.

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. Характеристика биологических свойств бактериофагов вида *Bacillus subtilis* / Д.А. Васильев Д.А., Н.А. Феоктистова М.А. Юдина [и др.] // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2011. - № 1. - С. 79-83.
3. 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.
4. Калдыркаев, А.И. Разработка системы фаговаров *Bacillus cereus* / А.И. Калдыркаев, Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев [и др.] // В сборнике: Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения: материалы V Международной научно-практической конференции. – Ульяновск, ГСХА. 2013. - С. 178-185.
5. 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.
6. Романова, Н.А. Сравнительная эффективность методов выделения фагов бактерий *Bacillus megaterium* / Н.А. Романова, Н.А. Феоктистова, С.Н. Золотухин [и др.] // Вестник ветеринарии. - 2013. - № 1 (64). - С. 26-27.

7. Садеева, Н.Т. Выделение фагов бактерий вида *Bacillus cereus* / Н.Т. Садеева, Н.А. Феоктистова, М.А. Юдина [и др.] // В сборнике: Актуальные проблемы инфекционной патологии и биотехнологии: материалы V-й Всероссийской (с международным участием) студенческой научной конференции. – Ульяновск: ГСХА, 2012. - С. 14-17.
8. 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.
9. 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 аграрно-университета. - 2011. - Т. 4. - № 32-1. - С. 288-290.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. Феоктистов, 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.
14. Юдина, М.А. Разработка фагового препарата *Bacillus mesentericus* и область его практического применения/ автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова. Саратов, 2012. – С. 5.

## OPREDENIYE OF THE QUANTITATIVE INDEX OF REACTION OF INCREASE OF THE CAPTION OF THE PHAGE WITH PHAGES OF BP-10 I BS-13 OF THE UGSKH SERIES

*Kudryashova K.V., Feoktistova N. A., Lydina M. A., Vasilyev D. A.,  
Zolotukhin S. N., Zakharova V. G., Loginova E. G., Scherbina A. A.,  
Raichynets Y. A.*

**Keywords:** reaction of increase of a caption of a phage, phage, parameters, *Bacillus mesentericus*, *Bacillus subtilis*, quantitative index of reaction, concentration.

Work is devoted to development of optimum conditions of statement of reaction of increase of a caption of a phage - to definition of the quantitative index of reaction having diagnostic value. By results of the made experiments it was established that the quantity the fagovykh of particles more than by 5 times exceeded quantity the fagovykh of particles in control tests at MPB kontamination bacteria of *Bacillus subtilis* (*Bacillus mesentericus*) in concentration 100 m.c./ml for phages of Br-10 UGSHA and Bs-13 UGSHA.