

УДК 579.64

## ВЫДЕЛЕНИЕ И СЕЛЕКЦИЯ БАКТЕРИОФАГОВ *VACILLUS COAGULANS*

К.В. Белова, аспирант

тел. 8(8422)55-95-47, [belova\\_ksenya@mail.ru](mailto:belova_ksenya@mail.ru)

М.А. Лыдина, кандидат биологических наук, ст. преподаватель

тел. 8(8422)55-95-47, [feokna@yandex.ru](mailto:feokna@yandex.ru)

Д.А. Васильев, доктор биологических наук, профессор

тел. 8(8422)55-95-47, [dav\\_ul@mail.ru](mailto:dav_ul@mail.ru)

С.Н. Золотухин, доктор биологических наук, профессор

тел. 8(8422)55-95-47, [fvm.zol@yandex.ru](mailto: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](mailto:dav_ul@mail.ru)

Д.Н.Хлынов, ассистент

ФГБОУ ВО Ульяновская ГСХА

тел. 8(8422)55-95-47

Ключевые слова: бактериофаг, негативные колонии фага, метод фильтрации, фаголизат, *Vacillus coagulans*

Работа посвящена выделению бактериофагов *Vacillus coagulans* из объектов внешней среды. При проведении исследований было выделено и селекционировано 8 изолятов фагов бактерий *Vacillus coagulans*.

**Введение.** Анализ литературных данных свидетельствует, что в настоящий момент в Российской Федерации не разработаны методики индикации и идентификации бактерий *Vacillus coagulans* с помощью бактериофагов в объектах санитарного надзора. Применение этих методик позволит в сжатые сроки найти и идентифицировать бактерии вида *Vacillus coagulans* в течение 25 часов, используя минимальное количество расходных материалов [10-13].

**Материалы и методы исследований.** Материалом для исследований были 3 штамма: *Vacillus coagulans* 566, *Vacillus coagulans* 10468, *Vacillus coagulans* 10473; 39 проб объектов санитарного надзора: почва, вода, пищевые продукты.

Выделение фагов бактерий *Vacillus coagulans* из объектов внешней среды проводили по методикам, опробованным сотрудниками ФГБОУ ВО Ульяновская ГСХА [1-9, 12].

**Методика исследования:** навеску пробы разводили для исследований в соотношении 1:10 физиологическим раствором. В 1,0 литровую колбу, содержащую стерильный, МПБ в количестве 50,0 мл, вносили 5 г (для жидкой фракции 5 мл) взятой пробы и ставили в термостат на 24ч. Затем на следующий день в эту колбу вносили по 1,0 мл из имеющихся у нас суточных культур 3 штаммов *Bacillus coagulans* 566, *Bacillus coagulans* 10468, *Bacillus coagulans* 10473. Это делалось для экономии посуды и питательных сред, таким образом, каждая проба испытывалась на наличие фагов ко всем имеющимся культурам *Bacillus coagulans*. Колбу ставили в термостат и инкубировали в течение 18 часов при 37°C.

Затем исследуемый субстрат очищали от механических примесей методом механического фильтрования. После этого фильтрат разливали в стерильные пробирки и центрифугировали при 3000 об./мин в течение 30 минут. Очищение продолжали, используя прогревание на водяной бане при 80°C в течение 45 минут. Исследуемые центрифугаты исследовали методом «стекающая капля». Данную модификацию метода выделения фагов из объектов внешней среды с целью экономии питательных сред предложил А.И. Калдыркаев [4,5].

На поверхность 1,5% мясо-пептонного агара в чашках Петри наносили пипеткой 3–4 капли 18–ти часовой бульонной культуры *Bacillus coagulans* 566, *Bacillus coagulans* 10468, *Bacillus coagulans* 10473, которую стерильным шпателем растирали по поверхности среды. Чашки ставили в термостат при 37 °С для подсушивания газона на 20-30 минут. Чашку делили на два сектора при помощи маркера. На поверхность засеянной среды наносили исследуемый на наличие бактериофага субстрат и наклоняли чашку Петри так, чтобы капля стекла, на вторую половину таким же образом наносили мясо-пептонный бульон (для контроля). Посевы ставили в термостат (температура 37°C), учет результатов проводили через 18 часов.

**Результаты исследований и их обсуждение.** Наличие зон лизиса на газоне роста *Bacillus coagulans* 566, *Bacillus coagulans* 10468, *Bacillus coagulans* 10473 свидетельствовало о присутствии в исследуемом материале бактериофага (рисунок 1).

При исследовании 39 проб различного вида, нам удалось выделить 8 изолятов фагов бактерий *Bacillus coagulans*. Результаты исследований представлены в таблице 1.

Селекцию фагов проводили десятикратным пассированием изолированных негативных колоний на мясо-пептонноагаре с перевива-

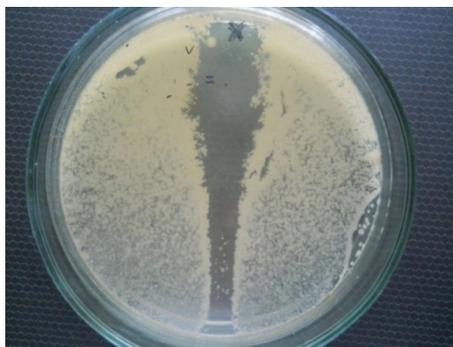


Рисунок 1 – Зона лизиса на газоне культуры *Bacillus coagulans*



Рисунок 2 – Рост выделенного бактериофага (слева) и культуры *Bacillus coagulans* (справа) на мясо-пептонном бульоне

нием на мясо-пептонный бульон. Негативные колонии фага (2-3 штуки) отвивали в пробирку с мясопептонным бульоном, куда добавляли индикаторные культуры. Ход работы: в две пробирки с 4,5 мл мясопептонного бульона (рН 7,4 – 7,6) добавляли стерильной пипеткой 0,2 мл 18 – часовой бульонной индикаторной культуры *Bacillus coagulans*. В первую пробирку отвивали негативную колонию, а вторая пробирка была контролем. Засеянные пробирки ставили в термостат и инкубировали их при 37°C до образования в контрольной пробирке пленки на поверхности среды. Опытная пробирка должна была визуальнo отличаться от контроля – быть более прозрачной и не иметь пленки на поверхности среды (рис. 2).

**Таблица 1 – Характеристика выделенных фагов бактерий  
*Bacillus coagulans***

| № проб выделенных бактериофагов | Объект выделения  |
|---------------------------------|---|
| 4                               | Специи:<br>1) Корица молотая. Galeo. KAMISS.A.<br>2) Куркума молотая. ООО «Сантус ЛТД»<br>3) Приправа для курицы. CYKORIAS.A.<br>4) Черный молотый перец. ООО «Пищевые технологии»<br>5) Корица молотая. ООО «Аллегро специи»   |
| 6                               | Овощные консервы (томатный сок) домашнего приготовления   |
| 7                               | Почва различного хозяйственного значения (г. Инза Ульяновская область):<br>1) проба почвы около яблони<br>2) проба почвы с мусором  |
| 8                               | Почва различного хозяйственного значения (г. Сенгилей Ульяновская область):<br>1) около бани<br>2) проба с костра   |
| 31                              | Проточная вода  |
| 32                              | Мука:<br>1) Мука пшеничная хлебопекарная. Сорты высший ПОДГОРЕНСКАЯ. Лимак. ОАО «ЛИПЕЦКХЛЕБМАКАРОНПРОМ»<br>2) АЛАДУШКИН. Мука пшеничная хлебопекарная высший сорт. ОАО «Петербургский мельничный комбинат»<br>3) Плюшечка-Ватрушечка. ЗАО «Магнитогорский комбинат хлебопродуктов - СИТНО»<br>4) WHEAT FLOUR. МАКФА. ОАО "Макфа"<br>5) Алейка. ЗАО «АЛЕЙСКЗЕРНОПРОДУКТ имени С.Н. Старовойтова» |
| 33                              | Почва различного хозяйственного значения (р.п.Мулловка Ульяновская область)   |
| 34                              | Почва различного хозяйственного значения (г. Барыш Ульяновская область)   |

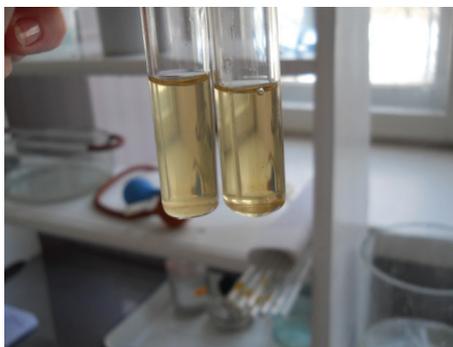


Рисунок 3 – Очищенный бактериофаг



Рисунок 4 – Выделенные бактериофаги во флаконах

Очистка фагов *Vacillus coagulans* от бактериальных клеток осуществлялась нами методом фильтрации с использованием мембранных фильтров фирмы Millipore (filtertype: 0,22  $\mu\text{m}$  GV) (рис. 3).

Использование физических и химических методов инактивации бактерий *Vacillus coagulans* в фаголизатах мы считали не целесообразным, так это длительные и не всегда результативные методики [3, 5].

Заключение. После проведения десятикратной серии пассажей каждого из 8 фаголизатов на индикаторной культуре, мы укупоривали их в стерильные флаконы и хранили при низкой температуре (4-6°C) без введения консервантов (рис. 4).

*Библиографический список*

1. Белова, К.В. Подбор методики выделения бактериофагов *Bacillus coagulans*/ К.В. Белова, Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин, М.А. Лыдина, Е.И. Климушкин // *Материалы Международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы ветеринарной науки»*. – Ульяновск, 2015. – с. 100. – режим доступа: URL: [http://old.ugsha.ru/index.php?option=com\\_frontpage&Itemid=1](http://old.ugsha.ru/index.php?option=com_frontpage&Itemid=1) – дата обращения 26.04.2015.
2. Васильев, Д.А. Тест-система ускоренной детекции бактерий рода *Bacillus* в пищевом сырье и продуктах питания / Д.А. Васильев, Н.А. Феоктистова, М.А. Лыдина, А.И. Калдыркаев, Н.А. Петрукова // *В сборнике: Каталог научных разработок и инновационных проектов*. - Ульяновск, 2015. - С. 49.
3. Золотухин, С.Н. Новый метод определения качества молока и молочных продуктов, контаминированных бактериями рода *Bacillus* / С.Н. Золотухин, Д.А. Васильев, Н.А. Феоктистова // *В сборнике: Фундаментальные и прикладные проблемы повышения продуктивности животных и конкурентоспособности продукции животноводства в современных экономических условиях АПК РФ: материалы Международной научно-практической конференции*. – Ульяновск, 2015. - С. 288-290.
4. Калдыркаев, А.И. Модификация методики выделения фагов бактерий вида *Bacillus cereus* / А.И. Калдыркаев, Д.А. Васильев, Н.А. Феоктистова // *Актуальные проблемы инфекционной патологии в ветеринарной медицине: материалы II-й конференции молодых ученых*. - Покров: ВНИИВВиМ, 2012. - с. 112–117.
5. 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.
6. Кудряшова, К.В. Выделение фагов бактерий *Bacillus coagulans* / К.В. Кудряшова, Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев, Е.И. Климушкин // *В сборнике: Биотехнология: реальность и перспективы: международная научно-практическая конференция*. – Саратов, 2014. - С. 26-28.
7. Кудряшова, К.В. Изучение видового разнообразия бактерий рода *Bacillus*, контаминирующих корне- и клубнеплоды / К.В. Кудряшова, Н.А. Феоктистова, М.А. Лыдина, Д.А. Васильев, Б.И. Шморгун //

- В сборнике: Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения: материалы VI Международной научно-практической конференции. – Ульяновск, 2015. - С. 95-98.
8. 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.
  9. Феоктистова, Н.А. Выделение и изучение биологических свойств бактериофагов рода *Proteus*, конструирование на их основе био-препарата 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.
  10. 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.
  11. Феоктистова, Н.А. Выявление бацилл, вызывающих порчу продуктов питания (БВППП) бактериологическими методами / Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев, Т.Г. Юдина, С.Н. Золотухин // В сборнике: Актуальные вопросы ветеринарной науки: материалы Международной научно-практической конференции. – Ульяновск, 2015. - С. 103-110.
  12. Феоктистова, Н.А. Подбор методики выделения бактериофагов *Bacillus coagulans* / Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин, М.А. Лыдина, К.В. Белова, К.В. Шокина // В сборнике: Актуальные вопросы ветеринарной науки Материалы Международной научно-практической конференции. – Ульяновск, 2015. - С. 100-102.
  13. Феоктистова, Н.А. Результаты сравнительного анализа бактериологических методов исследований какао-порошка на наличие бацилл, вызывающих порчу продуктов питания (БВППП) / Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2015. - № 1 - (29). - С. 69-76.

## **ALLOCATION AND SELECTION OF BACTERIOPHAGES OF *BACILLUS COAGULANS***

*Belova K.V., Lydina M. A., Vasilyev D. A., Zolotukhin S. N., Shmorgun B. I.*

**Keywords:** bacteriophage, negative colonies of a phage, filtration method, фаголизат, *Bacillus coagulans*.

Work is devoted to allocation of bacteriophages of *Bacillus coagulans* from objects of environment. When carrying out researches 8 isolates of phages of bacteria of *Bacillus coagulans* were allocated and selected.