

УДК 579.64

ФАГОИНДИКАЦИЯ БАКТЕРИЙ *VACILLUS SUBTILIS* И *VACILLUS MESENTERICUS* В ПИЩЕВОМ СЫРЬЕ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

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

Карпова Ю.С., студентка 4 курса

тел. 8(8422)55-95-47, abdrahmanov.ilnur@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, *Bacillus mesentericus*, *Bacillus subtilis*, концентрация, проба зерна (кукуруза), овощи (томаты), фрукты (персики)

Работа посвящена изучению эффективности применения фагоиндикации для выявления бактерий *Bacillus mesentericus*, *Bacillus subtilis* без выделения чистой культуры, при наличии посторонней микрофлоры. Установлено, что в концентрации 1000 м.к./г. бактерии *Bacillus subtilis* и *Bacillus mesentericus* выявлялись через 25 часов в пробах зерна (кукуруза), овощей (томаты) и фруктов (персики) может быть с успехом использована реакция нарастания титра фага.

Введение. Контаминация плодов и овощей фитопатогенными бактериями в процессе их выращивания, сбора и последующего хранения – это серьезная проблема производителей и переработчиков сельскохозяйственного сырья, но и медиков. Пищевые отравления, вызванные бактериями *Bacillus subtilis*, *Bacillus mesentericus* часто характеризуются острым течением болезни и могут вызвать летальный исход. В настоящее время обработка овощей и фруктов основана на отбраковке недо-

Таблица 1 – Исследование проб персиков, загрязненных бактериями *Bacillus mesentericus* 32 с помощью РНФ (фаг Вр–10 УГСХА)

Заражающая концентрация бактерий в 1 кубическом см	Контроль индикаторного фага	Контроль свободного фага	Опыт	Увеличение (раз)
	Количество негативных колоний фага			
100000	31 ± 1,2	-	Полный лизис	Более 10
10000	31 ± 1,2	-	Полный лизис	Более 10
1000	31 ± 1,2	-	186±4	6,0
100	31 ± 1,2	-	93±3	3,0
10	31 ± 1,2	-	54±	1,7

Таблица 2 – Исследование проб персиков, загрязненной бактериями *Bacillus subtilis* 12 с помощью РНФ (фаг Bs–13 УГСХА)

Заражающая концентрация бактерий в 1 кубическом см	Контроль индикаторного фага	Контроль свободного фага	Опыт	Увеличение (раз)
	Количество негативных колоний фага			
100000	24 ± 1,4	-	Полный лизис	Более 10
10000	24 ± 1,4	-	Полный лизис	Более 10
1000	24 ± 1,4	-	217±2	9,1
100	24 ± 1,4	-	142±1	5,9
10	24 ± 1,4	-	66±3	2,1

брокачественной продукции с использованием ручного труда и механических устройств. Подобная обработка – это трудоемкие и малоэффективные технологии, так как, удалив испорченную единицу продукции, нельзя гарантировать, что споры фитопатогенных бацилл не попали на другие фрукты и овощи. Выявление контаминанта и своевременная и эффективная обработка продуктов растительного происхождения безвредным для здоровья человека биопрепаратом – это актуальная цель для исследований [1,5,8,13-14].

**Таблица 3 – Исследование проб зерна кукурузы,
контаминированного бактериями *Bacillus mesentericus* 32 с
помощью РНФ (фаг Вр–10 УГСХА)**

Заражающая кон- центрация бактерий в 1 мл	Контроль индика- торного фага	Контроль свободного фага	Опыт	Увеличение (раз)
	Количество негативных колоний фага			
100000	31 ± 1,2	-	Полный лизис	Более 10
10000	31 ± 1,2	-	Полный лизис	Более 10
1000	31 ± 1,2	-	189 ± 2	6,1
100	31 ± 1,2	-	112±4	3,6
10	31 ± 1,2	-	59 ±4	1,9

**Таблица 4 – Исследование проб зерна кукурузы,
контаминированного бактериями *Bacillus subtilis* 12 с помощью
РНФ (фаг Bs–13 УГСХА)**

Заражающая концен- трация бактерий в 1кубическом см	Контроль индикатор- ного фага	Контроль свободного фага	Опыт	Увеличение (раз)
	Количество негативных колоний фага			
100000	24 ± 1,4	-	Полный лизис	Более 10
10000	24 ± 1,4	-	Полный лизис	Более 10
1000	24 ± 1,4	-	179±2	7,5
100	24 ± 1,4	-	108±1	4,5
10	24 ± 1,4	-	49±2	2,0

Материалы и методы. Использовали методику, предложенную В.Я. Ганюшкиным (1988), опробированную Васильевым Д.А. с сотр. [1,3], для проведения эксперимента постановки РНФ на пробах персиков, зерен кукурузы и томатов, искусственно контаминированных 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 селекци-

Таблица 5 – Исследование проб томатов, контаминированных бактериями *Bacillus mesentericus* 32 с помощью РНФ (фаг Вр–10 УГСХА)

Заражающая концентрация бактерий в 1 кубическом см	Контроль индикаторного фага	Контроль свободного фага	Опыт	Увеличение (раз)
	Количество негативных колоний фага			
100000	31 ± 1,2	-	Полный лизис	Более 10
10000	31 ± 1,2	-	Полный лизис	Более 10
1000	31 ± 1,2	-	166±1	5,3
100	31 ± 1,2	-	107 ± 1	3,5
10	31 ± 1,2	-	58 ± 1	1,9

Таблица 6 – Исследование проб томатов, контаминированных бактериями *Bacillus subtilis* 12 с помощью РНФ (фаг Bs–13 УГСХА)

Заражающая концентрация бактерий в 1 кубическом см	Контроль индикаторного фага	Контроль свободного фага	Опыт	Увеличение (раз)
	Количество негативных колоний фага			
100000	24 ± 1,4	-	Полный лизис	Более 10
10000	24 ± 1,4	-	Полный лизис	Более 10
1000	24 ± 1,4	-	155±2	6,5
100	24 ± 1,4	-	101±2	4,2
10	24 ± 1,4	-	61±3	2,5

онированы 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). Объекты исследований - образцы зерна (кукуруза), овощей (томаты) и фруктов (персики).

Результаты исследований и их обсуждение. Пробы персиков (зерен кукурузы, томатов), весом 10 г, первоначально измельчали в фар-

форовой ступке при помощи пестика, затем вносили в стерильные колбы объемом 100 мл, заливали стерильным МПБ из расчета 10 мл бульона на 1 г продукта. В опытные колбы вносили индикаторные культуры *Bacillus subtilis* и *Bacillus mesentericus* в концентрации 10- 100000 м.к. в 1 мл и брали колбы с пробой персиков (зерен кукурузы, томатов), не контаминированной бактериями *Bacillus subtilis* и *Bacillus mesentericus*. Далее работали по методике, изложенной выше. Результаты исследования представлены в таблице 1-6.

Из полученных данных, представленных в таблицах 1-6 видно, что увеличение титра фагов Вр–10 УГСХА и Вs–13 УГСХА в 5 раз и более произошло при концентрации 1000 микробных клеток бактерий *Bacillus subtilis* и *Bacillus mesentericus* в 1 г персиков, зерен кукурузы и томатов.

Закключение. Адаптирована методика реакции нарастания титра фага для индикации бактерий *Bacillus subtilis* и *Bacillus mesentericus* без выделения их чистой культуры из проб зерна, овощей и фруктов: методика фагоиндикации возбудителей в пробах зерна кукурузы, томатов и персиков, искусственно контаминированных бактериями *Bacillus subtilis* и *Bacillus mesentericus*, с помощью РНФ, показала свою эффективность: вышеназванные бактерии обнаруживались в объекте исследования в концентрации 1000 м.к./г без выделения чистой культуры, при наличии посторонней микрофлоры. На обнаружение возбудителя (*Bacillus subtilis* и *Bacillus mesentericus*) с помощью РНФ затрачивалось не более 25 часов. Полученные данные указывают, что для индикации вышеназванных бактерий в пробах зерна, овощей и фруктов может быть с успехом использована РНФ.

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 аграрного 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. 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.
 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.

FAGOINDIKATION OF BACTERIA OF *BACILLUS SUBTILIS* AND *BACILLUS MESENTERICUS* IN FOOD RAW MATERIALS OF THE PHYTOGENESIS

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

Keywords: reaction of increase of a caption of a phage, *Bacillus mesentericus*, *Bacillus subtilis*, kontsentation, test of grain (corn), vegetables (tomatoes), fruit (peaches).

Work is devoted to studying of efficiency of application of a fagoindication for identification of bacteria of *Bacillus mesentericus*, *Bacillus subtilis* without allocation of pure culture, in the presence of foreign microflora. It is established that in concentration 1000 ¼.-./g bacteria of *Bacillus subtilis* and *Bacillus mesentericus* came to light in 25 hours in tests of grain (corn), vegetables (tomatoes) and fruit (peaches) reaction of increase of a caption of a phage can be used with success.