

УДК 602.3:579.6

## ИЗУЧЕНИЕ ЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ФАГОВ *BACILLUS CEREUS* ПРИ ХРАНЕНИИ

*А.И. Калдыркаев, кандидат биологических наук, доцент,  
8(8422) 55-95-47, usxa@yandex.ru,  
З.С. Голякевич, студент, 8(8422) 55-95-47, usxa@yandex.ru,  
А.С. Гранкина, студент, 8(8422) 55-95-47, usxa@yandex.ru,  
Д.А. Васильев, доктор биологических наук, профессор,  
8(8422)55-95-47, dav\_ul@mail.ru  
ФГБОУ ВО Ульяновская ГСХА*

**Ключевые слова:** бактериофаг, *Bacillus cereus*, литическая активность, параметры, хранение

В статье описаны результаты исследований по определению литической активности фагов *Bacillus cereus* при хранении в течение четырех лет при температуре 2-4 °С. Установлено, что фаги *Bacillus cereus* снижают литическую активность на четыре порядка, которую возможно впоследствии повысить методом пассирования на индикаторной культуре.

Бактерии *Bacillus cereus* относятся к грамположительным факультативно-анаэробным, подвижным, спорообразующим, палочковидным бактериям, широко распространенным в окружающей среде (почве, пресной и морской воде, кишечнике беспозвоночных, на растениях и т.д.) и имеющим фенотипические и генетические (16S рРНК) признаки, сходные с рядом других видов бактерий рода *Bacillus*: *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. thuringiensis* и *B. anthracis* [1-3].

Литическая активность бактериофага оценивается по его способности вызывать лизис бактериальной культуры в жидких или плотных питательных средах и выражает это тем максимальным разведением, в котором испытуемый бактериофаг проявил свое литическое действие.

Нами были выделены и селекционированы в 2012 году бактериофаги, специфичные для *Bacillus cereus* - *FBc* – 4 УГСХА и *FBc* – 13 УГСХА, которые хранились при температуре 2-4 °С в течение 4 лет.

Цель исследований – определить показатель литической активности бактериофагов *FBc* – 4 УГСХА и *FBc* – 13 УГСХА.

Литическую активность бактериофагов определяли по методу Апфельмана и Грация [4-11]. По результатам этих тестов отбирали фаги с наиболее широким спектром литической активности.

Таблица 1 – Литическая активность бактериофагов *Bacillus cereus*

№ п/п	Бактериофаги	Литическая активность (титр) 2012		Литическая активность (титр) 2016	
		по методу Аппельмана (степень разведения)	по методу Грациа (количество корпускул в 1 мл)	по методу Аппельмана (степень разведения)	по методу Грациа (количество корпускул в 1 мл)
	<i>FBc – 4</i> УГСХА	$10^{-7}$	$(2,4 \pm 0,2) \times 10^8$	$10^{-3}$	$(1,3 \pm 0,3) \times 10^4$
	<i>FBc – 13</i> УГСХА	$10^{-8}$	$(1,8 \pm 0,2) \times 10^9$	$10^{-4}$	$(2,1 \pm 0,4) \times 10^5$

Определение литической активности фага по методу Аппельмана: в ряд пробирок одинакового диаметра наливаем по 4,5 мл бульона. В первую пробирку вносим 0,5 мл исследуемого фага. Затем делаем последовательные разведения, перенося отдельными пипетками из пробирки в пробирку по 0,5 мл бактериофага. Использовали 10 пробирок. Из последней пробирки 0,5 мл выливаем в дезинфицирующий раствор, затем во все пробирки вносим по 0,2 мл 18-часовой индикаторной культуры. 11 и 12 пробирки являются контрольными, в первой из них находится МПБ и культура (без фага), во второй - один МПБ (контроль на стерильность). Все 12 пробирок помещали в термостат при 37° С на 18 часов. Титр фага устанавливали по последней, прозрачной пробирке ряда и выражали разведением фага.

Определение литической активности по Грациа. Для проведения опыта готовили разведения испытуемых фагов в стерильном мясопептонном бульоне ( $10^{-1}$  –  $10^{-10}$ ). В пробирку с 2,5 мл расплавленного и остуженного до 45 – 47 °С 0,7 % мясопептонного агара вносили 1,0 мл фага в разведении от  $10^{-6}$  до  $10^{-10}$ , добавляли 0,2 мл индикаторной 18-часовой культуры *B. cereus*, содержимое пробирки быстро перемешивали вращением в ладонях и выливали на поверхность 1,5 % мясопептонного агара в чашки. Смесь осторожно распределяли по поверхности среды. После застывания агара чашки переворачивали и ставили в термостат при температуре 37 °С на 12 – 18 часов. Для определения титра фага подсчитывали число негативных колоний и умножали на степень разведения.

Согласно данным таблицы 1, литическая активность исследуемых фагов в 2012 году составила от  $10^{-7}$  до  $10^{-8}$  по методу Аппельмана и от

$(2,4 \pm 0,2) \times 10^8$  до  $(1,8 \pm 0,2) \times 10^9$  БОЕ/мл по методу Грация; в 2016 году литическая активность фагов, хранившихся без консервантов, составила по Аппельману - от  $10^{-3}$  до  $10^{-4}$  и от  $(1,3 \pm 0,3) \times 10^4$  до  $(2,1 \pm 0,4) \times 10^5$  БОЕ/мл по методу Грация. При пассировании изучаемые фаги повысили показатель на два порядка.

Установлено, что при хранении в течение четырех лет при температуре 2-4 °С фаги *Bacillus cereus* снижают литическую активность на четыре порядка, которую возможно впоследствии повысить методом пассирования на индикаторной культуре (соотношение - 0,5 мл культуры: 0,2 мл фага) в 4,5 мл МПБ (время пассажа – 16-18 часов).

#### Библиографический список

1. Васильев, Д.А. Идентификация бактерий *Bacillus cereus* на основе их фенотипической характеристики / Д.А. Васильев, А.И. Калдыркаев, Н.А. Феоктистова, А.В. Алешкин. - Ульяновск, 2013. – С. 21-22.
2. Феоктистова, Н.А. Результаты сравнительного анализа бактериологических методов исследований какао-порошка на наличие бацилл, вызывающих порчу продуктов питания / Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2015. - № 1 (29). - С. 69-76.
3. Макеев, В.А. Изучение чувствительности бактерий рода *Bacillus* к различным концентрациям хлорида натрия / В.А. Макеев, М.А. Юдина, Н.А. Феоктистова [и др.] // 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. 2011. С. 185-187.
4. 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. (315 с.)
5. 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 сельскохозяйственной академии. - 2015. - № 3 (31). - С. 69-76.
6. Феоктистова, Н.А. Выделение бактерий вида *Bacillus mesentericus* из объектов санитарного надзора / Н.А. Феоктистова Н.А., М.А. Юдина, Д.А. Васильев [и др.] // В Молодежь и наука XXI века: материалы III-й Международной научно-практической конференции молодых ученых. - Ульяновск, 2010. - С. 82-84.

7. 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.
8. 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.
9. Феоктистова, Н.А. Методы идентификации *Bacillus coagulans*, включая фенотипическую / Феоктистова Н.А., Васильев Д.А., Золотухин С.Н. [и др.] // Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности: материалы Третьей научно-практической конференции с международным участием. – Москва: Медицинское маркетинговое агентство. - С. 89-90.
10. Юдина, М.А. Диагностика картофельной болезни хлеба, вызываемой бактериями видов *Bacillus subtilis* и *Bacillus mesentericus* / М.А. Юдина, Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2011. - № 3. - С. 61-67.
11. Золотухин, С.Н. Штаммы бактериофагов малоизученных патогенных энтеробактерий и их практическое применение / С.Н. Золотухин, Д.А. Васильев, Н.А. Феоктистова [и др.] // Научные разработки и научно-консультационные услуги Ульяновской ГСХА: Информационно-справочный указатель. – Ульяновск, 2006. – С.45-49.

## STUDYING OF LYTIC ACTIVITY OF PHAGES OF *BACILLUS CEREUS* AT STORAGE

*Kaldyrkayev A. I., Golyakevich Z. S., Grankina A. S., Vasilyev D. A.*

**Keywords:** *bacteriophage, Bacillus cereus, lytic activity, parameters, storage*

*In article results of researches on definition of lytic activity of phages of Bacillus cereus at storage within four years at a temperature of 2-4 of 0C are described. It is established that a phage of Bacillus cereus reduce lytic activity on four orders which is possible for raising by a browning method on indicator culture subsequently.*