

БАКТЕРИОФАГИ *VACILLUS COAGULANS*: СПОСОБ ВЫДЕЛЕНИЯ И ПАРАМЕТРЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Белова Ксения Вячеславна, аспирант кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

Феоктистова Наталья Александровна, кандидат биологических наук, доцент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

Васильев Дмитрий Аркадьевич, доктор биологических наук, профессор кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

ФГБОУ ВО Ульяновская ГСХА

432017, г. Ульяновск, б. Новый Венец, 1; 8(8422)55-95-47

e-mail: feokna@yandex.ru

Ключевые слова: бактериофаг, *Vacillus coagulans*, метод, способ, параметры, культивирование

В статье описаны результаты исследований по выделению бактериофагов, специфичных *Vacillus coagulans*, и подбору оптимальных параметров их культивирования. Было выделено 7 бактериофагов *V. coagulans* из объектов окружающей среды. Метод индукции показал отрицательные результаты эксперимента – профаг у бактерий *V. coagulans* 566, *V. coagulans* 10473, *V. coagulans* 10468 не был выявлен. Установлено, что оптимальное соотношение фага и культуры - 1:1. Время пассажа – 7 часов инкубирования при температуре 35 ± 2 °C. Для очистки фагов от бактериальных клеток рекомендовано применение фильтров фирмы Millipore с диаметром 0,1 μm GV. Полученные результаты свидетельствуют, что выделенные и селекционированные бактериофаги строго специфичны в пределах вида *V. coagulans* и могут входить в состав биопрепарата для его индикации и идентификации.

Введение

По литературным данным, плоско-кислую порчу вызывают термоустойчивые бактерии *Vacillus coagulans*, иногда в ассоциации с мезофильными и термофильными микроорганизмами *V. cereus*, *V. subtilis*. Однако термическое воздействие и низкий водородный показатель во время варки приводит к значительному снижению уровня бактериальной обсемененности томатной заливки. Плоско-кислая порча характеризуется прокисанием продукта без внешних изменений банки. Прокисший продукт мо-

жет быть слегка разжижен, иногда в дальнейшем может произойти его расслоение, и масса продукта становится крупитчатой. Стенотермные термофильные бациллы могут развиваться в консервированных продуктах, активная кислотность которых 5,2 и выше. Обычно это происходит при количестве МАФАНМ консервов 10^7 - 10^8 клеток в 1 г продукта. Изменение активной кислотности продукта является одним из основных показателей, по которому судят о развитии в консервах термофилов. Развитие стено-термных термофилов протекает в консервах

тем интенсивнее, чем выше величина рН продукта. Иногда внешние изменения выражены слабо, но консервы могут содержать токсины [1, 2].

Вышеуказанная проблема может быть решена, если в технологический процесс изготовления консервов вводить бактериофаги в различных методах (обработка сырья, тары и т.п.). Также на этапе выходного (приемочного) контроля возникает проблема индикации и идентификации *B. coagulans*. С этой целью можно использовать специфичные бактериофаги, позволяющие достоверно идентифицировать пищевые контаминанты и проводить их дифференциацию на биотипы и фаговары внутри вида.

Патентный поиск и анализ литературных данных свидетельствует, что в настоящий момент в Российской Федерации не разработаны методики по фагоиндикации и фагоидентификации *B. coagulans*.

Цель - выделить новые бактериофаги, специфичные бактериям *Bacillus coagulans*.

Для решения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- провести эксперименты по выделению бактериофагов методом индукции на штаммах *B. coagulans*;
- провести эксперименты по выделению бактериофагов *B. coagulans* из объектов окружающей среды;
- подобрать оптимальные параметры культивирования выделенных бактериофагов;
- определить специфичность выделенных бактериофагов в пределах вида.

Объекты и методы исследований

Штамм *B. coagulans* 566, *B. coagulans* 10473, *B. coagulans* 10468; вакцинные штаммы *B. anthracis*-СТИ и *B. anthracis* 55-ВНИ-ИВВиМ, авирулентные штаммы *B. anthracis* – Шуя-15 и *B. anthracis* 34 F₂, 12 штаммов бактерии *B. mycoides*, 52 штамма бактерий *B. cereus* и *B. thuringiensis*, *B. subtilis* – 6 штаммов, *B. mesentericus (pumilus)* – 8 штаммов, *B. megaterium* – 2 штамма, полученные из музея НИИЦМиБ ФГБОУ ВО Ульяновская ГСХА.

Выделение бактериофагов и подбор оптимальных параметров их культивирования проводили с использованием методик, апробированных сотрудниками кафедры

микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ ФГБОУ ВО Ульяновская ГСХА [3, 4]. В исследованиях применяли питательный бульон для культивирования микроорганизмов сухой ((ГРМ-бульон), г. Оболенск Московская область Серпуховской район), трихлорметан стабилизированный 0,6-1 % этанола (хлороформ) ч.д.а. ТУ 2631-066-44493179-01.

Контроль специфической активности бактериофагов проводили с помощью специально подобранных наборов контрольных штаммов. Концентрацию микробных клеток определяли с помощью оптического стандарта мутности (ОСО 42-28-85 на 10 ед. производства ГИСК им. Л.А. Тарасевича).

Результаты исследований

В первой серии опытов на культуры *B. coagulans* 566, *B. coagulans* 10473, *B. coagulans* 10468, исследуемые как «лизогенные», мы воздействовали индуцирующим фактором (применялось воздействие на бактерии ультрафиолетовых лучей).

По литературным данным, при обработке лизогенных культур индуцирующими факторами продукция фага в значительной степени возрастает, потому с помощью этого метода удается выявить фаг в значительно большем проценте случаев, чем при изучении только спонтанной его продукции [5].

В качестве источника ультрафиолетовых лучей применялась бактерицидная лампа, 80 % энергии которой приходится на длину волны 2537 Å. Исследуемые культуры (*B. coagulans* 566, *B. coagulans* 10473, *B. coagulans* 10468) находились в экспоненциальной фазе роста, разводились в соотношении 1:100 в фосфатном буфере с рН 7,6. 2 мл взвеси помещали в чашку Петри и облучали в течение 20 (25, 30, 35, 40) секунд на расстоянии 40 (45, 50, 55, 60) см. Облученные культуры засеивались на мясо-пептонный бульон (МПБ) комнатной температуры (20-22 °С) в соотношении 1:100.

Все процедуры производились в затемненном помещении с учетом предохранения облученных бактерий от фотореактивации. Все посеы инкубировали при 37 °С 5 часов, после чего делали высев методом агаровых слоев.

Характеристика объектов исследований для выделения фагов

№\№	Название бактериофага	Индикаторная культура	Наименование объекта выделения	Местонахождение объекта выделения
1	В.с. - 1 УГСХА	<i>B. coagulans</i> 10473	почва	Астраханская область (Икрянинский район р.п. Красные Баррикады)
2	В.с. - 2 УГСХА	<i>B. coagulans</i> 566		Оренбургская область (Первомайский район с. Мирошкино)
3	В.с. - 3 УГСХА	<i>B. coagulans</i> 566		Самарская область (Елховский район с. Березовка)
4	В.с. - 4 УГСХА	<i>B. coagulans</i> 10473		Самарская область (Елховский район с. Березовка)
5	В.с. - 5 УГСХА	<i>B. coagulans</i> 10473		Оренбургская область (Первомайский район с. Мирошкино)
6	В.с. - 6 УГСХА	<i>B. coagulans</i> 566		Ульяновская область (Ульяновский район р.п. Ишеевка)
7	В.с. - 7 УГСХА	<i>B. coagulans</i> 10473		Ульяновская область (Ульяновский район р.п. Ишеевка)

Хотя лизогения широко распространена среди всех систематических групп микроорганизмов, нам не удалось выявить профагу у исследуемых культур *B. coagulans*. Не исключено, что явление лизогении является одним из механизмов защиты бактериальной клетки от фаговой инфекции, выработанным клеткой в процессе длительной эволюции. Лизогенизация в известной степени биологически выгодна как клетке, так и фагу. Клетка при лизогенизации становится устойчивой не только к данному фагу, но и к родственным ему фагам и, кроме того, приобретает дополнительные свойства.

Дальнейшие исследования были посвящены выделению бактериофагов из объектов внешней среды. Для проведения исследований мы брали пробы почвы различных территорий Ульяновской, Самарской, Астраханской и Оренбургской областей (дачные участки, огороды). Всего было использовано 39 проб. Первоначально готовили разведения почвы в мясо-пептонном бульоне в соотношении 1:10, добавляли в концентрации 10^4 КОЕ /мл по 1,0 мл штаммов бактерий *B. coagulans* 566 *B. coagulans* 10473, *B. coagulans* 10468. Колбы с пробами почв ставили в термостат на 24 часа при температуре 37 °С. Затем пробы фильтровали через ватно-марлевый фильтр для

освобождения от механических примесей. После этого содержимое колбы разливали в стерильные пробирки, центрифугировали при 3000 об./мин в течение 30 минут, далее прогревали в водяной бане при 60 °С в течение 45 минут с целью подавления роста грамотрицательных бактерий.

Исследуемые фильтраты исследовали на наличие фага методом нанесения «дорожки» на газон культуры, который был предварительно нанесен на мясо-пептонный агар (МПА) в чашках Петри и «подсушен» в термостате в течение 35-40 минут. В качестве контроля на газон культуры наносили стерильный МПБ с целью получения достоверного результата по выявлению присутствия фага в исследуемом субстрате. Посевы инкубировали в условиях термостата в течение 18 часов при температуре 35 ± 2 °С. Положительным результатом эксперимента было наличие на газоне культуры зоны лизиса в виде «дорожки» (рисунок 1-3).

В результате проведенных исследований нами были выделены 7 бактериофагов, специфичных для штаммов *B. coagulans*. Результаты исследований представлены в табл. 1.

Дальнейшая работа была посвящена подбору параметров культивирования бактериофагов.

Индикаторные культуры *B. coagulans*

хранились на полужидком МПА (рН 7,2-7,4) с содержанием 0,3 % бактериологического агара при температуре 2-4 °С, которые пересеивались каждые 4 месяца. Для пассирования бактериофагов использовали коммерческий МПБ (питательный бульон для культивирования микроорганизмов сухой (ГРМ-бульон), г. Оболенск Московская область Серпуховской район). Температурным оптимумом для культивирования бактериофагов с индикаторными культурами была температура 35±2 °С.

Селекцию бактериофагов проводили десятикратным пассированием изолированных негативных колоний на МПА с перевиванием на МПБ (Золотухин, 2007). Негативную колонию фага отвивали в пробирку с МПБ, туда же добавляли индикаторную культуру. Ход работы: в две пробирки с 4,5 мл МПБ (рН 7,4 – 7,6) вносили стерильной пипеткой 0,2 мл 18 – часовой индикаторной культуры *B. coagulans*. В первую пробирку отвивали негативную колонию, вторая пробирка - контроль. Засеянные пробирки помещали в термостат и инкубировали их при 35±2 °С до образования в контрольной пробирке пленки на поверхности среды. Экспериментально установлено, что это 7 часов инкубирования. Опытная пробирка должна была визуально отличаться от контроля – не иметь пленки на поверхности среды.

Эмпирическим методом было определено оптимальное соотношение бактериофага и индикаторного штамма – применяли следующие варианты 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 и 1:5. Установлено, что это соотношение 1:1, т.е. 0,2 мл фага на 0,2 мл индикаторной культуры.

По литературным данным, способами очистки фагов от бактериальных клеток являются обработка хлороформом (трихлорметаном), прогревание и фильтрация с применением мембранных фильтров.

Были проведены исследования по определению устойчивости к высоким температурам (в диапазоне 57-90 °С в течение 30 минут). Далее производили посев прогретых фагов на МПА методом «дорожки». Культивировали посе­вы в условиях термостата в течение 18 часов при температуре 35±2 °С. Наличие зоны лизиса

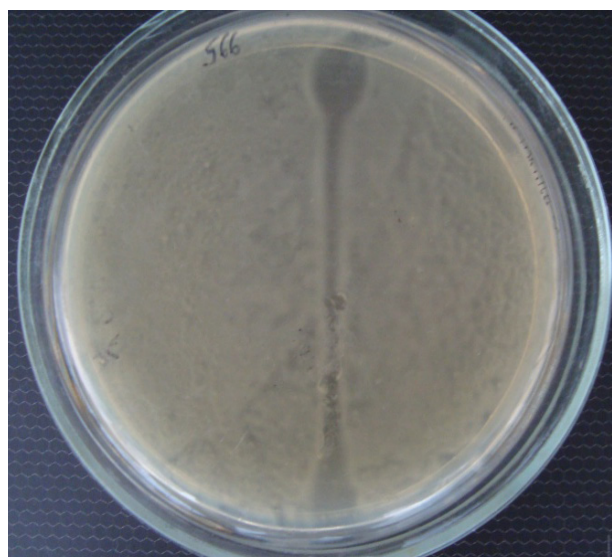


Рис. 1 – Выявление бактериофага В.с. - 6 УГСХА на газоне культуры *B. coagulans* 566

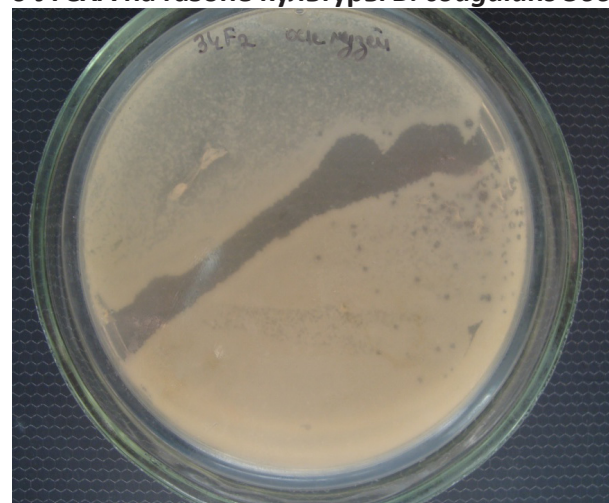


Рис. 2 – Выявление бактериофага В.с. - 5 УГСХА на газоне культуры *B. coagulans* 10473

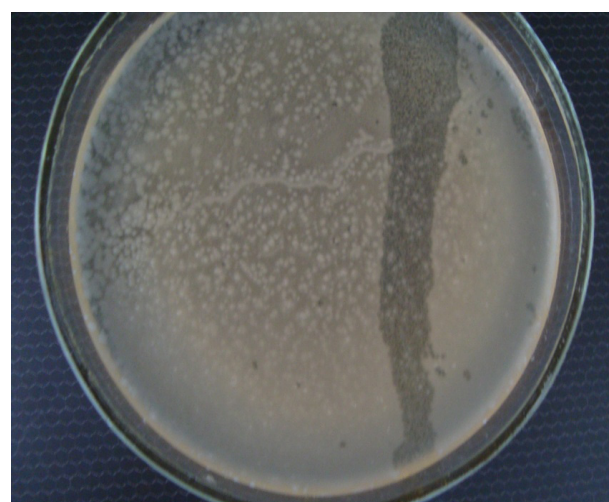


Рис. 3 – Выявление бактериофага В.с. - 1 УГСХА на газоне культуры *B. coagulans* 10473

Таблица 2

Устойчивость селекционированных фагов и индикаторных культур *B. coagulans* к воздействию температур в диапазоне 57-90 °С в течение 30 минут

Название исследуемого агента	Показатель температуры, °С											
	57	60	63	66	69	72	75	78	81	84	87	90
Бактериальная культура												
<i>B. coagulans</i> 10473	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>B. coagulans</i> 566	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Бактериофаги												
В.с. - 1 УГСХА	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
В.с. - 2 УГСХА	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
В.с. - 3 УГСХА	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
В.с. - 4 УГСХА	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
В.с. - 5 УГСХА	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
В.с. - 6 УГСХА	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
В.с. - 7 УГСХА	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Таблица 3

Устойчивость селекционированных фагов селекционированных фагов и индикаторных культур *B. coagulans* к воздействию хлороформа

Название исследуемого агента	Временной интервал воздействия хлороформа на бактериофаг, минут						
	5	10	15	20	25	30	35
Бактериальная культура							
<i>B. coagulans</i> 10473	+	-	-	-	-	-	-
<i>B. coagulans</i> 566	+	-	-	-	-	-	-
Бактериофаги							
В.с. - 1 УГСХА	-	-	-	-	-	-	-
В.с. - 2 УГСХА	-	-	-	-	-	-	-
В.с. - 3 УГСХА	+	+	+	-	-	-	-
В.с. - 4 УГСХА	+	+	+	-	-	-	-
В.с. - 5 УГСХА	+	+	+	-	-	-	-
В.с. - 6 УГСХА	+	+	+	-	-	-	-
В.с. - 7 УГСХА	+	+	+	-	-	-	-

в виде «дорожки» свидетельствует об устойчивости фагов к воздействию температуры. Результаты исследований представлены в табл. 2.

Нами установлено, что бактериальные культуры, применяемые при культивировании бактериофагов *B. coagulans* в качестве индикаторных, также выдерживают воздействие высоких температур до 90 °С, как и селекционированные авторами бактериофаги (таблица 2). Поэтому данный метод не может быть применен для очистки фагов от бактериальной культуры.

Изучение устойчивости селекционированных фагов к воздействию хлороформа про-

водили следующим образом: соотношение фага и хлороформа 10:1, время воздействия 5-35 минут с 5-минутным интервалом при постоянном встряхивании пробирок и отстаивании в течение 1/5 временного интервала воздействия. Затем при помощи пипетки проводили отбор надосадочной жидкости и высевали обработанный бактериофаг на МПА методом «дорожки». Культивировали посевы в условиях термостата в течение 18 часов при температуре 35±2 °С. Наличие зоны лизиса в виде «дорожки» свидетельствует об устойчивости фагов к воздействию хлороформа. Результаты исследований представлены в таблице 3.

В экспериментах также определено, что вегетативные формы индикаторных культур *B. coagulans* не выдерживают воздействия хлороформа при временной экспозиции 10-35 минут. Установлено, что фаги В.с. - 1 УГСХА и В.с. - 2 УГСХА не устойчивы к воздействию хлороформа. Фаги В.с. - 3 УГСХА, В.с. - 4 УГСХА, В.с. - 5 УГСХА, В.с. - 6 УГСХА устойчивы к воздействию хлороформа в течение 15 минут. Соответственно, этот метод может применяться для очистки бактериофагов. Однако длительное время, затрачиваемое на обработку фага, заставляет продолжить поиск оптимального способа очистки бактериофагов от индикаторной культуры.

Далее очистку фагов *B. coagulans* от бактериальных клеток осуществляли также методом фильтрации с использованием мембранных фильтров фирмы Millipore (filter type: 0,1 и 0,22 μm GV). Проводили пассаж по методике Золотухина [6]. Установлено, что предпочтительнее применять фильтры с диаметром 0,1 μm GV, чем с 0,22 μm GV. Полученные данные позволяют утверждать, что ранее полученные авторским коллективом бактериофаги рода *Bacillus* были более крупного размера [7-9].

Важнейшей характеристикой бактериофагов, составляющих биопрепарат для индикации и идентификации бактерий *B. coagulans*, является его специфичность в пределах вида. Изучение специфичности выделенного бактериофага *B. coagulans* мы проводили на культурах гомологичного рода: *B. mycooides* – 12 штаммов, *B. cereus* – 50 штаммов, *B. thuringiensis* – 2 штамма, *B. subtilis* – 6 штаммов, *B. mesentericus (pumilus)* – 8 штаммов, *B. megaterium* – 2 штамма, *B. anthracis* – 4 штамма. Наиболее важной, по мнению авторов, характеристикой выделенных и селекционированных бактериофагов была специфичность по отношению к штаммам *B. coagulans* и отсутствие способности лизировать культуры *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. mesentericus (pumilus)*, которые в ассоциации друг с другом вызывают плоско-кислую порчу консервов [10,13].

Исследования проводили методом нанесения исследуемого фага на газоны выше-названных бактериальных культур методом «дорожки». Экспериментальным путем нами

установлено, что на чашках Петри, засеянных культурами *B. subtilis*, *B. mycooides*, *B. megaterium*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mesentericus (pumilus)*, *B. anthracis*, зон лизиса, при нанесении выделенных и селекционированных нами бактериофагов на газон выше-названных культур, при визуальном осмотре обнаружено не было.

Выводы

В результате проведенных исследований было выделено 7 бактериофагов *Bacillus coagulans* из объектов окружающей среды. Метод индукции показал отрицательные результаты эксперимента – профаг у бактерий *B. coagulans* 566 *B. coagulans* 10473, *B. coagulans* 10468 не был выявлен. Полученные результаты не расходятся с данными исследователей, занимавшихся выделением бактериофагов рода *Bacillus*, утверждающих, что наиболее перспективным является методика выделения бактериофагов из объектов окружающей среды [11-12].

Селекцию бактериофагов проводили десятикратным пассированием изолированных негативных колоний на МПА с перевиванием на МПБ (питательный бульон для культивирования микроорганизмов сухой (ГРМ-бульон), г. Оболенск Московская область Серпуховской район). Оптимальное соотношение - 1:1, т.е. 0,2 мл фага на 0,2 мл индикаторной культуры. Время пассажа – 7 часов инкубирования при температуре 35 ± 2 °С. Для очистки фагов от бактериальных клеток применяли три метода: обработка хлороформом (трихлорметаном), прогревание и фильтрация с применением мембранных фильтров. Установлено, выделенные и селекционированные авторами бактериофаги устойчивы к воздействию температуры в диапазоне 57-90°С в течение 30 минут, поэтому данный способ невозможно применять для очистки фагов. Фаги *B. coagulans* показали различную чувствительность к воздействию хлороформа: В.с. - 1 УГСХА и В.с. - 2 УГСХА не устойчивы к его воздействию, остальные фаги устойчивы в течение 15 минут. Но применять данный способ очистки не совсем целесообразно, так как он длителен и материалоемок. Эмпирическим путем установлено, что применение фильтров фирмы Millipore с диаме-

тром 0,1 мкм GV наиболее предпочтительно. Полученные результаты свидетельствуют, что изучаемые бактериофаги строго специфичны в пределах вида *B. coagulans* и в перспективе могут входить в состав биопрепарата для его индикации и идентификации.

Научные исследования проводятся при финансовой поддержке государства в лице Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере (программа «УМНИК»).

Библиографический список

1. Юдина, М.А. Перспективы применения бациллярных бактериофагов / М.А. Юдина, Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев // Научно-техническое творчество молодежи – путь к обществу, основанному на знаниях. Материалы III Международной научно-практической конференции. - Москва, 2011. - С. 449-451.

2. Бактериофаги рода *Bacillus*: монография / Д.А. Васильев, Н.А. Феоктистова, С.Н. Золотухин, А.В. Алешкин. – Ульяновск: УГСХА им. П. А. Столыпина; НИИЦМиБ, 2013. – 80 с.

3. Методы выделения бактериофагов рода *Bacillus* / Н.А. Феоктистова, В.А. Макеев, М.А. Юдина, А.И. Калдыркаев // Вестник ветеринарии. - 2011.- № 4 (59). - С. 88-89.

4. Феоктистова, Н.А. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов бактерий *Bacillus subtilis* / Н.А. Феоктистова / Бактериофаги микроорганизмов значимых для животных, растений и человека. – Ульяновск; НИИЦМиБ, 2013. - С. 186-197.

5. Сравнительная эффективность методов выделения фагов *Bacillus megaterium* / Н.А. Романова, Н.А. Феоктистова, С.Н. Золотухин, Д.А. Васильев, А.В. Алешкин // Вестник ветеринарии. – 2013. - № 1 (64). – С. 26-27.

6. Золотухин, Сергей Николаевич. Создание и разработка схем применения диагностических биопрепаратов на основе выделенных и изученных бактериофагов энтеробактерий: автореф. дис. ... д-ра биологических наук: 03.00.23, 03.00.07 / С.Н.Золотухин. – Ульяновск, 2007. – 39с.

7. Характеристика биологических

свойств бактериофагов вида *Bacillus subtilis* / Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин, И.Н. Хайруллин, Н.А. Феоктистова, А.И. Калдыркаев, М.А. Юдина, А.Х. Мустафин // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2011. - № 1. - С. 79-83.

8. Юдина, М.А. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов бактерий вида *Bacillus mesentericus* / М.А. Юдина, Н.А. Феоктистова // Бактериофаги микроорганизмов значимых для животных, растений и человека. - Ульяновск, 2013. - С. 197-211.

9. 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.

10. Биоиндикация содержания бактерий *Bacillus megaterium* в молоке и молочных продуктах / Н.А. Петрукова, Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев, М.А. Лыдина// Экология родного края: проблемы и пути их решения. Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. - Киров, 2014. - С. 375-377.

11. Изучение бактерицидного и бактериостатического действия теотропина на микроорганизмы различной морфологической структуры / Д.А. Васильев, И.Н. Хайруллин, С.Н. Золотухин, Н.А. Феоктистова, Н.Х. Курьянова// Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2011. - № 1 – С. 75-78.

12. Биоиндикация бактерий *Bacillus thuringiensis* в объектах санитарного надзора / Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин, Н.А. Феоктистова, М.А. Лыдина, А.И. Калдыркаев, В.А. Макеев, И.Г. Швиденко// Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2013. - № 3 (23). - С. 52-56.

13. Биологические свойства сибиреязвенного бактериофага / Н.А. Феоктистова, Е.И. Климушкин, Д.А. Васильев, К.В. Белова // Вестник ветеринарии.- 2015.- №3 (74). -С. 46-49.