

УДК 602.3:579.6

ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ФАГОВОГО БИОПРЕПАРАТА *VACILLUS PUMILUS**

*И.М. Абдурахманов, магистрант,
(8422) 55-95-47, abdrahmanov.ilnur@yandex.ru*
С.В. Аннюк, аспирант, Тел.8(8422) 55-95-47, sv.annyuk@gmail.com
*Д.А. Васильев, доктор биологических наук, профессор
8(8422)55-95-47, dav_ul@mail.ru*
ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ

Ключевые слова: *Vacillus pumilus*, бактериофаги, биопрепарат, идентификация, метод, пробы.

В статье описаны результаты исследований экспериментального биопрепарата «FitoPhagin» для ускоренной идентификации бактерии *Vacillus pumilus* по показателям лизиса культур на плотной питательной среде («метод стекающей капли»).

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

Введение. По литературным данным бактерии *Vacillus pumilus* относятся к представителям первой морфологической группы по Gordon (1973). Эти спорообразующие микроорганизмы являются возбудителями бактериозов льна, тыквы, кукурузы, свеклы, плодов апельсина, абрикоса, кабачков, клубней картофеля, семенников капусты, коробочек хлопчатника и т.п. [1-3]. В настоящее время для идентификации возбудителей бактериозов применяют классические бактериологические схемы исследования, которые чрезвычайно материалоемкие и трудозатратны. Применение молекулярно-генетических методов исследований не всегда возможно из-за отсутствия коммерческих тест-систем и соответствующего оборудования в некоторых лабораториях.

Коллективы исследователей в настоящий момент предлагают для индикации и идентификации микроорганизмов применять специфические бактериофаги, которые позволяют достоверно идентифицировать контаминанты и проводить их дифференциацию на биотипы и фаговары внутри вида. Данные методики довольно просты в применении и не требуют дополнительных финансовых затрат на закупку сложного оборудования и расходных материалов. Специфичность дей-

ствия бактериофагов, входящих в состав биопрепаратов для фагоидентификации и фагоиндикации, многократно проверяется и не вызывает сомнения [4-10].

Цель работы – разработать ускоренный метод идентификации бактерии *Bacillus pumilus* по показателям лизиса культур на плотной питательной среде («метод стекающей капли»), используя строгую специфичность созданного нами ранее фагового биопрепарата.

Материалы и методы исследований. Подготовку и посев пищевых продуктов растительного происхождения (использовали клубни картофеля, семенники капусты, плоды тыквы и кабачка, початки кукурузы, плоды абрикоса, апельсина, на которых было выявлено признаков порчи), подлежащих исследованию, проводили в соответствии ГОСТ 26669 – 85 [11].

Пробы искусственно контаминировали бактериями *Bacillus pumilus* в концентрации 10^1 - 10^5 м.к./мл и помещали в термостат на 24 часа при $36 \pm 1^\circ\text{C}$. Затем нами был проведен комплекс исследований по изучению тинкториальных, культуральных и биохимических свойств изучаемых штаммов бактерий по схеме дифференциации бактерий рода *Bacillus*, относящихся к первой морфологической группе по R. Gordon (1973). Схематично алгоритм исследований отражен на рисунке 1. Нами были получены результаты, свидетельствующие, что штаммы бактерий, которые были использованы нами в эксперименте по искусственному заражению объектов исследований, относятся к виду *Bacillus pumilus*.

Параллельно бульонные культуры подвергали фагоидентификации методом «стекающая капля» с применением бактериофагов, входящих в состав экспериментального биопрепарата «*FitoPhagin*» P-1, P-2, P-3, P-4 серии УГСХА, которые были выделены и селекционированы нами ранее [9-10].

Результат мы считали положительным в том случае, если на месте нанесения фагов («стекающая капля») на газоне сплошного роста изучаемой культуры образовывалась прозрачная зона лизиса (допустимо наличие вторичного роста фагорезистентных штаммов). Отрицательным был результат, который проявлялся в отсутствии зоны лизиса на газоне культуры. При положительном результате изучаемую культуру мы относили к *Bacillus pumilus*, так как бактериофаги, используемые в эксперименте, были строго специфичны в пределах вида. Результаты отражены в таблицах 1-2.

Результаты и их обсуждение. Таким образом, фагоидентификация дала положительные результаты: из всех искусственно контаминированных бактериями *Bacillus pumilus* проб клубней картофеля, семенников капусты, плодов тыквы и кабачка, початков кукурузы, плодов

Таблица 1 – Результаты применения фагоидентификации бактерий *Bacillus pumilus* с применением бактериофагов Р-1 УГСХА, Р-2 УГСХА

Объекты	Результат воздействия фага Р-1 серии УГСХА			Результат воздействия фага Р-2 серии УГСХА		
	Проба 1	Проба 2	Проба 3	Проба 1	Проба 2	Проба 3
1 капуста	+	+	+	+	+	+
2 картофель	+	+	+	+	+	+
3 кукуруза	+	+	+	+	+	+
4 кабачки	+	+	+	+	+	+
5 апельсины	+	+	+	+	+	+
6 абрикосы	+	+	+	+	+	+
7 тыква	+	+	+	+	+	+

Таблица 2 - Результаты применения фагоидентификации бактерий *Bacillus pumilus* с применением бактериофагов Р-3 УГСХА, Р-4 УГСХА

Объекты	Результат воздействия фага Р-3 серии УГСХА			Результат воздействия фага Р-4 серии УГСХА		
	Проба 1	Проба 2	Проба 3	Проба 1	Проба 2	Проба 3
1 капуста	+	+	+	+	+	+
2 картофель	+	+	+	+	+	+
3 кукуруза	+	+	+	+	+	+
4 кабачки	+	+	+	+	+	+
5 апельсины	+	+	+	+	+	+
6 абрикосы	+	+	+	+	+	+
7 тыква	+	+	+	+	+	+

абрикоса, апельсина были выделены культуры, которые при взаимодействии с фагами *Bacillus pumilus* Р-1, Р-2, Р-3, Р-4 серии УГСХА были лизированы. Исследования по изучению некоторых биологических свойств изучаемых штаммов бактерий также не вызывает сомнения в их принадлежности к виду *Bacillus pumilus*.

В случае получения отрицательного результата фагоидентификации рекомендуется проведение исследований, направленных на изучение биохимических свойств выделенных микроорганизмов в максимально широком спектре (рисунок 1). Согласно литературным данным для бактерий рода *Bacillus* свойственен полиморфизм и многие биохимических тесты не дают четко положительного или четко отрицательного результата. Поэтому расширение методик типирования микро-

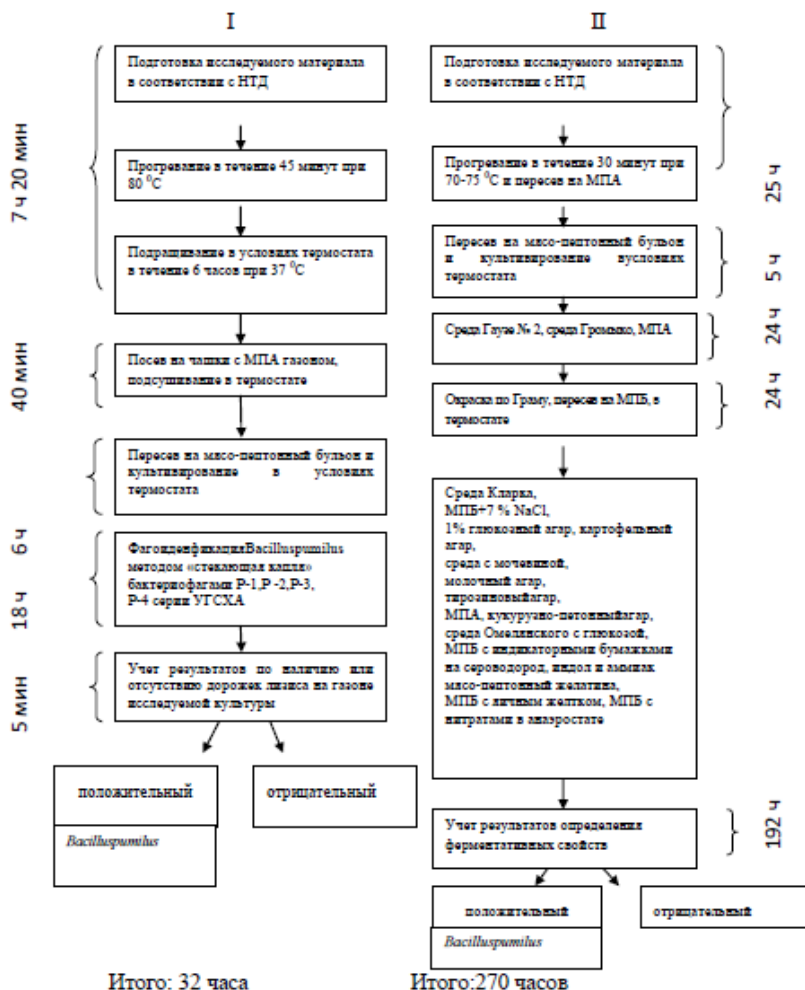


Рисунок 1 - Схема фагоидентификации бактерий *Bacillus pasteurii* в сравнении со схемой выделения и дифференциации бацилл первой морфологической группы (Gordon, 1973)

организмов, особенно относящихся к роду *Bacillus*, даст в перспективе исследователям возможность получить максимально достоверный результат в относительно короткие сроки.

На рисунке 1 схема фагоидентификации бактерий *Bacillus pumilus* представлена в сравнении с традиционной схемой выделения и дифференциации бацилл первой морфологической группы (Gordon, 1973). Экспериментально доказано, что время исследований в соответствии с предложенным нами методом применения экспериментального фагового биопрепарата сокращается примерно на 238 часов и значительно снижает затраты на исследования.

Выводы. Фагоидентификация бактерий *Bacillus pumilus* биопрепаратом «*FitoPhagin*», состоящим из фагов P-1, P-2, P-3, P-4 серии УГСХА, дала положительные результаты: из всех искусственно контаминированных бактериями *Bacillus pumilus* проб клубней картофеля, семенников капусты, плодов тыквы и кабачка, початков кукурузы, плодов абрикоса, апельсина были выделены культуры, лизированные вышеуказанными фагами.

Схема ускоренной идентификации занимает 32 часа по сравнению со схемой выделения и дифференциации бацилл первой морфологической группы по R. Gordon (1973), которая включает спектр исследований в течение примерно 270 часов. Перспективы применения фаговых биопрепаратов довольно широки, так как природа бактериофага позволяет применять их для деконтаминации пищевого сырья и готовых продуктов, тем самым повышая их сохраняемость в течение длительного времени без применения физических и химических методов, которые в настоящее время часто применяются переработчиками и производителями пищевого сырья и продуктов питания.

Библиографический список

1. Медведев, П.В. Оценка уровня зараженности зерна пшеницы различных природно-географических зон Оренбургской области возбудителями картофельной болезни хлеба / П.В. Медведев, А.С. Степанов, В.А. Федотов // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2010. – № 2 (108). – С. 114–118.
2. 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.
3. 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.
4. Феоктистова, Н.А. Выделение бактериофагов рода *Proteus* и подбор параметров культивирования / Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин

- // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2017. - № 2 (38). – С. 90-106.
5. Феоктистова, Н.А. Изучение биологических свойств бактериофагов рода *Proteus* / Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2017. - № 3 (39). – С. 99-105.
 6. Сульдина, Е.В. Выделение бактерий и бактериофагов *Yersinia enterocolitica* / Е.В. Сульдина, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2017. - № 3 (39). - С. 50-55.
 7. Васильев, Д.А. Молекулярно-генетическая характеристика штаммов протейных бактериофагов // Д.А. Васильев, Н.А. Феоктистова, Е.В. Сульдина, А.В. Мاستиленко // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2018. - № 1 (41). - С. 124-130.
 8. Сульдина, Е.В. Характеристика бактериофагов бактерий *Enterobacter* spp. для оценки возможностей их использования в составе терапевтического биопрепарат / Е.В. Сульдина, Д.А. Васильев, Н.А. Феоктистова, А.В. Мاستиленко // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2018. - № 1 (41). - С. 109-116.
 9. Абдурахманов, И.М. Результаты выделения бактериофагов *Bacillus pumilus* /И.М. Абдурахманов, Н.А. Феоктистова // Материалы V Всероссийской студенческой научной конференции «В мире научных открытий» (с международным участием), / - Ульяновск: УГСХА, 2016. Т. VI. Ч.1. - С. 21-23.
 10. Абдурахманов, И.М. Специфичность выделенных бактериофагов *Bacillus pumilus*/И.М. Абдурахманов, Ю.С. Карпова, Н.А. Феоктистова // Материалы V Всероссийской студенческой научной конференции «В мире научных открытий» (с международным участием), / - Ульяновск: УГСХА, 2016. Т. VI. Ч.1. - С. 15-17.
 11. ГОСТ 26669 – 85 «Продукты пищевые и вкусовые. Подготовка проб для микробиологических анализов(с Изменением N 1)»<http://docs.cntd.ru/document/1200022785> (дата обращения 25.01.2018 г.).

STUDY OF THE EFFECTIVENESS OF THE EXPERIMENTAL PHAGE BIOPESTICIDE BACILLUS PUMILUS

Abdurakhmanov I. M., Annyuk S. V., Vasilyev D. A.

Keywords: *Bacillus pumilus, bacteriophages, biological product, identification, method, samples.*

The article describes the results of experimental biological «FitoPhagin» product research for the accelerated identification of Bacillus pumilus bacterium according to the indicators of crop lysis in a dense nutrient medium («method of dripping drop»).