

УДК 602.3:579.6

БАКТЕРИОФАГИ *VACILLUS MEGATERIUM*: ВЫДЕЛЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ НЕКОТОРЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ*

Н.А. Феоктистова, кандидат биологических наук, доцент,

Тел.8(8422) 55-95-47, feokna@yandex.ru

Е.В. Сульдина, ассистент, Тел.8(8422) 55-95-47,

ekaterina-suldina@rambler.ru

А.В. Мастиленко, кандидат биологических наук, доцент,

Тел.8(8422) 55-95-47, mav0608@yandex.ru

Д.А. Васильев, доктор биологических наук, профессор,

Тел.8(8422) 55-95-47, dav_ul@mail.ru

К.В. Мартынова, аспирант, Тел.8(8422) 55-95-47

В.С. Маланина, аспирант, Тел.8(8422) 55-95-47, dav_ul@mail.ru

С.В. Аннюк, аспирант, Тел.8(8422) 55-95-47, sv.annyuk@gmail.com

ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ

Ключевые слова: *Vacillus megaterium*, бактериофаги, выделение, биологические свойства.

В статье представлены результаты исследований по выделению и изучению некоторых биологических свойств бактериофагов, специфичных для бактерий *Vacillus megaterium*. При исследовании 86 проб почвы Приволжского, Центрального и Южного федерального округов, нам удалось выделить 18 изолятов фагов бактерий *V. megaterium*, которые имели различные показатели титра в диапазоне от $2,3 \pm 0,7 \times 10^6$ до $6,2 \pm 0,8 \times 10^9$ БОЕ/мл по Грациа и от 10^{-5} до 10^{-9} по Аппельману. Опыты демонстрируют, что наиболее широким совокупным спектром литического действия по отношению к 8 изучаемым культурам обладают фаги *Vmeg-1* УГСХА и *Vmeg-16* УГСХА, совокупный процент лизиса составил 100 %.

***Исследования проводятся в соответствии с тематическим планом научно-исследовательских работ, выполняемых по заданию МСХ РФ в 2018 году.**

По литературным данным бактерии *V. megaterium* активно развиваются при различных температурах хранения, изменяя органолептические характеристики продукта. При размножении в диапазоне температур 28-37°C бациллярные факультативные анаэробы придают молоку и молочным продуктам специфический вяжущий вкус, запах порченных

фруктов, дрожжевой привкус, полынную и хинную горечь и изменяют цвет. Установлено, что в условиях холодильного хранения процессы порчи идут аналогично, но значительно медленнее. Доказано, что пастеризация не снижает уровень контаминации, а анаэробные условия и низкие температуры хранения задерживают, но не предотвращают развитие бактерий рода *Bacillus*, в том числе и *B. megaterium*. Своевременное качественное и количественное обнаружение этих микроорганизмов поможет предотвратить негативные процессы. Поэтому разработка методов детекции бактерий рода *Bacillus* в молоке и молочных продуктах является той практической задачей, которую необходимо решать в пищевой и перерабатывающей промышленности [1-3].

Цель исследований – выделение и изучение биологических свойств бактериофагов, специфичных к культурам *Bacillus megaterium* для конструирования высокоэффективного фагового биопрепарата для опосредованного биопроцессинга (обработки бактериофагами пищевого сырья и готовой продукции, способствующей увеличению сроков хранения).

Материалы и методы исследований. Штаммы бактерий *B. megaterium*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. subtilis*, *B. mesentericus (pumulus)*, *Bacillus mycoides*, *B. coagulans*. были получены из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ. Штаммы бактериофагов *Bacillus megaterium* – 18 изолятов бактериофагов были выделены из проб почвы Приволжского, Центрального и Южного федерального округов на этапе данной работы. Выделение и изучение биологических свойств бактериофагов проводили методами, отработанными коллективов исследователей кафедры микробиологии, вирусологи, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы [4-11].

Результаты исследований. Первый этап работы был связан с поиском профага в полученных из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ 8 штаммах бактерий *Bacillus megaterium*, т.е. они рассматривались нами как потенциально лизогенные. Для выхода профага применяют несколько методик, действие которых сводится к воздействию на бактериальную клетку каким-либо индуцирующим фактором или производят поиск бактериофага в бактериальной массе без воздействия на нее индуцирующего фактора [9-10]. В нашем случае индуцирующим фактором было воздействие на бактерии ультрафиолетовых лучей.

В качестве источника ультрафиолетовых лучей применялась бактерицидная лампа, 80 % энергии которой приходится на длину волны 2537 Å. Исследуемые культуры *Bacillus megaterium* находились в экспоненциальной фазе роста, разводились в соотношении 1:100 в фосфатном буфере с рН 7,6. 2 мл взвеси мы 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. Манипуляции производились нами в полузатемненном помещении с учетом предохранения облученных бактерий от фотореактивации. Все посева инкубировали при 37 °С 5 часов, после чего делали высев методом агаровых слоев. Проведенные нами эксперименты не позволили выявить естественной и искусственной лизогенности бактериальных культур *B. megaterium*. Установлено, что профагов, интегрированных с хромосомами микробных клеток 8 штаммов бактерий *B. megaterium*, выявлено не было.

Вторая серия экспериментов была посвящена выделению вирулентных бактериофагов *B. megaterium* из объектов внешней среды. Опираясь на ранние исследования, известно, что пробы почвы – это источник для эффективного выделения бактерий рода *Bacillus* и, соответственно, специфических им бактериофагов [4,8–11]. При исследовании 86 проб почвы Приволжского, Центрального и Южного федерального округов, нам удалось выделить 18 изолятов фагов бактерий *B. megaterium*. Селекция фагов осуществлялась десятикратным пассированием изолированных бляшкообразующих единиц на мясо-пептонном агаре с перевиванием на мясо-пептонный бульон. 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. Очистка фагов от бактериальных клеток проводилась через мембранные фильтры фирмы Millipore (filter type: 0,22 µm GV). Очищенные фаголизаты укупоривались в стерильные флаконы и хранились при температуре (2–4 °С) без применения консервирующих веществ.

Следующий этап работы был связан с изучением биологических свойств выделенных и селекционированных бактериофагов

Морфологию бляшкообразующих единиц изучали на МПА. Определено, что бляшкообразующие единицы, образуемые 18 изолятами фагов *B. megaterium*, прозрачные округлой формы, 2,0 – 13,0 мм в диаметре .

Важнейшей характеристикой фага, входящего в состав биопрепарата для индикации и идентификации бактерий, является его специфичность в пределах вида. Изучение специфичности 18 изолятов бактериофагов *B. megaterium* мы проводили на культурах гомологичного рода и одной морфологической группы: *B. cereus* – 105 штаммов, *B. thuringiensis* – 3 штамма, *B. subtilis* – 16 штаммов, *B. mesentericus (pumilus)* – 18 штаммов, *B. mycoides* – 12 штаммов, *B. coagulans* – 5 штаммов. В исследовании применяли метод «стекающая капля» по Отто и спот-тест [2,5]. Эксперимент, проведенный двумя способами дал однозначный результат – 18 выделенных и селекционированных авторами бактериофагов строго специфичны в пределах вида *B. megaterium*.

Литическую активность бактериофагов оценивали по их способности вызывать лизис бактериальной культуры на плотной питательной среде методом агаровых слоев и на мясо-пептонном бульоне по методу Аппельмана. Установлено, что 18 бактериофагов *B. megaterium* имеют различные показатели титра, которые находятся в диапазоне от $2,3 \pm 0,7 \times 10^6$ до $6,2 \pm 0,8 \times 10^9$ БОЕ/мл по Грациа и от 10^5 до 10^9 по Аппельману (табл.1). Наиболее высокими показателями отличались фаги Vmeg–1 УГСХА и Vmeg–16 УГСХА - $6,2 \pm 0,8 \times 10^9$ и $3,8 \pm 1,2 \times 10^9$ БОЕ/мл, соответственно по методу Грациа и 10^8 по Аппельману.

Для конструирования фагового биопрепарата чрезвычайно важен показатель - спектр литического действия в пределах вида. В исследованиях применяли метод «стекающая капля» по Отто и спот-тест [2,5]. Экспериментально определено, что изучаемые бактериофаги имеют различный диапазон действия по отношению к 8 изучаемым штаммам *B. megaterium*, от 25 до 87,5 % (табл.1). Определено, что наиболее широкий совокупный спектр литического действия по отношению к 8 изучаемым культурам *B. megaterium* имеют фаги Vmeg–1 УГСХА и Vmeg–16 УГСХА, которые в совокупности лизируют 100 % культур (табл. 1).

Проведенные нами исследования позволили выделить и селекционировать по некоторым биологическим свойствам бактериофаги, специфичные для *Bacillus megaterium*. В перспективе фаги Vmeg–1 УГСХА и Vmeg–16 УГСХА могут составить основу высокоэффективного фагового биопрепарата для опосредованного биопроектирования (обработки бактериофагами пищевого сырья и готовой продукции, способствующей увеличению сроков хранения).

Таблица 1 – Основные биологические свойства фагов *B. megaterium*

№	Бактериальная культура <i>B. megaterium</i> / название фага	Характеристика бляшкообразующих единиц	Спектр литического действия, %	Литическая активность, БОЕ/мл	Литическая активность по Аппельману
1.	<i>B.megaterium</i> 182/ <i>B meg-1</i> УФСХА	2,3±0,3	62,5	6,2±0,8x10 ⁹	10 ⁻⁸
2.	<i>B.megaterium</i> 1/ <i>B meg-2</i> УФСХА	1,9±0,2	37,5	2,3±0,7x10 ⁶	10 ⁻⁵
3.	<i>B.megaterium</i> 5/ <i>B meg-3</i> УФСХА	1,1±0,2	50,0	1,5±0,4x10 ⁹	10 ⁻⁸
4.	<i>B.megaterium</i> 7/ <i>B meg-4</i> УФСХА	1,5±0,1	50,0	7,8±0,2x10 ⁸	10 ⁻⁷
5.	<i>B.megaterium</i> 1/ <i>B meg-5</i> УФСХА	1,8±0,2	25,0	1,6±0,6x10 ⁷	10 ⁻⁶
6.	<i>B.megaterium</i> 2/ <i>B meg-6</i> УФСХА	0,9±0,2	50,0	2,2±0,4x10 ⁸	10 ⁻⁷
7.	<i>B.megaterium</i> 6/ <i>B meg-7</i> УФСХА	1,6±0,4	37,5	4,2±1,3x10 ⁷	10 ⁻⁶
8.	<i>B.megaterium</i> 2/ <i>B meg-8</i> УФСХА	1,7±0,2	25,0	1,8±0,2x10 ⁸	10 ⁻⁷
9.	<i>B.megaterium</i> 3/ <i>B meg-9</i> УФСХА	1,2±0,2	50,0	1,4±0,2x10 ⁸	10 ⁻⁷
10.	<i>B.megaterium</i> 7/ <i>B meg-10</i> УФСХА	0,7±0,3	37,5	1,2±0,8x10 ⁹	10 ⁻⁸
11.	<i>B.megaterium</i> 182/ <i>B meg-11</i> УФСХА	2,0±0,2	25,0	4,2±0,2x10 ⁸	10 ⁻⁷
12.	<i>B.megaterium</i> 1/ <i>B meg-12</i> УФСХА	0,9±0,4	50,0	3,5±0,5x10 ⁷	10 ⁻⁶
13.	<i>B.megaterium</i> 182/ <i>B meg-13</i> УФСХА	1,3±0,2	25,0	2,8±0,7x10 ⁶	10 ⁻⁵
14.	<i>B.megaterium</i> 4/ <i>B meg-14</i> УФСХА	0,8±0,3	37,5	1,0±0,3x10 ⁷	10 ⁻⁶
15.	<i>B.megaterium</i> 6/ <i>B meg-15</i> УФСХА	2,2±0,2	50,0	2,5±0,5x10 ⁸	10 ⁻⁷
16.	<i>B.megaterium</i> 182/ <i>B meg-16</i> УФСХА	1,4±0,1	87,5	3,8±1,2x10 ⁹	10 ⁻⁸
17.	<i>B.megaterium</i> 7/ <i>B meg-17</i> УФСХА	2,1±0,2	25,0	2,5±1,1x10 ⁸	10 ⁻⁸
18.	<i>B.megaterium</i> 2/ <i>B meg-18</i> УФСХА	1,7±0,1	50,0	1,4±0,4x10 ⁷	10 ⁻⁶

Библиографический список

1. Джей, Дж. М. Современная пищевая микробиология / Дж. М. Джей, М. Дж. Лёсснер, Д. А. Гольден. - М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2014. - 886 с.
2. Kutter, E. Bacteriophages: biology and applications / E. Kutter, A. Sulakvelidze. - Boca Raton, FL : CRC Press, 2005. - 510 p.
3. Bacteriophages. Methods and Protocols, Volume 3 / Martha R.J. Clokie, A. M. Kropinski, R. Lavigne. - Humana Press, 2018. – 311 p.
4. Романова, Н.А. Сравнительная эффективность методов выделения фагов *Bacillus megaterium* / Н.А. Романова, Н.А. Феоктистова, С.Н. Золотухин, Д.А. Васильев [и др.] // Вестник ветеринарии. – 2013. - № 1 (64). – С. 26-27.
5. Феоктистова, Н.А. Протейные бактериофаги: изучение некоторых биологических свойств / Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2017 - № 4(40). – С. 75-80.
6. 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.
7. Феоктистова, Н.А. Выделение и изучение биологических свойств бактериофагов рода *Proteus*, конструирование на их основе биопрепарата и разработка параметров практического применения: автореф. дис. ...канд. биол. наук: 03.00.07, 03.00.23 / Феоктистова Наталья Александровна. – Саратов, 2006. – С.8–10 (21с).
8. 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.
9. 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, НИИЦМиБ, 2013. - С. 186-197. (315 с.).
10. 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.)
11. Климушкин, Е.И. Выделение бактериофагов, специфичных к *Bacillus anthracis* / Е.И. Климушкин, Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев [и др.] // БиоКириков-2015: сборник материалов III Международного форума. [Электронный ресурс]. - 2015. - С. 10-12.

BACTERIOPHAGES OF BACILLUS MEGATERIUM: THE ISOLATION AND STUDY OF SOME BIOLOGICAL PROPERTIES

*Feoktistova N.A., Suldina E. V., Mastilenko A.V., Vasilyev D. A.,
Martynova K. V., Malanina V. S., Annyuk S. V.*

Keywords: *Bacillus megaterium, bacteriophages, isolation, biological properties.*

The article presents the results of research on the isolation and study of some biological properties of bacteriophages specific to bacteria Bacillus megaterium. In the study of 86 soil samples of the Volga, Central and southern Federal districts, we were able to identify 18 isolates of B. megaterium bacteria phages, which had different titer values in the range from $2.3 \pm 0,7 \times 10^6$ to $6.2 \pm 0,8 \times 10^9$ BOE/ml in Grazia and from 10^{-5} to 10^{-9} in Appelman. The experiments demonstrate that the Bmeg-1 UGSHA and Bmeg-16 UGSHA phages possess the widest total spectrum of lytic action in relation to 8 studied cultures, the total percentage of lysis was 100 %.