

УДК 602.3:579.62

БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БАКТЕРИОФАГОВ *BACILLUS COAGULANS*

*К.В. Мартынова, аспирант, тел. 8-904-195-25-31,
belova_ksenya@mail.ru;*

*Н.А. Феоктистова, кандидат биологических наук, доцент,
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
ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ*

Ключевые слова: *Bacillus coagulans*, биологические свойства, специфичность, морфология, температура, трихлорметан.

В статье представлены результаты изучения основных биологических свойств выделенных бактериофагов. В ходе проведенных исследований было выделено 13 бактериофагов и изучены их биологические свойства. Для конструирования биопрепарата нами был отобран один фаг Phagum B.c. 11 УГСХА, который характеризовался высоким титром литической активности.

Исследования проводятся в соответствии с тематическим планом научно-исследовательских работ, выполняемых по заданию МСХ РФ в 2019 году.

Введение. Бактерии *Bacillus coagulans* являются основными контаминантами растительного пищевого сырья и продуктов питания. Благодаря высокой устойчивости к физическим и химическим факторам они широко распространены в окружающей среде. Токсины, выделяемые бактериями данного вида, служат причиной возникновения пищевых отравлений, как людей, так и животных [1]. Благодаря изучению основных биологических свойств бактериофагов *Bacillus coagulans* появляется возможность для разработки биопрепарата на их основе, который можно будет использовать для деконтаминации пищевого сырья или готовых к употреблению продуктов питания [2].

Цель работы – изучение основных биологических свойств выделенных бактериофагов *Bacillus coagulans*.

Материалы и методы исследований. Объекты исследований – 45 проб объектов внешней среды (почва различных территорий, пищевое сырье и продукты питания растительного происхождения).

Штаммы *B. coagulans* 566, *B. coagulans* 732, *B. coagulans* 948, *B. coagulans* 2770, *B. coagulans* 3042, *B. coagulans* 4521, *B. coagulans* 6668, *B. coagulans* 10268, *B. coagulans* 10468, *B. coagulans* 10473; авирулентные штаммы *B. thuringiensis* – 2 штамма, *B. megaterium* – 2 штамма, *B. anthracis* – 4 штамма, *B. subtilis* – 6 штаммов, *B. mesentericus (pumilus)* – 8 штаммов, *B. mycooides* – 12 штаммов, *B. cereus* – 50 штаммов, полученные из музея НИИЦМиБ ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ; 20 штаммов бактерии *B. coagulans* выделенные из проб пищевого сырья и продуктов питания.

Выделение и изучение биологических свойств фагов проводили по методам И.П. Ревенко [3], Э. Каттера [4], С.Н. Золотухина [5]. Литическую активность определяли по методам Грация и Аппельману [6].

Результаты исследований. Первая серия опытов была посвящена выделению бактериофагов. Для проведения исследований мы брали 45 проб объектов внешней среды (почва различных территорий Ульяновской, Самарской, Астраханской и Оренбургской областей), пробы пищевого сырья и продуктов питания растительного происхождения (морковь, свекла, свежие томаты, томаты в собственном соку, томатная паста, кетчуп, растительные консервы с добавлением томатной пасты). Зона лизиса в виде «дорожки» свидетельствовала о присутствии фага в исследуемой пробе. В ходе проведенных исследований было выделено 13 бактериофагов (таб. 1).

Вторая серия опытов заключалась в селекции выделенных бактериофагов с помощью десятикратного пассирования изолированных негративных колоний на мясо-пептонном агаре с перевиванием на мясо-пептонный бульон [5] и метода смывов фагов с «дорожки» [7]. Классическим методом было селекционированно 5 бактериофагов, а методом с помощью смывов 8, при этом установлено, что в обоих случаях для появления пленки требовалось 6 часов инкубирования в условиях термостата при температуре $35 \pm 2^\circ\text{C}$.

Установлено, что оптимальное соотношение бактериофага и индикаторного штамма *B. coagulans* составляет 1:1, т.е. 0,2 мл бактериофага и 0,2 мл индикаторной культуры *B. coagulans*.

Третьим этапом наших исследований было изучение основных биологических свойств селекционированных бактериофагов *B. coagulans*.

Литическую активность выделенных и селекционированных бактериофагов *B. coagulans* изучали с помощью методов Аппельмана и Грация [6]. По Аппельману она составила от 10^{-7} до 10^{-10} ; по Грация от $6,0 \pm 0,1 \times 10^7$ до $4,0 \pm 0,1 \times 10^{10}$ (БОЕ/мл).

Для изучения спектра литической активности бактериофагов [4, 6] мы использовали 10 референс-штаммов и 20 полевых штаммов бакте-

Таблица 1 – Характеристика объектов исследований выделенных бактериофагов

№ п/п	Название бактериофага	Индикаторная культура	Наименование объекта выделения
1	Phagum B.c. 1 УГСХА	<i>B. coagulans</i> 10473	Проба № 1 – почва, Астраханская область (Икрянинский район р.п. Красные Баррикады)
2	Phagum B.c. 2 УГСХА	<i>B. coagulans</i> 566	Проба № 4 – почва, Оренбургская область (Первомайский район с. Мирошкино)
		<i>B. coagulans</i> 10473	
3	Phagum B.c. 3 УГСХА	<i>B. coagulans</i> 566	Проба № 5 – почва, Самарская область (Елховский район с. Березовка)
4	Phagum B.c. 4 УГСХА	<i>B. coagulans</i> 566	Проба № 6 – почва, Оренбургская область (Первомайский район с. Мирошкино)
5	Phagum B.c. 5 УГСХА	<i>B. coagulans</i> 10473	Проба № 7 – почва, Ульяновская область (Ульяновский район р.п. Ишеевка)
		<i>B. coagulans</i> 10468	
		<i>B. coagulans</i> 566	
6	Phagum B.c. 6 УГСХА	<i>B. coagulans</i> 566	Проба № 33 – Свекла из Старомайнского района
		<i>B. coagulans</i> 10468	
		<i>B. coagulans</i> 732	
		<i>B. coagulans</i> 948	
7	Phagum B.c. 7 УГСХА	<i>B. coagulans</i> 566	Проба № 34 – Морковь из Старомайнского района
		<i>B. coagulans</i> 10468	
		<i>B. coagulans</i> 732	
		<i>B. coagulans</i> 948	
8	Phagum B.c. 8 УГСХА	<i>B. coagulans</i> 566	Проба № 36 – почва возле кафедры микробиологии, Чердаклинский район
		<i>B. coagulans</i> 732	
		<i>B. coagulans</i> 10468	
		<i>B. coagulans</i> 732	
9	Phagum B.c. 9 УГСХА	<i>B. coagulans</i> 948	Проба № 38 – Томатная паста «Каждый день» (с признаками порчи)
		<i>B. coagulans</i> 10468	
		<i>B. coagulans</i> 10268	
		<i>B. coagulans</i> 2770	
11	Phagum B.c. 11 УГСХА	<i>B. coagulans</i> 10268	Проба № 43 – Свежий томат с признаками порчи
		<i>B. coagulans</i> 2770	
12	Phagum B.c. 12 УГСХА	<i>B. coagulans</i> 566	Проба № 44 – Свежий болгарский перец с признаками порчи
		<i>B. coagulans</i> 732	
13	Phagum B.c. 13 УГСХА	<i>B. coagulans</i> 732	Проба № 45 – Сок с мякотью. Мультиовощной со свеклой «Сады Придонья» (с признаками порчи)
		<i>B. coagulans</i> 10468	
		<i>B. coagulans</i> 10268	
		<i>B. coagulans</i> 10473	
		<i>B. coagulans</i> 4521	



Рисунок 1 – Морфология негативных колоний бактериофага Phagum B.c. 11 УГСХА

рий *B. coagulans*. В результате исследования все изучаемые фаги показали различные спектры литической активности. Минимальный процент лизируемых культур *B. coagulans* составил 13,4%, максимальный – 86,6%.

Так же нами было установлено, что исследуемые фаги не лизировали представителей других видов и родов бактерий, и являются строго специфичными по отношению к штаммам *B. coagulans* [3, 5].

Морфологию негативных колоний изучали согласно классификации И.П. Ревенко [3, 7]. Установлено, что выделенные бактериофаги формировали схожие негативные колонии округлой формы с прозрачными центрами, без вторичного роста и зонами неполного лизиса, диаметром 1-4 мм (рис. 1).

Применение высокой температуры является хорошим способом для инактивации фаголизатов от бактерий [8]. Экспериментально установлено, что селекционированные бактериофаги выдерживают воздействие высоких температур до 90°C, но применять данный метод в качестве очистки фагов от бактериальной культуры не следует, так как индикаторные бактериальные культуры так же выдерживают воздействие высоких температур до 90°C.

Ввиду того, что бактериофаги более устойчивы к воздействию трихлорметана (хлороформа), чем бактерии, то его можно использовать для инактивации фаголизатов от бактерий [6, 8]. Установлено, что референс-штаммы *B. coagulans* выдерживают воздействие хлороформа только при пятиминутной экспозиции, фаги Phagum B.c. 1 УГСХА и Phagum B.c. 2 УГСХА не устойчивы к его воздействию, остальные фаги выдерживают воздействие хлороформа в течение 15 минут. Однако применять данный метод для очистки бактериофагов не следует, так длительное время, затрачиваемое на обработку фага, заставляет продолжить поиск оптимального способа очистки бактериофагов от индикаторной культуры.

Для конструирования биопрепарата нами был отобран один фаг Phagum В.с. 11 УГСХА, который характеризовался высоким титром литической активности. Установлено, что в течение месяца показатель литической активности исследуемого бактериофага оставался без изменений $4,0 \pm 0,1 \times 10^{10}$ корпускул в 1 мл фаголизата, через 3 месяца – $6,0 \pm 0,1 \times 10^9$ корпускул в 1 мл фаголизата, через 6 месяцев – $3,0 \pm 0,1 \times 10^8$ корпускул в 1 мл фаголизата. Пассирование данного бактериофага на штамме бактерии *V. coagulans* в течение 7 пассажей восстанавливает литическую активность бактериофага на 1 порядок.

Изменение литической активности фага Phagum В.с. 11 УГСХА в диапазоне 10^8 - 10^{10} не является критическим при конструировании биопрепарата и не отразится на его способности лизировать культуру *V. coagulans* в пищевом сырье и продуктах питания при проведении исследований по их индикации и идентификации [5, 7].

Заключение. Из 45 проб объектов внешней среды (почва различных территорий, пищевое сырье и продукты питания растительного происхождения) было выделено 13 бактериофагов *Bacillus coagulans*. Селекцию бактериофагов проводили десятикратным пассированием: классическим методом было селекционировано 5 бактериофагов, методом с помощью смывов 8. Оптимальное соотношение бактериофага и индикаторного штамма *V. coagulans* – 1:1, т.е. 0,2 мл фага на 0,2 мл индикаторной культуры. Время пассажа – 6 часов инкубирования при температуре $35 \pm 2^\circ\text{C}$.

Изучены основные биологические свойства селекционированных бактериофагов. Литическая активность по Аппельману составляет от 10^{-7} до 10^{-10} , по Грация от $6,0 \pm 0,1 \times 10^7$ до $4,0 \pm 0,1 \times 10^{10}$ (БОЕ/мл); изучен спектр литической активности: минимальный процент лизируемых культур *V. coagulans* – 13,4%, максимальный – 86,6%. Бактериофаги строго специфичны в пределах вида *V. coagulans*, формировали схожие негативные колонии округлой формы с прозрачными центрами, без вторичного роста и зонами неполного лизиса, диаметром 1-4 мм. Все выделенные фаги устойчивы к воздействию температуры в диапазоне 57 - 90°C в течение 30 минут. Фаги Phagum В.с. 1 УГСХА и Phagum В.с. 2 УГСХА не устойчивы к воздействию трихлорметана, остальные фаги устойчивы к его воздействию в течение 15 минут.

Для конструирования биопрепарата нами был отобран один фаг Phagum В.с. 11 УГСХА, который характеризовался высоким титром литической активности. Показатель литической активности исследуемого бактериофага в течение месяца оставался без изменений, при хранении в условиях 2 - 4°C в течение 6 месяцев литическая активность снижалась

не значительно. Изменение литической активности фага Phagum B.c. 11 УГСХА в диапазоне 10^8 - 10^{10} не является критическим при конструировании биопрепарата.

Библиографический список:

1. Современная пищевая микробиология / Под ред. Дж. М. Джеймс; пер. с англ. Е. Баранова. - М.: Бином, 2012. - с. 888.
2. Алешкин, А.В. Биодеконтаминация и продление сроков годности мясных и рыбных полуфабрикатов с помощью бактериофагов / А.В. Алешкин, Э.Р. Зулкарнеев, Ю.В. Ларина // Астраханский медицинский журнал. - 2015. - Т. 10. - № 4. - с. 40-48.
3. Ревенко, И.П. Бактериофаги и их использование в ветеринарной практике/ И.П. Ревенко. - Киев: Урожай, 1978. - с. 88.
4. Каттер, Э. Бактериофаги: биология и практическое применение / Э. Каттер, А. Сулаквелидзе; науч. ред. А.В. Летаров; [пер. с англ. Е. Е. Куликов и др.]. - Москва: Научный мир, 2012. - с. 636.
5. Золотухин С.Н. Создание и разработка схем применения диагностических биопрепаратов на основе выделенных и изученных бактериофагов энтеробактерий / автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора биологических наук / Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия. - Ульяновск, 2007. - с. 5-8.
6. Васильев, Д.А. Антология научно - методических материалов по изучению бактериофагов / Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин. - Ульяновск, УГСХА, 2017. - с. 201.
7. Васильев, Д.А. Бактериофаги рода *Bacillus*: монография / Д.А. Васильев, Н.А. Феоктистова, С.Н. Золотухин, А.В. Алешкин – Ульяновск, УГСХА им. П. А. Столыпина, НИИЦМиБ, 2013. - с. 66-67.
8. Феоктистова, Н.А. 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.

BIOLOGICAL PROPERTIES OF BACTERIOPHAGES BACILLUS COAGULANS

Martynova K.V., Feoktistova N.A., Vasiliev D.A.

Key words: *Bacillus coagulans*, biological properties, specificity, morphology, temperature, trichloromethan.

The article presents the results of the study of the basic biological properties of isolated bacteriophages. In the course of the research, 13 bacteriophages were isolated and their biological properties were studied. Phagum bs 11 UGSAA, which was allocated a high titer of lytic activity.