

УДК 579.6:578.5

ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БАКТЕРИОФАГОВ *VACILLUS COAGULANS*

Феоктистова Н. А., кандидат биологических наук, доцент,
тел. 8(8422) 55-95-47, feokna@yandex.ru

Мартынова К.В., аспирант, тел.: 8(8422) 55-95-47,
belova_ksenya@mail.ru

Васильев Д.А., доктор биологических наук, профессор,
тел.: 8(8422) 55-95-47, dav_ul@mail.ru

Хусаинова Д.Д., магистрант, тел.: 8(8422) 55-95-47,
dinad@mail.ru

Сайгушева Е. В., магистрант, тел.: 8(8422) 55-95-47,
s.elena@yandex.ru

Балтаева Г.З., студентка, тел.: 8(8422) 55-95-47,
jandaneziz@gmail.com

Сулейманова М.И., студентка,
тел.: 8(8422) 55-95-47, mellkaleeva@yandex.ru
ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ

Ключевые слова: *Vacillus coagulans*, бактериофаг, биологические свойства, трихлорметан.

В статье представлены результаты исследований по изучению биологических свойств 7 бактериофагов, специфичных для *Vacillus coagulans*. Литическая активность от $(6,0 \pm 0,1) \times 10^7$ до $(4,0 \pm 0,1) \times 10^{10}$ БОЕ/мл, специфичность – специфичны в пределах вида *Vacillus coagulans*, спектр литического действия составил от 66 % до 92 % на 50 штаммах. Рекомендуемый метод очистки бактериофага от индикаторной культуры – мембранная фильтрация.

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

Введение. Известно, что бактерии *Vacillus coagulans* являются возбудителями плоско-кислой порчи плодоовощных консервов. В основном она возникает в низкокислотных консервах, у которых pH превышает 5,2. К таким консервам относятся: консервы из сахарной кукурузы, фасоли, зеленого горошка, пюреобразные консервы из тыквы и кабачков. Наблюдались случаи, когда термофильные бациллы способствовали порче мяса тушеного, гороха в томатной заливке, икры кабачковой и баклажанной [1-3].

Проведя анализ литературных данных можно сделать вывод, что в Российской Федерации на данный момент для обнаружения в объектах санитарного надзора бактерий *Bacillus coagulans* отсутствуют методики с помощью применения бактериофагов. Благодаря использованию бактериофагов можно идентифицировать бактерии вида *Bacillus coagulans* в течение 25 часов, используя при этом расходные материалы в минимальном количестве [4]. Цель исследований – это выделение из объектов внешней среды бактериофагов, специфичных для бактерий *Bacillus subtilis* и изучение их биологических свойств с целью создания фагового биопрепарата.

Материалы и методы исследований. *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; *B. megaterium* – 2, *B. anthracis* – 4 авирулентных штамма, *B. thuringiensis* – 2, *B. pumilus* – 8, *B. subtilis* – 6 штаммов, *B. cereus* – 2, *B. mycoides* – 12 штаммов получены из музея НИИЦМиБ ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ; 40 штаммов бактерии *B. coagulans*, выделенные из продуктов ветеринарно-санитарного надзора. Штаммы бактериофагов – 13 изолятов бактериофагов *Bacillus coagulans*, выделенные из продуктов питания, проб почвы различного хозяйственного назначения. Биологические свойства – литическая активность, специфичность и спектр литического действия изучали по Васильеву Д.А. [5].

Результаты исследований и их обсуждение. У 7 выделенных авторами и селекционированных бактериофагов бактерий *B. coagulans* литическую активность определяли методами Аппельмана и Грация. Полученные данные свидетельствуют о том, что бактериофаги *Bacillus coagulans*, выделенные нами, имеют различную активность, показатели которой выявлены по Аппельману в диапазоне от 10^{-7} до 10^{-10} ; а по Грация диапазон составляет от $6,0 \pm 0,1 \times 10^7$ до $4,0 \pm 0,1 \times 10^{10}$ (БОЕ/мл).

Для изучения диапазона литического действия бактериофагов мы использовали метод нанесения фага на газон индикаторной культуры «стекающей каплей». Спектр литической активности фагов был у всех различный. Минимальный процент лизируемых культур *B. coagulans* составил 66%, максимальный – 92%.

Биопрепарат для индикации и идентификации бактерий *B. coagulans* должен содержать бактериофаг, который обладает специфичностью в пределах вида. Выделенные 13 изолятов бактериофагов *Bacillus coagulans* подвергали исследованию по изучению специфичности на культурах гомотипического рода. Исследования проводили, используя метод Отто «стекающая капля». Установлено, что селекционированные

нами бактериофаги, обладают строгой специфичностью в пределах вида *Bacillus coagulans*.

Очистка бактериофагов от бактериальных клеток является важным моментом, для этого можно использовать три разных способа, это очистка фагов с помощью прогревания на водяной бане, обработка хлороформом (трихлорметаном) или фильтрацией с применением мембранных фильтров.

Устойчивость индикаторных культур *B. coagulans* и выделенных бактериофагов к высоким температурам определяли в диапазоне 57-90°C в течение 30 минут. В результате было установлено, что индикаторные культуры *B. coagulans* и селекционированные бактериофаги выдерживают воздействие высоких температур до 90°C, это указывает на то, что данный способ очистки фагов от бактериальной культуры не даст положительный результат.

Чувствительность индикаторных штаммов бактериофагов определяли воздействием на них хлороформа (трихлорметана) в соотношении 1:10, при этом в течение 5-35 минут проводили постоянное встряхивание с 5-минутным интервалом. В проведенных опытах установлено, что индикаторные культуры *B. coagulans* выдерживают воздействие хлороформа (трихлорметана) только при пятиминутной экспозиции, фаги PhagumB.c. 1 УГСХА и PhagumB.c. 2 УГСХА оказались вообще не устойчивы к воздействию трихлорметана, а остальные фаги устойчивы к его воздействию при временной экспозиции 5-15 мин. Бактериофаги можно было бы очищать таким способом, но из-за того, что на это уходит много материалов и времени, данный метод лучше заменить наиболее выгодным и быстрым. Следующий способ очистки от бактериальных клеток осуществляли фильтрацией фагов *B. coagulans* мембранными фильтрами Millipore 0,22 µm GV, после чего по методике Золотухина (2007) проводили их пассаж. Установлено, что благодаря такому способу очистки бактериофаг становится прозрачным и затрачивается меньше времени на его обработку.

Выводы. Установлено, что при изучении биологических свойств 7 бактериофагов, специфичных для *Bacillus coagulans*, получены следующие результаты:

- литическая активность от $(6,0 \pm 0,1) \times 10^7$ до $(4,0 \pm 0,1) \times 10^{10}$ БОЕ/мл,
- специфичность – специфичны в пределах вида *Bacillus coagulans* и не лизируют иных представителей рода *Bacillus*,
- спектр литического действия составил от 66 % до 92 % на 50 штаммах;

- рекомендуемый метод очистки бактериофага от индикаторной культуры – мембранная фильтрация фильтрами Millipore 0,22 µm GV.

Библиографический список:

1. Современная пищевая микробиология / Дж.Д. Джей, М.Дж. Лёсснер, Д.А. Гольден. – М.: Бином, Лаборатория знаний, 2011. – 886 с.
2. Keller, D. *Bacillus coagulans* as a probiotic [Text] / D. Keller, S. Farmer, A. McCartney, G. Gibson // Food Science and Technology Bulletin: Functional Foods. - 2010.- Vol. 7, N 7. - p. 103-109.
3. LeMarrec, C. Biochemical and genetic characterization of coagulin, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins, produced by *Bacillus coagulans* I4 / C. LeMarrec, B. Hyronimus, P. Bressollier, B. Verneuil, and M.C. Urdaci // Appl. Environ. Microbiol. - 2000. – V. 66. – P. 5213-5220.
4. Мартынова, К.В. Бактериофаг *Bacillus coagulans* – метод борьбы с плоскокислой порчей плодоовощных консервов / К.В. Мартынова, Ю.В. Зонина, Н.А. Феоктистова // Материалы Международной научной конференции «Молодежь и наука XXI века». - Том II. Ульяновск, 2018. - с. 53-56.
5. Васильев, Д.А. разработка биотехнологических параметров создания бактериофаговых биопрепаратов для деконтаминации микрофлоры, вызывающей порчу пищевого сырья животного происхождения и мясных, рыбных, молочных продуктов (биопроцессинг) / Д.А. Васильев, Н.А. Феоктистова, А.В. Алешкин и др. – Ульяновск, 2019. – 450с.

STUDY OF BIOLOGICAL PROPERTIES OF BACILLUS COAGULANS BACTERIOPHAGES

Feoktistova N. A., Martynova K.V., Vasilyev D.A., Husainova D.D., Saigusheva E. V., Baltayeva G.Z., Suleimanova M.I.

Keywords: *Bacillus coagulans, bacteriophage, biological properties, trichloroman.*

The article presents the results of studies on the biological properties of 7 bacteriophages specific to Bacillus coagulans. Lytic activity from $(6.0 \ 0.1) \times 10^7$ to $(4.0 \ 0.1) \times 10^{10}$ BOE/ml, specificity - specific within Bacillus coagulans species, the spectrum of lytic action was from 66% to 92% on 50 strains. The recommended method of cleaning bacteriophage from indicator culture is membrane filtration.