

УДК 579.6:578.5

БАКТЕРИОФАГИ *VACILLUS SUBTILIS*: ВЫДЕЛЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ

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

тел. 8(8422) 55-95-47, feokna@yandex.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: бактериофаги, *Bacillus subtilis*, свойства, характеристики, изолят, метод

В статье представлены результаты исследований по выделению бактериофагов, специфичных для *Bacillus subtilis*. При исследовании 84 проб объектов внешней среды выделено 8 фагов. Литическая активность от $(1,2 \pm 0,2) \times 10^7$ до $(8,0 \pm 0,3) \times 10^9$ БОЕ/мл, специфичность – фаги не лизируют иных представителей группы «*Bacillus subtilis*», спектр литического действия составил 88,6 % на 35 штаммах.

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

Введение. Согласно литературным данным группа «*Bacillus subtilis*» включает 8 видов: *B. subtilis*, *B. amiloliquefaciens*, *B. atrophaens*, *B. licheniformis*, *B. mojavensis*, *B. pumilus*, *B. sonorensis*, *B. vallismortis* [1]. По мнению некоторых исследователей, представители группы в действительности являются патоварами (патогенными вариантами) единственного вида, и все же филогенетическое и фенотипическое разграничение этой группы поддерживает генетический статус [2]. Внутреннее разграничение различных 16S рРНК групп внутри рода *Bacillus* в настоящее время далеко не ясно. Многие из этого рода распадаются на несколько очевидно четких групп рРНК последовательности, таких как

«*Bacillus subtilis* группа», «*Bacillus cereus* группа» и «*Bacillus sphaericus* группа», но хотя такие разделения могут также быть фенотипически отличимыми, промежуточные организмы могут сделать удовлетворительное подразделение сложным [3]. Для ускоренной дифференциации представителей этих групп целесообразно, на наш взгляд, разработать систему фаготипирования, поэтому цель наших исследований – это выделение из объектов внешней среды бактериофагов, специфичных для бактерий *Bacillus subtilis*.

Материалы и методы исследований. В исследованиях нами были использованы объекты внешней среды: пробы сточных вод, почвы и пищевых продуктов. Методика исследований - метод обогащения «с подсевом». Биологические свойства – литическая активность, специфичность и спектр литического действия изучали по Васильеву Д.А. [4]. В исследованиях было использовано 14 культур *Bacillus subtilis*, выделенных авторами и идентифицированных по Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria [1]; бактерии *B. subtilis* – 21 штамм; *B. pumilus* – 18 штаммов, *B. cereus* – 25 штаммов, *B. mycoides* – 15 штаммов, *B. megaterium* – 14 штаммов, , *B. thuringiensis* – 4 штамма были получены из музея НИИЦМиБ ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ.

Результаты исследований и их обсуждение. Нами были проведены исследования объектов ветеринарно-санитарного надзора на наличие в них бактериофагов, специфичных для *B. subtilis*, и установлено следующее:

- выделено и селекционировано 14 изолятов бактериофагов, которые отличались по времени пассирования – 5,5 до 7,0 часов; индикаторной культуре для наработки вирионов бактериофага – *B. subtilis* 61/ Bs – 1 УлГАУ, *B. subtilis* 3/ Bs – 2 УлГАУ, *B. subtilis* 3П/ Bs – 3 УлГАУ, *B. subtilis* 98/ Bs – 4 УлГАУ, *B. subtilis* 8/ Bs – 5 УлГАУ, *B. subtilis* 21/ Bs – 6 УлГАУ, *B. subtilis* 17/ Bs – 7 УлГАУ, *B. subtilis* 5/ Bs – 8 УлГАУ. При проведении исследований был подобран оптимальный метод очистки бактериофагов от индикаторной культуры – это мембранная фильтрация с применением фильтров filter type: 0,45 µm GV и filter type: 0,22 µm GV;

- установлена морфология бляшкообразующих единиц – вирионы фага на плотной питательной среде образуют зоны лизиса округлой формы, которые были сгруппированы нами по показателям размера и степени прозрачности в 2 группы: типа. 1 тип: прозрачные, до 5 мм в диаметре; 2 тип: прозрачные более 5 мм в диаметре;

- определена специфичность действия выделенных бактериофагов – экспериментально установлено, что вышеназванные бактериофа-

ги не лизируют бактерии *B. pumilus*, *B. cereus*, *B. mycoides*, *B. megaterium*, *B. thuringiensis*;

- изучена литическая активность – установлено, что по методу Грациа показатель находится в диапазоне от $1,7 \times 10^6$ до $8,0 \times 10^9$ БОЕ/мл, по методу Аппельмана – 10^{-5} до 10^{-8} (таблица 1); определено, что при хранении в условиях бытового холодильника в течение 3, 6, 9 месяцев укупоренных в стерильные флаконы без применения консервирующих веществ бактериофагов, показатель литической активности снижался после 6 месяцев на 1 порядок, после девяти месяцев изменений зафиксировано не было;

- спектр литического действия, определяемый у выделенных бактериофагов, позволяет рекомендовать бактериофаг Bs – 4 УлГАУ, нарабатываемый на бактериальном штамме *B. subtilis* 98, как производственно-перспективный штамм фага для конструирования биопрепарата, он лизирует 31 культуру *B. subtilis*, что составляет 88,6 %; необходимо также подчеркнуть, что нами не были выявлены фаги, способные лизировать 1-2 культуры;

Выводы. При проведении исследований объектов ветеринарно-санитарного надзора на наличие бактериофагов, специфичных для *B. subtilis* было установлено, что из 84 проб объектов внешней среды выделено 8 фагов, применяя метод обогащения «с подсевом».

Таблица 1 – Показатели литической активности и спектра литического действия

| Бактериальная культура <i>B. subtilis</i> / название фага | Тип колонии | Спектр литического действия на 35 штаммах, % | Литическая активность | |
|--|-------------|--|-----------------------------|---------------|
| | | | по Грациа. БОЕ/мл | по Аппельману |
| <i>B. subtilis</i> 61/ Bs – 1 УлГАУ | 1 | 80,0 | $(2,8 \pm 0,2) \times 10^9$ | 10^{-8} |
| <i>B. subtilis</i> 3/ Bs – 2 УлГАУ | 1 | 22,9 | $(2,4 \pm 0,7) \times 10^8$ | 10^{-7} |
| <i>B. subtilis</i> 3П/ Bs – 3 УлГАУ | 1 | 28,6 | $(4,0 \pm 0,6) \times 10^7$ | 10^{-6} |
| <i>B. subtilis</i> 98/ Bs – 4 УлГАУ | 2 | 88,6 | $(8,0 \pm 0,3) \times 10^9$ | 10^{-8} |
| <i>B. subtilis</i> 8/ Bs – 5 УлГАУ | 2 | 17,1 | $(1,5 \pm 0,3) \times 10^7$ | 10^{-6} |
| <i>B. subtilis</i> 21/ Bs – 6 УлГАУ | 2 | 54,3 | $(5,1 \pm 0,5) \times 10^8$ | 10^{-8} |
| <i>B. subtilis</i> 17/ Bs – 7 УлГАУ | 1 | 37,2 | $(3,0 \pm 0,7) \times 10^7$ | 10^{-6} |
| <i>B. subtilis</i> 5/ Bs – 8 УлГАУ | 1 | 20,0 | $(1,2 \pm 0,2) \times 10^7$ | 10^{-6} |

Литическая активность выделенных фагов находилась в диапазоне от $1,7 \times 10^6$ до $8,0 \times 10^9$ БОЕ/мл, они были специфичны в пределах вида и совокупный спектр литического действия составил 100% на 35 штаммах. Бактериофаг Bs – 4 УЛГАУ рекомендован как производственно-перспективный штамм для конструирования биопрепарата, так как лизирует 31 культуру *B. subtilis*, что составляет 88,6 % и его литическая активность составляет $(8,0 \pm 0,3) \times 10^9$ БОЕ/мл.

Библиографический список:

1. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria / W. B. Whitman, P. DeVos, J. Chun, S. Dedysh, B. Hedlund, P. Rainey, M. Trujillo. – Hoboken, New Jersey: Wiley, 2015 – URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9781118960608> (дата обращения 12.07.2018).
2. Bentur, H. N. Central venous catheter infection with *Bacillus pumilus* in an immunocompetent child: a case report / H. N. Bentur, A. Dalzell, F. A. I. Riordan // Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials. - 2007. - Vol. 6. - P. 12.
3. Balasubramanian, N. *Bacillus pumilus* S124A carboxymethyl cellulase; a thermo stable enzyme with a wide substrate spectrum utility / N. Balasubramanian, N. Simões // International Journal of Biological Macromolecules. - 2014. - Vol. 67. - P. 132–139.
4. 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.

BACTERIOPHAGES BACILLUS SUBTILIS: ISOLATION AND STUDY OF PROPERTIES

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

Key words: *bacteriophages, Bacillus subtilis, properties, characteristics, isolate, method.*

The article presents the results of studies on the isolation of bacteriophages specific to Bacillus subtilis. In the study of 84 samples of objects of the external environment 8 phages were isolated. Lytic activity from $(1,2 \pm 0,2) \times 10^7$ to $(8,0 \pm 0,3) \times 10^9$ BOE/ml, specificity (not licked by other members of «Bacillus subtilis» group), lytic spectrum – 88,6% on 35 strains.