

УДК 632.3.01/.08

РАЗРАБОТКА ФАГОВОГО БИОПРЕПАРАТА, СПЕЦИФИЧНОГО ДЛЯ *VACILLUS SUBTILIS*, И МЕТОДОВ ЕГО ПРИМЕНЕНИЯ ДЛЯ ДЕКОНТАМИНАЦИИ ПЛОДООВОЩНОЙ ПРОДУКЦИИ

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

*И.М. Абдрахманов, аспирант,
8(8422) 55-95-47, abdrahmanov.ilhur@yandex.ru*

*Е.В. Сайгушева, магистрант,
8(8422) 55-95-47, sbv2210@yandex.ru*

С.В. Аннюк, аспирант, 8(8422) 55-95-47, s.v.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 subtilis*, бактерии, бактериофаги, биопрепарат, метод, применение.

*В статье представлены материалы исследований по разработке фагового биопрепарата, специфичного для *Vacillus subtilis*, и методов его применения для деконтаминации плодоовощной продукции. Из объектов фито-санитарного надзора было выделено и селекционировано 22 изолята фагов, специфичных для *Vacillus subtilis*. Были изучены биологические свойства фаго-кандидат. Выбран производственно-перспективный изолят фага - FBs-16 УГСХА, имеющий широкий спектр литической активности, титром фаговых частиц - 10^9 БОЕ/мл. Анализ генетических и протеомных характеристик бактериофага FBs-16 УГСХА не выявил локусов патогенности и их гомологов. Установлено, что однократная обработка картофеля, томатов, яблок и листового салата 5% рабочим раствором биопрепарата снижает развитие их порчи.*

Введение. Основной причиной потерь растительного сырья при хранении является микробиальная порча [1]. Современные способы обработки сырья при хранении такие, как обработка химическими препаратами, искусственное охлаждение, озонирование, электромагнитное излучение и другие, предотвращают микробиальную порчу, но, в тоже время, уничтожают биологический барьер, препятствующий проникновению патогенных микроорганизмов, снижая естественный иммунитет растительного сырья [2].

Перспективным направлением в хранении растительного сырья является применение биологических средств защиты, на основе активных штаммов антагонистов патогенной микрофлоры [3]. Биопрепараты используют для борьбы с фитопатогенными организмами в послепосевочный период и при длительном холодильном хранении. При этом не создается угрозы нарушения экологического равновесия в биосфере, так как микроорганизмы, применяемые в качестве биопрепаратов, являются естественной микрофлорой окружающей среды [4].

Цель работы - разработка фагового биопрепарата, специфично для *Bacillus subtilis* и методов фаг-опосредованного биопроецирования (обработка бактериофагами) плодоовощной продукции с целью увеличения сроков хранения и профилактики пищевых отравлений.

Материалы и методы. Для выделения бактериофагов из объектов внешней среды было отобрано 148 проб почвы, корне- и клубнеплоды с признаками порчи – 27 проб. Банк бактериальных штаммов *Bacillus subtilis* – 56 штаммов из музея кафедры МВЭ и ВСЭ ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ.

Выделение и изучение биологических свойств фагов проводили по методам Э. Каттер [5-6]. Литическую активность определяли по методам Грация и Аппельману [7]. Для протеомного анализа нами были использованы ресурсы систем SnapGene Viewer v.4.1.7 и ExPasy (<https://web.expasy.org>) [8]. Для анализа белковых профилограмм выделенных бактериофагов нами был использован метод вертикального электрофореза в ПААГ. Анализ профилограмм был проведен с использованием программного обеспечения GelAnalyzer 2010. Определение эффективности фагового биопрепарата FBS-16 УГСХА мы проводили на товарном картофеле сорта Ласунок, томатах сорта Премиум F1, листовом салате сорта Тайфун, яблоках сорта Айдарен на искусственном инфекционном фоне (*Bacillus subtilis*) в условиях лаборатории (бактериологического бокса). Метод искусственного заражения: опрыскивание плодов бактериальной суспензией 48-часовых культур *Bacillus subtilis* с инфекционной нагрузкой $1 \times 10^7 - 10^8$ КОЕ/мл. В каждом варианте было взято по 25 образцов. Контролем служили инокулированные плоды без обработки.

Результаты исследований и их обсуждение. В ходе эксперимента нами из объектов фито-санитарного надзора было выделено методом обогащения «с подсевом» 22 изолята фагов, специфичных для *Bacillus subtilis*.

Далее мы занимались их селекцией и определением биологических свойств, знание о которых позволит выбрать для дальнейшей

работы наиболее перспективный. Нами изучался спектр литической активности бактериофагов на банке бактериальных штаммов, урожайность, устойчивость, параметры, идущего инфекционного процесса в системе фаг–клетка-хозяин. Полученные нами данные позволили для последующей работы выбрать фаг FBs-16 УГСХА, имеющий широкий спектр литической активности, титром фаговых частиц - 10^9 БОЕ/мл. Однако, далее нами были проведены исследования генома и протеома этого бактериофага с целью поиска «локусов патогенности». Для этого данные генетической последовательности бактериофага FBs-16 УГСХА были сопоставлены с аннотированными данными в системе NCBI. Также нами установлено, что качественный состав белков вышеназванного бактериофага соответствует таковому у аннотированных аналогов, представленных в системах: SnapGene Viewer v.4.1.7, ExPasy, имеет явные гомологии нуклеотидного и аминокислотного наборов. Определено, что в белковой структуре наблюдается закономерность, которая присуща бактериофагам – это наличие структурных и неструктурных компонентов. Определены продукты генов, не обладающие четкими функциональными характеристиками, которые имеют аналоги в аннотированных геномах бактериофагов *Bacillus subtilis*. Установлено, что «локусов патогенности» не выявлено у фага FBs-16 УГСХА, что дает возможность использовать его для создания биопрепарата для обработки плодов и овощей.

Нами было определено, что готовая форма фагового биопрепарата *Bacillus subtilis* объемом 100 мл включает только фаголизат FBs-16 УГСХА в титре $n \times 10^9$ БОЕ/мл. Таким образом, фаговый биопрепарат *Bacillus subtilis* представляет собой прозрачную жидкость желтого цвета, налитую в стеклянные флаконы под резиновые пробки с алюминевыми колпачками объемом 100-500 мл, условия хранения: при температуре 2-4 °С в течение 6 месяцев при относительной влажности воздуха 70-80 %.

Обработка плодоовощной продукции 5% рабочим раствором биопрепарата FBs-16 УГСХА, проходила из расчета расхода рабочей жидкости 6–8 мл/м³, согласно четырем вариантам: вариант - 1. плоды, инокулированные *Bacillus subtilis* и обработанные биопрепаратом при первых признаках порчи. Это примерно через 36-48 часов; вариант - 2. плоды, предварительно обработанные биопрепаратом и через 8 часов инокулированные *Bacillus subtilis*; вариант - 3. плоды, инокулированные *Bacillus subtilis* и обработанные биопрепаратом без наличия признаков порчи. Плоды погружались в раствор бактериофагового биопрепарата

на 1-2 минуты (коктейль бактериофагов объемом 85 мл разводили в 10 литрах воды); вариант – 4. плоды, инокулированные *Bacillus subtilis*, без обработки препаратом (контроль).

В экспериментах нами установлено, что однократная обработка плодов 5% рабочим раствором биопрепарата снижает развитие порчи. Уничтожение более 70 % микроорганизмов с поверхности образцов (картофеля, томатов, яблок и листового салата) подтверждалась при условии множественности инфицирования фаг–бактерия-хозяин не менее 100:1 и времени обработки не менее 2 минут (метод погружения).

Таким образом, нами был разработан фаговый биопрепарат, специфичный только для бактерий *Bacillus subtilis*, имеющий высокий титр и не несущий в составе своего генома «локусов патогенности», который по нашим данным способен снижать развитие порчи, возникающей при контаминации вышеназванными бактериями картофеля, томатов, яблок и листового салата, а также повышать сроки хранения данной плодоовощной продукции, так как вирус специфического действия «работает» только на «своих».

**Исследования проводились по техническому заданию
Министерства сельского хозяйства Российской Федерации
в 2019 году.**

Библиографический список:

1. *Bacillus pumilus*, a new pathogen on Mango plants / A. A. Galal, A. El-Bana, J. Janse // Egyptian Journal of Phytopathology. - 2006. - Vol. 34, № 1. - P. 17–29.
2. Порча пищевых продуктов: виды, причины и способы предотвращения / В. Н. Леонтьев, Х. М. Элькаиб, А. Э. Эльхедми // Тр. Белорус. гос. ун-та. Сер.: Физиол., биохим. и молекуляр. основы функционирования биосистем.- 2013. - Т. 8, ч. 1. - с. 125-130.
3. Биопрепараты как фактор повышение экспортного потенциала растениеводческой продукции / Д.В. Кабалина, В.В. Лисовой, Т.В. Першакова // Никонские чтения. – 2017. – №. 22. – с. 262-263.
4. Лисовой В.В. Российский и зарубежный опыт применения биопрепаратов при хранении фруктов / В.В. Лисовой, Д.В. Кабалина // Научный журнал КубГАУ - Scientific Journal of KubSAU. 2017. №134. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/rossiyskiy-i-zarubezhnyy-opyt-primeneniya-biopreparatov-pri-hranenii-fruktov> (дата обращения: 12.04.2020).
5. Kutter, E. Bacteriophages: biology and applications / E. Kutter, A. Sulakvelidze. - Boca Raton, FL : CRC Press, 2005. - 510 p.

6. 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. Bacteriophages. Methods and Protocols, Volume 3 / Martha R.J. Clokie, A. M. Kropinski, R. Lavigne. - Humana Press, 2018. – 311 p.
8. Анализ протеома протейного бактериофага / Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев, А.В. Мاستиленко, Е.В. Сульдина, // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2018. - № 2 (42). – С. 223-229.

DEVELOPMENT OF PHAGE BIOPREPARATION SPECIFIC FOR BACILLUS SUBTILIS AND METHODS OF ITS APPLICATION FOR DECONTAMINATION OF FRUIT AND VEGETABLE PRODUCTS

Feoktistova N.A., Abdrakhmanov I.M., Saigusheva E.V., Annyuk S.V., Vasilyev D.A.

Keywords: *Bacillus subtilis, bacteria, bacteriophages, biopreparation, method, application*

The article presents research materials on development. Phage biopreparation, specific for Bacillus subtilis, and methods of its application for decontamination of fruit and vegetable products. From the objects of phyto-sanitary supervision, 22 isolates of phages specific to Bacillus subtilis were isolated and selected. The biological properties of the fago candidate were studied. Selected is a production-promising phage isolate - FBs-16 UGSHA, having a wide range of lytic activity, with phage particle titer - 109 BOE/ml. Analysis of the genetic and proteomic characteristics of bacteriophage FBs-16 UGSHA did not reveal pathogenicity loci and their homologues. It has been found that single treatment of potatoes, tomatoes, apples and leaf salad with 5% working solution of biopreparation reduces the development of their spoilage.