

УДК 578

ИЗУЧЕНИЕ НЕКОТОРЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БАКТЕРИОФАГА *BACILLUS MEGATERIUM* ВМЕГ–16 УЛГАУ

**Столетов В.В., магистрант 2 курса, stoletov.vlad@bk.ru,
Степочкина Я.А., магистрант 1 курса факультета
ветеринарной медицины и биотехнологии, ulgau1943@mail.ru
Научный руководитель – Феоктистова Н.А., кандидат
биологических наук, доцент
ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ**

Ключевые слова: *Bacillus megaterium*, бактериофаг, свойства, латентный период, скорость адсорбции, урожайность.

В статье представлены результаты исследований по изучению биологических свойств бактериофага *Bmeg*–16 УлГАУ: экспериментально определен латентный период внутриклеточного развития, урожайность бактериофага и константа скорости адсорбции.

Спорообразующие бактерии рода *Bacillus* (*Bacillus cereus*, *Bacillus mycooides*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus mesentericus (pumilus)*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus coagulans*) являются одним из этиологических факторов биологического разрушения продуктов питания, в том числе молока. Наличие у бацилл спор препятствует инактивации этих микроорганизмов после кратковременного термического воздействия, а выраженная их протеолитическая активность приводит к различным порокам [1].

Анализ нормативно-технической документации (ГОСТов и СанПиНов) свидетельствует о том, что в настоящее время для молочных продуктов споровые факультативно-анаэробные микроорганизмы, которыми являются бациллы, не являются санитарно-показательными, поэтому их наличие не нормируется и не подлежит обязательному контролю в условиях производственных лабораторий. Однако при появлении ряда характерных пороков вкуса и внешнего вида у молочных продуктов для бактериологического контроля рекомендуется делать посевы 2–4-кратно разведенного продукта на наличие указанной неспецифической микрофлоры.

Основным источником контаминации молока являются объекты окружающей среды, корма и воздуха. 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* [2-3]. Разработка биопрепаратов на основе специфических бактериофагов – это актуальная обширная тема для исследований. В данном исследовании нами были изучены некоторые биологические свойства фага *Bmeg-16 УлГАУ*.

Штамм фага *Bmeg-16 УлГАУ* и штамм бактерий *B. megaterium* 182 были получены из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ.

Индикаторная культура хранилась на полужидком МПА (рН 7,2-7,4) с содержанием 0,3 % бактериологического агара при температуре 2-4 °С, которые пересеваются каждые 2-3 месяца.

Методы изучения биологических свойств бактериофагов (скорость адсорбции, длительность латентного периода и урожайность фага) ранее были апробированы в экспериментах сотрудниками кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ [4-15].

Метод определения скорости адсорбции бактериофагов основан на исследовании количества корпускул неадсорбированного фага в смеси бактерия-фаг. В качестве бактериальных клеток-хозяев использовали индикаторную культуру бактерий *Bacillus megaterium*. Адсорбцию фага *Bmeg-16 УлГАУ* изучали на клетках *Bacillus megaterium* 182.

Время адсорбции для фага устанавливали в зависимости от процента максимальной адсорбции для конкретной смеси (фаг+клетка хозяина).

Определено, фаг *Bmeg-16 УлГАУ* за 6 минут адсорбировался на клетках *Bacillus megaterium* 182 в количестве 62,7%, константа скорости адсорбции $K = 4,1 \text{ см}^3/\text{мин}^{-1}$ (таблица 1).

Для определения длительности латентного периода и урожайности фага использовали способ изучения одиночного цикла размножения фага без применения антифаговой сыворотки. В основу метода положено свойство эмбихина избирательно инактивировать различные фаги без повреждения бактерий. В предварительном опыте параллельного титрования эмбихина на исследуемом фаге *Bmeg-16 УлГАУ* и соответствующем бактериальном хозяине *Bacillus megaterium* 182 устанавливается рабочая доза препарата, т.е. то его количество, которое в 0,9 мл физиологического раствора способно за 5 минут при 37°

Таблица 1 - Результаты опыта по изучению скорости адсорбции *Vmeg-16 УлГАУ* на клетках *Bacillus megaterium 182*

Название фага и микро-организма	Время адсорбции максимального количества фага (мин)	Количество фага до адсорбции (по показателю негативных колоний) $M \pm m$	Количество неадсорбированного фага (по показателю бляшкообразующие единиц) $M \pm m$	Процент адсорбции (%)
<i>Vmeg-16 УлГАУ / Bacillus megaterium 182</i>	5	94,4±1,6	58,5±1,5	38,03
	6		35,2±2,1	62,7
	Константа скорости адсорбции $K = 4,1 \text{ см}^3/\text{мин}^{-1}$			

инактивировать 90-95 % фага при исходной его концентрации $3-5 \times 10^7$ частиц в 1 мл. Опытным путем установлено, что препарат в рабочей дозе в аналогичных условиях не должен оказывать антибактериального действия при контакте с $4,4 \times 10^8$ бактерий. В экспериментах определено, что рабочая доза эмбихина была равна 7 γ , т.е. среднему из двух последних эффективных доз. После определения рабочей дозы проводили основной опыт. Бактериальные культуры, выращенные в мясо-пептонном бульоне и находящиеся в логарифмической фазе роста, разводили мясо-петонным бульоном до концентрации бактерий $6,2 \pm 0,8 \times 10^9$ в 1 мл. К 0,9 мл такой культуры, предварительно адаптированной к 36 ± 1 °С, добавляли соответствующего бактериофага 0,1 мл, содержащего $6,2 \pm 0,8 \times 10^9$ БОЕ/мл, смесь инкубировали в термостате в течение 5 минут, а затем 0,1 мл переносили в 0,9 мл физиологического раствора с рабочей дозой эмбихина, предварительно прогретого в водяной бане при 36 ± 1 °С. После 5-минутной инкубации смеси при 36 ± 1 °С опыт продолжали по методу Эллиса и Дельбрюка. Затем из этой пробирки брали 0,1 см³ жидкости, которую вносили к 9,9 см³ бульона. Из четвертой пробирки брали 0,1 см³ жидкости и вносили в 9,9 см³ бульона (пятая пробирка). Получая указанные разведения, мы стремились создать постоянную и наименьшую концентрацию частиц фага в четвертой пробирке и свести ее на нет в пятой с целью возможности подсчета колоний фага по окончании латентного периода. Из 4 и 5 пробирок приготовленными разведениями через каждые 1-2

минуты брали по 0,1 см³ жидкости и засевали в две бактериологические чашки по методу агаровых слоев. Подсчет негативных колоний проводили после 16-18 часового инкубирования чашки при 36±1 °С. Результаты исследований отражены в таблице 2.

Таблица 2 - Изучение латентного периода и урожайности бактериофага *Vmeg-16* УлГАУ

Время начала опыта	Число негативных колоний фага при высеве из 4-ой пробирки M±m	Число негативных колоний фага при высеве из 5-ой пробирки M±m
15	133,4±2,8	
17	139,3±4,5	
20	149,3±2,6	
25	164,8±5,8	
27	614,3±15,1	21,3±1,1
29	Стерильное пятно	18,4±2,3
30	Сливной рост негативных колоний	20,1±4,2
35	Лизис	47,5±2,8
40		67,3±4,1
45		64,2±3,5
50		71,3±2,7
55		63,5±7,2
60		74,4±6,4

Экспериментально определено, что латентный период внутриклеточного развития фага *Vmeg-16* УлГАУ на клетках *Bacillus megaterium* 182 равен 25-26 минут. Среднее количество негативных колоний на чашках при высеве из 4-ой пробирки с 15 по 20 минуту опыта равно 140,3, а при высеве с 40 по 60 минуту из пятой пробирки – 68,14. Ср. урожайность бактериофага *Vmeg-16* УлГАУ равна 6814:141=48,6 вирусных частиц на одну микробную клетку *Bacillus megaterium* 182. Установлено, фаг *Vmeg-16* УлГАУ за 6 минут адсорбировался на клетках *Bacillus megaterium* 182 в количестве 62,7%, константа скорости адсорбции K= 4,1 см³/мин⁻¹.

Библиографический список:

1. 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, С.Н. Золотухин, А.В. Мاستиленко, И.А. Киселёва, Е.В. Сульдина, Д.В. Никитченко. Ульяновск, 2019. – 450с.
2. Бактериофаги зооантропонозных и фитопатогенных бактерий / Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин, И.Р. Насибуллин, Н.Г. Куклина, И.Г. Горшков, Н.А. Феоктистова и др. Ульяновск, 2017. – 176 с.
3. Выявление бацилл, вызывающих порчу продуктов питания (БВППП) бактериологическими методами / Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев, Т.А. Юдина, С.Н. Золотухин // Материалы Международной научно-практической конференции Актуальные вопросы ветеринарной науки. – Ульяновск, 2015. - С. 103-110.
4. Выделение бактерий вида *Bacillus mesentericus* из объектов санитарного надзора / Н.А. Феоктистова, М.А. Юдина, Д.А. Васильев, И.Р. Хусаинов // Материалы III-й Международной научно-практической конференции молодых ученых: Молодежь и наука XXI века. – Ульяновск, 2010. - С. 82-84.
5. Разработка экологически чистого инновационного фагового биопрепарата для снижения и/или предотвращения порчи плодоовощной продукции. Научная монография / Д.А. Васильев, Н.А. Феоктистова, А.В. Алешкин, А.В. Мاستиленко, Е.В. Сульдина, К.В. Мартынова, И.А. Киселева. - Ульяновск, 2020. – 412 с.
6. Разработка фагового биопрепарата, специфичного для *Bacillus subtilis*, и методов его применения для деконтаминации плодоовощной продукции/ Н.А. Феоктистова, И.М. Абдрахманов, Е.В. Сайгушева, С.В. Аннюк, Д.А. Васильев// Материалы X Международной научно-практической конференции: Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения. – Ульяновск, 2020. - С. 312-316.
7. Основные технологические параметры изготовления биопрепарата для борьбы с возбудителем сосудистого бактериоза крестоцветных/ П.С. Майоров, Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев// Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2020. - № 1 (49).- С. 60-64.
8. Изучение некоторых свойств выделенных бактериофагов *Pseudomonas syringae*/ А.К. Беккалиева, Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев// Современная наука: актуальные проблемы теории и практики. Серия: Естественные и технические науки. - 2020. - № 3-2. - С. 11-13.
9. Identifying the main technological parameters for bio-product exemplified by bacteriophage pv. k134–*utsav xanthomonas campestris campestris*/ P. Maiorov, N.A.

- Feoktistova, D.A. Vasilyev, E.N. Mallyamova, A.A. Nafeev, A.L. Toigildin, I.A. Toigildina, I.L. Obukhov, B.I. Shmorgun // Ambient Science.- 2020. - Т. 7. № 1. - С. 7-10.
10. Конструирование бактериофагового препарата для биоконтроля *Pseudomonas syringae* в растениеводстве/ Д.А. Васильев, А.К. Беккалиева, Н.А. Феоктистова, Е.В. Сульдина // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2020. - № 2 (50). - С. 130-137.
 11. Изучение биологических свойств бактериофагов *Bacillus coagulans*/ Н.А. Феоктистова, К.В. Мартынова, Д.А. Васильев, Д.Д. Хусаинова, Е.В. Сайгушева, Г.З. Балтаева, М.И. Сулейманова // Материалы Национальной научно-практической конференции: Актуальные проблемы аграрной науки: состояние и тенденции развития. - 2019. - С. 149-152.
 12. Феоктистова, Н.А. Выделение бациллярных бактериофагов и их селекция/ Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев // Биология – наука XXI века. Сборник тезисов 23-ой Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых. - 2019. - С. 256.
 13. Конструирование экспериментального биопрепарата на основе бактериофага Ars 25-УГСХА для проведения биопроцессинга/ Д.А. Васильев, А.В. Алёшкин, С.Н. Золотухин, Н.А. Феоктистова, Н.Г.Куклина [и др.] // Естественные и технические науки. - 2018. - № 2 (116).- С. 33-37.
 14. Идентификация бактерий *Bacillus cereus* на основе их фенотипической характеристики / Д.А. Васильев, А.И. Калдыркаев, Н.А. Феоктистова, А.В. Алешкин. - Ульяновск, 2013. – 98 с.
 15. Выделение фагов бактерий вида *Bacillus cereus* / Н.Т. Садеева, Е.В. Меркулова, Н.А. Феоктистова, М.А. Юдина // Материалы V-й Всероссийской (с международным участием) студенческой научной конференции: Актуальные проблемы инфекционной патологии и биотехнологии. – Ульяновск, 2012. - С. 14-17.

STUDY OF CERTAIN BIOLOGICAL PROPERTIES OF BACTERIOPHAGE BACILLUS MEGATERIUM BMEG-16 ULGAU

Stoletov V.V., Stepochkina Y.A.

Key words: *Bacillus megaterium, bacteriophage, properties, latent period, adsorption rate, yield.*

The article presents the results of research on the biological properties of bacteriophage Bmeg-16 UIGAУ: the latent period of intracellular development, the yield of bacteriophage and the adsorption rate constant were experimentally determined.