

УДК 578

ХАРАКТЕРИСТИКА ОСНОВНЫХ КОМПОНЕНТОВ ФАГОВОГО БИОПРЕПАРАТА *VACILLUS MEGATERIUM*

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

Ключевые слова: *Vacillus megaterium*, бактериофаги, био-препарат, свойства, литическая активность, специфичность, спектр литического действия.

В статье представлены результаты исследований по изучению биологических свойств бактериофага *Vmeg-16* УлГАУ, который является основным компонентом фагового биопрепарата, специфичного для *Vacillus megaterium*; описаны этапы его изготовления и внешний вид.

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 *Vacillus*, в том числе и *V. megaterium* [1].

При производстве ряда продуктов, в технологическом процессе которых заложено концентрирование сухих веществ молока (сыры, сгущенные и сухие молочные продукты), происходит увеличение количества бактериальных клеток изучаемых споровых микроорганизмов за счет их концентрации. Для плавленых сыров и молокосодержащих продуктов, в рецептуре которых используются разнообразные молочные и немолочные компоненты и высокотемпературная обработка сырья (пастеризация или плавление), споровая микрофлора становится подавляющей. Так, в плавленых сырах ее количество может превышать 70% от общего количества микроорганизмов в продукте [2].

Своевременное качественное и количественное обнаружение этих микроорганизмов поможет предотвратить негативные процессы. Поэтому разработка методов детекции бактерий рода *Vacillus* в

молоке и молочных продуктах является той практической задачей, которую необходимо решать в пищевой и перерабатывающей промышленности [3]. Разработка для решения данной проблемы биопрепаратов на основе специфических бактериофагов – это актуальная тема для исследований.

Для изготовления биопрепарата использовали штамм фага *Vmeg-16* УлГАУ и штамм бактерий *B. megaterium 182*, полученные 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 (литической активности, специфичности, морфологии бляшкообразующих единиц) ранее были апробированы в экспериментах сотрудниками кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ [4-12].

Биологические свойства вышеназванного бактериофага представлены в таблицах 1-3.

Таблица 1 – Морфология бляшкообразующих единиц фага *Vmeg-16* УлГАУ

№ п/п	Описание морфология бляшкообразующих единиц	Название бактериофага
4 тип	Прозрачные негативные колонии округлой формы, 6,0±1,0 мм с полным лизисом в центре, неполным лизисом в виде ореола по периферии, 8,5±0,5 мм в диаметре	<i>Vmeg 16 – УлГАУ</i>

Таблица 2 – Литическая активность фага *Vmeg-16* УлГАУ

Название бактериофага	Литическая активность (титр)	
	титрование в МПБ, степень разведения	метод диффузии в мягком слое двуслойного МПА, БОЕ/мл
<i>Vmeg 16 – УлГАУ</i>	10 ⁻⁸	6,2±0,8x10 ⁹

Таблица 3 – Результаты изучения специфичности фага *Vmeg-16* УлГАУ

Бактериофаг	Виды бактерий										
	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus mesentericus</i>	<i>Bacillus mycoides</i>	<i>Bacillus anthracis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Paenibacillus polymixa</i>	<i>Paenibacillus larvae</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria ivanovii</i>
Кол-во испытанных штаммов	8	8	13	12	11	16	3	2	2	3	2
<i>Vmeg 16</i> – УлГАУ	+/8	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

Примечание: «+» - отмечена зона лизиса по ходу стекания капли бактериофага на газоне культуры;

«-» - отмечено отсутствие зоны лизиса по ходу стекания капли бактериофага на газоне культуры.

Опыты демонстрируют, что наиболее широким совокупным спектром литического действия по отношению к изучаемым культурам обладает штамм фага *Vmeg-16* УГСХА, совокупный процент лизиса составил 100 % (табл. 3). Для конструирования биопрепарата был отобран фаг *Vmeg-16* УГСХА, у которого были зафиксированы самые высокие показатели литической активности ($6,2 \pm 0,8 \times 10^9$ БОЕ/мл) и максимально широкий совокупный спектр литического действия – 100 % на 8 штаммах *B. megaterium*.

Экспериментальный биопрепарат готовится на коммерческом мясо-пептонном бульоне. Температурный оптимум для культивирования биопрепарата на основе фага *Vmeg-16* УлГАУ – 36 ± 1 °С. Оптимальное соотношение бактериофага *Vmeg-16* УлГАУ и индикаторного штамма *Bacillus megaterium* 182 – 1:1, т.е. 0,2 мл фага на 0,2 мл индикаторной культуры, время пассажа составляет 6 часов.

Бактериофаг очищаются от бактериальной массы методом фильтрации через мембранный фильтр фирмы Millipore (filter type: 0,22 μ m GV), после чего они разливаются во флаконы по 10 мл без добавления консервирующих веществ. У фага после розлива во флаконы определяется титр литической активности, контролируется его стерильность.

Внешний вид биопрепарата - два флакона со светло-желтой прозрачной жидкостью (цвет засеянной среды) без осадка и посторонних примесей, титр фагов должен быть не ниже 10^7 БОЕ/мл. Дата серии изготовления исчисляется со дня укупоривания флаконов. Биопрепарат хранится 12 месяцев при температуре 2-4 °С.

Библиографический список:

1. Разработка биотехнологических параметров создания бактериофаговых биопрепаратов для деконтаминации микрофлоры, вызывающей порчу пищевого сырья животного происхождения и мясных, рыбных, молочных продуктов (биопроессинг) / 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) биотехнологическими 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 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.
6. 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.
7. 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.

8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. Феоктистова, Н.А. Выделение бациллярных бактериофагов и их селекция/ Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев // *Биология – наука XXI века. Сборник тезисов 23-ой Международной Пушинской школы-конференции молодых ученых*. - 2019. - С. 256.
12. 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.
13. 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.
14. 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.

CHARACTERISTICS OF BASIC COMPONENTS OF PHAGE BIOLOGIC PREPARATION *BACILLUS MEGATERIUM*

Stoletov V.V., Stepochkina Y.A.

Key words: *Bacillus megaterium*, bacteriophages, biologic preparation, properties, lytic activity, specificity, yield.

The article presents the results of research on the biological properties of bacteriophage Bmeg-16 UIGAU, which is the main component of the phage biologic preparation specific for Bacillus megaterium; described are stages of its manufacture and appearance.