

УДК 602.3:579.8

**СЕЛЕКЦИЯ БАКТЕРИОФАГОВ *BACILLUS CEREUS* И
ПОВЫШЕНИЕ ИХ ЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ**

Голякевич О., Гранкина Н., Симурзина О., Палаткина Н.,
Панина Н., студентки 2 курса факультета ветеринарной
медицины

Научные руководители – Феоктистова Н.А., к.б.н., доцент,
Лыдина М.А., к.б.н., старший преподаватель
ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина»

Ключевые слова: *Bacillus cereus*, бактериофаги, селекция, лизис, литическая активность, пассаж, фаголизат.

В статье описана методика селекции специфических бактериофагов *Bacillus cereus*. После проведения многократных серии пассажей на индикаторных культурах и доведения титра каждого из 57 бактериобазов не менее 1×10^9 корпускул в 1 мл. мы укупоривали их в стерильные флаконы и хранили при низкой температуре (4 - 6 °C) без введения консервантов.

Известно, что для подтверждения наличия бактерий *Bacillus cereus* в пищевых продуктах и клинических образцах за рубежом применяют серологические (ИФА) и молекулярно-генетические (ПЦР) методы. Наиболее распространенный (классический) метод идентификации этого вида бацилл основан на выделении чистой культуры на МҮР среде Мозеля – желточный агар с маннитом, полимиксином и феноловым красным, и ее последующем биохимическом тестировании. Однако, нестабильность ферментативных реакций *Bacillus cereus* затрудняют межвидовую дифференциацию бактерий первой морфологической группы рода *Bacillus* и, кроме того, требуют серьезных временных затрат. В связи с этим, вопрос о разработке ускоренного достоверного метода идентификации бактерий *Bacillus cereus* все еще остается актуальным [1-5].

Начиная с 2006 года сначала в США, а потом и в Европе все более широкое распространение получает теория использования бактериофаг-опосредованного биоконтроля в сфере санитарно-эпидемиологических мероприятий, проводимых в сельском хозяйстве, пищевой

промышленности, пунктах общественного питания, ЛПУ и организованных коллективах. W.J. Lee (2011) и J.H. Lee (2012) продемонстрировали возможность включения специфических бактериофагов, литически активных в отношении бактерий *Bacillus cereus*, в процедуры по деkontаминации продуктов питания. В Российской Федерации на сегодняшний день отсутствуют данные о созданных фаговых биопрепаратах, в том числе диагностических, специфичных в отношении бактерий *Bacillus cereus*. Разработка бактериофаговой тест-системы позволит не только ускорить процедуру по идентификации бактерий *Bacillus cereus* в продуктах питания и клинических образцах, но и даст возможность дифференцировать бациллы внутри данного вида на фаговары и фаготипы [6-8].

Выделение «чистых линий» фага проводили путем последовательных пассажей изолированных морфологически однотипных негативных колоний на мясопептонном агаре с перевиванием на мясопептонный бульон. Для этого негативные колонии или участки лизиса отщипывали в пробирки с 4,5 мл МПБ, добавляли по 0,2 мл 18-часовой индикаторной культуры *Bacillus cereus*. Параллельно ставили контроль роста культуры без добавления фага. Засеянные пробирки инкубировали в термостате при 37 °C в течение 4 – 8 часов до образования в контрольной пробирке выраженного помутнения и образовании пленки на поверхности среды. Опытная пробирка должна была визуальнo отличаться от контроля – быть более прозрачной и не иметь пленки на поверхности среды. Затем содержимое пробирки с фагом освобождали от микробных клеток путем центрифугирования при 3000 об/мин в течение 30 минут, с последующим фильтрованием через мембранные фильтры $d = 0,22 - 0,45$ мкм. В качестве основного метода очистки от бактериальных клеток выбрали фильтрование, так как обработка фаголизата хлороформом и температурой не инактивирует бактерий, по причине устойчивости спор к вышеперечисленным факторам (Калдыркаев и соавт., 2009). Полученный фаголизат переносили в стерильную пробирку и использовали для проведения следующего пассирования фага.

Селекцию бактериофагов и повышение их литической активности проводили методом многократного пассирования фага на индикаторной культуре *Bacillus cereus* в соответствии с методикой, описанной и использованной Габриловичем И.М. (1992), Золотухиным С.Н. (1994) и модифицированной Феоктистовой Н.А.[9]. Последовательные разведения фага в мясопептонном бульоне ($10^{-7} - 10^{-10}$) засеивали методом агаровых слоев по Грациа. После инкубирования посевов

при 37 °С через 18 – 20 часов получали изолированные негативные колонии. Одну из таких негативных колоний переносили в пробирку с мясопептонным бульоном, добавляли 0,2 мл индикаторной 18-часовой культуры *Bacillus cereus*. Контролем служила пробирка с мясопептонным бульоном и культурой без фага. Через 4 – 6 часов инкубирования в термостате фаголизат центрифугировали с последующим фильтрованием и вновь исследовали методом агаровых слоев и отбирали колонию, идентичную предыдущей. Таким образом, проводили несколько операций до получения однородных негативных колоний фага. Путем последовательных пассажей типичных негативных колоний фага с соответствующей культурой *Bacillus cereus* проводили не только селекцию фага, но и увеличивали литическую активность бактериофага до титра 1×10^{11} корпускул в 1 мл. Путем пассажей титр фага в лизате может возрасти в сотни тысяч раз. Эту особенность усиления литической активности использовали и для расширения спектра литической активности фага, путем пассирования его на штаммах *Bacillus cereus*, первоначально не лизируемых. В результате чего фаг менял свои свойства, лизируя в дальнейшем не только индикаторную культуру, но и первоначально устойчивый к лизису штамм.

После проведения многократных серии пассажей на индикаторных культурах и доведения титра каждого из 57 бактериобогов не менее 1×10^9 корпускул в 1 мл. мы укупоривали их в стерильные флаконы и хранили при низкой температуре (4 - 6 °С) без введения консервантов.

Дальнейшие наши исследования были посвящены изучению основных биологических свойств выделенных бактериофагов *Bacillus cereus*, знание которых необходимо для отбора фагов с целью конструирования фагового биопрепарата для индикации и идентификации бактерий *Bacillus cereus* в пищевом сырье и продуктах питания.

Библиографический список:

1. Васильев, Д.А. Распространение *Bacillus cereus* и *Bacillus mycoides* в объектах санитарного надзора / Феоктистова Н.А., Калдыркаев А.И., Васильев Д.А. [и др.] // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2014. - № 1 (25). - С. 68-76.
2. Васильев, Д.А. Фагоидентификация бактерий *Bacillus subtilis* и *Bacillus cereus* / Феоктистова Н.А., Калдыркаев А.И., Васильев Д.А. [и др.] // Бактериофаги: теоретические и практические аспекты примене-

ния в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности Материалы Международной научно-практической конференции. – Ульяновск, 2013. - С. 126-131.

3. Калдыркаев, А.И. Разработка системы фаговаров *Bacillus cereus* / Калдыркаев А.И., Феоктистова Н.А., Васильев Д.А. [и др.] // Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения Материалы V Международной научно-практической конференции. – Ульяновск, 2013. - С. 178-185.

4. Калдыркаев, А.И. Биохимические свойства бактерий *Bacillus cereus* / Калдыркаев А.И., Алешкин А.В., Феоктистова Н.А. [и др.] // Биотехнология: реальность и перспективы в сельском хозяйстве/ - Саратов, 2013. - С. 186-188.

5. Калдыркаев, А.И. Разработка системы фаговаров бактерий *Bacillus cereus* для идентификации и мониторинга данного микроорганизма / Калдыркаев А.И., Феоктистова Н.А., Алешкин А.В. // Бактериофаги микроорганизмов значимых для животных, растений и человека. Коллектив авторов под ред. Васильев Д.А., Золотухин С.Н. - Ульяновск, 2013. - С. 211-225.

6. Феоктистова, Н.А. Выделение фагов бактерий вида *Bacillus cereus* / Меркулова Е.В., Феоктистова Н.А., Юдина М.А. [и др.] // Актуальные проблемы инфекционной патологии и биотехнологии Материалы V-й Всероссийской (с международным участием) студенческой научной конференции. Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия. – Ульяновск, 2012. - С. 14-17.

7. Феоктистова, Н.А. Заболевания, вызывает бактериями вида *Bacillus cereus* / Садеева Н.Т., Меркулова Е.В., Феоктистова Н.А. [и др.] // Актуальные проблемы инфекционной патологии и биотехнологии Материалы V-й Всероссийской (с международным участием) студенческой научной конференции. Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия. – Ульяновск, 2012. С. 25-30.

8. Феоктистова, Н.А. Перспективы применения бактериофагов рода *Bacillus* / Феоктистова Н.А., Васильев Д.А., Меркулов А.В. [и др.] // Настоящее и будущее биотехнологии в решении проблем экологии, медицины, сельского, лесного хозяйства и промышленности Научно-практический семинар с международным участием. – Ульяновск, 2011. - С. 136-139.

9. Феоктистова, Н.А. Перспективы применения бактериофагов для индикации и идентификации бактерий вида *Bacillus cereus* в речной воде и рыбе / Васильев Д.А., Феоктистова Н.А., Юдина М.А. [и др.] // Задачи ветеринарной науки в реализации доктрины продовольственной безопасности Российской Федерации. – Ульяновск, 2011. - С. 175-180.

SELECTION OF BACTERIOPHAGES OF *BACILLUS CEREUS* AND INCREASE OF THEIR LYTIC ACTIVITY

Golyakevich O., Grankina N., Simurzina O., Palatkina N., Panina N.

Keywords: *Bacillus cereus*, bacteriophages, selection, лизис, lytic activity, passage, фаголизат.

In article the technique of selection of specific bacteriophages of Bacillus cereus is described. After carrying out repeated series of passages on indicator cultures and finishing a caption of each of 57 bakteriofag not less than 1×10^9 corpuscles in 1 ml. we corked them in sterile bottles and stored at a low temperature (4 - 6 °C) without introduction of preservatives.

УДК 602.3:579.8

ПРИМЕНЕНИЕ ФАГОВ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ БАКТЕРИЙ *BACILLUS CEREUS*

Голякевич О., Гранкина Н., Симурзина О., Палаткина Н.,
Панина Н. - студентки 2 курса факультета ветеринарной
медицины
Научные руководители – Феоктистова Н.А., к.б.н., доцент,
Лыдина М.А., к.б.н., старший преподаватель
ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина»

Ключевые слова: *Bacillus cereus*, контаминация, пищевые продукты, среда, фаги, колонии, лизис, качество.

Контаминация пищевых продуктов Bacillus cereus - это серьёзная проблема для пищевого производства. Используя строгую родовую и видовую специфичность селекционированных бактериофагов, была отработана схема выделения и ускоренной идентификации бактерий вида Bacillus cereus.