

## ПОДБОР МЕТОДИКИ ВЫДЕЛЕНИЯ БАКТЕРИОФАГОВ *VACILLUS COAGULANS*

Н.А. Феоктистова, кандидат биологических наук, доцент  
Д.А. Васильев, доктор биологических наук, профессор  
С.Н. Золотухин, доктор биологических наук, профессор  
М.А. Лыдина, кандидат биологических наук  
К.В. Белова, студент, К.В. Шокина, студент  
ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина»  
8(8244) 55-95-47, feokna@yandex.ru

**Ключевые слова:** бактерий *Vacillus coagulans*, бактериофаги, почва, выделение, лизогения.

**Аннотация:** описаны методы, направленные на выделение фагов бактерий *Vacillus coagulans*. В результате их применения удалось выделить 8 специфических бактериофагов, используя методику выделения бактериофага из объектов окружающей среды.

**Введение.** Известно, что «плоско-кислую» порчу продуктов питания вызывают термофильные бациллы. Наиболее часто выделяемым возбудителем этого порока, чаще всего встречающегося у плодоовощных консервов, являются представители вида *Vacillus coagulans*. Вышеназванные бактерии являются факультативными анаэробами почвенного происхождения. Например, в томатном соке они растут лучше всего при температуре 54,4-60,0° С. Термоустойчивость спор микроорганизма, вызывающего эту порчу, очень различается в зависимости от штамма бактерий [6].

Выделение новых бактериофагов, специфичных к возбудителю плоско-кислой порчи, и изучение их биологических свойств позволит расширить знания в области биологии фагов, в дальнейшем сконструировать биопрепараты, имеющие практическое значение для индикации и идентификации *Vacillus coagulans* в пищевом сырье и готовых к употреблению продуктов питания [7].

Цель - выделить новые бактериофаги *Vacillus coagulans*.

Для решения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- провести эксперименты по выделению бактериофагов методом индукции штаммов *Vacillus coagulans*;

- провести эксперименты по выделению бактериофагов из объектов окружающей среды.

**Материалы и методы исследований.** Штаммы *Vacillus coagulans* 566, *Vacillus coagulans* 10468, *Vacillus coagulans* 10473 получены из му-

зея НИИЦМиБ ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина».

Выделение бактериофагов проводили с использованием методик, опробованных сотрудниками кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина» [1-4, 8-13].

**Результаты и их обсуждение.** В первой серии опытов на культуры *Vacillus coagulans*, исследуемые как «лизогенные», мы воздействовали индуцирующим фактором (применялось воздействие на бактерии ультрафиолетовых лучей).

По литературным данным при обработке лизогенных культур индуцирующими факторами продукция фага в значительной степени возрастает, потому с помощью этого метода удается выявить фаг в значительно большем проценте случаев, чем при изучении только спонтанной его продукции [10].

В качестве источника ультрафиолетовых лучей применялась бактерицидная лампа, 80 % энергии которой приходится на длину волны 2537 Å. Исследуемые культуры (*Vacillus coagulans*) находились в экспоненциальной фазе роста, разводилась в соотношении 1:100 в фосфатном буфере с pH 7,6. 2 мл взвеси помещали в чашку Петри и облучали в течение 20 (25, 30, 35, 40) секунд на расстоянии 40 (45, 50, 55, 60) см. Облученные культуры засеивались на мясо-пептонный бульон комнатной температуры (20-22 °С) в соотношении 1:100 [5].

Все процедуры производились в полузатемненном помещении с учетом предохранения

облученных бактерий от фотореактивации. Все посеы инкубировали при 37 °С 5 часов, после чего делали высев методом агаровых слоев.

В наших исследованиях не удалось выделить фаги *Bacillus coagulans*, то есть мы не обнаружили перехода профага в свободный фаг у имеющихся в коллекции НИИЦМиБ штаммов по вышеизложенной методике, поэтому дальнейшие исследования были посвящены выделению бактериофагов из объектов внешней среды.

Для проведения исследований мы брали пробы почвы различных территорий Ульяновской, Самарской областей и Республики Татарстан лесной, лесо-степной и степной, почвы различного хозяйственного назначения (огород, грунтовая дорога - улица, двор частного дома), продукты питания (специи, пряности, пробы муки пшеничной, сок томатный, консервы рыбные в томатном соусе и т.п.), водопроводная вода. Всего было использовано 114 проб. Первоначально готовили разведения объекта исследований в мясо-пептонном бульоне в соотношении 1:10, добавляли в концентрации 10<sup>4</sup> КОЕ /мл по 1,0 мл штаммов бактерий *Bacillus coagulans*. Колбы с объектами исследований ставили в термостат на 24 часа при температуре 37 °С. Затем пробы фильтровали через ватно-марлевый фильтр для освобождения от механических примесей. После этого содержимое колбы разливали в стерильные пробирки, центрифугировали при 3000 об./мин в течение 30 минут, далее прогревали в водяной бане при 60-62 °С в течение 45 минут с целью подавления роста грамотрицательных бактерий.

Исследуемые фильтраты исследовали на наличие фага методом нанесения «дорожки» на газон культуры, который был предварительно нанесен на мясо-пептонный агар в чашках Петри и «подсушен» в термостате в течение 35-40 минут. В качестве контроля на газон культуры наносили стерильный мясо-пептонный бульон с целью получения достоверного результата по выявлению присутствия фага в исследуемом субстрате.

**Выводы.** В результате проведенных исследований нами были выделены 8 бактериофагов, специфичных для штаммов *Bacillus coagulans*. Анализ результатов исследований свидетельствуют, что бактериофаги *Bacillus coagulans* не широко распространены в окружающей среде: 114 проб было выделено 8 бактериофагов, 4 из которых из проб почвы, 1 – из томатного сока, 1 - из пробы пшеничной муки и 1 – из пробы водопроводной воды.

Методику выделения бактериофагов из объектов внешней среды мы считаем наиболее перспективной для получения вирулентных фагов с целью создания специфичных фаговых био-препаратов широкого спектра действия в пределах вида.

#### **Библиографический список:**

1. Васильев, Д.А. Разработка параметров постановки реакции нарастания титра фага для индикации бактерий *Bacillus mesentericus* в объектах санитарного надзора / Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин, Н.А. Феоктистова [и др.] // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2012. – № 3 (19). – С.69–73.
2. Васильев, Д.А. Характеристика биологических свойств бактериофагов вида *Bacillus subtilis* / Д.А. Васильев Д.А., Н.А. Феоктистова М.А. Юдина [и др.] // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2011. - № 1. - С. 79-83.
3. Васильев, Д.А. Биосенсорная детекция бактерий рода *Bacillus* в молоке и молочных продуктах для предупреждения их порчи / Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин, Н.А. Феоктистова [и др.] // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2013. - № 4 (24). - С. 36-43.
4. Калдыркаев, А.И. Разработка системы фаговаров бактерий *Bacillus cereus* для идентификации и мониторинга данного микроорганизма / А.И. Калдыркаев, Н.А. Феоктистова, А.В. Алешкин // В книге: «Бактериофаги микроорганизмов значимых для животных, растений и человека». - Ульяновск, 2013. - С. 211-225.
5. Капырина, Н.А. Идентификация возбудителя листериоза с помощью бактериофага / Н.А. Капырина, И.А. Бакулов // Симпозиум «Профилактика и меры борьбы с лептоспирозом и листериозом с/х животных». Новочеркасск, 1972. - С. 76-78.
6. Климушкин, Е.И. Биоиндикация содержания бактерий *Bacillus coagulans* в пищевых продуктах / Е.И. Климушкин, Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев [и др.] // Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Экология родного края: проблемы и пути их решения». – Киров: Вятский ГАУ, 2014. – С. 377-379.

7. Кудряшова, К.В. Выделение фагов бактерий *Bacillus coagulans* // К.В. Кудряшова, Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев [и др.] // В сборнике: Материалы Международной научно-практической конференции «Биотехнология: перспективы и реальность». – Саратов: Издательский центр «Наука», 2014. – С. 26-28.
8. Садеева, Н.Т. Выделение фагов бактерий вида *Bacillus cereus* / Н.Т. Садеева, Н.А. Феоктистова, М.А. Юдина [и др.] // В сборнике: Актуальные проблемы инфекционной патологии и биотехнологии: материалы V-й Всероссийской (с международным участием) студенческой научной конференции. – Ульяновск: ГСХА, 2012. - С. 14-17.
9. Феоктистова, Н.А. Перспективы применения бактериофагов рода *Bacillus* / Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев, М.А. Юдина [и др.] // В сборнике: Настоящее и будущее биотехнологии в решении проблем экологии, медицины, сельского, лесного хозяйства и промышленности Научно-практический семинар с международным участием. – Ульяновск: УлГУ, 2011. - С. 136-139.
10. Феоктистова, Н.А. Выделение и изучение биологических свойств бактериофагов рода *Proteus*, конструирование на их основе биопрепарата и разработка параметров практического применения / автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова. - Саратов, 2006. – С. 13.
11. Феоктистова, Н.А. Методы выделения бактериофагов рода *Bacillus* / Н.А. Феоктистова, В.А. Макеев, М.А. Юдина [и др.] // Вестник ветеринарии. - 2011. - Т. 59. - № 4. - С. 88-89.
12. Феоктистова, Н.А. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов бактерий *Bacillus subtilis* / Н.А. Феоктистова // В книге: «Бактериофаги микроорганизмов значимых для животных, растений и человека». - Ульяновск, 2013. - С. 186-197.
13. Юдина, М.А. Разработка фагового препарата *Bacillus mesentericus* и область его практического применения / автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова. - Саратов, 2013. – С. 8.

## **SELECTION OF THE TECHNIQUE OF ALLOCATION OF BACTERIOPHAGES OF BACILLUS COAGULANS**

N. A. Feoktistova, D. A. Vasilyev, S. N. Zolotukhin, M. A. Lydina, K.V. Belova, K.V. Shokina

**Keywords:** *bacteria Bacillus coagulans, bacteriophages, soil, allocation, lizogeniye.*

*Summary: the methods directed on allocation of phages of bacteria of Bacillus coagulans are described. As a result of their application it was succeeded to allocate 8 specific bacteriophages, using a technique of allocation of a bacteriophage from objects of environment.*