

КОНСТРУИРОВАНИЕ ФАГОВОГО БИОПРЕПАРАТА *BACILLUS MEGATERIUM* ДЛЯ ДЕКОНТАМИНАЦИИ ПИЩЕВОГО СЫРЬЯ И ПРОДУКТОВ ПИТАНИЯ

Балтаева Г.З., студентка

тел.: 8(8422) 55-95-47, jandaneziz@gmail.com

Феоктистова Н. А., кандидат биологических наук, доцент

тел. 8(8422) 55-95-47, feokna@yandex.ru

ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ

Ключевые слова: бактериофаги, *Bacillus megaterium*, штаммы, выделение

Подобраны производственно-перспективные штаммы для конструирования биопрепарата на основе фагов Вm-1 и Вm-7 серии УГСХА, индикаторные штаммы - бактерии *Bacillus megaterium* 182. Фаги характеризовались высокими титрами литической активности ($6,2 \times 10^9 \pm 0,8 \times 10^9$ и $4,2 \times 10^9 \pm 1,3 \times 10^9$) БОЕ/мл, соответственно) и максимально широким совместным спектром литического действия – 91 %, сохраняли литическую активность в пределах 10^7 в течение 12 месяцев при хранении в условиях 2-4 °С.

Создание отсутствующего на сегодняшний день в Российской Федерации специфического биопрепарата на базе бактериофагов активных в отношении *Bacillus megaterium*, позволит в сжатые сроки проводить надежную идентификацию и индикацию данного вида бактерий, вызывающих порчу продуктов питания, в объектах санитарного надзора.

Введение. Бактерии *Bacillus megaterium* – почвенные сапрофиты, факультативные анаэробы, активно развивающиеся в диапазоне температур 28-37 °С. Вышеназванный вид бацилл современная микробиология относит к почвенным сапрофитам, его ближайшим родственником является патогенный для человека вид - *Bacillus cereus*, фитопатогенный - *Bacillus pumilus*. Исследование по 16S рРНК каталогизации бактерий данного рода показало, что *Bacillus subtilis* и другие эллипсоидные спорообразующие виды: *Bacillus cereus*,

Bacillus megaterium, *Bacillus pumilus* формируют когерентный кластер. Генетическое родство вышеназванных микроорганизмов подразумевает и наличие аналогичных токсигенных свойств, проявляющихся при определенных условиях. До настоящего времени влияние спорных аэробных микроорганизмов на качество и сроки хранения молочных и молкосодержащих продуктов считалось незначительным, в связи с отсутствием в данных продуктах свободного кислорода и использования низкотемпературных режимов хранения. Научно-исследовательская работа, проводимая в отделе микробиологии ГНУ ВНИИМС Россельхозакадемии в последние годы, позволила установить, что спорные факультативно анаэробные микроорганизмы, *Bacillus megaterium* в частности, являются значимыми микроорганизмами порчи для молока-сырья и молочных продуктов. По литературным данным, бактерии *Bacillus megaterium* сложно поддаются идентификации на основе фенотипических характеристик. В настоящее время в бактериологических лабораториях на территории Российской Федерации идентификация *Bacillus megaterium*, основана на выделении чистой культуры микроорганизма и изучении его биохимических свойств. Этот метод трудоемок и не достаточно эффективен из-за выраженного полиморфизма ферментативных свойств данного вида бактерий [1-3].

В этой связи вызывает интерес практическое применение бактериофагов в процедуре биоконтроля продуктов питания, в том числе и молочных, подразумевающее их использование в деконтаминационной обработке пищевого сырья и оборудования производств, а также и в диагностических целях для идентификации бацилл, вызывающих порчу продуктов питания. Создание отсутствующего на сегодняшний день в Российской Федерации специфического биопрепарата на базе бактериофагов активных в отношении *Bacillus megaterium*, позволит в сжатые сроки проводить надежную идентификацию и индикацию данного вида бактерий в объектах санитарного надзора.

Объекты и методы исследований. 22 штамм бактерий *Bacillus megaterium*, из них 1 референс-штамм *Bacillus megaterium* 182 из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина», 21 штамм был выделен в процессе исследования из проб пищевых продуктов и других объектов санитарного надзора. Штаммы бактерий *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus mycoides*, также были получены из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина». Объекты исследований - пробы почвы Приволжского Федерального округа различного хозяйственного назначения. Штаммы бактериофагов – 18 изолятов бактериофагов *Bacillus megaterium*, выделены из проб почвы Приволжского Федерального округа. Выделение и изучение биологических свойств бактериофагов проводили классическими методами [4-8].

Результаты исследований и их обсуждение. Первоначально, мы исследовали штаммы *Bacillus megaterium* как потенциально лизогенные. В первой серии экспериментов мы использовали методику выделения бактериофагов бацилл без воздействия на них индуцирующего фактора.

Во второй серии экспериментов на культуры *Bacillus megaterium*, исследуемые как «лизогенные», воздействовали индуцирующим фактором (воздействие на бактерии ультрафиолетовых лучей при помощи бактерицидной лампы, 80 % энергии которой приходится на длину волны 2537 Å). Полученный фильтрат исследовали на наличие фага на имеющихся культурах *Bacillus megaterium* методом агаровых слоев. В исследованиях не наблюдалось естественной и искусственной лизогенности исследуемых штаммов *Bacillus megaterium*, т.е. профаги, интегрированные с хромосомой микробной клетки, выявлены не были.

Цель третьей серии экспериментов - выделение бактериофагов из объектов внешней среды. По литературным данным, наиболее эффективно в качестве источника выделения бактерий рода *Bacillus* использовать пробы почвы, так как

они являются почвенными сапрофитами [6-7]. При исследовании 384 проб почвы различного хозяйственного назначения двух областей Приволжского федерального округа, нам удалось выделить 18 изолятов фагов бактерий *Bacillus megaterium*. Селекцию фагов проводили десятикратным пассированием изолированных негативных колоний на мясо-пептонном агаре с перевиванием на мясо-пептонный бульон. Фаги очищали от бактериальных клеток через мембранные фильтры фирмы Millipore (filter type: 0,22 μm GV) Все фаголизаты укупоривались в стерильные флаконы и хранили при низкой температуре (4-6 °С) не используя консервантов.

Вторым этапом исследований было изучение биологических свойств выделенных бактериофагов *Bacillus megaterium*. Важнейшей характеристикой фага, входящего в состав биопрепарата для индикации и идентификации бактерий, является его специфичность в пределах вида. Изучение специфичности 18 выделенных изолятов бактериофагов *Bacillus megaterium* мы проводили на культурах гомологичного рода: *Bacillus cereus* – 105 штаммов, *Bacillus thuringiensis* – 4 штамма, *Bacillus subtilis* – 35 штаммов, *Bacillus mesentericus (pumilus)* – 15 штаммов, *Bacillus mycoides* – 14 штаммов. Полученные нами бактериофаги строго специфичны в пределах вида. Литическую активность выделенных бактериофагов оценивали по их способности вызывать лизис бактериальной культуры на плотной питательной среде методом агаровых слоев. Эксперименты проводили трехкратно для статистической обработки. Эталонные культуры выращивали на бульоне в течение 18 часов. Учет результатов проводили через 18 часов инкубирования посевов в термостате при 37 °С. Опыты демонстрируют, что наиболее широким спектром литического действия по отношению к изучаемым культурам обладают штаммы фагов Вm-1 УГСХА и Вm-7 УГСХА, совокупный процент лизиса составил приблизительно 91 % (табл. 1). Исследования проводили методом нанесения фага на газон культуры – «стекающей каплей».

Таблица 1 – Характеристика выделенных фагов бактерий *Bacillus megaterium*

| № | Название фага | Хар-ка негативных колонии, мм в диаметре | Спектр литического действия на 22 штаммах, % | Литическая активность, БОЕ /мл |
|-----|-----------------------|--|--|---|
| 1. | <i>B meg-1 УГСХА</i> | 2,3±0,3 | 66,7 | 6,2x10 ⁹ ± 0,8x10 ⁹ |
| 2. | <i>B meg-2 УГСХА</i> | 1,9±0,2 | 41,7 | 2,3x10 ⁶ ± 0,7x10 ⁶ |
| 3. | <i>B meg-3 УГСХА</i> | 1,1±0,2 | 16,7 | 1,5x10 ⁹ ± 0,4x10 ⁹ |
| 4. | <i>B meg-4 УГСХА</i> | 1,5±0,1 | 50,0 | 7,8x10 ⁸ ± 0,2x10 ⁸ |
| 5. | <i>B meg-5 УГСХА</i> | 1,8±0,2 | 75,0 | 1,6x10 ⁸ ± 0,6x10 ⁸ |
| 6. | <i>B meg-6 УГСХА</i> | 0,9±0,2 | 41,7 | 2,2x10 ⁸ ± 0,4x10 ⁸ |
| 7. | <i>B meg-7 УГСХА</i> | 1,6±0,4 | 58,3 | 4,2x10 ⁹ ± 1,3x10 ⁹ |
| 8. | <i>B meg-8 УГСХА</i> | 1,7±0,2 | 25,0 | 1,8x10 ⁷ ± 0,2x10 ⁷ |
| 9. | <i>B meg-9 УГСХА</i> | 1,2±0,2 | 15,0 | 1,4x10 ⁵ ± 0,2x10 ⁵ |
| 10. | <i>B meg-10 УГСХА</i> | 0,7±0,3 | 30,0 | 1,2x10 ⁹ ± 0,8x10 ⁹ |
| 11. | <i>B meg-11 УГСХА</i> | 2,0±0,2 | 45,0 | 4,2x10 ⁶ ± 0,2x10 ⁶ |
| 12. | <i>B meg-12 УГСХА</i> | 0,9±0,4 | 52,0 | 3,5x10 ⁷ ± 0,5x10 ⁷ |
| 13. | <i>B meg-13 УГСХА</i> | 1,3±0,2 | 20,0 | 2,8x10 ⁷ ± 0,7x10 ⁷ |
| 14. | <i>B meg-14 УГСХА</i> | 0,8±0,3 | 35,0 | 1,0x10 ⁵ ± 0,3x10 ⁵ |
| 15. | <i>B meg-15 УГСХА</i> | 2,2±0,2 | 24,6 | 2,5x10 ⁷ ± 0,5x10 ⁷ |
| 16. | <i>B meg-16 УГСХА</i> | 1,4±0,1 | 22,3 | 3,8x10 ⁶ ± 1,2x10 ⁶ |
| 17. | <i>B meg-17 УГСХА</i> | 2,1±0,2 | 11,7 | 2,5x10 ⁸ ± 1,1x10 ⁸ |
| 18. | <i>B meg-18 УГСХА</i> | 1,7±0,1 | 27,0 | 1,4x10 ⁷ ± 0,4x10 ⁷ |

В результате экспериментов нами выделено и селекционировано 18 изолятов фагов из объектов внешней среды активных по отношению к бактериям *Bacillus megaterium*. Изучены их основные биологические свойства (специфичность, спектр литического действия, литическая активность). Полученные результаты свидетельствуют, что выделенные бактериофаги *Bacillus megaterium* обладают разной литической активностью в диапазоне от $1,4 \times 10^5 \pm 0,2 \times 10^5$ до $6,2 \times 10^9 \pm 0,8 \times 10^9$ корпускул в 1 мл фага. Для конструирования биопрепарата было отобрано два фага Вm-1 и Вm-7 серии УГСХА, у которых были самые высокие показателями литической активности и максимально широкий совместный спектр литического действия. Последующие эксперименты были направлены на изучение изменения литической активности укупоренных во флаконы бактериофагов Вm-1 и Вm-7 серии УГСХА, хранящихся при температуре 2-4 °С в течение 12 месяцев. Установлено, что в течение 12 месяцев показатели литической активности исследуемых бактериофагов Вm-1 УГСХА и

Vm-7 УГСХА уменьшились на 2 порядка и составили $1,3 \times 10^7 \pm 0,1 \times 10^7$ и $0,7 \times 10^7 \pm 0,1 \times 10^7$ БОЕ/мл фаголизата, соответственно. Экспериментально установлено, что пассирование бактериофагов на исходном штамме бактерий *Bacillus megaterium* в течение 7 пассажей методом агаровых слоев восстанавливает литическую активность бактериофагов на 1 порядок.

Выводы. Подобраны производственно-перспективные штаммы для конструирования биопрепарата на основе фагов Vm-1 и Vm-7 серии УГСХА, индикаторные штаммы - бактерии *Bacillus megaterium* 182. Фаги характеризовались высокими титрами литической активности ($6,2 \times 10^9 \pm 0,8 \times 10^9$ и $4,2 \times 10^9 \pm 1,3 \times 10^9$) БОЕ/мл, соответственно) и максимально широким совместным спектром литического действия – 91 %, сохраняли литическую активность в пределах 10^7 в течение 12 месяцев при хранении в условиях 2-4 °С.

Вышеназванные бактериофаги подходят для конструирования биопрепарата на основе консорциума бактериофагов *Bacillus megaterium*, который в перспективе будет использоваться для деконтаминации пищевого сырья и продуктов питания.

Список использованных источников литературы

1. Slepecky, R.A. The Genus *Bacillus*-Nonmedical / R.A. Slepecky, H.T. Nemphill // Prokaryotes. – 2006. - № 4. – P. 530–562.
2. Петрукова, Н.А. Биоиндикация содержания бактерий *Bacillus megaterium* в молоке и молочных продуктах / Н.А. Петрукова, Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев [и др.] // «Экология родного края: проблемы и пути их решения»: материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. – Киров, 2014. - С. 375-377.
3. 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.

4. 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.

5. Романова, Н.А. Сравнительная эффективность методов выделения фагов бактерий *Bacillus megaterium* / Н.А. Романова, Н.А. Феоктистова, С.Н. Золотухин [и др.] // Вестник ветеринарии. - 2013. - № 1 (64). - С. 26-27.

6. Феоктистова, Н.А. Выделение бактерий вида *Bacillus mesentericus* из объектов санитарного надзора / Н.А. Феоктистова, М.А., Юдина, Д.А. Васильев [и др.] // Молодежь и наука XXI века: материалы III-й Международной научно-практической конференции молодых ученых. - Ульяновск: ГСХА, 2010. - С. 82-84.

7. 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. 6.

8. Ефрейторова, Е.О. Биологические свойства бактериофагов *Citrobacter*/ Е.О. Ефрейторова, Л.П. Пульчеровская, С.Н. Золотухин, Д.А. Васильев. - Бактериофаги: Теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности Материалы Международной научно-практической конференции - Ульяновск, 2013. - Том 1. - С. 98-103.

**DESIGN OF PHAGE BIOPREPARATION BACILLUS MEGATERIUM
FOR DECONTAMINATION OF FOOD RAW MATERIALS AND FOOD
PRODUCTS**

Baltayeva G.Z., Feoktistova N. A.

Keywords: bacteriophages, Bacillus megaterium, strains, isolation

Production-promising strains are selected for design of biopreparation based on Bm-1 phages and Bm-7 of UGSHA series, indicator strains - bacteria *Bacillus megaterium* 182. The phages were characterized by high titers of lytic activity ($6.2 \times 10^9 \pm 0.8 \times 10^9$ and $4.2 \times 10^9 \pm 1.3 \times 10^9$) BOE/ml, respectively) and the broadest joint spectrum of lytic action - 91%, maintaining the lytic activity within 10^7 for 12 months under storage conditions of 2-4 °C.

The creation of a specific biopreparation on the basis of bacteriophages active against *Bacillus megaterium*, which is not currently available in the Russian Federation, will allow to carry out in a short time reliable identification and indication of this type of bacteria causing food damage in the objects of sanitary supervision.