

УДК 619:578

ПОИСК ФАГОВ БАКТЕРИЙ ВИДА *BACILLUS SUBTILIS* SEARCH OF PHAGES OF BACTERIA OF TYPE *BACILLUS SUBTILIS*

Н.А. Феоктистова, А.Х. Мустафин, А.И. Калдыркаев, Д.А. Васильев
N.A. Feoktistova, A.H. Mustafin, A.I. Kaldirkaev, D.A. Vasiliev

Научно-исследовательский инновационный центр микробиологии и биотехнологии Ульяновской ГСХА
The research innovation centre of microbiology and biotechnology
Ulyanovsk state academy of Agriculture

In article ways of allocation of phages of bacteria of type Bacillus subtilis from objects of an environment, from a prophage, from cultures of bacteria Bacillus subtilis without influence on them of the inducing factor are described.

Первым этапом нашей работы была попытка выделить бактериофаги бактерий вида *Bacillus subtilis* из имеющихся 35 штаммов бактерий вида *Bacillus subtilis*. Мы рассчитывали обнаружить лизогенные культуры, так как бактериофаги, выделенные из таких культур, обладают более выраженной специфичностью [2,3].

В первой серии опытов использовали методику, предложенную С. Лурия, Д. Дарнеллом [4], для выделения бациллярных бактериофагов из бактерий без воздействия на них индуцирующего фактора.

Сущность методики: в 1,0 литровую колбу, содержащую 0,5 литра мясопептонного бульона, добавляли по 1,0 мл 18 часовых культур всех имеющихся у нас штаммов *Bacillus subtilis*. Колбу ставили в термостат при 33 °С на 24 часа. Затем смесь бактерий центрифугировали при 2000 об./мин в течение 30 минут, затем прогревали на водяной бане при 78-80 °С в течение 30 минут. Надосадочную жидкость исследовали на наличие фага методом агаровых слоев по Грациа [5] на имеющихся у нас штаммах *Proteus*.

Метод посева агаровыми слоями по Грациа. Накануне опыта по чашкам разливали 1,5 % мясопептонный агар. Перед использованием чашки подсушивали в термостате 15-20 минут. Индикаторные выращивались в условиях термостата в течение 18-20 часов при 33 °С на мясо-пептонном бульоне. Стерильно подготовленный 0,7 % мясопептонный агар, разлитый в пробирки по 2,5 мл, расплавляли и остужали до 46-48 °С. Исследуемый на наличие бактериофага субстрат в количестве 1,0 мл помещали в 2,5 мл 0,7 % мясопептонного агара, туда же вносили 0,2 мл индикаторной культуры. Все быстро и тщательно перемешивали вращением пробирки в ладонях и выливали на поверхность 1,5 % МПА. Смесь осторожными движениями распределяли по поверхности мясопептонного агара, чашки оставляли на горизонтальной поверхности с приоткрытыми крышками на 30 минут до полного застывания агара, затем инкубировали в термостате при 33 °С в течение 18-20 часов.

В результате проведенных исследований было установлено, что выделение бактериофагов из культур бактерий *Bacillus subtilis* без воздействия на них индуцирующего фактора не приводило к появлению свободного фага.

Во второй серии опытов на культуры, исследуемые как «лизогенные», воздействовали индуцирующим фактором, затем фильтровали через бактериальные свечи Шамберлана L-3 (Ревенко, 1978). В качестве индуцирующего фактора применяли воздействие на бактерии ультрафиолетовыми лучами, в течение 15, 30 и 45 секунд при помощи прибора «Изольда» с ртутной лампой ДРБ8, 18,0 %, мощности которой приходится на область 254 нм.

Полученный фильтрат исследовали на наличие фага на имеющихся культурах *Bacillus subtilis* методом агаровых слоев по Грациа.

Проведя эти исследования, нам не удалось выделить бактериофаги бактерий вида *Bacillus subtilis* из имеющихся у нас штаммов бактерий *Bacillus subtilis*.

В наших исследованиях мы не обнаружили перехода профага в свободный фаг у имеющихся штаммов бактерий вида *Bacillus subtilis* по вышеизложенным методикам, поэтому дальнейшие исследования были посвящены выделению бактериофагов *Bacillus subtilis* из объектов внешней среды по методике Л.И. Адельсона. Для проведения исследований мы брали пробы пищевых продуктов, почвы, сточных вод из частных хозяйств Ульяновской и Самарской областей.

Сточные воды фильтровали через бумажный фильтр для освобождения от механических примесей. Навеску почвы разводили для исследований в соотношении 1:10 физиологическим раствором. Аналогично мы готовили для исследования пробы пищевых продуктов: первоначально пробу растирали в ступке при помощи пестика, затем делали разведения в соотношении 1:10 физиологическим раствором. В 1,0 литровую колбу, содержащую стерильный, МПБ в количестве 0,5 литра, вносили 50,0 мл фильтрата сточных вод или пробу почвы (пищевых продуктов) в концентрации 10^{-1} и по 1,0 мл всех имеющихся у нас штаммов бактерий *Bacillus subtilis*. Таким образом, каждая проба испытывалась на наличие фагов ко всем имеющимся культурам *Bacillus subtilis*. Колбу помещали в термостат и инкубировали в течение 24 часов при 33 °С. После этого содержимое колбы разливали в стерильные пробирки, центрифугировали при 1000 об./мин в течение 30 минут, затем прогревали в водяной бане при 78-80 °С в течение 30 минут. Исследуемые фильтраты исследовали методом агаровых слоев по Грациа. Чашки ставились в термостат на 18-20 часов при 33 °С. Наличие негативных колоний или зон лизиса на газоне роста индикаторной культуры свидетельствовало бы о присутствии в исследуемом материале бактериофага.

Негативные колонии отвивали в МПБ с индикаторными культурами. Для этого в две пробирки с 4,5 мл мясопептонного бульона (рН 7,4-7,6) добавляли стерильной пипеткой 0,2 мл 18 - часовой бульонной индикаторной культуры *Bacillus subtilis*. В одну из пробирок отвивали негативную колонию, а вторая пробирка служила контролем. Посевы помещали в термостат и инкубировали их при 33 °С до выраженного помутнения контроля. Затем содержимое опытной пробирки освобождали от микробных клеток прогреванием в водяной бане при 78-80 °С в течение 30 минут. Прогретый фильтрат переносили стерильной пипеткой в пробирку и использовали для проведения пассирования фага. Для получения чистой линии фага проводили до десяти пассажей из изолированных негативных колоний. В результате исследований 10 проб сточных вод, 32 проб почвы и 40 проб пищевых продуктов нам удалось по указанной схеме выявить 22 изолята фагов.

В ходе проведенных исследований бактериофаги субтилиса были выделены в 1 пробе пищевых продуктов (изучались специи, мясные и молочные продукты, мука, хлебобулочные изделия), 8 пробах сточных вод частных хозяйств Ульяновской и Самарской областей и из 13 проб почвы, взятых в частных хозяйствах Ульяновской и Самарской областей.

Как показали результаты исследований, использование методики выделения бактериофагов из объектов внешней среды, разработанной Л.И. Адельсоном (1962), дало наилучшие результаты.

Литература

1. Адельсон Л.И. Бактериофаги, активные по отношению к энтеропатогенным кишечным палочкам // Вопросы микробиологической диагностики и бактериофагии. – М., 1962. – С. 184-194.

2. Бабков В.В., Ленц Э.К. О лизогении среди энтеропатогенных кишечных палочек серологических групп O111: B4, O26:B6 и O124; B17 // Проблемы бактериофагии и биологии кишечных бактерий: Сб. кафедры микробиологии 1 Лен. Мед. ин-та им. акад. И.П. Павлова. – Л., 1973. – С.163.
3. Жугова Т.Ч. Бактериофаги *Yersinia enterocolitica*: // Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Минск, 1985. – 20с.
4. Лурия С., Дарнелл Д. Общая вирусология – М.: Мир, 1970. – С.36-47.
5. Ревенко И.П. Бактериофаги и их использование в ветеринарной практике. – Киев: Урожай, 1978. – С. 41-88.

УДК 619:578

**БАКТЕРИИ ВИДА *BACILLUS MESENTERICUS* – ВОЗБУДИТЕЛИ ПИЩЕВЫХ
ОТРАВЛЕНИЙ**
**BACTERIA OF TYPE *BACILLUS MESENTERICUS* – ACTIVATORS OF FOOD
POISONINGS**

Н.А. Феоктистова, М.А. Юдина, Д.А. Васильев, И.Р. Хусаинов
N.A. Feoktistova, M.A. Udina, D.A. Vasiliev, I.R. Husainov

**Научно-исследовательский инновационный центр микробиологии и
биотехнологии Ульяновской ГСХА**
The research innovation centre of microbiology and biotechnology
Ulyanovsk state academy of Agriculture

*In article literary data on infection of food stuffs with bacteria of type *Bacillus mesentericus* are analyzed, or the potato stick, capable to cause food poisonings the person.*

В последнее время очень актуальным становится вопрос о здоровой и полезной пище, о способах самозащиты от недобросовестных производителей продуктов питания, о методиках «обезвреживания» еды. Популярные телевизионные передачи много рассказывают о некоторых микроорганизмах, контаминирующих пищевые продукты, названия которых на данный момент знакомы многим рядовым потребителям, например: сальмонелла, кишечная палочка, клостридия ботулинус. Но остается большая группа микроорганизмов, которая не так широко известна рядовому потребителю, но может привести его не только на больничную койку, но и «отправить на тот свет»....

Целью наших исследований является анализ данных по контаминации продуктов питания бактериями вида *Bacillus mesentericus*, или картофельной палочкой.

«*Bacillus mesentericus* представляет собой крупную грамположительную палочку с закругленными концами и спорой, расположенной в центре клетки. На мясо-пептонном агаре образуют колонии с морщинистой слизистой поверхностью. По ферментативным свойствам имеет сходство с сенной палочкой (*Bacillus subtilis*), поэтому их объединяют в группу картофельно-сенных бацилл. Vegetативные клетки подвижны, грамположительны, образуют овальные споры, при этом клетки не раздуваются, а сохраняют свою цилиндрическую форму. Колонии желто-бурые, сухие, морщинистые. На поверхности жидких сред картофельная палочка образует мощную складчатую пленку, на ломтиках картофеля - складчатый налет (отсюда название). Желатину разжижает, молоко подщелачивает и пептонизирует, образует кислоту из глюкозы, сахарозы и мальтозы, крахмал не разлагает. Картофельная палочка широко распространена в природе (в почве, пищевых продуктах и пр.).