
**ВЫДЕЛЕНИЕ ФАГОВ БАКТЕРИЙ *BACILLUS CEREUS*, *BACILLUS MESENTERICUS*, *BACILLUS MYCOIDES*, *BACILLUS MEGATERIUM*
ISOLATION OF PHAGES OF BACTERIA *BACILLUS CEREUS*, *BACILLUS MESENTERICUS*, *BACILLUS MYCOIDES*, *BACILLUS MEGATERIUM***

**Феоктистова Н.А., Калдыркаев А.И., Юдина М.А.,
Макеев В.А., Наговицын Е., Васильев Д.А.
ФГБОУ ВПО «Ульяновская государственная
сельскохозяйственная академия», Россия
Научно-исследовательский инновационный центр
микробиологии и биотехнологии
feokna@yandex.ru**

Ключевые слова: бактерий рода *Bacillus* (*Bacillus cereus*, *Bacillus mesentericus*, *Bacillus mycooides*, *Bacillus megaterium*), бактериофаги, почва, выделение.

*В статье описаны методики выделения фагов бактерий видов *Bacillus cereus*, *Bacillus mesentericus*, *Bacillus mycooides*, *Bacillus megaterium*. В результате их применения удалось выделить 21 бактериофага, используя методику выделения бактериофагов из объектов окружающей среды.*

В настоящий момент идентификация бактерий рода *Bacillus* (*Bacillus cereus*, *Bacillus mesentericus*, *Bacillus mycooides*, *Bacillus megaterium*), вызывающих порчу пищевых продуктов и способных вызывать пищевые отравления, основана бактериологических методах исследования или ПЦР. Это в одном случае длительные , а в другом – материалоемкие технологии. Применение бактериофагов для индикации и идентификации вышеназванных бацилл вытекает из их специфичности действия, которая может быть настолько выражена, что позволяет дифференцировать не только отдельные виды, но и серологически неотличимые штаммы в пределах одного вида [5].

В природных условиях фаги встречаются в тех местах, где есть чувствительные к ним бактерии. Чем богаче тот или иной субстрат (почва, вода, выделения человека и животных и т. д.) микроорганизмами, тем в большем количестве в нем встречаются соответствующие фаги. Так, фаги, лизирующие клетки всех видов почвенных микроорганизмов, находятся в почвах. Особенно богаты фагами черноземы и почвы, в которые вносились органические удобрения. Фаги, активные против разных видов кишечной, дизентерийной, тифозной и паратифозной палочек, часто встречаются в содержимом кишечника человека и животных, сточных водах и загрязненных водоемах. Фаги фитопатогенных микроорганизмов успешнее всего выделяются из остатков растений, пораженных этими микробами [2].

Цель и задачи исследования. Цель - выделить фаги бактерий видов *Bacillus cereus*, *Bacillus mesentericus*, *Bacillus mycooides*, *Bacillus megaterium*, вызывающих порчу пищевых продуктов. При проведении исследований используются несколько ме-

тодик выделения бактериофагов:

- выделение фагов из культур без воздействия на них индуцирующего фактора,
- выделение фагов из культур с использованием индуцирующего фактора,
- выделение фагов из объектов внешней среды.

Материал и методы исследования. Референс-штаммы *Bacillus cereus* 2527, *Bacillus cereus* 8035, *Bacillus cereus* 96, *Bacillus mesentericus* 66, *Bacillus mycoides* 537, *Bacillus megaterium* 182, полученные из музея НИИЦМиБ ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА». Мясопептонный бульон, мясопептонный агар. Холодильники бытовые, термостаты ТС-80М-2, центрифуги лабораторные ОПн-8УХЛ4,2 и ЦЛС-3; бактерицидная лампа, 80 % энергии которой приходится на длину волны 2537 Å; весы чашечные с разновесами, автоклав, сушильный шкаф, машина для изготовления ватных пробок, водяная баня, колбы мерные емкостью 50 см³; пипетки мерные на 1,0; 2,0 см³; чашки Петри, пробирки, стандарты мутности на 0,5 и 1,0 млрд. микробных клеток.

Результаты и выводы исследований.

В первой серии опытов использовали методику, предложенную С. Лурия, Д. Дарнеллом [3], для выделения бациллярных бактериофагов из бактерий без воздействия на них индуцирующего фактора. При изучении явления бактериофагии исследователи обратили внимание на то, что иногда встречаются культуры микроорганизмов, которые содержат фаги, хотя на эти культуры фагами и не воздействовали. Явление фагоносительства получило название лизогении. Оно было описано одним из основоположников учения о бактериофагах - Д.Эреллем, который считал, что такие культуры загрязняются фагом извне [2].

Сущность методики: в 1,0 литровую колбу, содержащую 0,5 литра мясопептонного бульона, добавляли 1,0 мл 18 часовой культуры рода *Bacillus* (*Bacillus mesentericus* 66, *Bacillus cereus* 2527, *Bacillus cereus* 8035, *Bacillus cereus* 96, *Bacillus mycoides* 537, *Bacillus megaterium* 182). Колбу ставили в термостат при 37 °С на 24 часа. Затем смесь бактерий центрифугировали при 3000 об./мин в течение 30 минут, затем прогревали на водяной бане при 80 °С в течение 45 минут. Надосадочную жидкость исследовали на наличие фага методом агаровых слоев по Грациа [4] на исходном штамме бактерий.

Метод агаровых слоев. 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 37 °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 мясопептонного агара, затем инкубировали в термостате при 37 °С в течение 18 часов.

В результате проведенных исследований было установлено, что выделение бактериофагов из культур бактерий *Bacillus cereus*, *Bacillus mesentericus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus megaterium* без воздействия на них индуцирующего фактора не приводило к проявлению свободного фага. Мы пытались бациллярную клетку экс-

периментально сделать лизогенной. Такой эксперимент помог бы нам выяснить механизмы процесса, благодаря которому клетка становится лизогенной.

Известно, что при воздействии на клетку умеренным фагом часть популяции клеток лизируется, а другая часть становится лизогенной. При этом фаг адсорбируется клеткой и его нуклеиновая кислота проникает внутрь клетки. Однако, в отличие от продуктивной инфекции, вызываемой вирулентным фагом, при лизогенизации нуклеиновая кислота фага связывается с ядерным аппаратом клетки (хромосомой) и остается в ней в виде профага [2].

Образование лизогенными культурами зрелых частиц фага получило название спонтанной индукции. Количество лизируемых клеток и количество образовавшихся зрелых частиц фага зависят от особенностей данной культуры и условий выращивания. В то же время количество клеток, освобождающих фаги, может быть резко увеличено при воздействии на лизогенную культуру некоторыми физическими и химическими факторами, получившими название индуцирующих. При индукции некоторых лизогенных культур удавалось вызывать образование зрелых частиц фага почти у всех клеток. К индуцирующим агентам относятся ультрафиолетовые (УФ), рентгеновские и гамма-излучения, перекиси, азотистый иприт и его гомологи, этиленмин, урацил, многие антибиотики. Наиболее эффективные и широко применяемые индуцирующие факторы - УФ-лучи и антибиотик митомицин С.

Во второй серии опытов на культуры, исследуемые как «лизогенные», мы воздействовали индуцирующим фактором (применялось воздействие на бактерии ультрафиолетовых лучей в течение 5-23 минут – интервал составил 2 минуты - при помощи бактерицидной лампы, 80 % энергии которой приходится на длину волны 2537 Å, на расстоянии 50 см между лампой и объектом). На подсушенный газон 18-ти часовой культуры воздействовали индуцирующим фактором, затем делали смыв культуры стерильным физиологическим раствором, смыв фильтровали и полученный фильтрат исследовали на наличие фага на культуре *Bacillus mesentericus 66* (*Bacillus cereus 2527*, *Bacillus cereus 8035*, *Bacillus cereus 96*, *Bacillus mycoides 537*, *Bacillus megaterium 182*) методом агаровых слоев по Грациа [4].

Хотя лизогения широко распространена среди всех систематических групп микроорганизмов нам не удалось выявить профаг у исследуемых культур. Не исключено, что явление лизогении является одним из механизмов защиты бактериальной клетки от фаговой инфекции, выработанным клеткой в процессе длительной эволюции. Лизогенизация в известной степени биологически выгодна и клетке, и фагу. Клетка при лизогенизации становится устойчивой не только к данному фагу, но и к родственным ему фагам и, кроме того, приобретает дополнительные свойства.

В наших исследованиях не удалось выделить фаги бактерий видов *Bacillus cereus*, *Bacillus mesentericus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus megaterium*, то есть мы не обнаружили перехода профага в свободный фаг у имеющихся штаммов бацилл по вышеизложенным методикам, поэтому дальнейшие исследования были посвящены выделению бактериофагов *Bacillus cereus*, *Bacillus mesentericus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus megaterium* из объектов внешней среды по методике Л.И. Адельсона [1].

Для проведения исследований мы брали пробы почвы из различных географических зон Ульяновской и Самарской областей: лесной, лесостепной и степной, почвы различного хозяйственного назначения (огород, грунтовая дорога - улица, двор частного дома). Всего было использовано 13 проб.

Первоначально готовили разведения почвы в мясо-пептонном бульоне в со-

Таблица 1

Источники выделения бактериофагов

	Название фага	Культура, на которую выделен бактериофаг	Источник выделения
1	В.с.8035-1	<i>Bacillus cereus</i> 8035	р.п. Николаевка Ульяновская область, огород
2	В.с.8035-2	<i>Bacillus cereus</i> 8035	р.п. Павловка Ульяновская область, огород
3	В.с.8035-3	<i>Bacillus cereus</i> 8035	р.п. Цильна Ульяновская область, хвойный лес
4	В.с.8035-4	<i>Bacillus cereus</i> 8035	с.Тушна Сенгилеевского р-она Ульяновской область, двор частного хозяйства
5	В.с.2527-1	<i>Bacillus cereus</i> 2527	р.п. Ст. Майна Ульяновской области, лес
6	В.с.2527-2	<i>Bacillus cereus</i> 2527	р.п. Павловка Ульяновская область, огород
7	В.с.2527-3	<i>Bacillus cereus</i> 2527	р.п. Николаевка Ульяновская область, огород
8	В.с.2527-4	<i>Bacillus cereus</i> 2527	р.п. Елховка, Самарская область, огород
9	В.с.2527-5	<i>Bacillus cereus</i> 2527	с.Тушна Сенгилеевского р-она Ульяновской область, двор частного хозяйства
10	В.с.96-1	<i>Bacillus cereus</i> 96	г. Сызрань Самарская область, огород
11	В.с.96-2	<i>Bacillus cereus</i> 96	с.Тушна Сенгилеевского р-она Ульяновской область, двор частного хозяйства
12	В.с.96-3	<i>Bacillus cereus</i> 96	г. Тольятти Самарская область, огород
13	В.с.96-4	<i>Bacillus cereus</i> 96	с.Тушна Сенгилеевского р-она Ульяновской область, дорога
14	В.с.96-5	<i>Bacillus cereus</i> 96	г. Барыш Ульяновская область, огород
15	В.с.96-6	<i>Bacillus cereus</i> 96	р.п. Цильна Ульяновская область, хвойный лес
16	В.м. 66-1	<i>Bacillus mesentericus</i> 66	г. Барыш Ульяновская область, огород
17	В.м. 66-2	<i>Bacillus mesentericus</i> 66	г. Димитровград Ульяновская область, огород
18	В.м.с. 537-1	<i>Bacillus mycoides</i> 537	г. Сызрань Самарская область, двор частного хозяйства
19	В.мег.182-1	<i>Bacillus megaterium</i> 182	р.п. Елховка, Самарская область, огород
20	В.мег.182-2	<i>Bacillus megaterium</i> 182	с.Тушна Сенгилеевского р-она Ульяновской область, двор частного хозяйства
21	В.мег.182-3	<i>Bacillus megaterium</i> 182	р.п. Ст. Майна Ульяновской области, лес

отношении 1:10, добавляли в концентрации 10^4 КОЕ /мл по 1,0 мл изучаемых штаммов бактерий. Колбы с пробами почв ставили в термостат на 24 часа при температуре 37 °С. Затем взвеси фильтровали через бумажный фильтр для освобождения от механических примесей. Таким образом, каждая проба испытывалась на наличие фагов ко всем имеющимся культурам *Bacillus cereus*, *Bacillus mesentericus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus megaterium*. Колбу помещали в термостат и инкубировали в течение 18 часов при 37 °С. После этого содержимое колбы разливали в стерильные

пробирки, центрифугировали при 3000 об./мин в течение 30 минут, затем прогревали в водяной бане при 80 °С в течение 45 минут. Исследуемые фильтраты исследовали методом агаровых слоев по Грациа [4]. Чашки ставились в термостат на 18 часов при 37 °С. Наличие негативных колоний или зон лизиса на газоне роста индикаторной культуры свидетельствовало бы о присутствии в исследуемом материале бактериофага. Результаты исследований представлены в таблице 1 и на рис. 1-2.

В результате проведенных исследований, используя методику Л.И. Адельсона [1] было выделено 2 бактериофага *Bacillus mesentericus*, 1- *Bacillus mycooides*, 3 - *Bacillus megaterium* и 15 фагов бактерий вида *Bacillus cereus*.

Результаты исследований свидетельствуют, что бактерии вида *Bacillus cereus* наиболее широко распространены в окружающей среде, чем бактерии видов *Bacillus mesentericus*, *Bacillus mycooides*, *Bacillus megaterium*, а методика выделения бактериофагов из объектов внешней среды наиболее

перспективна, так как исследуемые нами референс-штаммы бактерий не проявляли лизогенных свойств. Все выделенные нами бациллярные бактериофаги из объектов внешней среды вирулентные и будут использованы в дальнейших исследованиях при разработке фаговых биопрепаратов. При использовании методики с воздействием на бактерии индуцирующего фактора выделяются умеренные фаги, которые при использовании для создания биопрепарата нуждаются в длительном пассировании с целью повышения их литической активности. В наших исследованиях таких бактериофагов выделено не было.

Библиографический список:

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

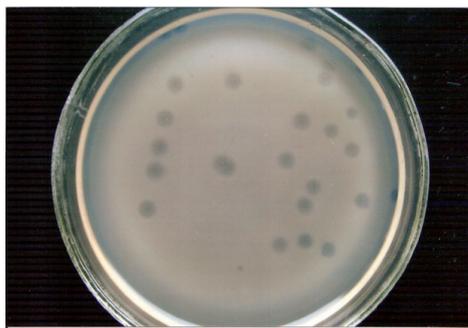


Рис. 1. Морфология негативных колоний фага V.c.96-6



Рис. 2. Морфология негативных колоний фага V.m. 66-1

2. Красильников Н.А. Жизнь растений // Под редакцией члена-корреспондента АН СССР профессора Н.А. Красильникова, профессора А.А. Уранова - М.; «Промышленность», 1974. – Т. I. - С 186.

3. Лурия С., Дарнелл Д. Общая вирусология – М., Мир, 1970. – С.36-47.

4. Ревенко И.П. Бактериофаги и их использование в ветеринарной практике. – Киев: Урожай, 1978. – С. 41-88.

5. Феоктистова Н.А., Мустафин А.Х., Калдыркаев А.И., Юдина М.А., Васильев Д.А., Климентова Е.Г. Разработка фаговых препаратов индикации и идентификации бактерий рода *Vacillus* в пищевом сырье и продуктах питания // Материалы Всероссийского симпозиума с международным участием «Биологически активные вещества микроорганизмов прошлое, настоящее, будущее», 27-29 января 2011 года. – Москва, 2011. – С.86.

ТЕХНОЛОГИЯ ПРОИЗВОДСТВА И ПЕРЕРАБОТКИ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ ПРОДУКЦИИ

УДК 633.553.52

СПОСОБ ПРИГОТОВЛЕНИЯ БЕЛКОВО-УГЛЕВОДНОГО ПРОДУКТА

С.М. Доценко, д.т.н., профессор

Всероссийский НИИ сои

тел. 89145387603

М.А. Зайцева, к.т.н., доцент

тел.8(4162)53-26-49

Е.А. Неретина, инженер

**ФГБОУ ВПО «Дальневосточный государственный аграрный университет»
тел.89622850997**

Ключевые слова: *кормопроизводство, соевый белковый продукт, гранулы, влажность, термообработка.*

Работа посвящена способу приготовления соевого белкового кормового продукта, включающий смешивание в определенном соотношении и при определенной влажности соевого белкового компонента с углеводистым, формование и термообработку смеси до определённого содержания сухих веществ, отличающийся тем, что в качестве соевого белкового компонента используют необезжиренную соевую муку или муку из вторичного соевого сырья, а углеводисто-картофельную пасту. Смесь готовят в соотношении как 1,0:1,0, а влажность сформированной смеси в виде гранул, круп-

178