

АНАЛИЗ ИЗМЕНЕНИЙ ЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ФАГОВ БАКТЕРИЙ ВИДОВ *BACILLUS CEREUS* И *BACILLUS SUBTILIS* ПРИ ХРАНЕНИИ

В.А. Макеев, аспирант кафедры МВЭиВСЭ УГСХА

М.А. Юдина, аспирант кафедры МВЭиВСЭ УГСХА

А.Х. Мустафин, аспирант кафедры МВЭиВСЭ УГСХА

А.И. Калдыркаев, соискатель кафедры МВЭиВСЭ УГСХА

Н.А. Феоктистова, к б н, доцент кафедры МВЭиВСЭ УГСХА

Мерчина С.В., к б н, ст преподаватель кафедры МВЭиВСЭ УГСХА

ФГОУ ВПО «Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия»

Тел. 8(84231)55-95-47, feokna@yandex.ru

*В статье дан анализ изменений литической активности фагов бактерий видов *Bacillus cereus* и *Bacillus subtilis* при хранении в течение 21 месяца. Доказано, что хранение фагов свыше 1 года понижает литическую активность и делает бактериофаги менее чувствительными, что может отрицательно сказаться на результатах по индикации и идентификации бактерий видов *Bacillus subtilis* и *Bacillus cereus* в объектах санитарного надзора.*

*Бактериофаг, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, литическая активность, индикация, идентификация, хранение.*

Введение. Вопрос об изменении литической активности фагов при хранении в отношении бактериофагов рода *Bacillus* в настоящее время остается открытым. При разработке биопрепарата на основе фагов для индикации и идентификации бактерий рода *Bacillus* важным параметром для использования с применением различных методик (реакция нарастания титра фага, реакция адсорбции фага, фаготетразоловый метод, метод «стекающей капли») являются сроки хранения биопрепарата. Анализ литературных данных по бактериофагам бацилл за последние 30 лет свидетельствует, что проблемой изучения литической активности в динамике никто из фагологов не занимался. Понижение литической активности бактериофагов, входящих в состав биопрепарата, до показателей $10^4 - 10^5$ по Грациа может привести к Общеизвестно, что роль бактериофага как средства терапии и профилактики некоторых инфекционных заболеваний в настоящее время невелика, а значение для лабораторной диагностики ряда пищевых инфекций этот биологический объект не только не утратил, а, наоборот, начал привлекать к себе все более пристальное внимание исследователей. С каждым годом повышается значимость бактериофагов как высоко специфического диагностического средства, позволяющего надежно дифференцировать возбудителей бактериальных видов, а порой проводить более детальную дифференциацию отдельных типов и вариантов внутри вида бацилл. Возможность фагоидентификации вытекает из специфичности действия фагов, которая может быть настолько выражена, что позволяет дифференцировать не только отдельные виды, но и серологически неотличимые штаммы в пределах одного вида [2].

Поэтому все большее число исследователей предпочитают обращаться к фаговым тестам, как единственному средству, способному дифференцировать близкородственные штаммы [1,4,5].

Благодаря типовым бактериофагам можно изучить мониторинг распространения бактерий, возможность установить источник и путь передачи инфекционного заболевания, т.е. провести его эпидемиологический анализ. Так в Канаде в промежуток с 1986 по 1993 было отобрано 146 изолятов *Bacillus cereus*, причастных к 18 вспышкам пищевого отравления. Из них 142 штамма было разделено на 17 типов фагов [6].

Первоначально нами были выделены и селекционированы бактериофаги видов *Bacillus cereus* и *Bacillus subtilis*, изучены их биологические свойства и сконструированы экспериментальные био-

препараты «Bs-УГСХА» (Bs-13 и Bs-16 серии УГСХА) и «Bc-УГСХА» (Bc-4 и Bc-8 серии УГСХА). Для разработки технологических параметров изготовления биопрепаратов на основе фагов необходимо установить как происходит изменение литической активности указанных фагов при хранении.

Методика. Фаги бактерий видов *Bacillus cereus* и *Bacillus subtilis* после изучения их биологических свойств герметично закрывали во флаконы с мясо-пептонным бульоном и хранили при температуре 2-4 °С. Периодически флаконы вскрывали и определяли их литическую активность методом агаровых слоев по Грациа [3].

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 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 агара, затем инкубировали в термостате при 37 °С в течение 18-20 часов.

Результаты. Анализируя полученные результаты, необходимо отметить, что селекционированные нами бактериофаги Bs-13 и Bs-16 серии УГСХА, выбранные для создания биопрепарата «Bs-УГСХА», при хранении в условиях 2-4 °С в течение 12 месяцев не значительно снижали литической активности и, поэтому, могут быть компонентами биопрепарата для фагодиагностики бактерий вида *Bacillus subtilis*.

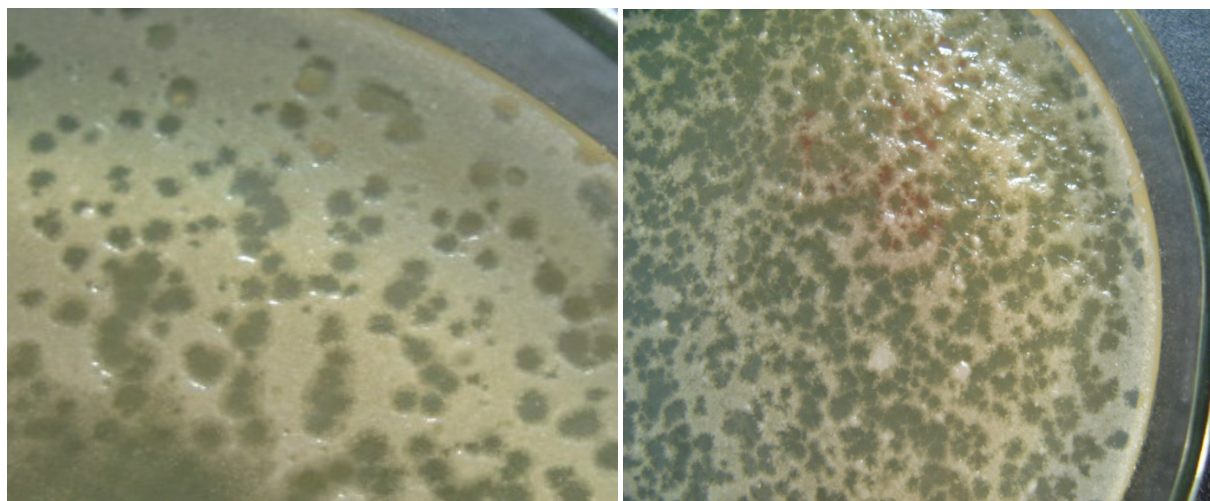


Рис.1 – Рост фага Bc-4 УГСХА на мясо-пептонном агаре (метод Грациа)
Результаты исследований представлены в таблицах 1-2 и на рис. 1.

Таблица 1.- Изменение литической активности фагов Bs-13 и Bs-16 серии УГСХА при хранении

№/№	Интервал времени	Литическая активность	
		Bs-13 УГСХА	Bs-16 УГСХА
1	Через 1 месяц	2,8x10 ⁹	8,0x10 ⁹
2	Через 3 месяца	2,4x10 ⁹	7,7x10 ⁹
3	Через 6 месяцев	1,8x10 ⁸	1,6x10 ⁸
4	Через 9 месяцев	1,0x10 ⁸	0,9x10 ⁸
5	Через 12 месяцев	0,4x10 ⁸	0,3x10 ⁸
6	Через 15 месяцев	0,6x10 ⁷	0,8x10 ⁷
7	Через 18 месяцев	0,2x10 ⁶	0,5x10 ⁶
8	Через 21 месяц	0,7x10 ⁵	0,9x10 ⁵

Таблица 2. - Изменение литической активности фагов Вс-4 и Вс-8 серии УГСХА при хранении

№/№	Интервал времени	Литическая активность	
		Вс-4 УГСХА	Вс-8 УГСХА
1	Через 1 месяц	$3,2 \times 10^9$	$6,6 \times 10^9$
2	Через 3 месяца	$2,6 \times 10^9$	$2,1 \times 10^9$
3	Через 6 месяцев	$1,3 \times 10^8$	$1,2 \times 10^8$
4	Через 9 месяцев	$0,8 \times 10^8$	$0,4 \times 10^7$
5	Через 12 месяцев	$0,5 \times 10^7$	$0,1 \times 10^7$
6	Через 15 месяцев	$0,9 \times 10^6$	$0,2 \times 10^6$
7	Через 18 месяцев	$0,4 \times 10^5$	$0,6 \times 10^5$
8	Через 21 месяц	$0,1 \times 10^5$	$0,2 \times 10^5$

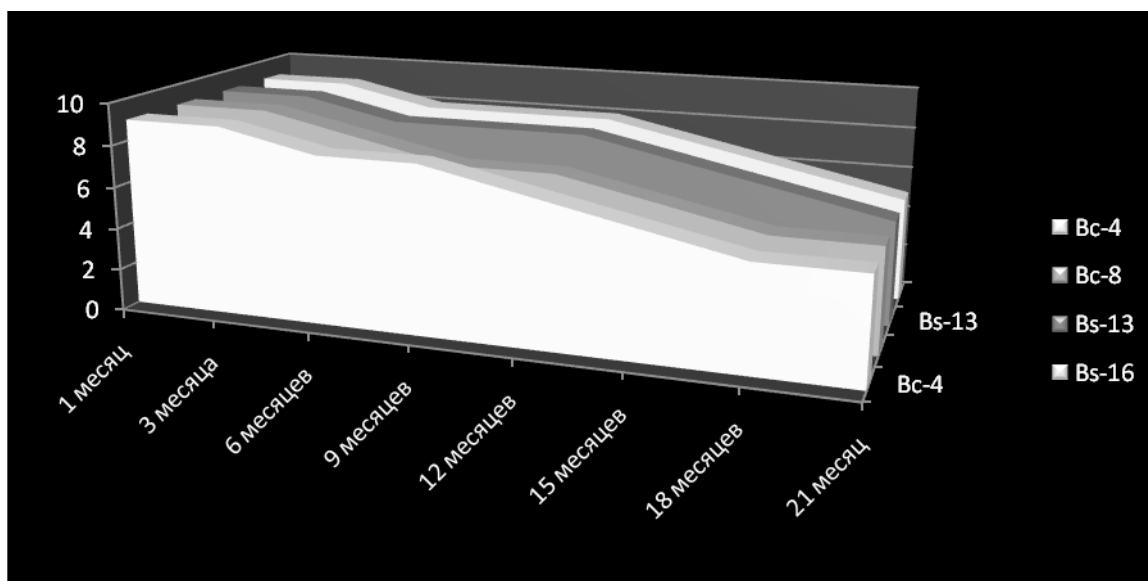


Рис. 2 - Анализ изменений литической активности фагов бактерий видов *Bacillus cereus* и *Bacillus subtilis* при хранении

Изучение показателей литической активности при хранении исследуемых фагов в течение 15-21 месяца показало, что с течением времени бактериофаги Bs-13 и Bs-16 серии УГСХА продолжают снижать показатели литической активности. Изменение литической активности фагов бактерий вида *Bacillus cereus* Вс-4 и Вс-8 серии УГСХА, использованных для конструирования экспериментального биопрепарата «Вс-УГСХА», происходит довольно равномерно. Критические для фаговых препаратов показатели литической активности были через 15 месяцев – 10^5 . Однако, экспериментальным путем было доказано, что активность бактериофагов повышается после 5-6 пассажей на индикаторной культуре на 2-3 порядка.

Полученные данные будут использованы при составлении нормативно-технической документации по изготовлению, контролю и хранению фагов Bs-13 УГСХА и Bs-16 УГСХА для индикации и идентификации бактерий вида *Bacillus subtilis*» и аналогичных документов для фагов бактерий вида *Bacillus cereus* Вс-4 и Вс-8 серии УГСХА.

Выводы. Мы рекомендуем использовать селекционированные нами бактериофаги Bs-13 и Bs-16 серии УГСХА и Вс-4 и Вс-8 серии УГСХА в течение 1 года с момента закупки в герметичные сосуды. Хранение фагов свыше 1 года понижает литическую активность и делает бактериофаги менее чувствительными, что может отрицательно сказаться на результатах по индикации и идентификации бактерий видов *Bacillus subtilis* и *Bacillus cereus* в объектах санитарного надзора.

Библиографический список:

1. Бургасов П.Н., Рожков Г.И. Сибиреязвенная инфекция. – М.: Медицина. – 1984. – С.206.
2. Ганюшкин В.Я. Бактериофаги сальмонелл и их применение в ветеринарии. – Ульяновск. – 1988. – С.45.
3. Гольдфарб Д.М. Бактериофагия. – М.: Медгиз, 1961. – С. 6-184.
4. Ревенко И.П. Бактериофаги и их использование в ветеринарной практике. – Киев: Урожай, 1978. – С. 41-88.
5. Смирнов В.В., Резник С.Р., Василевская И.А. Спорообразующие аэробные бактерии – продуценты биологически активных веществ – Киев: Наукова Думка, 1982. – С.117-120.
6. Ahmed R., Sankar-mistry P., Jackson S., Ackermann H.W. and Kasatiya S.S. *Bacillus cereus* Phage Typing as an Epidemiological Tool in Outbreaks of Food Poisoning // Journal of clinical microbiology, Mar. 1995. - P. 636-640.

УДК 619:578

**ДИАГНОСТИКА КАРТОФЕЛЬНОЙ БОЛЕЗНИ ХЛЕБА, ВЫЗЫВАЕМОЙ БАКТЕРИЯМИ ВИДОВ
BACILLUS SUBTILIS И BACILLUS MESENTERICUS**

М.А. Юдина, аспирант кафедры МВЭиВСЭ УГСХА

А.Х. Мустафин, аспирант кафедры МВЭиВСЭ УГСХА

Н.А. Феоктистова, к б н, доцент кафедры МВЭиВСЭ УГСХА

Меркулов А.В., к б н, ст преподаватель кафедры МВЭиВСЭ УГСХА

Бахаровская Е.О., студент УГСХА

Васильев Д.А. д б н, профессор кафедры МВЭиВСЭ УГСХА

*В статье описаны способы диагностики картофельной болезни хлеба, вызываемой бактериями видов *Bacillus subtilis* и *Bacillus mesentericus*. Описан способ индикации возбудителя картофельной болезни хлеба – бактерий вида *Bacillus subtilis* с помощью специфических бактериофагов методом «стекающая капля».*

*Ключевые слова: Бактерии: *Bacillus subtilis*, *Bacillus mesentericus*, картофельная болезнь хлеба, фаги, индикация, диагностика.*

В большинстве стран мира зерно и продукты его переработки являются основным источником питания для человека и кормом для сельскохозяйственных животных. Поэтому проблема микробиологического загрязнения зерна является одним из главенствующих факторов, определяющих здоровье населения и сохранения его генофонда. В связи с этим одной из важных проблем в хлебопекарной промышленности является оценка микробиологической зараженности зернового сырья, а также предупреждение картофельной болезни пшеничного хлеба [1].

В зерне сконцентрированы различные питательные вещества, и потому оно является благоприятным субстратом для развития микроорганизмов. Только один грамм зерновой массы содержит от нескольких сотен до нескольких тысяч микроорганизмов [5]. Развитие этих микроорганизмов является одной из возможных причин снижения качества зерна пшеницы и других зерновых культур при хранении. В зависимости от условий хранения зерновой массы изменения в численном и видовом составе ее микрофлоры могут носить различный характер [9].

При нарушении санитарно-технического режима хранения зерна, муки, выпечки и реализации хлеба создаются условия для размножения картофельной палочки. Болезнь вызывают штаммы бакте-