

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ИЗГОТОВЛЕНИЯ СКОНСТРУИРОВАННОГО ФАГОВОГО БИОПРЕПАРАТА *BACILLUS PUMILUS (PUMILUS)*

Н.А. Феоктистова, кандидат биологических наук, доцент

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

М.А. Лыдина, кандидат биологических наук, ст. преподаватель

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

Е.О. Ефрейторова, аспирант

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

Д.А. Васильев, доктор биологических наук, профессор

тел. 8(8422)55-95-47, dav_ul@mail.ru

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

Б.И. Шморгун, кандидат ветеринарных наук

ФГБУ «ВГНКИ»,

тел. 7 (499) 253-14-68, dav_ul@mail.ru

Ключевые слова: бактериофаги, *Bacillus mesentericus (pumilus)*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus megaterium*, бактерии, штаммы, параметры, картофельная болезнь хлеба.

Работа посвящена разработке технологических параметров изготовления сконструированного нами биопрепарата для определения картофельной болезни хлеба пшеничной муки. Определены штаммы бактерий и изоляты фагов, температурные и временные параметры культивирования и хранения, метод очистки фагов от бактериальных культур, внешний вид биопрепарата.

При нарушении санитарно-технического режима хранения зерна, муки, выпечки и реализации хлеба создаются условия для размножения картофельной палочки. Болезнь вызывают штаммы бактерий видов *Bacillus mesentericus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus megatherium*, обладающие высокой протеолитической и амилолитической активностью. Под действием высокоактивных ферментов – амилаз в хлебе увеличивается количество декстринов, придающих мякишу хлеба излишнюю липкость. Продукты распада белков, образующиеся в результате действия протеолитических ферментов, обладают резким специфическим запахом. Внешне картофельная болезнь хлеба характеризуется очаговым, влажным ослизнением мякиша с желтовато-коричневым цветом и гнилостным запахом. При разламывании хлеба видны тонкие тягучие нити. Употребление такого хлеба может привести к пищевому отравлению [11-14].

В настоящее время индикация и идентификация бацилл на предприятиях, занимающихся производством хлеба и хлебобулочных изделий проводится бактериологическими методами. Это трудоемкие и материалоемкие методики. Задача изыскания простого и доступного метода индикации и идентификации названных микроорганизмов – актуальная тема

для исследований, результаты которых позволят повысить эффективность применения микробиологического контроля и контрольных мер по системе ХАССП на перерабатывающих предприятиях, а также сделать данный этап исследований значительно дешевле [5,6,9].

Цель исследования - разработать технологические параметры изготовления сконструированного биопрепарата для определения картофельной болезни хлеба пшеничной муки.

Материалы и методы. Штаммы бактерии *Bacillus mesentericus (pumilus)*, *Bacillus megatherium*, *Bacillus mycoides*, циркулирующие на перерабатывающих предприятиях зерномучной промышленности, 3 изолята фагов бактерий *Bacillus mycoides* B.myc - 1, *Bacillus megatherium* B.meg - 9, *Bacillus pumilus (pumilus)* B.mes - 8. Создание биопрепарата проводили по методике, описанной Н.А. Феоктистовой, Юдиной М.А. [8, 12].

Результаты собственных исследований. Для конструирования биопрепарата нами было отобрано 3 изолята фагов бактерий *Bacillus mycoides* B.myc - 1, *Bacillus megatherium* B.meg - 9, *Bacillus pumilus (pumilus)* B.mes - 8, которые характеризовались высокими титрами литической активности и максимально

Таблица 1 – Изменение литической активности фагов В-3 и В-8 серии УГСХА при хранении

Бактериальная культура / название фага	Временной интервал	Литическая активность, количество корпускул в 1 мл фага
<i>Bacillus pumilus</i> (<i>pumilus</i>) / <i>B. mes</i> – 8 УГСХА	момент укуповоривания	$1,4 \times 10^9 \pm 0,2 \times 10^9$
	3 месяца	$1,4 \times 10^9 \pm 0,1 \times 10^9$
	6 месяцев	$2,3 \times 10^8 \pm 0,4 \times 10^8$
	9 месяцев	$1,5 \times 10^7 \pm 0,3 \times 10^7$
	12 месяцев	$0,3 \times 10^7 \pm 0,1 \times 10^7$
<i>Bacillus megatherium</i> / <i>B. meg</i> – 9 УГСХА	момент укуповоривания	$3,0 \times 10^9 \pm 0,2 \times 10^9$
	3 месяца	$3,0 \times 10^9 \pm 0,2 \times 10^9$
	6 месяцев	$0,3 \times 10^8 \pm 0,1 \times 10^8$
	9 месяцев	$0,2 \times 10^8 \pm 0,1 \times 10^8$
	12 месяцев	$1,1 \times 10^7 \pm 0,2 \times 10^7$
<i>Bacillus mycoides</i> / <i>B. myc</i> – 1 УГСХА	момент укуповоривания	$1,0 \times 10^9 \pm 0,1 \times 10^9$
	3 месяца	$1,0 \times 10^9 \pm 0,1 \times 10^9$
	6 месяцев	$0,4 \times 10^8 \pm 0,2 \times 10^8$
	9 месяцев	$0,1 \times 10^8 \pm 0,1 \times 10^8$

широким совместным спектром литического действия [10]. Последующие эксперименты были направлены на изучение изменения литической активности укуповоренных во флаконы бактериофагов *Bacillus mycoides* *B.myc* - 1, *Bacillus megatherium* *B.meg* - 9, *Bacillus mesentericus* (*pumilus*) *B.mes* - 8, хранящихся в условиях холодильника в течение 12 месяцев. Так как для разработки технологических параметров изготовления биопрепарата на основе фагов бактерий *Bacillus mycoides* *B.myc* - 1, *Bacillus megatherium* *B.meg* - 9, *Bacillus mesentericus* (*pumilus*) *B.mes* - 8 серии УГСХА это необходимо, потому что срок годности биопрепарата начинает исчисляться с момента наработки фага и его укуповоривания в герметично закрытые флаконы. Показатели литической активности фагов при хранении определяется по классической методике определения активности методом агаровых слоев по Грациа. Для получения достоверных данных каждый эксперимент проводили троекратно и результаты исследований подвергали статистической обработке. Эталонные культуры бактерий *Bacillus megatherium*, *Bacillus pumilus* (*pumilus*), *Bacillus mycoides* выращивали на мясо-пептонном бульоне в течение 18 часов. Учет результатов проводили через 18 часов инкубирования посевов в термостате при 37 °С. Результаты исследований представлены в таблице 1.

Опытным путем установлено, что в течение 3 месяцев показатели литической активности исследуемых бактериофагов *Bacillus mesentericus* (*pumilus*) *B.mes* – 8, *Bacillus megatherium* *B.meg* – 9, *Bacillus mycoides* *B.myc* - 1, серии УГСХА оставались без изменений, $1,4 \times 10^9 \pm 0,2 \times 10^9$, $3,0 \times 10^9 \pm 0,2 \times 10^9$, $1,0 \times 10^9 \pm 0,1 \times 10^9$ корпускул в 1 мл фаголизата, соответственно. Через 6 месяцев литическая активность снижалась и составила у фага *Bacillus mesentericus* (*pumilus*) *B.mes*

– 8 - $2,3 \times 10^8 \pm 0,4 \times 10^8$ корпускул в 1 мл фаголизата, у *Bacillus megatherium* *B.meg* – 9 - $0,3 \times 10^8 \pm 0,1 \times 10^8$ корпускул в 1 мл фаголизата, у фага *Bacillus mycoides* *B.myc* – 1 - $0,4 \times 10^8 \pm 0,2 \times 10^8$ корпускул в 1 мл фаголизата. Экспериментально установлено, что пассирование бактериофагов на исходном штамме бактерий в течение 7 пассажей методом агаровых слоев восстанавливает литическую активность бактериофагов на 1 порядок.

Изменение литической активности фагов в диапазоне 10^7 - 10^9 не является притическим при конструировании биопрепарата и не отразится на его способности лизировать культуры бактерий *Bacillus megatherium*, *Bacillus pumilus* (*pumilus*), *Bacillus mycoides* в пищевом сырье и продуктах питания при проведении исследований по их индикации и идентификации.

Для изготовления биопрепарата использовали штаммы фагов *Bacillus mesentericus* (*pumilus*) *B.mes* – 8, *Bacillus megatherium* *B.meg* – 9, *Bacillus mycoides* *B.myc* - 1 серии УГСХА и штаммы бактерий *Bacillus megatherium*, *Bacillus pumilus* (*pumilus*), *Bacillus mycoides*. Индикаторные культуры хранили на полужидком МПА (рН 7,2-7,4) с содержанием 0,3 % бактериологического агара при температуре 2-4 °С, которые пересеваются каждые 2-3 месяца [1-3,5].

Биопрепарат готовится на коммерческом мясо-пептонном бульоне. Установлено, что температурным оптимумом для культивирования биопрепарата на основе фагов *Bacillus mesentericus* (*pumilus*) *B.mes* – 8, *Bacillus megatherium* *B.meg* – 9, *Bacillus mycoides* *B.myc* - 1 серии УГСХА с индикаторными культурами была температура 37 °С. Определено оптимальное соотношение бактериофагов *Bacillus mesentericus* (*pumilus*) *B.mes* – 8, *Bacillus megatherium* *B.meg* – 9, *Bacillus mycoides* *B.myc* - 1 серии УГСХА Вм-3 УГСХА и штаммов бактерий *Bacillus megatherium*, *Bacillus*

pumilus (pumilus), *Bacillus mycoides* – 1:1, т.е. 0,2 мл фага на 0,2 мл индикаторной культуры, время пассажа составляет 6 часов.

Очистка фагов от бактериальных клеток осуществлялась методом фильтрации с использованием мембранных фильтров фирмы Millipore (filter type: 0,22 µm GV). Разлитый во флаконы фаг контролируется на чистоту и стерильность, обязательно определяется его титр. Биопрепарат на основе фагов представляет собой 3 флакона с прозрачной жидкостью желтоватого цвета (цвет засеянной среды) без посторонних примесей, осадка. Титр не ниже 10⁸. Дату изготовления серии исчисляют со дня закупки флаконов. Срок годности бактериофагов при температуре 2-4 °С 12 месяцев.

Был написан и утвержден первым проректором – проректором по науке ФГБОУ ВПО «Ульяновская

ГСХА им. П.А. Столыпина» «Лабораторный регламент по изготовлению и контролю биопрепарата на основе фагов *Bacillus pumilus (pumilus)*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus megatherium* для контроля и профилактики картофельной болезни хлеба».

Были получены паспорта фагов *Bacillus mesentericus (pumilus) B.mes – 8*, *Bacillus megatherium B.meg – 9*, *Bacillus mycoides B.мыс - 1* серии УГСХА в лаборатории Научно-исследовательского инновационного центра микробиологии и биотехнологии (г. Ульяновск).

Заключение. Разработаны технологические параметры изготовления сконструированного биопрепарата для выявления картофельной болезни хлеба в пшеничной муке и оформлена соответствующая нормативно-техническая документация.

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. - 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. Курьянова, Н.Х. Изучение влияния «Теотропина» на бактерии *Bacillus mesentericus* / Н.Х. Курьянова, Н.А. Феоктистова, М.А. Юдина [и др.] // Молодежь и наука XXI века: материалы III-й Международной научно-практической конференции молодых ученых. – Ульяновск: ГСХА, 2010. - С. 42-44.
5. 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.
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. Разработка схемы исследования материала с целью выделения и ускоренной идентификации бактерий видов *Bacillus subtilis* и *Bacillus cereus* / Н.А. Феоктистова, А.И. Калдыркаев, А.Х. Мустафин // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. - 2011. - Т. 4. - № 32-1. - С. 288-290.
8. 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.
9. Феоктистова, Н.А. Распространение *Bacillus cereus* и *Bacillus mycoides* в объектах санитарного надзора / Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин [и др.] // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2014. - № 1 (25). - С. 68-76.
10. 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.
11. Феоктистова, Н.А. Оценка качества пшеничной муки на наличие возбудителей картофельной болезни хлеба / Н.А. Феоктистова, С.Н. Золотухин, Д.А. Васильев [и др.] // Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения. – Ульяновск: ГСХА, 2012. - Т. I. – С. 320-327.
12. 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, 2012. – С. 5.
13. Юдина, М.А. Диагностика картофельной болезни хлеба, вызываемой бактериями видов *Bacillus subtilis* и *Bacillus mesentericus* // М.А. Юдина, Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев [и др.] // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2011. - № 3. - С. 61-67.

14. Юдина, М.А. Перспективы применения бациллярных бактериофагов / М.А. Юдина, Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев // Научно-техническое творчество молодежи – путь к обществу, основанному на знаниях: сборник докладов III Международной научно-практической конференции. – Москва, 2011. - С. 449-451.

DEVELOPMENT OF TECHNOLOGICAL PARAMETERS OF PRODUCTION OF THE BIOLOGICAL PRODUCT OF BACILLUS PUMILUS (PUMILUS) DESIGNED BY FAGOVOGO

N. A. Feoktistova, M. A. Lydina, E.O. Efreytorova, D. A. Vasilyev, B. I. Shmorgun

Key words: *bacteriophages, Bacillus mesentericus (pumilus) of Bacillus mycoides, Bacillus megaterium, bacterium, strains, parameters, potato illness of bread.*

Work is devoted to development of technological parameters of production of the biological product designed by us for definition of a potato illness of bread of wheat flour. Strains of bacteria and isolates of phages, temperature and temporary parameters of cultivation and storage, a method of cleaning of phages of bacterial cultures, appearance of a biological product are defined.

УДК 579. 64

ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ, КАК ОСНОВА ТЕХНОЛОГИИ ПРОИЗВОДСТВА ЭФФЕКТИВНЫХ БИОПРЕПАРАТОВ

В.А. Жирнов, кандидат биологических наук,
Нижегородский НИИ Эпидемиологии и микробиологии им. И.Н. Блохиной
тел. 89050132038, E-mail: lab-lb@yandex.ru

А.П. Мансуров, доктор сельскохозяйственных наук, профессор
ФГОУ ВПО Нижегородская ГСХА,
тел. 89108993839, E-mail: ap. mansurow@yandex.ru

Н.Н. Кучин, доктор сельскохозяйственных наук, профессор,
ГОУ ВПО Нижегородский государственный инженерно-экономический институт,
тел. 89056646347; E-mail: kuchin53@mail.ru

Ключевые слова: *состав питательных сред, культивирование, молочнокислые бактерии, пептиды, углеводы, минеральные вещества, витамины.*

Молочнокислые бактерии отличаются сложными трофическими потребностями и полностью зависят от питательной среды, поэтому для их культивирования используются богатые по составу аминокислот, витаминов, микроэлементов питательные среды. Питательные среды определяют качество препаратов, получаемых на основе живых микроорганизмов. Разработанная питательная среда отвечает предъявляемым требованиям и позволяет получать препараты с требуемой концентрацией микроорганизмов.

Введение. В сельскохозяйственном производстве в постоянно увеличивающихся объемах используются продукты микробиологического синтеза. Популярность этих препаратов связана с их эффек-

тивностью, экологической безопасностью и относительной дешевизной. К числу таких препаратов относятся добавки для консервирования кормов различных составов и назначения.