

УДК 602.3:579.8

АЛГОРИТМ ПРОИЗВОДСТВА ЛАБОРАТОРНОЙ СЕРИИ ФАГОВОГО БИОПРЕПАРАТА *BACILLUS PUMILUS* (*MESENTERICUS*)

Лыдина М.А., Феоктистова Н.А., кандидаты биологических наук

Васильев Д.А., доктор биологических наук

Симурзина О.Н., студент

ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина», Ульяновск, Россия

E-mail: feokna@yandex.ru

АННОТАЦИЯ

Статья посвящена вопросу разработки биотехнологических параметров изготовления фагового препарата для индикации и идентификации бактерий *Bacillus pumilus* (*mesentericus*) в пищевом сырье и продуктах питания. Определено оптимальное соотношение бактериофага и индикаторной культуры, время пассажа, способ чистки от культуры.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА

Бактериофаги, параметры, изготовление, *Bacillus pumilus* (*mesentericus*), индикаторные культуры.

Бактерии *Bacillus pumilus* (*mesentericus*) - фитопатогенные бактерии, поражающие лен, тыкву, кукурузу, свеклу, плоды апельсина, абрикоса, кабачков и других растений, клубни картофеля, семенники капусты, коробочки хлопчатника и т.п., и тем самым наносящие значительный экономический ущерб сельскохозяйственным и перерабатывающим предприятиям. Бактерии *Bacillus pumilus* в ассоциации с *Bacillus subtilis* являются возбудителями картофельной болезни хлеба. Разрушение структуры хлеба и разложение содержащихся в нем веществ, связано с продуцированием этими видами бактерий активных протеолитических и амилолитических ферментов. Спороносным бактериям *Bacillus pumilus*, особенно их термофильным формам, отводится значительная роль в процессах самосогревания зерна [1-4].

Мы предлагаем использовать для индикации и идентификации *Bacillus pumilus* использовать специфичные бактериофаги, позволяющие достоверно идентифицировать пищевые контаминанты и проводить их дифференциацию на биотипы и фаговары внутри вида.

Патентный поиск и анализ литературных данных свидетельствует, что в настоящий момент в Российской Федерации не разработаны методики индикации и идентификации бактерий *Bacillus pumilus* с помощью бактериофагов в объектах санитарного надзора. Применение этих методик позволит в сжатые сроки найти и идентифицировать бактерии вида *Bacillus pumilus*, в течение 25 часов, используя минимальное количество расходных материалов.

Цель исследования – разработать биотехнологические параметры изготовления фагового препарата для индикации и идентификации бактерий *Bacillus pumilus* в пищевом сырье и продуктах питания.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Для изготовления индикаторных бактериофагов бактерий *Bacillus pumilus* использовали штаммы фагов Вм-3 УГСХА и Вм-8 УГСХА и индикаторные культуры: *Bacillus pumilus* 2 и *Bacillus pumilus* 66, выделенные и селекционированные авторами. Штаммы бактерий *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus thuringiensis* получены из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина». Методы исследований [5-10].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Бактериофаги изготавливали путем культивирования в коммерческом мясопептонном бульоне (МПБ) с индикаторными культурами для фага Vm-3 УГСХА - *Bacillus pumilus* 66 и для фага Vm-8 УГСХА - *Bacillus pumilus* 2.

Индикаторные культуры хранили на 0,3% мясопептонном агаре (МПА) при температуре 2-4 °С, кратность пересева составляет 1 раз в 3 месяца.

Морфологические, культуральные, ферментативные свойства производственных штаммов культур *Bacillus pumilus* 2 и *Bacillus pumilus* 66 проверяли перед их использованием. Кратность проверки - не реже одного раза в 6 месяцев.

Производственная культура должны отвечать следующим требованиям.

Бактерии *Bacillus pumilus* 2 и *Bacillus pumilus* 66 – имеют палочкообразную форму, образуют споры, капсул не образуют, грамположительны. На МПА вырастают в виде сочных, с морщинистой поверхностью, слизистых матовых колоний серо-белого цвета с волнистым краем. Рост в МПБ - вызывают его слабое помутнение и образуют пленку на поверхности среды. Оптимальная температура роста 37°С. Все выделенные штаммы *Bacillus pumilus* разжижают желатин, свертывают и пептонируют молоко, продуцируют ацетилметилкарбинол. При разложении белков выделяют много сероводорода. Индол не образуют. Вызывают гидролиз крахмала. Не ферментируют глюкозу и лактозу. Растут в присутствии 7% NaCl. Гемолитическая активность не выявлена; утилизация цитрата – реакция отрицательная, фенилаланиндезаминаза – реакция отрицательная, D-глюкоза – реакция положительная, L-арабиноза – реакция положительная, D-ксилоза - реакция положительная, D-маннит - реакция положительная.

Чувствительность индикаторных культур к фагам *Bacillus pumilus* 66 и *Bacillus pumilus* 2 - Vm-3 УГСХА и Vm-8 УГСХА проверяли на чашках с 1,5% МПА методом нанесения на газон культуры капли фага.

Ход работы: 18 часовую бульонную культуру индикаторного штамма наносили на чашку с 1,5% МПА и распределяли стерильным шпателем по поверхности МПА для получения сплошного роста культуры, затем посева подсушивали в условиях термостата в течение 20-30 минут при температуре 37°С с целью получения достоверных результатов. Чашку Петри делили маркером на 2 сектора. После чего на поверхность среды, в зоне первого сектора, наносили каплю фага возле края чашки и, наклоняя чашку, давали ему стечь в виде дорожки по МПА. На второй сектор аналогичным образом наносили стерильный МПБ в качестве контроля на механическое повреждение газона током жидкости. Посевы в чашках инкубировали при 37°С. Учет проводили через 18 часов. На месте нанесения фагов на их индикаторные культуры (Vm-3 УГСХА - *Bacillus pumilus* 66 и Vm-8 УГСХА - *Bacillus pumilus* 2) должны образовываться зоны лизиса.

Фаг Vm-3 УГСХА поддерживают на культуре *Bacillus pumilus* 66 на МПБ, при температуре 2-4°С; фаг Vm-8 УГСХА поддерживают на культуре *Bacillus pumilus* 2 в аналогичных условиях. Пересев фагов проводили через 3-4 месяца. Перед пересевом фаги пассировали по следующей схеме: к 4,5 мл питательного бульона добавляли 0,2 мл фага и 0,2 мл 18-часовой бульонной индикаторной культуры. Контроль: к 4,5 мл питательного бульона добавляли 0,2 мл индикаторной культуры. Смеси инкубировали в течение 18 часов при температуре 37°С. После наступления лизиса бактерий и просветления среды пробирку с фагом фильтровали через мембранный фильтр фирмы Millipore (filter type: 0,22 µm GV), из нее проводили пересев (второй пассаж) в пробирку, содержащую 4,5 мл питательного стерильного МПБ в объеме 0,2 мл, куда вновь добавляли 0,2 мл культуры. Проводили 4-7 пассажей фага.

Пассирование проводили 1 раз в 3-4 месяца. После пассажа фаг вновь укупоривали во флаконы. Во флакон с содержанием 200 мл МПБ вносили 4 мл фага с титром 10⁸ БОЕ/мл и 4 мл 18-ти часовой бульонной культуры. Контроль: к 4,5 мл питательного бульона добавляли 0,2 мл индикаторной культуры. Флакон и пробирку ставили в термостат на 18 часов при 37°С. Среда с добавленным фагом и культурой

должна оставаться прозрачной, а в контрольной пробирке наблюдается рост культуры – легкое помутнение среды и образование пленки на ее поверхности. Фаги для очистки от бактериальной массы фильтровали через мембранный фильтр фирмы Millipore (filter type: 0,22 μm GV), затем разливали во флаконы по 10 мл. Разлитый во флаконы фаг контролировали на чистоту, стерильность и определяли его титр.

Биопрепарат на основе фагов представлен во флаконе в виде прозрачной жидкости желтоватого цвета (цвет засеянной среды) без посторонних примесей, осадка. Титр не ниже 10^8 БОЕ/мл. Дату изготовления серии исчисляют со дня закупки флаконов. Срок годности бактериофагов при температуре 2-4°C 12 месяцев.

Для приготовления исходных фагов Vm-3 УГСХА и Vm-8 УГСХА использовали фаги 4-го пассажа на индикаторной культуре *Bacillus pumilus* 66 к - фагу Vm-3 УГСХА и *Bacillus pumilus* 2 к - фагу Vm-8 УГСХА. Для наработки бактериофагов используют коммерческий МПБ.

Опыт: фаг с титром 10^8 БОЕ/мл в объеме 2 мл вносили в колбу с 45 мл МПБ, куда добавляли 2 мл 18 часовой бульонной индикаторной культуры. Контроль: к 4,5 мл питательного бульона добавляли 0,2 мл 18 часовой бульонной индикаторной культуры. Смеси ставили в термостат на 18 часов при 37°C. За это время МПБ с добавленным в него фагом и культурой должен был стать прозрачным при визуальном осмотре, а в контроле должен наблюдаться рост культуры – наличие пленки на поверхности МПБ и опалесцирующая муть. Полученные по вышеуказанной методике фаги Vm-3 УГСХА и Vm-8 УГСХА фильтруются через мембранные фильтры фирмы Millipore (filter type: 0,22 μm GV).

Приготовление средних объемов фага: «опыт» - исходные фаги с титром 10^8 БОЕ/мл в объеме 20 мл добавляли в колбу с 450 мл МПБ. В эту же колбу добавляли 20 мл 18 часовой индикаторной бульонной культуры. «Контроль»: к 4,5 мл МПБ добавляли 0,2 мл 18 часовой индикаторной бульонной культуры. Емкость и пробирку инкубировали при 37°C в течение 18 часов. Полученный фаг фильтровали через мембранные фильтры фирмы Millipore (filter type: 0,22 μm GV).

Получение больших объемов индикаторных фагов: «опыт» в бутыль с 4,5 литрами МПБ вносили 20 мл маточного фага в титре 10^8 БОЕ/мл и 20 мл 18 часовой индикаторной бульонной культуры. «Контроль» - в пробирку помещают 4,5 мл МПБ и 0,2 мл 18-ти часовой индикаторной бульонной культуры. Посевы ставили в термостат на 18 часов при 37°C. Через 18 часов бульонная культура индикаторного штамма *Bacillus pumilis* лизируется фагом, а МПБ остается прозрачным. В контрольной пробирке должно наблюдаться легкое помутнение среды, связанное с ростом культуры, и образование пленки. Полученный фаголизат фильтровали через мембранные фильтры фирмы Millipore (filter type: 0,22 μm GV).

Из полученного объема бактериофага отбирали пробу в количестве 30-50 мл для определения чистоты, физических свойств, титра фага по отношению к эталонной культуре, реакции нарастания титра фага в мясопептонном бульоне, искусственно зараженном индикаторной культурой, спектра литического действия и специфичности. Контроль по всем показателям проводится до разлива фага во флаконы.

При получении удовлетворительных результатов контроля бактериофаги разливали по 2 мл в стерильные флаконы и закатывали. На флаконы с фагом наклеивали этикетки с указанием наименования препарата, наименования и адреса предприятия-изготовителя, номера серии, титра и срока годности. Флаконы упаковывали в картонные коробки с разделительными перегородками по 10 штук. В каждую коробку должно быть вложено наставление по применению фага. На крышку каждой коробки наклеивали этикетку с указанием: наименование препарата, наименование и адрес предприятия-изготовителя, его товарный знак, титр фага, номер серии, количество флаконов в коробке, объем биопрепарата в одном флаконе, дата изготовления, срока годности, условий хранения и обозначения нормативно-технической документации.

Качество фагов Vm-3 УГСХА и Vm-8 УГСХА для индикации и идентификации бактерий *Bacillus pumilis* определяли по следующим показателям: внешнему виду,

чистоте, титру, степени нарастания титра фага, спектру литической активности и специфичности. Для проверки качества фага отбирали из разных мест серии 10 флаконов, из которых 5 флаконов использовали для анализа, а остальные хранили в архиве государственного контролера 18 месяцев.

Внешний вид фага определяли путем визуального осмотра флаконов с препаратом в проходящем свете. Индикаторный фаг не должен содержать посторонних примесей, лизат должен быть прозрачным светло-желтого или желтого цвета.

Для проверки на чистоту использовали 3 флакона препарата из каждой партии. Из каждого флакона высевали фаг в объеме 0,1-0,2 мл в пробирки с МПБ, на чашки с МПА, со средой Китта-Тароцци, со средой Сабуро и 1-2 мл во флаконы с 80-100 мл МПБ. Для чистоты эксперимента каждый высеv производили трехкратно. Посевы культивировали при температуре 37°C. На питательных средах с посевами не должно быть роста бактериальной микрофлоры и грибов.

Определение титра фагов (литической активности). Титр фага, проверяемый по методу Грациа, должен быть не ниже 10^8 БОЕ/мл.

Для изучения спектра литического действия использовали штаммы бактерий *Bacillus pumilis* и определяли на МПА путём нанесения фага на газон культуры. Результат считали положительным, если на месте нанесения штамма фага на газоне сплошного роста культуры образуется прозрачная зона лизиса. Отрицательным считается результат при отсутствии лизиса на газоне роста исследуемой культуры микроорганизмов.

Специфичность индикаторных фагов на штаммах *Bacillus subtilis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, которые не должны лизироваться исследуемым фагом (на чашках отмечали наличие роста культуры).

ВЫВОДЫ

Для изготовления биопрепарата использовали штаммы фагов Vm-3 УГСХА и Vm-8 УГСХА и штаммы бактерий *Bacillus pumilis* 2 и *Bacillus pumilis* 66. Индикаторные культуры хранятся на полужидком МПА (рН 7,2-7,4) с содержанием 0,3 % бактериологического агара при температуре 2-4°C, которые пересеваются каждые 2-3 месяца.

Биопрепарат готовится на коммерческом МПБ. Установлено, что температурным оптимумом для культивирования биопрепарата на основе фагов Vm-3 УГСХА и Vm-8 УГСХА с индикаторными культурами была температура 37°C. Определено оптимальное соотношение бактериофага Vm-3 УГСХА и штамма *Bacillus pumilis* 66 – 1:1, т.е. 0,2 мл фага на 0,2 мл индикаторной культуры, время пассажа составляет 6 часов (параметры культивирования бактериофага Vm-8 УГСХА с культурой *Bacillus pumilis* 2 аналогичны).

Очистка фагов от бактериальных клеток осуществлялась методом фильтрации с использованием мембранных фильтров фирмы Millipore (filter type: 0,22 μ m GV). Разлитый во флаконы фаг контролируется на чистоту и стерильность, обязательно определяется его титр. Биопрепарат на основе фагов представляет собой 2 флакона с прозрачной жидкостью желтоватого цвета (цвет засеянной среды) без посторонних примесей, осадка. Титр не ниже 10^8 БОЕ/мл. Дату изготовления серии исчисляют со дня закупки флаконов. Срок годности бактериофагов при температуре 2-4°C 12 месяцев.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Омельченко, В.Д. Зерна, поврежденные и испорченные микроорганизмами и самосогреванием как критерий санитарно-гигиенического состояния пшеницы и кукурузы: автореф. дис. ...канд. техн. наук: 03.00.04 / Омельченко Виктор Данилович. – М., 1992. – С. 19.

2. Пучкова, Л.И. Технология хлеба / Л.И. Пучкова, Р.Д. Поландова, И.В. Матвеева. – СПб. ГИОРД, 2005. – С.65.
3. Пельц, О.В. Гигиеническая оценка контаминации муки возбудителями картофельной болезни / О.В. Пельц, Е.Я. Долгушина, Н.Н. Аксенова, [и др.] // Медицина в Кузбассе, спецвыпуск. 2003, №5. С.74–75.
4. Очирова, Л.А. Микробиологическая оценка безопасности пищевых продуктов: автореф. дис. ...канд. техн. наук: 16.00.03 / Очирова Луиза Андреевна. – Барнаул, 2008. – С.12.
5. 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.
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. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.