

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ КОНСТРУИРОВАНИЯ БИОПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ ФАГОВ ДЛЯ ИНДИКАЦИИ И ИДЕНТИФИКАЦИИ *BACILLUS PUMILUS* В ПИЩЕВОМ СЫРЬЕ И ПРОДУКТАХ ПИТАНИЯ

Феоктистова Н.А.¹, Лыдина М.А.¹, Васильев Д.А.¹, Золотухин С.Н.¹, Васильева Ю.Б.¹, Молофеева Н.И.¹, Сульдина Е.В.¹, Калдыркаев А.И.¹, Майоров П.С.¹, Абдурахманов И.М.¹, Юдина Т.Г.², Павлова И.Б.³, Обухов И.Л.³, Швиденко И.Г.⁴, Бадаев Р.Р.⁵

¹ФГБОУ ВО Ульяновская ГСХА, Ульяновск, e-mail: feokna@yandex.ru;

²ФГБОУ ВО Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, e-mail: yudinatg@mail.ru;

³ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной санитарии, гигиены и экологии, Москва, e-mail: oil15@mail.ru;

⁴ГБОУ ВПО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского Минздрава России, Саратов, e-mail: dav_ul@mail.ru;

⁵Аккредитованное образовательное частное учреждение высшего образования «Московский финансово-юридический университет», Москва, e-mail: Badaev@dashkova.ru

В статье описаны результаты исследований по выделению из проб почвы и изучению основных биологических свойств специфичных бактериофагов *Bacillus pumilus*. Из них для конструирования биопрепарата отобраны фаги Bm-3 УГСХА и Bm-8 УГСХА, имеющие наиболее широкий спектр литического действия и высокие показатели литической активности, незначительно изменяющиеся при хранении в течение 12 месяцев. Биопрепарат готовится на коммерческом мясо-пептонном бульоне. Установлено, что температурным оптимумом для культивирования биопрепарата на основе Bm-3 УГСХА и Bm-8 УГСХА с индикаторными культурами была температура 35±2 °С. Определено оптимальное соотношение бактериофагов и индикаторных культур, т.е. 0,2 мл фага на 0,2 мл индикаторной культуры, время пассажа составляет 6 часов. Разлитые во флаконы фаги контролируются на чистоту и стерильность, обязательно определяется его титр. Биопрепарат на основе фагов представляет собой флакон с прозрачной жидкостью желтоватого цвета (цвет засеянной среды) без посторонних примесей, осадка. Титр не ниже 10⁷. Дату изготовления серии исчисляют со дня закупорки флаконов. Срок годности бактериофагов при температуре 2–4 °С 12 месяцев. Использование разработанных схем фагоиндикации и фагоидентификации бактерий *Bacillus pumilus* открывает перспективы их использования в лабораторной практике для оценки качества пищевого сырья и продуктов питания растительного и животного происхождения, позволяющие сократить время исследования до 25 часов (при постановке РНФ) и до 32 часов (при фагоидентификации) и снизить экономические затраты на исследование.

Ключевые слова: *Bacillus pumilus*, бактериофаги, биопрепарат, индикация, идентификация, литическая активность, спектр литического действия, специфичность.

BIOTECHNOLOGICAL PARAMETERS OF DESIGNING OF THE BIOLOGICAL PRODUCT ON THE BASIS OF PHAGES FOR INDICATION AND IDENTIFICATION OF *BACILLUS PUMILUS* IN FOOD RAW MATERIALS AND FOOD

Feoktistova N.A.¹, Lydina M.A.¹, Vasilyev D.A.¹, Zolotukhin S.N.¹, Vasilyeva Yu.B.¹, Molofeeva N.I.¹, Suldina E.V.¹, Majorov P.S.¹, Abdurakhmanov I.M.¹, Kaldyrkayev A.I.¹, Yudina T.G.², Pavlova I.B.³, Obuchov I.L.³, Shvidenko I.G.⁴, Badaev R.R.⁵

¹FGBOOU WAUGH Ulyanovsk GSHA, Ulyanovsk, e-mail: feokna@yandex.ru;

²FGBOOU WAUGH Lomonosov Moscow State University, Moscow, e-mail: yudinatg@mail.ru;

³FGBNU All-Russian research institute of veterinary sanitation, hygiene and ecology, Moscow, e-mail: oil15@mail.ru;

⁴SEI VPO Saratovsky GMU of V. I. Razumovsky of the Russian Ministry of Health, Saratov, e-mail: dav_ul@mail.ru;

⁵The accredited educational private institution of the higher education "Moscow financial and legal university", Moscow, e-mail: Badaev@dashkova.ru

In article results of researches on allocation from tests of the soil and to studying on the main of biological properties of specific bacteriophages *Bacillus pumilus* are described. From them for designing of a biological product the having widest ranges of lytic action and high rates of lytic activity which are slightly changing in case of storage within 12 months are selected a phage of Bm-3 UGSHA and Bm-8 UGSHA. The biological product prepares on commercial meat-peptonnom broth. It is established that temperature of 35±2 degrees

Celsius was a temperature optimum for cultivation of a biological product on the basis of Bm-3 UGSHA and Bm-8 UGSHA with indicator cultures. The optimum ratio of bacteriophages and indicator cultures is determined, i.e. 0,2 ml of a phage on 0,2 ml of indicator culture, make time of a passage 6 hours. Poured in bottles a phage it is controlled on purity and sterility, its caption is surely determined. The biological product on the basis of phages represents a bottle with transparent liquid of yellowish color (color of the sowed environment) without foreign impurity, a deposit. Caption not lower than 10000000. Date of production of a series is estimated from the date of obstruction of bottles. An expiration date of bacteriophages at a temperature of 2–4 degrees Celsius of 12 months. Use of developed schemes of a fagoindikation and fagoidentifikation of bacteria of *Bacillus pumilus* opens the prospects of their use in laboratory practice for a quality evaluation of food raw materials and food of a vegetable and animal origin allowing to reduce research time till 25 o'clock (in case of statement of RNF) and till 32 o'clock (in case of a fagoidentifikation) and to lower economic research costs.

Keywords: *Bacillus pumilus*, bacteriophages, biological product, indication, identification, lytic activity, range of lytic action, specificity.

Бактерии *Bacillus pumilus* – это 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. 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 [6-7, 11].

Бактерии *Bacillus pumilus* являются возбудителями порчи пищевого сырья и продуктов питания, вызывают отравления, характеризующиеся острым течением болезни по типу отравлений, вызываемых *Bacillus cereus*. В настоящее время в бактериологических лабораториях идентификация бактерий *Bacillus pumilus* основана на выделении чистой культуры микроорганизмов и изучении их биохимических свойств. Этот метод трудоемок и не достаточно эффективен из-за выраженного полиморфизма ферментативных свойств бактерий *Bacillus pumilus*. Поэтому перед исследователями стоит задача разработки достоверного и метода индикации и идентификации названных микроорганизмов. Классическая схема идентификации бактерий рода *Bacillus* первой морфологической группы по R. Gordon (1973) чрезвычайно материально затратная и трудоемкая. На сегодня вопрос о разработке ускоренной схемы идентификации *Bacillus pumilus* остается открытым [9].

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.

Цель и задачи исследований

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

Задачи исследования:

1. Изучить распространение бактерий *Bacillus pumilus* в пищевых продуктах.
2. Выделить и селекционировать бактериофаги, активные в отношении бактерий *Bacillus pumilus*.
3. Изучить основные биологические свойства (литическую активность и ее спектр, специфичность, температурную устойчивость, изменение литической активности при хранении) выделенных бактериофагов.
4. Сконструировать биопрепарат для индикации и идентификации бактерий *Bacillus pumilus* в пищевом сырье и продуктах питания.
5. Разработать технологические параметры изготовления биопрепарата на основе фагов.
6. Разработать схему ускоренной индикации бактерий *Bacillus pumilus* в объектах санитарного надзора методом реакции нарастания титра фага с использованием созданного биопрепарата.

Материалы и методы исследований

Объекты исследований. 22 штамма бактерий *Bacillus pumilus*, штаммы бактерий *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus thuringiensis*, полученные из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ ФГБОУ ВО Ульяновская ГСХА.

Штаммы бактериофагов – 22 изолята бактериофагов *Bacillus pumilus*, выделенные из проб почвы Ульяновской и Самарской областей.

Методы: для выделения бактерий *Bacillus pumilus* использовали схему дифференциации бактерий рода *Bacillus* [11]. Изучение морфологических, культуральных, биохимических свойств выделенных бактерий проводили по методам, рекомендованным А.С. Лабинской, Л.П. Блинковой, А.С. Ещиной, отработанным Юдиной М.А. [15]. Работа с бактериофагами проводилась по методикам, опробованным сотрудниками кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ ФГБОУ ВО Ульяновская ГСХА [1,4-5, 7-8, 12,13].

Результаты исследований

Первоочередной задачей наших исследований стало выделение бактерий *Bacillus pumilus* из объектов санитарного надзора. В результате проведенных исследований нами было выделено 20 культур бактерий, которые мы классифицировали согласно схеме идентификации бактерий рода *Bacillus* первой морфологической группы по R. Gordon (1973)

и отнесли к виду *Bacillus pumilus*. Уровень контаминации всех исследованных проб бактериями *Bacillus pumilus* составил 31 %.

Все выделенные бактерии палочкообразной формы, спорообразующие, капсул не образуют. На мясо-пептонном агаре вырастают в виде сочных, с морщинистой поверхностью, слизистых матовых колоний серо-белого цвета с волнистым краем; 3 выделенных штамма *Bacillus pumilus* образуют серо-бурые колонии, т.е. продуцируют пигмент коричневого цвета. Все штаммы *Bacillus pumilus* вызывают слабое помутнение мясо-пептонного бульона и образуют пленку на поверхности среды; гемолитическая активность не выявлена.

Установлено, что оптимальная кислотность среды pH 6,5-7,5, pH 5,0 обладает бактериостатическим действием. Оптимальная температура роста 37 °С. Все выделенные штаммы *Bacillus pumilus* разжижают желатин, свертывают и пептонизируют 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.

Вторым этапом работы было выделение фагов бактерий *Bacillus pumilus*. Первоначально, мы исследовали штаммы *Bacillus pumilus* как потенциально лизогенные. Поиск умеренных фагов проводили по методике С. Лурия и Д. Дарнелла (1970) в модификации С.Н. Золотухина [2]. В первой серии экспериментов мы использовали методику выделения бактериофагов бацилл без воздействия на них индуцирующего фактора. Во второй серии экспериментов на культуры *Bacillus pumilus*, исследуемые как «лизогенные», воздействовали индуцирующим фактором (воздействие на бактерии ультрафиолетовых лучей в течение 5–20 минут при помощи бактерицидной лампы, 80 % энергии которой приходится на длину волны 2537 Å, на расстоянии 50 см между лампой и объектом) [3]. Полученный фильтрат исследовали на наличие фага на имеющихся культурах *Bacillus pumilus* методом агаровых слоев. В исследованиях не наблюдалось естественной и искусственной лизогенности исследуемых штаммов *Bacillus pumilus*, т.е. профаги, интегрированные с хромосомой микробной клетки, выявлены не были.

Цель третьей серии экспериментов – выделение бактериофагов из объектов внешней среды по методике Д.М. Гольдфарба [4]. По литературным данным, наиболее эффективно в качестве источника выделения бактерий рода *Bacillus* использовать пробы почвы, так как они являются почвенными сапрофитами. При исследовании 88 проб почвы различного хозяйственного назначения двух областей Приволжского федерального округа, нам удалось выделить 22 изолята фагов бактерий *Bacillus pumilus*.

Селекцию фагов проводили десятикратным пассированием изолированных

негативных колоний на мясо-пептонном агаре с перевиванием на мясо-пептонный бульон (Золотухин, 2007). Очистка фагов от бактериальных клеток осуществлялась методом фильтрации с использованием мембранных фильтров фирмы Millipore (filter type: 0,22 μm GV). Фаголизаты укупоривали в стерильные флаконы и хранили при низкой температуре (4-6 °C) без использования консервантов.

Морфология негативных колоний. Морфологию негативных колоний изучали на плотных питательных средах для дифференциации их на умеренные и вирулентные. Негативные колонии, образуемые 22 изолятами фагов *Bacillus pumilus*, были однотипными – это прозрачные негативные колонии округлой формы, 1,0–4,0 мм в диаметре. Данная характеристика подтверждает их вирулентность, так как лизогенизированных фаги бактериальных клеток на дне фага отмечено не было.

Специфичность. Важнейшей характеристикой фага, входящего в состав биопрепарата для индикации и идентификации бактерий, является его специфичность в пределах вида. Изучение специфичности 22 выделенных изолятов бактериофагов *Bacillus pumilus* мы проводили на культурах гомологичного рода: *Bacillus subtilis* – 35 штаммов, *Bacillus mycoides* – 15 штаммов, *Bacillus megaterium* – 14 штаммов, *Bacillus cereus* – 25 штаммов, *Bacillus thuringiensis* – 4 штамма. Полученные результаты свидетельствуют, что выделенные и селекционированные нами бактериофаги, строго специфичны в пределах вида.

Литическую активность выделенных бактериофагов оценивали по их способности вызывать лизис бактериальной культуры на плотной питательной среде методом агаровых слоев. Для статистической обработки каждый эксперимент проводили трехкратно. Эталонные культуры выращивали на мясо-пептонном бульоне в течение 18 часов. Учет результатов проводили через 18 часов инкубирования посевов в термостате при 37 °C, используя формулу:

$$X = Y \times N, \text{ где}$$

Y – количество негативных колоний фага, выросших на чашке Петри,

N – фактор разведения.

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что выделенные бактериофаги *Bacillus pumilus* обладали различной активностью. Ее показатели были выявлены в диапазоне от $n \times 10^6$ до $n \times 10^9$ БОЕ/мл. Наиболее высокой активностью обладали фаги Вм–3 УГСХА и Вм–8 УГСХА, титр составил $n \times 10^9$ БОЕ/мл.

Спектр литического действия. Важной характеристикой выделенных фагов является диапазон их действия на штаммы бактерий в пределах вида. Для изучения спектра литического действия селекционированных фагов использовали 20 штаммов бактерий *Bacillus pumilus*, выделенных нами из проб пищевого сырья и продуктов питания, и 2

штамма, полученных из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ ФГБОУ ВО Ульяновская ГСХА. Исследования проводили методом нанесения фага на газон бактериальной культуры методом «стекающая капля». Экспериментальным путем установлено, что изучаемые специфичные бактериофаги имеют различный диапазон действия по отношению к 22 изучаемым штаммам *Bacillus pumilus*.

Опыты демонстрируют, что наиболее широким спектром литического действия по отношению к изучаемым культурам обладают штаммы фагов Вm-3 УГСХА и Вm-8 УГСХА, совокупный процент лизиса составил 91,0 %.

Для конструирования биопрепарата было отобрано два фага Вm-3 и Вm-8 серии УГСХА, которые характеризовались высокими показателями литической активности и максимально широким совместным спектром литического действия.

Последующие эксперименты были направлены на изучение изменения литической активности укупоренных во флаконы бактериофагов Вm-3 и Вm-8 серии УГСХА, хранящихся в условиях холодильника в течение 12 месяцев. Установлено, что в течение 3 месяцев показатели литической активности исследуемых бактериофагов Вm-3 УГСХА и Вm-8 УГСХА оставались без изменений $n \times 10^9$ БОЕ в 1 мл фаголизата, соответственно. Через 6 месяцев литическая активность снижалась и составила $n \times 10^8$ БОЕ/мл, через 9 месяцев – $n \times 10^7$ БОЕ/мл, через 12 месяцев – $n \times 10^7$ БОЕ/мл. Опытным путем установлено, что пассирование бактериофагов на исходном штамме бактерий *Bacillus mesentericus* в течение 7 пассажей методом агаровых слоев восстанавливает литическую активность бактериофагов на 1 порядок.

Для изготовления биопрепарата использовали штаммы фагов Вm-3 УГСХА и Вm-8 УГСХА и штаммы бактерий *Bacillus pumilus 2* и *Bacillus pumilus 66*. Индикаторные культуры хранятся 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.

Биопрепарат готовится на коммерческом мясо-пептонном бульоне. Установлено, что температурным оптимумом для культивирования биопрепарата на основе фагов Вm-3 УГСХА и Вm-8 УГСХА с индикаторными культурами была температура 37 °С. Определено оптимальное соотношение бактериофага Вm-3 УГСХА и штамма *Bacillus pumilus 66* – 1:1, т.е. 0,2 мл фага на 0,2 мл индикаторной культуры, время пассажа составляет 6 часов (параметры культивирования бактериофага Вm-8 УГСХА с культурой *Bacillus pumilus 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 . Дату изготовления серии исчисляют со дня закупорки флаконов. Срок годности бактериофагов при температуре 2–4 °С 12 месяцев.

Используя строгую специфичность биопрепарата, нами был разработан экспресс-метод идентификации бактерии *Bacillus pumilus* по показателям лизиса культур на плотной питательной среде («метод стекающей капли») [14]. Подготовку и посев пищевых продуктов, подлежащих исследованию, проводили в соответствии ГОСТ 26669 – 85 «Продукты пищевые и вкусовые. Подготовка проб для микробиологических анализов».

Разработанная нами схема позволяет идентифицировать бактерии *Bacillus pumilus* за 32 часа. Срок бактериологического исследования по традиционной схеме выделения и дифференциации бацилл первой морфологической группы (Gordon, 1973) составил 107 часов при значительных экономических затратах.

Для разработки схемы индикации бактерий использовали метод реакции нарастания титра фага по В.Я. Ганюшкину (1988) в модификации С.Н. Золотухина [3]. Первоначально определяли параметры постановки реакции. Были проведены эксперименты на модели – искусственно контаминированном бактериями *Bacillus pumilus* в концентрации 10^1 – 10^5 м.к./мл мясопептонном бульоне. В качестве контроля был использован интактный МПБ. Учет результатов проводили через 18 часов инкубирования, согласно оценке, предложенной В.Я. Ганюшкиным [10]. Реакция считалась положительной, если количество негативных колоний фага, образовавшихся в контроле превышало количество негативных колоний фага, образовавшихся в эксперименте в 5 и более раз.

Доказано, что количество негативных колоний фага в эксперименте более чем в 5 раз превышает количество негативных колоний фага в контроле при контаминации МПБ бактериями *Bacillus pumilus* в концентрации 10^2 м.к./мл. Необходимо было также определить наиболее эффективный временной показатель взаимодействия фага и индикаторной культуры при сохранении остальных параметров реакции нарастания титра фага (температурный режим, концентрация бактериальной культуры и фаговых корпускул в 1 мл).

Установлено, что при 6 часовой экспозиции индикаторной культуры с фагом без дополнительного ее подращивания, удается провести индикацию бактерий *Bacillus pumilus* в концентрации 10^2 м.к./мл МПБ. На исследование затрачивается 25 часов (0,5 часа – подготовка реакции + 6 часов – время экспозиции субстрата с фагом + 0,5 часа – постановка реакции + 18 часов – время термостатирования). Увеличение времени инкубирования до 10 – 24 часов не повышает чувствительность метода.

Для ускоренной индикации бактерий вида *Bacillus pumilus* в пищевом сырье и продуктах питания без выделения чистой культуры, нами была разработана модель постановки реакции нарастания титра фага на пищевом сырье и продуктах питания, максимально подверженных контаминации вышеназванными бактериями. Использовали муку пшеничную высшего и первого сортов, персики, перец черный молотый, мясо – свинину. Подготовку и посев проб пищевых продуктов, подлежащих исследованию, проводили в соответствии ГОСТ 26669 – 85 «Продукты пищевые и вкусовые. Подготовка проб для микробиологических анализов». Пробы растирали в фарфоровой ступке до получения гомогенной массы. Затем объекты исследований в количестве 10 г вносили в колбы с МПБ в соотношении 1:10 и искусственно контаминировали штаммами *Bacillus pumilus* 66 и *Bacillus pumilus* 2 в концентрации 10^1 – 10^5 м.к./мл. В качестве контроля использовали колбы МПБ с пробами, неконтаминированными бактериями *Bacillus pumilus* 66 и *Bacillus pumilus* 2.

Доказано, что увеличение титра фагов Вм–3 и Вм–8 серии УГСХА в 5 раз произошло при концентрации 10^3 м.к. бактерий *Bacillus pumilus* в 1 г объектов исследований. Данная концентрация бактерий в пищевом сырье и продуктах питания считается пороговой для их отбраковки или вторичной переработки с использованием соответствующих технологий.

Выводы

Обнаружено 20 культур бактерий вида *Bacillus pumilus* при исследовании 65 проб объектов санитарного надзора. Уровень контаминации исследуемых пищевых продуктов бактериям *Bacillus pumilus* составил 31 %.

Выделено и селекционировано 22 изолята фагов из объектов внешней среды, активных по отношению к бактериям *Bacillus pumilus*.

Изучены основные биологические свойства 22 изолятов фагов *Bacillus mesentericus* (морфология негативных колоний, специфичность, спектр литического действия, литическая активность).

Сконструирован биопрепарат на основе фагов Вм–3 и Вм–8 серии УГСХА, индикаторные штаммы – бактерии *Bacillus pumilus* 66 и *Bacillus pumilus* 2. Фаги характеризовались высокими титрами литической активности ($1,5 \times 10^9 \pm 0,1 \times 10^9$ и $4,0 \times 10^9 \pm 0,3 \times 10^9$ корпускул в 1 мл фаголизата, соответственно) и максимально широким совместным спектром литического действия – 91,0 %, сохраняли литическую активность в пределах 10^7 в течении 12 месяцев при хранении в условиях 2–4 °С.

Усовершенствована технология изготовления фагового биопрепарата *Bacillus pumilus*: наработка фагов идет на коммерческом мясо-пептонном бульоне. Температурный оптимум – 37 °С. Оптимальное соотношение бактериофага Вм–3 УГСХА и штамма *Bacillus pumilus* 66

– 1:1, т.е. 0,2 мл фага на 0,2 мл индикаторной культуры, время пассажа составляет 6 часов (параметры культивирования бактериофага Вm–8 УГСХА с культурой *Bacillus pumilus* 2 аналогичны). Очистка фагов от бактериальных клеток осуществляется методом фильтрации с использованием мембранных фильтров фирмы Millipore (filter type: 0,22 µm GV). Биопрепарат представляет собой 2 флакона с прозрачной жидкостью желтоватого цвета (цвет засеянной среды) без посторонних примесей и осадка. Титр не ниже 10⁸. Дату изготовления серии исчисляют со дня закупки флаконов. Срок годности бактериофагов при температуре 2–4 °С 12 месяцев.

Создана схема ускоренной индикации бактерий *Bacillus pumilus* методом реакции нарастания титра фага с использованием биопрепарата на основе фагов Вm–3 УГСХА и Вm–8 УГСХА, которая позволяет обнаружить бактерии в концентрации 10³ м.к./г пищевого сырья и продуктов питания за 25 часов.

Разработана схема идентификации бактерий *Bacillus pumilus* с помощью сконструированного биопрепарата, позволяющая идентифицировать микроорганизмы за 32 часа.

Научные исследования проводятся при финансовой поддержке государства в лице Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере (программа «УМНИК»).

Список литературы

1. Васильев Д.А. Биосенсорная детекция бактерий рода *Bacillus* в молоке и молочных продуктах для предупреждения их порчи / Д.А. Васильев Д.А., С.Н. Золотухин, Н.А. Феоктистова, А.В. Алешкин // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2013. – № 4 (24). – С. 36-43.
2. Золотухин С.Н. Штаммы бактериофагов малоизученных патогенных энтеробактерий и их практическое применение / С.Н. Золотухин, Д.А. Васильев, Н.А. Феоктистова [и др.] // Научные разработки и научно-консультационные услуги Ульяновской ГСХА: Информационно-справочный указатель. – Ульяновск, 2006. – С.45-49.
3. Каттер Э. Бактериофаги. Биология и практическое применение / Э. Каттер, А. Сулаквелидзе. – М.: Научный мир, 2012. – С. 114.
4. Климушкин Е.И. Биологические свойства сибирезвенного бактериофага / Е.И. Климушкин, Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев, К.В. Белова // Вестник ветеринарии. – 2015. – № 3 (74). – С. 46-49.
5. Климушкин Е.И. Выделение бактериофагов, специфичных к *Bacillus anthracis* / Е.И. Климушкин, Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев [и др.] // БиоКиров-2015: сборник материалов

III Международного форума. [Электронный ресурс]. – 2015. – С. 10-12.

6. Кудряшова К.В. Методика выделения фитопатогенных бацилл / К.В. Кудряшова, Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев // Студенческий научный форум – 2014 VI Международная студенческая электронная научная конференция: [Электронное издание]. – 2014. – URL: <http://www.scienceforum.ru/2014/666/2963> (дата обращения 12.09.2016).

7. Макеев В.А. Изучение чувствительности бактерий рода *Bacillus* к различным концентрациям хлорида натрия / В.А. Макеев, Н.А. Феоктистова, М.А. Юдина [и др.] // Ветеринарная медицина XXI века: инновации, опыт, проблемы и пути их решения: международная научно-практическая конференция, посвященная Всемирному году ветеринарии в ознаменование 250-летия профессии ветеринарного врача. – Ульяновск, 2011. – С. 185-187.

8. Пирюшова А.Н. Фагоидентификация бактерий *Bacillus subtilis* / А.Н. Пирюшова, А.Ю. Журавкова, Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев // Студенческий научный форум – 2014, VI Международная студенческая электронная научная конференция: [Электронное издание]. – 2014. – URL: <http://www.scienceforum.ru/2014/645/2964> (дата обращения: 23.09.2016).

9. 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, 2010. – С. 82-84.

10. Феоктистова Н.А. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов бактерий *Bacillus subtilis* / Н.А. Феоктистова // Бактериофаги микроорганизмов значимых для животных, растений и человека. – Ульяновск, 2013. – С. 186-197.

11. Феоктистова Н.А. Результаты сравнительного анализа бактериологических методов исследований какао-порошка на наличие бацилл, вызывающих порчу продуктов питания (БВП) / Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2015. – № 1 (29). – С. 69-76.

12. Феоктистова Н.А. Подбор перспективного производственного штамма *Bacillus anthracis* для конструирования фагового биопрепарата // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2015. – № 3 (31). – С. 69-75.

13. Феоктистова Н.А. Получение производственно-перспективных штаммов фагов *Bacillus megaterium* / Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев, М.А. Лыдина [и др.] // Биотика. – 2015. – Т.2. – № 1. – С. 3-7.

14. Юдина М.А. Диагностика картофельной болезни хлеба, вызываемой бактериями видов *Bacillus subtilis* и *Bacillus mesentericus* / М.А. Юдина, Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев

// Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2011. – № 3. – С. 61-67.

15. Юдина М.А. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов бактерий вида *Bacillus mesentericus* / М.А. Юдина, Н.А. Феоктистова // Бактериофаги микроорганизмов значимых для животных, растений и человека. – Ульяновск, 2013. – С. 197-211.