

УДК 578

О МЕТОДАХ ВЫДЕЛЕНИЯ ЛИСТЕРИОЗНЫХ ФАГОВ ИЗ ОБЪЕКТОВ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ

*Коцур М.Д., магистрант 3 года обучения,
Гранкина А.С., магистрант 2 года обучения,
Родионова А.В., Родионова И.В., магистранты
1 года обучения ФВМиБ
Научные руководители – Сульдина Е.В., ассистент,
Васильев Д.А., доктор биологических наук, профессор
ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ*

Ключевые слова: *выделение фагов, культивирование, центрифугирование, листериозные штаммы.*

В работе рассмотрены различные методы выделения фагов листерий из объектов внешней среды.

**Исследования проводятся при поддержке
Фонда содействия инновациям в соответствии с договором
№13730ГУ/2018 от 01.04.2019.**

По методам разработанным Loessner M. J. [4] прежде всего, для выделения бактериофагов необходим подходящий набор бактериальных индикаторных штаммов для выделения и культивирования фагов. Необходимо чтобы штаммы не были ни лизогенным, ни бактериоциногенным [1, 2, 3] а колониальные формы их обычно гладкие, а не грубые или нетипичные. Всего было протестировано 27 фагов. Из них 21 был изолирован из источников окружающей среды, то есть сточных вод от местного очистного сооружения. Образцы центрифугировали при $2500 \times g$ в течение 10 минут для удаления любого большого мусора, супернатант пропустили через бактериальные фильтры с размером пор 0,22 мкм (Syrfil MF, Nucleopore Corp., Pleasanton, Калифорния), чтобы получить стерильный раствор, все еще содержащий частицы предполагаемого фага.

Каждый образец затем смешивали с равный объем стерильного бульона и разделяли на 12 партий (10 мл каждый). К каждому добавляли 0,5 мл культуры в логарифмической фазе роста одного из потенциальных хозяев, то есть индикаторный штамм. После 5 - 6 ч инкубации на качающейся водяной бане, растворы снова центрифугировали и фильтровали. Если листериозные бактериофаги присутствовали в исходных образцах, препараты после данных процедур содержали достаточное количество

фагов, которые могут быть легко обнаружены двухслойным методом.

Пять фагов были выделены из лизогенных штаммов. Они индуцировались из клеток методом УФ-облучения, впервые описанным Lwoff et al. [5]. Образцы (5 мл) 2–3-часовых бульонных культур штаммов, подлежащих исследованию были распределены в стерильные чашки Петри, а затем подвергались воздействию ультрафиолетового света ($\lambda = 254 \text{ nm}$) в течение 60 с на расстоянии 20 см универсальной УФ-лампой (№ 29200, Camag, West Берлин, Федеративная Республика Германия). Затем облученные культуры инкубировали в темноте еще 3 дня, после чего центрифугировали и фильтровали. Фаговая активность была проверена на бактериальном газоне индикаторного штамма методом с выбранным. Один фаг (ATCC 23074-B1) был получен из американской коллекции типовых культур, Rockville, Md. [4].

Sword C. P., Pickett M. J. использовали культуры определенных листериозных штаммов (44-24 л, 44-50, 44-51 и 44-671), которые были подобраны для переноса фага. Предварительное использование техники ультрафиолетовой индукции другими учеными (Liegeois-Muller & Fredericq, 1952 a, b; Thibaut & Fredericq, 1952) давали многообещающие результаты, при использовании лампы (Модель V41 Ультрафиолет Products, Inc., Сан-Габриэль, Калифорния, США), с ультрафиолетовым излучением с длиной волны 2537 Å. Светильник располагали на расстоянии 45 см от облучаемого объекта. Облучение проводили в течение 1-2 мин с расстояния 25 см и последующей инкубацией при 37°C для 90 мин дали максимальные титры фагов. Штаммы *Listeria* для облучения выращивали в течение ночи при 37 °. Небольшие объемы (2-3 мл) распределяли тонким слоем по поверхности открытых чашек Петри и облучали. Чашки периодически вращали во время облучения, чтобы обеспечить максимальную выдержку, и процедуру проводили в полумраке, чтобы избежать фотореактивации. После облучения и инкубации штаммы были обнаружены в интервалы с помощью пипеток Пастера на пластинках с засеянными индикаторами культурами. Индикаторные штаммы были внесены в тонкий слой полутвердого агара на поверхности пластины с кровавым агаром, как описывал Adams. Пятнам позволили высохнуть и чашки инкубировали при 37°C. Группа из 123 штаммов была проверена на наличие фагов. Очистка и приготовление исходных фаговых суспензий. Стерильные области, которые показали наличие бляшек или слияния лизиса были отобраны для дальнейшего изучения. Небольшое количество полутвердого агара с таких участков удаляли проволоочной петлей и встряхивали в 1 мл бульона для элюции фага; 0,1 мл этого бульона затем вносили в полужидкий по-

кровный агар вместе с соответствующим микроорганизмом. Таким образом вновь выделенные фаги переносили два-три раза из одной бляшки для обеспечения чистоты конечного препарата фага. Стоки фаговых препаратов были получены путем сбора урожая с накладных пластин агара путем модификации метода Swanstrom & Adams (1951). Фаговая суспензия была внесена в наложенные на агар с кровью агаровые пластины. После инкубации наложенный агар соскребали с поверхности агара и помещали в инфузионный бульон. Фаг извлекали из агара элюированием в течение ночи при 4 °С с последующим центрифугированием при 2000 g в течение 30 мин. Полученную супернатантную жидкость стерилизовали добавлением 0 * 001% (мас. / об.) тимола или путем пропускания через фильтрующую прокладку (Millipore Filter Corp., Бедфорд, Массачусетс, США) и хранили при температуре 4°С. Такие препараты были стабильны на в течение 6 месяцев и часто в течение 1 года [5].

Библиографический список:

1. Выделение бактериофагов бактерий рода *Listeria* / Д.А. Васильев, Е.Н. Ковалева, Е.В. Сульдина // Инфекция и иммунитет. – 2014. – сентябрь, специальный выпуск – С. 69-70.
2. Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного микроорганизмами 1 и 2 групп патогенности. Методические указания. - М.: Минздрав России, 2003. С. 22.
3. Савельева Л. Д. Автореферат диссертации. Усовершенствование методов лабораторной диагностики листериоза.// Саратов.- 2003.
4. Loessner M. J., Busse M. Bacteriophage typing of *Listeria* species //Appl. Environ. Microbiol. – 1990. – Т. 56. – №. 6. – С. 1912-1918.
5. Sword C. P., Pickett M. J. The isolation and characterization of bacteriophages from *Listeria monocytogenes* //Microbiology. – 1961. – Т. 25. – №. 2. – С. 241-248.

ABOUT THE METHODS OF ISOLATION OF LYSTERIOUS PHAGES FROM EXTERNAL ENVIRONMENTAL OBJECTS

Kotsur M.D, Grankina A.S, Rodionova A.V, Rodionova I.V

Key words: *phage isolation, cultivation, centrifugation, listeriosis strains.*

The paper discusses various methods for isolating phages of listeria from environmental objects.