

## ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРИОФАГОВ *LISTERIA MONOCYTOGENES*

*Ковалева Е.Н., кандидат биологических наук, доцент*

*тел. 8(8422) 55-95-47, elkov@pochta.ru*

*Васильев Д.А., доктор биологических наук, профессор*

*тел. 8(8422) 55-95-47, dav\_ul@mail.ru*

*Сульдина Е.В., аспирант, ekaterina-suldina@rambler.ru*

*Имамов М.А., аспирант, saerax@gmail.com*

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

**Ключевые слова:** *Listeria monocytogenes*, бактериофаг, пищевое сырье, контаминация.

*В статье рассматриваются аспекты контаминации пищевого сырья и продуктов бактериями вида *Listeria monocytogenes*. В качестве инактивирующего средства предложены бактериофаги и представлена методика их выделения с помощью индуцирующих факторов из лизогенных культур. Определены некоторые биологические свойства полученного изолята.*

Начиная с середины 80-х гг. годов XX столетия листериозу людей стали уделять все большее внимание. Это обусловлено лавинообразным появлением вспышек листериоза, связанных с употреблением пищевых продуктов контаминированных листериями. Ухудшает ситуацию и то, что болезнь протекает очень тяжело, как у новорожденных, их матерей, так и у пожилых людей [3, 4, 5, 9]. Продукты питания могут быть контаминированы листериями из-за некачественного пищевого сырья, используемого в процессе приготовления пищи. В первую очередь вызывают опасение те продукты, которые употребляются в необработанном виде – охлажденные свежие салаты, овощи, фрукты [7, 9].

Тем самым актуальна проблема профилактики инфицирования листериями пищевого сырья и продуктов питания, возникает необходимость своевременной детекции указанных бактерий. Бактериофаги являются простым и надежным инструментом для реализации данной цели [4, 5, 7, 8].

### **Цели и задачи исследования**

Целью работы является разработка схемы выделения бактериофага *L.monocytogenes* методом индукции из лизогенных культур и изучение некоторых биологических свойств полученного изолята.

Для достижения поставленной цели необходимо подобрать оптимальные параметры воздействия индуцирующих факторов на бактериальную клетку и взаимодействия бактериальных клеток и фаговых корпускул, определить рациональный метод очищения фаголизата.

### **Материалы и методы**

В работе использовали тест-штамм бактерий вида *L.monocytogenes* 766, индикаторный референс-штамм 9-127 (I серотип) из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ Ульяновской ГСХА им. П.А. Столыпина.

Выделение и изучение биологических свойств фага проводили по методам, предложенным Н.А. Капыриной [1], M.R.J. Clokie, A.M. Kropinski [6], Э.Каттер, А. Сулаквелидзе [2], С.Р. Sword, M.J. Pickett [10].

### **Результаты исследований**

В качестве тест-штамма для оптимизации параметров индукции использова-

ли вирулентный штамм *L.monocytogenes* – 766, индикаторным служил референс-штамм *L.monocytogenes* 9-127. В качестве индуцирующего агента использовали ультрафиолетовые лучи (УФ-лучи), источником которых служила ртутно-кварцевая лампа, дающая не менее 90 % излучаемой энергии в виде УФ-лучей с длиной волны 254 нм.

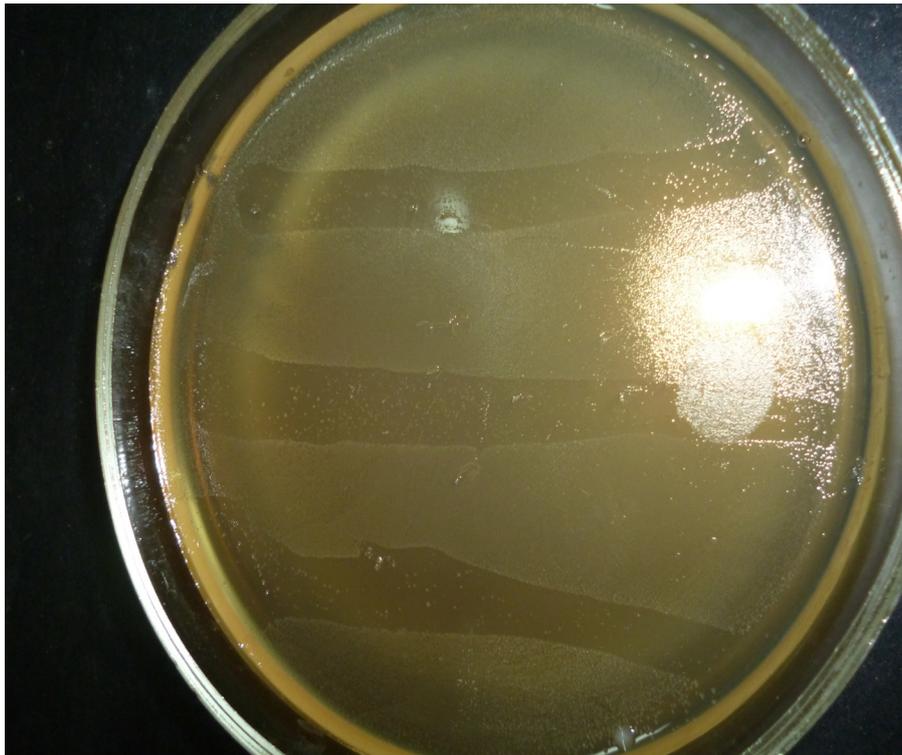
Облучению подвергали 4-х часовую бульонную культуру тест-штамма *L.monocytogenes* – 766, выращенную при 28°C. Перед облучением бактерии разводили в слабощелочном фосфатном буфере (рН-7,6) в отношении 1:100. Разведенную бактериальную взвесь выливали в чашку Петри с таким расчетом, чтобы толщина облучаемого слоя не превышала 2 мм. Чашки с культурой помещали на расстоянии 40 см от источника излучения и облучали с экспозицией (с) – 20; 30; 40; 60. Для более равномерного воздействия УФ-лучей на бактериальные клетки чашки во время облучения периодически покачивали.

После облучения 50 мкл культуры вносили в мясопептонный бульон комнатной температуры. Облученные листериозные культуры инкубировали при 28°C в течение 16 часов, после чего полученные лизаты пропускали через бактериальные фильтры с диаметром пор 0,2 мкм, выдерживали сутки при комнатной температуре, а затем исследовали на присутствие в них бактериофага. Во время облучения, с целью предохранения обработанных культур от фотореактивации, все манипуляции проводили в затемненном помещении [1, 10].

Выявление индуцированных фагов проводили методом «стекающей капли» с индикаторным штаммом *L.monocytogenes* 9-127. Учет результатов осуществляли после 24-х часового инкубирования в термостате при 28°C. Присутствие бактериофага, определяли по наличию прозрачной «дорожки», хорошо видимой на матовом фоне роста бактерий (рис. 1).

Морфологию негативных колоний фага изучали при посевах методом агаровых слоев. Для этого в пробирку с расплавленным и остуженным до 46 – 48°C 0,7 % мясопептонным агаром вносили 1 мл фага и 0,2 мл 18-часовой бульонной индикаторной культуры *L.monocytogenes*. Содержимое пробирки тщательно перемешивали и выливали на поверхность 1,5 % мясопептонного агара. После застывания агара чашки помещали в термостат.

Учет производили через 12 – 18 часов инкубации при температуре 28°C. Негативные колонии оценивали по размеру, характеру края, прозрачности, наличию вторичного роста и характеру роста культур вокруг колоний.



**Рис. 1 – Дорожки лизиса на сплошном бактериальном газоне индикаторной культуры *L.monocytogenes* 9-127**

Негативные колонии, образуемые изучаемым листериозным бактериофагом, были округлой формы с ровными краями в диаметре от 0,7 до 1 мм, непрозрачные, с зоной вторичного роста.

Выводы. В результате проведенных исследований выделен бактериофаг бактерий вида *L.monocytogenes*. Экспериментально установлено, что для выделения листериозного бактериофага методом индукции из лизогенных культур наилучшим образом подходит жидкая слабощелочная среда, время экспозиции – 30 с, расстояние до источника излучения – 40 см. Негативные колонии изучаемого бактериофага мелкие, округлые, непрозрачные, с зоной вторичного роста.

#### **Библиографический список**

1. Капырина, Н.А. Изучение листериозного бактериофага и использование его для идентификации возбудителя болезни / Н.А. Капырина // Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Покров, 1973. – 22 с.
2. Каттер Э. Бактериофаги : биология и практическое применение / Э. Каттер, А. Сулаквелидзе; пер. с англ.: коллектив пер.; науч. ред. рус. изд. А.В. Летаров. – Москва: Научный мир, 2012. – 636 с.
3. Листерии и листериоз / И.А. Бакулов, Д.А. Васильев, Д.В. Колбасов [и др.] // монография. – Ульяновск, УГСХА, 2008. – 168 с.
4. Bacteriophage P100 for control of *Listeria monocytogenes* in foods: genome sequence, bioinformatic analyses, oral toxicity study, and application / R.M. Carlton [et al.] / Regulatory Toxicology and Pharmacology. – 2005. – 43. – P. 301 – 312.
5. Biocontrol of *Listeria monocytogenes* on fresh-cut produce by treatment with lytic bacteriophages and a bacteriocin / B. Leverentz [et al.] // Appl. and Environ. Microbiol. – 2003. – 69, N

8. – P. 4519 – 4526.

6. Clokie, M.R.J. Bacteriophages: methods and protocols, volume 1: isolation, characterization, and interactions / M.R.J. Clokie, A.M. Kropinski. – 2009, Humana Press. – 301 p.

7. Guenther, S. Bacteriophage biocontrol of *Listeria monocytogenes* on soft ripened white mold and red-smear cheeses / S. Guenther, M.J. Loessner // Bacteriophage: Landes Bioscience. – 2011. – P. 94 – 100.

8. Loessner, M.J. Bacteriophage typing of *Listeria* species / M.J. Loessner, M. Busse // Appl. and Environ. Microbiol. – 1990. – 56, N 6. – P. 1912 – 1918.

9. McLauchlin, J. Aspects of the epidemiology of human *Listeria monocytogenes* infections in Britain 1967 – 1984; the use of serotyping and phage typing / J. McLauchlin, A. Audurier, A.G. Taylor // J. Med. Microbiol. – 1986. – 22. – P. 367 – 377.

10. Sword, C.P. The isolation and characterization of bacteriophages from *Listeria monocytogenes* / C.P. Sword, M.J. Pickett // J. gen. Microbiol. – 1961. – 25, N 2. – P. 241 – 248.

## ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF BACTERIOPHAGES *LISTERIA MONOCYTOGENES*

*Kovaleva E.N., Vasiliev D.A., Suldina E.V., Imamov M.A.*

**Keywords:** *Listeria monocytogenes, the bacteriophage, food raw materials, contamination.*

*The paper discusses aspects of contamination of food products and raw materials bacterium *Listeria monocytogenes*. As a means of inactivating phages and suggested the technique of their selection by inducing factors of the lysogenic cultures. Identified some of the biological properties of the isolate.*

УДК 578.81:579.67

## РАЗРАБОТКА БИОПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ ЭНТЕРОКОККОВЫХ ФАГОВ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ *ENTEROCOCCUS FAECALIS*

*Ковалева Е.Н., кандидат биологических наук, доцент, [elkov@pochta.ru](mailto:elkov@pochta.ru)*

*Золотухин С.Н., доктор биологических наук, профессор*

*тел. 8(8422) 55-95-47, [fvn.zol@yandex.ru](mailto:fvn.zol@yandex.ru)*

*Васильев Д.А., доктор биологических наук, профессор, [dav\\_ul@mail.ru](mailto:dav_ul@mail.ru)*

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

**Ключевые слова:** *биопрепарат, бактериофаг, *E.faecalis*, детекция.*

*В статье рассматриваются технологические параметры (время пассажа, множественность инфекции) создания биопрепарата на основе выделенных и изученных энтерококковых бактериофагов с целью детекции бактерий вида *E.faecalis*.*

Энтерококки в настоящее время являются одними из самых часто встречающихся возбудителей нозокомиальных инфекций. Тем не менее, наибольшую опасность вызывает не столько широкая распространенность этих микроорганизмов, сколько их устойчивость к большому спектру антибактериальных препаратов [1, 5, 6]. Поскольку из биологического материала чаще всего выделяют *Enterococcus faecalis*, то в большинстве случаев приходится иденти-