

ОСНОВНЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЛИСТЕРИОЗНЫХ БАКТЕРИОФАГОВ

Е.В. Сульдина, аспирант,
тел. 89374545651, ekaterina-suldina@rambler.ru
Е.Н. Ковалева, кандидат биологических наук, доцент
Д.А. Васильев, доктор биологических наук, профессор,
8(8422) 55-95-47, dav_ul@mail.ru
ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина»

Ключевые слова: листерии, листериоз, бактериофаги, морфология негативных колоний, литическая активность, спектр литического действия, специфичность действия

В статье дана характеристика биологических свойств бактериофагов (литическая активность, спектр литической активности, специфичность действия).

Введение. Бактерии рода *Listeria* являются серьезной угрозой для человеческого здоровья. Во многих странах листериоз отнесен к особо опасным заболеваниям.

Лабораторная диагностика листериоза основывается, преимущественно, на бактериологических и серологических методах исследования. Что сопряжено с длительностью исследования – 7 суток при бактериологическом исследовании и 8-14 при постановке биопроб [5].

Всё это вызывает необходимость разработки более эффективных и менее трудоёмких методов диагностики листериоза.

Применение листериозных бактериофагов, которые благодаря специфичности действия можно использовать для диагностики инфекционных заболеваний, определения видовой принадлежности возбудителя и идентификации бактерий из объектов внешней среды, может отчасти решить эту проблему.

Цель работы - изучение основных биологических свойств полученных нами изолятов листериозных бактериофагов.

Материалы и методы:

Штаммы бактерий: В работе использованы 26 штаммов бактерий рода *Listeria* (16 - *L. monocytogenes* 3 – *L. innocua*, 1 – *L. seeligeri*, 1 – *L. welshimeri*, 1 – *L. murrayi* 1 – *L. grayi*, 3 – *L. ivanovii*) и референс-штаммы других родов из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы Ульяновской ГСХА им. П.А. Столыпина (1 штамм бактерий рода *Erysipelothrix*, 1 – *Jonesia*, и 1- *Staphylococcus*). Бактерии обладали типичными для данных родов и видов биологическими свойствами.

Бактериофаги: выделенные нами из лизогенных культур L.m 1, L.m 2, L.m 12

Изучение биологических свойств фагов проводили по методам, предложенным Н.А. Капыриной, М.Р.С. Clokie, А.М. Kropinski [6], С.Р. Sword [7], М.С. Pickett.

Морфологию негативных колоний фагов изучали при посевах фагов методом агаровых слоев. Литическую активность фагов определяли методами Аппельмана (метод серийных разведений в жидкой питательной среде) и Грация (метод агаровых слоев) [1].

Диапазон литической активности и специфичность селекционированных фагов изучали методом нанесения фага на газон гомологичных или гетерологичных бактериальных культур [3,4].

Результаты исследований и их обсуждение.

Морфологию негативных колоний бактериофагов изучали двухслойным методом Грация (А. Gratia, 1936) с использованием 1,5%-ного агара и мясopетонного бульона с добавлением 1% глюкозы.

Негативные колонии, образуемые изучаемыми бактериофагами, имели схожую морфологию: колонии округлой формы с ровными краями, в диаметре от 1 до 2 мм, прозрачные, без зоны неполного лизиса (рис. 1 а, б).

Литическую активность бактериофагов оценивали по их способности вызывать лизис бактериальной культуры в жидких и на плотных питательных средах и выражали максимальным разведением, в котором испытуемый фаг проявил свое литическое действие. Литическую активность листериозных бактериофагов определяли методами Аппельмана (метод серийных разведений в жидких питательных средах) и Грация (метод агаровых слоев на плотных питательных средах).

Титром считали то максимальное разведение бактериофага, при котором наблюдали полный лизис чувствительной к нему культуры – это соответствовало той последней пробирке в ряду, в которой бульон еще оставался совершенно прозрачным.

Проведенные исследования показали, что изучаемые бактериофаги обладали литической активностью в диапазоне от 10^6 до 10^7 , по методу

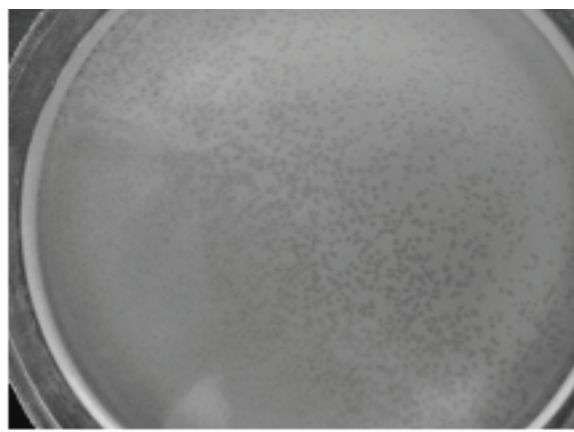
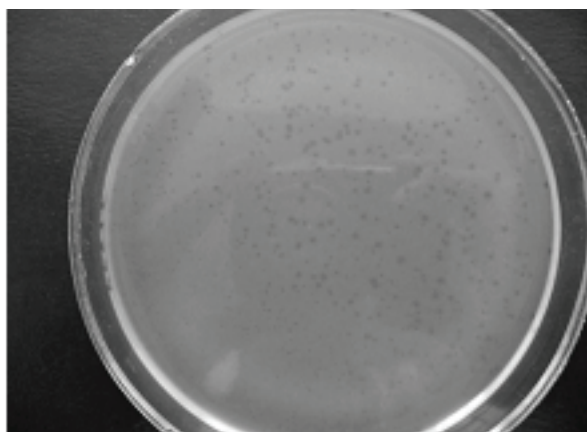


Рисунок 1 - Негативные колонии листериозных бактериофагов, а – *L.m-1*, б - *L.m-12*

Таблица 1 – Литическая активность листериозных бактериофагов

Бактериофаги	Литическая активность	
	по методу Аппельмана	по методу Грация
Lm 1	10^{-6}	1×10^6
Lm 2	10^{-7}	2×10^7
Lm 12	10^{-6}	2×10^6

Таблица 2 – Спектр литической активности фагов листерий*

№ п/п	№ штамма	Листериозные бактериофаги		
		Lm 1	Lm 2	Lm 12
	<i>L.monocytogenes</i> № 766	+	—	—
	<i>L.monocytogenes</i> № 634	—	—	+
	<i>L.monocytogenes</i> № 10522	+	+	+
	<i>L.monocytogenes</i> № 11944	+	+	—
	<i>L.monocytogenes</i> № 139	—	+	—
	<i>L.monocytogenes</i> № 1197	—	—	+
	<i>L.monocytogenes</i> № 1213	-	-	-
	<i>L.monocytogenes</i> № 9-72	—	+	—
	<i>L.monocytogenes</i> № 9-127	+	—	+
	<i>L.monocytogenes</i> № 9-130	—	+	—
	<i>L.monocytogenes</i> № 129	+	+	—
	<i>L.monocytogenes</i> № 17/57	—	+	+
	<i>L.monocytogenes</i> № K-1	—	+	—
	<i>L.monocytogenes</i> № 56	—	+	+
	<i>L.monocytogenes</i> № 1221	+	—	+
	<i>L.monocytogenes</i> № 4в	—	+	—
Процент лизируемых культур:		37,5	62,5	43,7

*Примечание: «+» - лизис, «—» - отсутствие лизиса.

Аппельмана и от 1×10^6 до 2×10^7 фаговых корпускул в 1 мл по методу Грация (табл. 1).

Спектр литической активности является характерной особенностью штаммов фага. Определение проводили методом нанесения фага на газон бактериальной культуры.

При положительном результате на газоне

сплошного роста культуры на месте нанесения капли фага была видна прозрачная зона лизиса. При отсутствии лизиса на газоне исследуемой культуры результат считали отрицательным.

Спектр литической активности находится в пределах от 37,5 % до 62,5 % из числа исследуемых штаммов (табл. 2).

Таблица 3 – Специфичность листериозных бактериофагов

Род (вид) бактерий	Количество исследуемых штаммов	Бактериофаги		
		L.m 1	L. m 2	L. m 12
		Процент лизируемых культур		
<i>L.monocytogenes</i>	16	37,5	62,5	43,7
<i>L.innocua</i>	3	–	–	–
<i>L.ivanovii</i>	3	–	–	–
<i>L.seeligeri</i>	1	–	–	–
<i>L.welshimeri</i>	1	–	–	–
<i>L.grayi</i>	1	–	–	–
<i>L.murrayi</i>	1	–	–	–
<i>Erysipelothrix insidiosa</i>	1	–	–	–
<i>Jonesia dentrificans</i>	1	–	–	–
<i>Staphylococcus spp</i>	1	–	–	–

*Примечание: «–» - отсутствие лизиса

Специфичность – одно из основных свойств бактериофага, определяющее возможность его применения для идентификации культур возбудителя. Специфичность исследуемых фагов изучали методом нанесения фага на газон гетерологичных бактериальных культур.

В результате изучения бактериофагов *L.m 1* и *L.m 2* по отношению к представителям других родов (*Erysipelothrix*, *Jonesia*, *Staphylococcus*) и видов рода *Listeria* (*L.monocytogenes*, *L.innocua*, *L.murrayi*, *L.grayi*, *L.ivanovii*) установлено, что данные фаги лизировали только бактерии вида *L.monocytogenes*. Показатели

специфичности бактериофагов *Listeria* представлены в таблице 3.

Заключение. В результате проведенных исследований нами изучены основные биологические свойства бактериофагов *L.m 1*, *L.m 2* и *L.m 12*. Выделенные бактериофаги специфичны, обладают литической активностью в диапазоне от 10^{-6} до 10^{-7} , по методу Аппельмана и от 1×10^6 до 2×10^7 фаговых корпускул в 1 мл по методу Грация. Спектр литической активности фагов находится в пределах от 37,5 % до 62,5 % из числа исследуемых штаммов.

Библиографический список:

1. Адамс, М. Бактериофаги / М. Адамс. – М.: Медгиз, 1961. – 521 с.
2. Васильев, Д.А. Разработка методов выделения и селекции бактериофагов *Bordetella bronchiseptica* / Д.А. Васильев, Ю.Б. Васильева, Е.Н. Семанина // Материалы Международной научно-практической конференции «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности». - Ульяновск: УГСХА им. П.А. Столыпина. – 2013. - Т.1. – С. 28-32
3. Васильев, Д.А. Изучение основных биологических свойств бактериофагов *Bordetella bronchiseptica*, выделенных методом индукции / Д.А. Васильев, Е.Н. Семанина, С.Н. Золотухин, Ю.Б. Васильева [и др.] // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2011. - №1 (13). - С. 59–62.
4. Гольдфарб, Д.М. Бактериофагия / Д.М. Гольдфарб. – М.: Медгиз, 1961. – 299 с.
5. Листерии и листериоз / И.А. Бакулов, Д.А. Васильев, Д.В. Колбасов [и др.] // монография. – Ульяновск, УГСХА, 2008. – 168 с.
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. Sword, C.P. The isolation and characterization of bacteriophages from *Listeria monocytogenes* / C.P. Sword, M.J. Pickett // J. gen. Microbial. – 1961. – 25, № 2. – P. 241 – 248.

BASIC BIOLOGICAL PROPERTIES OF LISTERIA BACTERIOPHAGES

Suldina E.V., Kovaleva E.N., Vasilev D.A.

Keywords: *Listeria*, listeriosis, bacteriophages, morphology negative colonies, lytic activity, the spectrum of lytic action, the specificity of action

The article describes characteristic of the biological properties of bacteriophages (lytic activity, lytic activity spectrum, the specificity of action).