

/ Е.В. Сафонова. Автореферат дис. ... канд. биол. наук. Владивосток, 2011. – 25 с.

3. Виноградова, Ю.К. Черная книга флоры Средней России: чужеродные виды растений в экосистемах Средней России /Ю.К. Виноградова, С.Р. Майорова, Л.В. Хо-

рун. - М.: ГЕОС, 2009. – 512 с.

4. Raunkiaer Cr. C. The life form of plants and statical plant geography. Oxford: Clarendon, 1934. – 632 p.

5. Серебряков, И.Г. Экологическая морфология растений /И.Г. Серебряков. - М.: Высшая школа, 1962. – 380 с.

УДК 578.81:579.67

ВЫДЕЛЕНИЕ БАКТЕРИОФАГОВ *LISTERIA MONOCYTOGENES* МЕТОДОМ ИНДУКЦИИ

Ковалева Елена Николаевна, кандидат биологических наук, доцент*

Васильев Дмитрий Аркадьевич, доктор биологических наук, профессор*

Золотухин Сергей Николаевич, доктор биологических наук, профессор*

Сутьдина Екатерина Владимировна, аспирант*

Имамов Марат Амиржанович, аспирант*

Швиденко Инна Григорьевна, доктор медицинских наук, профессор**

*ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина», кафедра микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы

432017, г. Ульяновск, бульвар Новый Венец, 1,

e-mail: elkov@pochta.ru

** ГБОУ ВПО Саратовский ГМУ имени В.И. Разумовского Минздравсоцразвития России, кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии

410012, Саратов, ул. Большая Казачья, 112

Научные исследования проводятся при финансовой поддержке государства в лице Минобрнауки России в рамках реализации федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009 – 2013 годы (соглашение № 8267 от 10.08.2012).

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.

Уже более 100 лет известны заболевания людей и животных, обусловленные листериями, но до настоящего периода листериоз остается недостаточно изученным. Данную инфекцию, как на причину пищевой инфекции ранее не обращали внимания, только в 80-х годах двадцатого столетия в ряде высокоразвитых стран мира (США, Великобритания, Швейцария, Франция, Кана-

да) после вспышек в связи с употреблением готовых продуктов, данное заболевание стали рассматривать как пищевую инфекцию [4].

Во многих странах мира приняты государственные системы контроля продуктов питания, несущими риск заражения листериями, выработаны стандарты для готовой пищевой продукции с учетом возможности

их реконтаминации при хранении в холодильниках, законодательно закреплена необходимость соблюдения правил и технологических норм в пищевой индустрии, при транспортировке, хранении и реализации продуктов.

В настоящее время актуальна проблема профилактики инфицирования листериями кормов и продуктов питания, тем самым обусловлена необходимость ускоренной индикации и идентификации указанных бактерий. Бактериофаги являются простым и надежным инструментом для реализации данной цели [5, 6, 8, 9].

Цели и задачи исследования

Целью работы является разработка схемы выделения бактериофагов бактерий вида *L.monocytogenes* методом индукции из лизогенных культур.

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 фагов проводили по методам, предложенным Н.А. Капыриной [2], M.R.J. Clokie, A.M. Kropinski [7], Э.Каттер, А. Сулаквелидзе [3], С.Р. Sword, M.J. Pickett [10], Д.А. Викторовым [1].

Результаты исследований

В качестве тест-штамма для оптимизации параметров индукции использовали вирулентный штамм *L.monocytogenes* – 766 (рис.1), 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.

Плотность среды при облучении, время экспозиции и расстояние до источника света варьировали, в ходе эксперимента применялись 3 схемы:

1 схема: 0,5 мл 24-часовой культуры тест-штамма *L.monocytogenes* наносили сплошным газоном на чашки Петри с мясопептонным агаром и подсушивали в термостате при температуре 37°C 15 – 30 минут. Затем на бактериальный газон в чашках воздействовали ультрафиолетовым излучением с длиной волны 254 нм с расстояния 1,0 м в течение 5 минут.

Облученную таким образом чашку инкубировали в термостате 24 ч при температуре 37°C. Через указанный срок, чашку просматривали на наличие бактерий. На поверхности агара наблюдался рост отдельных колоний (рис.2). Затем с помощью шпателя Дригальского растирали выросшую бактериальную массу по поверхности среды до получения однородного слоя, после чего повторно воздействовали УФ-лучами на чашки с тест-штаммом в течение 10 минут и последующем инкубированием в термостате при аналогичных условиях (37°C, 24 ч). На третьем этапе снова растирали бактериальную массу по поверхности агара, проводили облучение в течение 15 минут с расстояния 1,0 м и инкубировали чашки 24 ч при 37 °C.

Затем проводили смыв с поверхности агара мясопептонным бульоном в количестве 5,0 мл, фильтровали полученную суспензию через мембранный фильтр с диаметром пор 0,2 мкм для удаления бактериальных клеток, и переносили суспензию в пустую стерильную пробирку для дальнейших исследований на наличие в ней активных фаговых корпускул. Для этого сначала проводили накопление бактериофага. В пробирку с 4,5 мл мясопептонного бульона добавляли 0,2 мл 18-часовой индикаторной бульонной культуры штамма *L.monocytogenes* 9-127 и 1,0 мл исследуемой суспензии, инкубировали 24 ч при 37°C, после чего освобождали суспензию от бактериальных клеток фильтрованием и исследовали на наличие фага методом стекающей капли на чашках со сплошным газоном штамма *L.monocytogenes* 9-127. Посевы ин-

кубировали при 37°C 24 ч. При наличии фага в суспензии на сплошном бактериальном газоне индикаторной культуры должна наблюдаться дорожка лизиса или отдельные негативные колонии бактериофага. В случае отсутствия фага газон на чашках однородный, без признаков выраженного лизиса или задержки роста [1].

2 схема: проводили однократное облучение 4-х часового газона культуры тест-штамма *L.monocytogenes* – 766, с использованием экспозиции различной продолжительности (с): 20; 40; 60; 120; 180, при этом чашку с газоном помещали на расстоянии 40 см от источника излучения. Облученную таким образом чашку термостатировали при 37°C в течение 24 ч, после чего проводили смыв с поверхности агара мясopептонным бульоном в количестве 5,0 мл, фильтровали полученную суспензию через мембранный фильтр с диаметром пор 0,2 мкм и переносили суспензию в стерильную пробирку. Для накопления бактериофага в пробирку с 4,5 мл мясopептонного бульона добавляли 0,3 мл 18-часовой индикаторной бульонной культуры штамма *L.monocytogenes* 9-127 и 1,0 мл исследуемой суспензии, инкубировали 24 ч при 37°C, после чего освобождали суспензию от бактериальных клеток фильтрованием. Полученные фильтраты исследовали методом агаровых слоев. Для этого мясopептонный 1,5 % агар разливали в чашки Петри в количестве 25 – 30 мл (первый слой). После застывания среды чашки ставили на 1,5 – 2 часа для подсыхания. В пробирку с 2,5 мл 0,7 % расплавленного и остуженного до температуры 45°C агара вносили 1 мл исследуемого фильтрата и 0,2 мл 18-часовой бульонной культуры штамма *L.monocytogenes* 9-127. Содержимое пробирок быстро перемешивали, чтобы не произошло застывания агара, и выливали в ту же чашку вторым слоем. После того, как агар принимал плотную консистенцию, посе́вы ставили в термостат при 37°C.

Контролем служила индикаторная культура референс-штамма бактерий вида *L.monocytogenes*, засеянная методом агаровых слоев с 1 мл стерильного мясopептонного бульона. Учет результатов проводили



Рис. 1 – Контроль 24-х часового бактериального газона из тест-штамма *L.monocytogenes* – 766

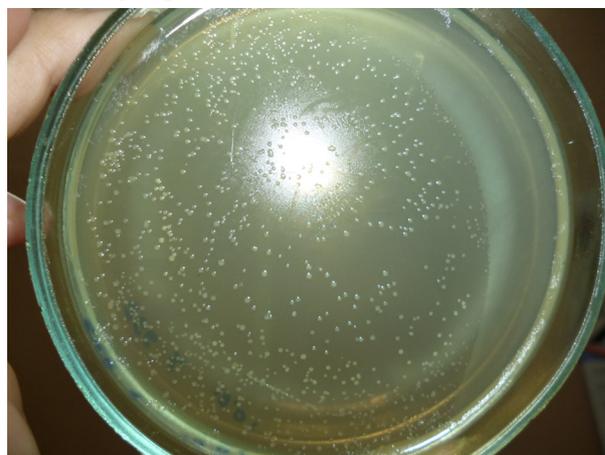


Рис. 2 – Рост отдельных колоний после воздействия на газон УФ-лучей в течение 5 мин, при расстоянии 1 м до источника излучения

через 18 часов инкубирования при температуре 37°C [3, 7].

3 схема: облучению подвергали 4-х часовую бульонную культуру тест-штамма *L.monocytogenes* - 766, выращенную при 37°C. Перед облучением бактерии разводили в слабощелочном фосфатном буфере (pH-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 мясо-

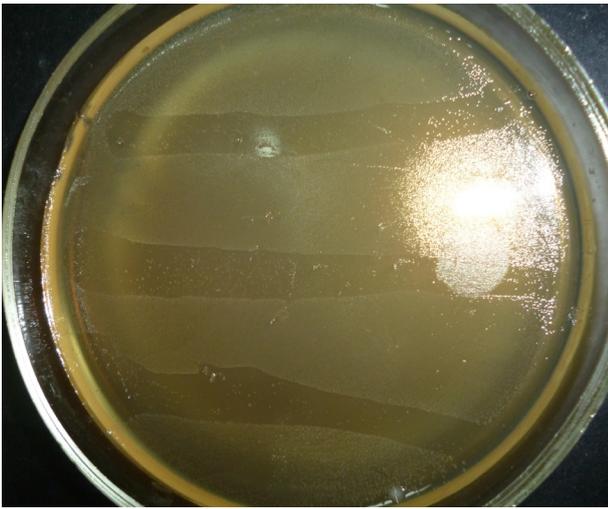


Рис. 3 – Дорожки лизиса на сплошном бактериальном газоне индикаторной культуры *L.monocytogenes* 9-127

пептонный бульон комнатной температуры. Облученные листериозные культуры инкубировали при 22°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. 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 37°C (рис.3). Присутствие бактериофага, определяли по наличию прозрачных пятен, хорошо видимых на матовом фоне глубинного роста бактерий [2, 10].

Выводы. В результате проведенных исследований выделен бактериофаг бактерий вида *L.monocytogenes*, разработана оптимальная схема выделения листериозного бактериофага методом индукции УФ-лучами. Экспериментально установлено, что для облучения наилучшим образом подходит жидкая слабощелочная среда, время экспозиции – 30 с, расстояние до источника излучения – 40 см.

Библиографический список

1. Викторов, Д.А. Выделение бактериофагов бактерий *Pseudomonas putida* и их се-

лекция в целях создания биопрепарата для диагностики псевдомоноза рыб / Д.А. Васильев, Д.А. Викторов, И.И. Богданов // Естественные и технические науки. – 2011. – № 2 (52). – С. 79 – 82.

2. 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.

3. 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.

4. Листерии и листериоз / И.А. Бакулов, Д.А. Васильев, Д.В. Колбасов [и др.] // монография. – Ульяновск, УГСХА, 2008. – 168 с.

5. Bacteriophage P100 for control of *Listeria monocytogenes* in foods: genome sequence, bioinformatic analyses, oral toxicity study, and application / R.M. Carlton, W.H. Noordman, B. Biswas [et al.] / Regulatory Toxicology and Pharmacology. – 2005. – 43. – P. 301 – 312.

6. Biocontrol of *Listeria monocytogenes* on fresh-cut produce by treatment with lytic bacteriophages and a bacteriocin / B. Leverentz, W.S. Conway, M.J. Camp [et al.] // Appl. and Environ. Microbiol. – 2003. – 69, № 8. – P. 4519 – 4526.

7. 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.

8. 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.

9. Loessner, M.J. Bacteriophage typing of *Listeria* species / M.J. Loessner, M. Busse // Appl. and Environ. Microbiol. – 1990. – 56, № 6. – P. 1912 – 1918.

10. Sword, C.P. The isolation and characterization of bacteriophages from *Listeria monocytogenes* / C.P. Sword, M.J. Pickett // J. gen. Microbiol. – 1961. – 25, № 2. – P. 241 – 248.