

УДК 579.62

БАКТЕРИОФАГИ *PSEUDOMONAS PUTIDA* И *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ДЛЯ ДЕКОНТАМИНАЦИИ РЫБНОГО, МЯСНОГО СЫРЬЯ И ГОТОВЫХ ПРОДУКТОВ ПИТАНИЯ ИЗ НИХ

Мартынова К.В., аспирант, тел. 8-904-195-25-31, belova_ksenya@mail.ru, Столетов В.В., магистрант, Феоктисова Н.А., к.б.н., доцент, Васильев Д.А., д.б.н., профессор ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ, Ульяновск, Россия

Ключевые слова: бактериофаг, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa*, биопрепарат, псевдомоноз рыб.

Работа посвящена выделению из проб пищевого сырья и продуктов питания бактериофагов специфичных к бактериям *Pseudomonas putida* и *Pseudomonas aeruginosa*, и подбору оптимальных параметров их культивирования. Было выделено и селекционировано 14 изолятов бактериофагов активных в отношении бактерий *P. putida* и 7 изолятов бактериофагов активных в отношении бактерий *P. aeruginosa*.

Исследования проводятся в соответствии с тематическим планом научно-исследовательских работ выполненных ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ по заданию МСХ РФ в 2018 году.

Введение. Бактерии *Pseudomonas putida* и *Pseudomonas aeruginosa* играют значительную роль в порче пищевого сырья и продовольственных товаров (мяса, рыбы, молока), их часто выделяют как из внешней среды (вода, почва, растения), так и из патологического материала. Данные микроорганизмы являются возбудителями псевдомоноза рыб [1, 2].

С середины прошлого столетия бактериофаги широко используются для диагностики различных бактериальных инфекций. В настоящее время фаговые биопрепараты интересны для пищевой промышленности в качестве экологически безопасного и эффективного способа для деконтаминации продовольственного сырья и готовых продуктов питания [2, 3].

Цель работы – выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов *Pseudomonas putida* и *Pseudomonas aeruginosa*.

Материалы и методы исследований. Штаммы бактерий: 2 референс-штамма бактерии *P. putida* №901 IV-89; ATCC 12633 IV-87, полученные из музея ГИСК им. Л.А. Тарасевича; 4 референс-штамма бактерии *P. aeruginosa* 128, 1677, 381, 453, полученные из музея НИИЦМБ ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ; 22 штамма бактерий *P. putida* и 15 штаммов бактерий *P. aeruginosa*, выделенных нами из проб пищевого сырья и продуктов питания. Объекты исследований – 100 наименований пищевого сырья и продуктов питания (молоко, мясо,

мясные продукты, рыба и рыбные консервы). Выделение и изучение биологических свойств фагов проводили по методам В.Я. Ганюшкина [4], И.П. Ревенко [5], Э. Каттер [6], С.Н. Золотухина [7].

Результаты исследований. Исследования были посвящены выделению бактериофагов *P. putida* и *P. aeruginosa* методом агаровых слоев по Грация из 100 наименований пищевого сырья и продуктов питания (молоко, мясо, мясные продукты, рыба и рыбные консервы). В результате проведенных исследований нами было выделено 14 изолятов бактериофагов активных в отношении бактерий *P. putida* и 7 изолятов бактериофагов активных в отношении бактерий *P. aeruginosa* [2, 3].

Изучены основные биологические свойства выделенных бактериофагов *P. putida* и *P. aeruginosa* (литическая активность: по Аппельману от 10^{-5} до 10^{-10} , по Грация от $4,0 \pm 0,1 \times 10^5$ до $4,0 \pm 0,1 \times 10^{10}$ (БОЕ/мл); спектр литической активности составляет: минимальный процент лизируемых культур *P. putida* – 71,4%, максимальный – 85,7%; минимальный процент лизируемых культур *P. aeruginosa* составил 76,9%, максимальный – 94,8%; специфичность действия бактериофагов; морфология корпускул фагов; воздействие температуры в диапазоне 58-60°C не понижает литическую активность фагов, как и воздействие хлороформа в соотношении 1:10 во временном интервале 15-45 минут; определено, что в течение месяца показатели литической активности исследуемых бактериофагов Ps.p10-УГСХА, Ps.a.4-УГСХА остались без изменений, при хранении в условиях 2-4°C в течение 6 месяцев литическая активность не значительно была снижена).

После изучения основных биологических свойств выделенных штаммов бактериофагов бактерий *P. putida* и *P. aeruginosa* для изготовления диагностического биопрепарата были отобраны штаммы фага Ps.p10-УГСХА и фага Ps.a.4-УГСХА.

Штаммы фагов Ps.p10-УГСХА и Ps.a.4-УГСХА культивировали в МПБ (рН 7,4-7,6) с индикаторными культурами бактерий *P. putida* АТСС 12633 и *P. aeruginosa* 128. Для определения температурного оптимума культивирования бактериофагов готовили разведение фага от 10^{-1} до 10^{-10} в стерильном МПБ. Разведения фага от 10^{-5} до 10^{-10} засевали на чашке методом агаровых слоев по Грация, подсушивали, ставили в термостат при температурных режимах от 20 до 36°C, инкубировали от 18 до 24 часов. Для учета результатов подсчитывали количество негативных колоний. Полученные данные показывают, что температура 28°C является оптимальной для культивирования бактериофагов.

Проведенными исследованиями было установлено, что оптимумом соотношения фагов и индикаторных бактерий будет соотношение 1:2, или 0,2 мл фага к 0,4 мл культуры.

Для определения оптимума соотношения между временем пассажа и активностью бактериофага 0,2 мл 18-24-часовой бульонной культуры индикаторной бактерии и 0,2 мл бактериофага смешивали в пробирке с 4,5 мл стерильного МПБ, перемешивали, инкубировали в термостате при температуре 28°C в течение 4, 6, 8, 10, 12 часов. Затем содержимое пробирок фильтровали через мембранные фильтры на установке вакуумной фильтрации фирмы «Millipor» и исследовали методом агаровых слоев по Грациа. В результате опытов определили, что оптимумом времени пассажа для фагов Ps.p10-УГСХА и Ps.a.4-УГСХА будет 8 часов.

Резюмируя выше изложенное, рекомендовано для изготовления биопрепарата использовать бактериофаги Ps.p10-УГСХА и Ps.a.4-УГСХА, и культуры *P. putida* ATCC 12633 и *P. aeruginosa* 128, которые хранятся на полужидком МПА (рН 7,2-7,4) с содержанием 0,3% бактериологического агара при температуре 2-4°C (пересев музея рекомендуется каждые 3-4 месяца). Культивирование изучаемых бактериофагов на вышеназванных штаммах дает литическую активность $4,0 \pm 0,1 \times 10^{10}$ БОЕ в 1 мл фаголизата.

Заключение. В результате проведенных исследований было выделено и селекционировано 14 изолятов бактериофагов активных в отношении бактерий *P. putida* и 7 изолятов бактериофагов активных в отношении бактерий *P. aeruginosa*. Для изготовления биопрепарата рекомендовано использовать бактериофаги Ps.p10-УГСХА и Ps.a.4-УГСХА, и культуры *P. putida* ATCC 12633 и *P. aeruginosa* 128. Установлено, что температурным оптимумом для культивирования биопрепарата на основе полученных фагов с индикаторными культурами была температура 28°C. Определено оптимальное соотношение бактериофагов и штаммов *P. putida* и *P. aeruginosa* – 1:2, т.е. 0,2 мл фага на 0,4 мл индикаторной культуры, время пассажа составляет 8 часов.

Библиографический список:

1. Васильев, Д.А. Выделение бактериофагов бактерий *Pseudomonas putida* и их селекция 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. Шестаков, А.Г. Усовершенствование методов выделения, идентификации индикации бактерий *Pseudomonas aeruginosa* // Автореф. дис. канд. биол. наук. - Саратов, 2010.
3. Викторов, Д.А. Усовершенствование методов выделения, идентификации и индикации бактерий *Pseudomonas putida*// Автореф. дис. канд. биол. наук. - Саратов, 2011.
4. Ганюшкин, В.Я. Бактериофаги сальмонелл и их применение в ветеринарии / В.Я. Ганюшкин. - Ульяновск, 1988. - с. 45.

5. Ревенко, И.П. Бактериофаги и их использование в ветеринарной практике / И.П. Ревенко. - Киев: Урожай, 1978. - с. 88.
6. Каттер, Э. Бактериофаги: биология и практическое применение / Э. Каттер, А. Сулаквелидзе; науч. ред. А.В. Летаров; [пер. с англ. Е. Е. Куликов и др.]. - Москва: Научный мир, 2012. - с. 636.
7. Васильев, Д.А. Антология научно-методических материалов по изучению бактериофагов / Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин. - Ульяновск, УГСХА, 2017. - с. 201.

BACTERIOPHAGES OF PSEUDOMONAS PUTIDA AND PSEUDOMONAS AERUGINOSA FOR THE DECONTAMINATION OF FISH, MEAT RAW MATERIALS AND FINISHED FOOD PRODUCTS FROM THEM

Martynova K.V., Stoletov V.V., Feoktistova N.A., Vasilyev D.A.

Key words: *bacteriophage, Pseudomonas putida, Pseudomonas aeruginosa, biological product, pseudomonosis of fish.*

The work is devoted to the selection of samples of food raw materials and food bacteriophages specific to bacteria Pseudomonas putida and Pseudomonas aeruginosa, and the selection of optimal parameters of their cultivation. Allocated and selected 14 isolates of bacteriophages active against bacteria P. putida and 7 isolates of bacteriophages active against bacteria P. aeruginosa.