

БАКТЕРИОФАГИ БАКТЕРИЙ *LISTERIA* SPP. И ИХ БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

Сулдына Екатерина Владимировна¹, ассистент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

Васильев Дмитрий Аркадьевич¹, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

Обухов Игорь Леонидович², доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник

¹ ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ

² Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной санитарии, гигиены и экологии — филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр — Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.П. Коваленко Российской академии наук» (ВНИИВСГЭ — филиал ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН)

¹432017, г. Ульяновск, бульвар Новый Венец, 1; 89374545651, e-mail: e.suldina2006@yandex.ru

²123022, г. Москва, Звенигородское шоссе, д. 5.

Ключевые слова: *Listeria*, *Listeria monocytogenes* листерии, листериоз, пищевые патогены, фаг, бактериофаги, бактерии, биологические свойства.

В статье представлены результаты исследований по изучению биологических свойств 5 изолятов бактериофагов бактерий рода *Listeria* и отбору наиболее перспективного штамма фага с целью конструирования биопрепарата для деконтаминации рыбного, мясного сырья и готовой продукции. Установлено, что все 5 штаммов изучаемых листериозных бактериофагов L.m 1 УлГАУ, L.m 2 УлГАУ, L.m 4 УлГАУ, L.m 6 УлГАУ, L.m 12 УлГАУ имеют различную морфологию негативных колоний. Литическая активность изучаемых фагов находится в пределах от $1,2 \pm 0,1 \times 10^7$ до $2,9 \pm 0,1 \times 10^{10}$ по Грациа и от 10^0 до 10^9 по методу Аппельмана. Установлено отсутствие активности изучаемых бактериофагов в отношении бактерий гетерологичных родов, однако, бактериофаг L.m 4 УлГАУ кроме культур *L.monocytogenes*, лизировал культуры других гемолетически активных видов листерий *L.ivanovii* и *L.seeligeri*. Диапазон литического действия фагов находится в пределах 37,5 % до 86,8%. Бактериофаги умеренно устойчивы к воздействию температуры и устойчивы к 45 минутному воздействию хлороформа. При хранении в течение 6 месяцев литическая активность исследуемых бактериофагов снижалась в пределах одного порядка. При хранении бактериофагов в лиофильновысушенном состоянии титр фага снижался в пределах одного порядка, даже при хранении в течение 12 месяцев. Таким образом, опираясь на полученные данные, по совокупности изученных биологических свойств для дальнейших исследований нами был отобран бактериофаг L.m 4 серии УлГАУ, обладающий свойствами, позволяющими использовать его в составе биопрепарата для деконтаминации рыбного, мясного сырья и готовой продукции.

Исследования проводятся в соответствии с тематическим планом научно-исследовательских работ, выполняемых по заданию МСХ РФ в 2018 году.

Введение

Listeria monocytogenes – опасный пищевой патоген [1]. Этот бактериальный вид - вездесущ по своей природе и может загрязнять производственные линии пищевой промышленности в любой критической контрольной точке. Возрастающее сопротивление этих микроорганизмов дезинфицирующим средствам при определенных условиях требует использования более высоких концентраций химических продуктов [2]. Кроме того, бактерии, подверженные воздействию дезинфицирующих средств, могут с большей вероятностью развивать устойчивость к антибиотикам [3].

Поиск альтернативных решений для преодоления этих проблем вызвал интерес к бактериальным вирусам (бактериофагам) в области сельского

хозяйства [4], аквакультуры [5], безопасности пищевых продуктов [6] и инфекционных заболеваний [7, 8].

Использование бактериофагов, активных в отношении *Listeria spp.* в качестве биодезинфектанта, представляет собой альтернативу, которая могла бы уменьшить использование химических соединений в пищевой промышленности и снизить концентрации токсичных отходов в окружающей среде [9]. Специфические биодезинфицирующие средства, состоящие из суспензий высоковирулентных фагов с широким спектром действия, позволяют элиминировать (разрушить) патогенные микроорганизмы [10] с поверхности пищевого сырья и готовых к употреблению пищевых продуктов в т.ч. рыбной и мясной продукции.

В связи с этим **целью** нашей работы было изучение биологических свойств бактериофагов бактерий *Listeria spp.* и отбор перспективных штаммов фагов для конструирования биопрепарата для деконтаминации рыбного, мясного сырья и готовой продукции.

Задачи исследования:

1. Изучить морфологию негативных колоний бактериофагов бактерий рода *Listeria spp.*
2. Определить литическую активность листериозных фагов.
3. Изучить спектр литического действия фагов бактерий *Listeria spp.*
4. Определить специфичность фагов *Listeria spp.*
5. Изучить устойчивость листериозных бактериофагов к воздействию температуры и хлороформа.
6. Отобрать штаммы фагов для конструирования биопрепарата.

Объекты и методы исследований

Бактериофаги, специфичные к бактериям рода *Listeria spp.* - 5 изолятов: L.m 1 УлГАУ, L.m 2 УлГАУ, L.m 4 УлГАУ, L.m 6 УлГАУ, L.m 12 УлГАУ, выделенные и селекционированные авторами.

В экспериментах использовали чистые штаммы культур бактерий, полученные из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ в количестве 67 штук. Из них 53 принадлежали *Listeria spp.* и 14 штаммов гетерологичных родов: *Erysipelothrix spp.*, *Jonesia spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Rhodococcus spp.*, *Enterobacter spp.*, *Pseudomona spp.*, *Proteus spp.* Культуры бактерий обладали типичными для данных видов биологическими свойствами.

Работа с бактериофагами проводилась по методикам, ранее апробированным сотрудниками кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ ФГБОУ ВО Ульяновского ГАУ [11-13].

Результаты исследований

Морфологию негативных колоний фагов изучали при посевах фагов методом агаровых слоев. Негативные колонии, образуемые изучаемыми

бактериофагами, имели различную морфологию (табл. 1, рис. 1-2).

Для размножения бактериофагов на плотной питательной среде фаг и культуру засеивали методом агаровых слоев в таком соотношении, при котором наблюдается сплошной лизис бактерий. Верхний слой агара, в котором сконцентрированы фаговые частицы, освободившиеся из клеток в результате лизиса, осторожно снимали шпателем и переносили в пробирку, куда добавляли мясо-пептонный бульон из расчета 5 мл на одну чашку. Содержимое пробирки ресуспендировали и оставляли на 30-40- минут при комнатной температуре, затем центрифугировали 20 минут при 3000 об/мин, (ELMI Центрифуга медицинская СМ-6М, Латвия), что позволяло освободить фаголизат от крупных частичек агара. Для более полной очистки фаголизата от остатков агара и бактериальных клеток жидкость повторно центрифугировали при 3000 об/мин 30 мин. С целью получения безбактериального лизата последний подвергали стерилизующей фильтрации, пропуская через бактериальные мембранные фильтры «Millipore» с диаметром пор 0,22 мкм.

Полученные таким образом листериозные бактериофаги хранили в условиях холодильника.

Литическую активность листериозных бактериофагов серии УлГАУ определяли методом титрования на жидкой среде (по Аппельману) и диффузии в верхнем слое полужидкого агара (методом агаровых слоев по А. Gratia). Посев последовательных разведений бактериофагов с целью повышения точности эксперимента проводили в трех повторностях. Результаты исследований отражены в таблице 2.

Изучение специфичности листериозных бактериофагов серии УлГАУ проводили на культурах рода *Listeria*: *L.monocytogenes*, *L.ivanovii*, *L.grayi*, *L.murrayi*, *L.innocua*, *L.seeligeri*, *L.welshimeri* и культурах гетерологичных родов: *Erysipelothrix spp.*, *Jonesia spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Rhodococcus spp.*, *Enterobacter spp.*, *Pseudomona spp.*, *Proteus spp.* (табл. 3).

Экспериментально установлено, что на чашках Петри, засеянных культурами гетерологичных

Таблица 1

Описание морфологии негативных колоний фагов *Listeria*

№ фага	Колонии фага	Индикаторная культура
L.m 1 УлГАУ	Мелкие колонии, диаметром до 0,1 прозрачные, без зоны неполного лизиса	L.m 9-127
L.m 2 УлГАУ	Колонии диаметром 0,3-0,4, округлые, прозрачные, без зоны неполного лизиса	L.m 9-72
L.m 4 УлГАУ	Колонии диаметром 0,5-0,7, округлые, прозрачные, без зоны неполного лизиса	L.m 56
L.m 6 УлГАУ	Колонии диаметром 0,2-0,3, округлые с прозрачным центром и узкой зоной неполного лизиса	L.m 139
L.m 12 УлГАУ	Колонии диаметром 0,2-0,3, округлые, прозрачные, без зоны неполного лизиса	L.m 9-72

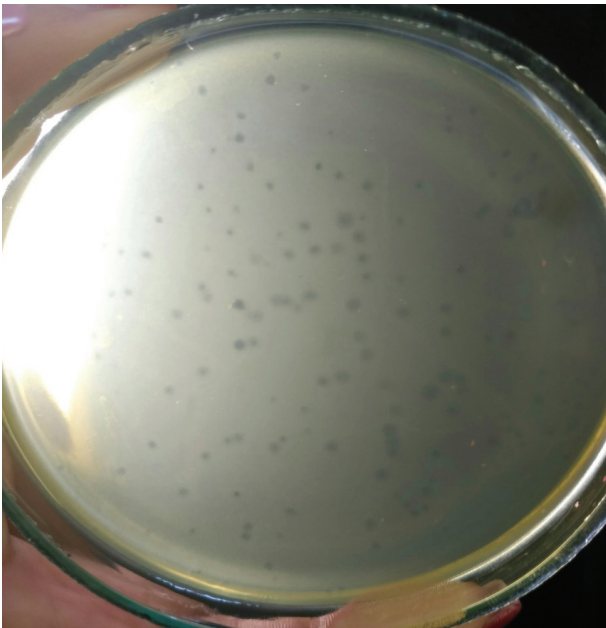


Рис. 1. – Формирование негативных колоний бактериофагом L.m 6 УлГАУ на индикаторной культуре время термостатирования 18 часов при температуре 28±1 °С

родов зон лизиса, при нанесении выделенных и селекционированных нами фагов серии УлГАУ при визуальном осмотре выявлено не было. Однако бактериофаг L.m 4 кроме культур *L.monocytogenes*, лизировал культуры других гемолитически активных видов листерий *L.ivanovii* и *L.seeligeri*.

Опираясь на морфологию негативных колоний и способность полученных бактериофагов к лизису листериозных культур, 4 бактериофага мы отнесли к С-мутантам умеренных фагов. У фага L.m 4 УлГАУ отмечена литическая активность в отношении штамма-продуцента, на основании чего мы отнесли его к V-мутантам умеренных фагов.

Спектр литического действия бактериофагов устанавливался на 53 культурах бактерий рода *Listeria*.

Культуры для исследований готовили стандартным образом, исследования проводили методом «стекающая капля» по Отто. Бактериофаги для эксперимента культивировались на соответствующих индикаторных культурах.

Полученные данные свидетельствуют о том, что диапазон литического действия выделенных и селекционированных листериозных бактериофагов серии УлГАУ находится в пределах от 37,5 % до 86,8% (табл. 3).

Нами была изучена устойчивость выделенных бактериофагов к воздействию температуры в диапазоне 50-90 °С с интервалом в 3 °С. Нагревание фага проводили на водяной бане в течение 30 минут. Установлено, что температура выше 58

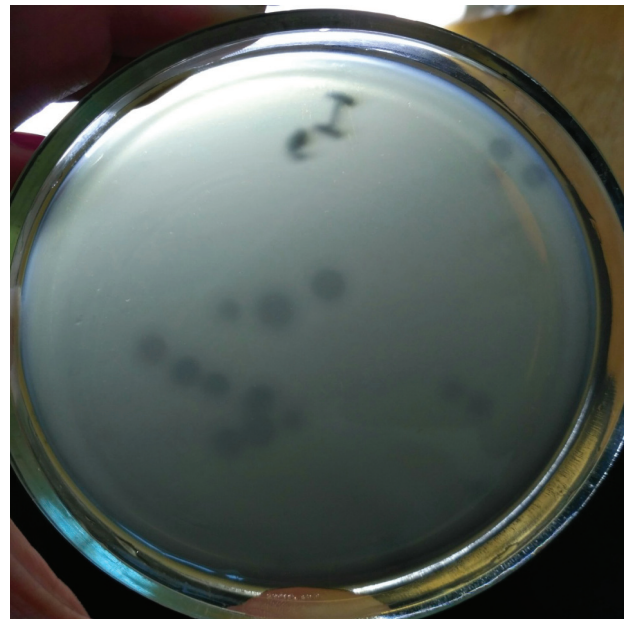


Рис. 2. - Формирование негативных колоний бактериофагом L.m 4 УлГАУ на индикаторной культуре время термостатирования 18 часов при температуре 28±1 °С

°С резко снижает литическую активность фагов в среднем на 2-3 порядка. Температурный диапазон 63-67 °С не снизил титр фага, который был зафиксирован при 63 °С. При температуре выше 70 °С бактериофаг перестал существовать как морфологическая единица.

Эмпирическим путем установлено, что титр исследуемых бактериофагов снижался в пределах одного порядка при 45 - минутном взаимодействии с трихлорметаном в соотношении 10:1.

Для изучения изменения литической активности листериозных бактериофагов в процессе хранения брали закрытые в стерильные флаконы без добавления консерванта монофаги, которые хранились в условиях бытового холодильника (2-4 °С).

Опытным путем нами установлено, что в течение 6 месяцев показатели литической активности исследуемых бактериофагов снижались в пределах одного порядка. Последующие исследования свидетельствуют об относительно высокой скорости снижения показателя литической активности в пределах 12 месяцев, пока велся мониторинг данного показателя. К окончанию анализируемого периода – 12 месяцев с момента укупоривания - нами было зафиксировано снижение титра фагов на 2-3 порядка. Последующее 5-6 кратное пассирование бактериофагов на индикаторных культурах позволяло восстановить их исходный титр, который был установлен при укупоривании в стерильные флаконы.

При хранении бактериофагов в лиофильно высушенном состоянии титр фага снижался в пре-

Литическая активность листериозных бактериофагов серии УлГАУ

№	Название изучаемого биологического свойства бактериофага	Результат изучения характерных биологических свойств сибиреязвенного бактериофага на бактериальной культуре				
		L.m 1 УлГАУ	L.m 2 УлГАУ	L.m 4 УлГАУ	L.m 6 УлГАУ	L.m 12 УлГАУ
1	Литическая активность, БОЕ (бляшкообразующих единиц) / мл (по методу агаровых слоев по Грация)	1,2±0,1×10 ⁷	1,8±0,1×10 ⁹	2,9±0,1×10 ¹⁰	2,1±0,1×10 ⁸	4,2±0,1×10 ⁷
2	Литическая активность (по методу Аппельмана)	10 ⁻⁶	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	10 ⁻⁷	10 ⁻⁶
3	Спектр литического действия на культуре (по Отто)	+	+++	+++	++	++

Таблица 3

Изучение диапазона литической активности и специфичности листериозных бактериофагов серии УлГАУ

Род (вид) бактерии	Количество исследуемых штаммов	Бактериофаг				
		L.m 1 УлГАУ	L.m 2 УлГАУ	L.m 4 УлГАУ	L.m 6 УлГАУ	L.m 12 УлГАУ
		Процент лизируемых культур				
<i>Listeria spp</i>	53	37,5	62,5	86,8	67,8	43,7
<i>Erysipelothrix insidiosa</i>	1	–	–	–	–	–
<i>Jonesia dentrificans</i>	2	–	–	–	–	–
<i>Staphylococcus aureus</i>	4	–	–	–	–	–
<i>Rhodococcus equi</i>	1	–	–	–	–	–
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	–	–	–	–	–
<i>Pseudomonas aureginosa</i>	2	–	–	–	–	–
<i>Proteus vulgaris</i>	3	–	–	–	–	–

делах одного порядка, даже при хранении в течение 12 месяцев.

Выводы

Нами были изучены основные биологические свойства 5 бактериофагов активных по отношению к бактериям рода *Listeria* spp. -: L.m 1 УлГАУ, L.m 2 УлГАУ, L.m 4 УлГАУ, L.m 6 УлГАУ, L.m 12 УлГАУ.

Литическая активность фагов составила от 1,2±0,1×10⁷ до 2,9±0,1×10¹⁰ по Грация и от 10⁻⁶ до 10⁻⁹ по методу Аппельмана.

Установлено отсутствие активности изучаемых бактериофагов по отношению к бактериям гетерологичных родов, однако, бактериофаг L.m 4 УлГАУ кроме культур *L.monocytogenes*, лизировал культуры других гемолетически активных видов листерий *L.ivanovii* и *L.seeligeri*.

Диапазон литического действия фагов находится в пределах 37,5 % до 86,8%.

Бактериофаги умеренно устойчивы к воздействию температуры и устойчивы к 45 - минутному воздействию хлороформа.

При хранении в течение 6 месяцев литическая активность исследуемых бактериофагов снижалась в пределах одного порядка. При хранении

бактериофагов в лиофильно высушенном состоянии титр фага снижался в пределах одного порядка, даже при хранении в течение 12 месяцев.

Таким образом, опираясь на полученные данные по совокупности изученных биологических свойств, мы для дальнейших исследований отобрали бактериофаг L.m 4 серии УлГАУ, обладающий всеми свойствами, необходимыми для использования его в составе биопрепарата для деконтаминации пищевого сырья и продуктов питания.

Библиографический список

1. Radoshevich, L.; Cossart, P. *Listeria monocytogenes*: Towards a complete picture of its physiology and pathogenesis. *Nat. Rev. Microbiol.* 2018, 16, 32–46.
2. Directorate-General for Health and Consumers. Assessment of the Antibiotic Resistance Effects of Biocides, 28th Plenary; Commission Européenne, Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks: Bruxelles, Belgium, 2009.
3. Pearce, H.; Messenger, S.; Maillard, J.-Y. Effect of biocides commonly used in the hospital environment on the transfer of antibiotic-resistance genes in

Staphylococcus aureus. J. Hosp. Infect. 1999, 43, 101–108. [CrossRef] [PubMed]

4. Buttmer, C.; McAuliffe, O.; Ross, R.P.; Hill, C.; O'Mahony, J.; Coffey, A. Bacteriophages and bacterial plant diseases. Front. Microbiol. 2017, 8, 34.

5. Stalin, N.; Srinivasan, P. Efficacy of potential phage cocktails against *Vibrio harveyi* and closely related *Vibrio* species isolated from shrimp aquaculture environment in the south east coast of India. Vet. Microbiol. 2017, 207, 83–96.

6. Bai, J.; Kim, Y.-T.; Ryu, S.; Lee, J.-H. Biocontrol and rapid detection of food-borne pathogens using bacteriophages and endolysins. Front. Microbiol. 2016, 7, 474.

7. Abedon, S.T. Phage therapy of pulmonary infections. Bacteriophage 2015, 5, e1020260.

8. Hagens, S.; Loessner, M.J. Phages of *Listeria* offer novel tools for diagnostics and biocontrol. Front. Microbiol. 2014, 5, 159.

9. Lin, D.M.; Koskella, B.; Lin, H.C. Phage therapy: An alternative to antibiotics in the age of multi-

drug resistance. World J. Gastrointest. Pharmacol. Ther. 2017, 8, 162–173.

10. Алешкин, А.В. Возможности применения бактериофагов в качестве пробиотических средств деконтаминации в области питания / А.В. Алешкин, М.В. Зейгарник // Вопросы диетологии. – 2012. – Т.2, № 4. – С. 24 – 34.

11. Васильев, Д.А. Выделение бактериофагов бактерий рода *Listeria* / Д.А. Васильев, Е.Н. Ковалева, Е.В. Сульдина // Инфекция и иммунитет. – 2014. – сентябрь, специальный выпуск – С. 69-70.

12. Выделение листериозных бактериофагов и изучение их основных биологических свойств / Е.В. Сульдина, Е.Н. Ковалева, Д.А. Васильев, Б.И. Шморгун // Аграрный научный журнал. -2015.- № 3.- С. 37-41.

13. Выделение бактериофагов *Listeria monocytogenes* методом индукции/Е.Н. Ковалева, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин, Е.В. Сульдина, М.А. Имамов, И.Г. Швиденко//Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. -2013. -№ 1. -С. 76-80.

BACTERIOPHAGES OF *LISTERIA* SPP. BACTERIA AND THEIR BIOLOGICAL PROPERTIES

Suldina E. V.¹, Vasiliev D.A.¹, Obukhov I.L.²

¹ FSBEI HE Ulyanovsk SAU

² All-Russian Scientific Research Institute of Veterinary Sanitation, Hygiene and Ecology - a branch of the Federal State Budget Scientific Institution "Federal Scientific Center - All-Russian Scientific Research Institute of Experimental Veterinary Medicine named after K.I. Scriabin and Ya. R. Kovalenko, Russian Academy of Sciences "

¹432017 Ulyanovsk, Novyy Venets Boulevard, 1; 89374545651, e-mail: e.suldina2006@yandex.ru

²123022, Moscow, Zvenigorodskoe rd., 5.

Key words: *Listeria*, *Listeria monocytogenes*, *listeria*, listeriosis, food pathogens, phage, bacteriophages, bacteria, biological properties.

The article presents results of studies on biological properties of 5 isolates of bacteriophages of *Listeria* genus bacteria and selection of the most promising phage strain for constructing a biological preparation for decontamination of fish, raw meat and food products. It was established that all 5 strains of the studied listeriosis bacteriophages L.m 1 ULSAU, L.m 2 ULSAU, L.m 4 ULSAU, L.m 6 ULSAU, L.m 12 ULSAU have different morphology of negative colonies. The lytic activity of the studied phages is in the range from $1.2 \pm 0.1 \times 10^7$ to $2.9 \pm 0.1 \times 10^{10}$ by Gracia and from 10 to 10^9 according to Appelman method. No activity of the studied bacteriophages to bacteria of heterologous genera is established, however, the L.m 4 ULSAU bacteriophage, except the cultures of *L.monocytogenes*, lysed cultures of other hemolytically active species of *L.ivanovii* and *L. seeligeri listeria*. The range of the phage lytic activity ranges from 37.5% to 86.8%. Bacteriophages are moderately resistant to temperature and resistant to 45 minutes of chloroform exposure. During storage for 6 months, the lytic activity of the bacteriophages was reduced in one range. During storage of bacteriophages in the freeze-dried state, the phage titer decreased in the same range, even if stored for 12 months. Thus, on the basis of the data obtained, we selected the bacteriophage L.m 4 of ULSAU series for further research, it has the properties which allow it to be used in a biopreparation for decontamination of fish, raw meat and food products.

Bibliography

1. Radoshevich, L. *Listeria monocytogenes*: Towards a complete picture of its physiology and pathogenesis / L. Radoshevich, P. Cossart // Nat. Rev. Microbiol. - 2018. - No. 16. - P. 32–46.
2. Directorate-General for Health and Consumers. Assessment of the Antibiotic Resistance Effects of Biocides, 28th Plenary; Commission Européenne, Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks: Bruxelles, Belgium, 2009.
3. Pearce, H. Effect of biocides, commonly used in the hospital environment on the transfer of antibiotic-resistance genes in *Staphylococcus aureus* / H. Pearce, S. Messenger, J.-Y. Maillard // J. Hosp. Infect. - 1999. - No. 43. - P. 101-108. [CrossRef] [PubMed]
4. Bacteriophages and bacterial plant diseases / C. Buttmer, O. McAuliffe, R. P. Ross, C. Hill, J. O'Mahony, A. Coffey // Front. Microbiol. - 2017. - No. 8. - P. 34.
5. Stalin, N. Efficacy of potential phage cocktails against *Vibrio harveyi* and closely related *Vibrio* species isolated from shrimp aquaculture environment in the south east coast of India / N. Stalin, P. Srinivasan // Vet. Microbiol. - 2017. - No. 207. - P. 83-96.
6. Biocontrol and rapid detection of food-borne pathogens using bacteriophages and endolysins / J. Bai, Y.-T. Kim, S. Ryu, J.-H. Lee // Front. Microbiol. - 2016. - No. 7. - P. 474.
7. Abedon, S.T. Phage therapy of pulmonary infections / S.T. Abedon // Bacteriophage. - 2015. - No. 5. - e1020260.
8. Hagens, S. Phages of *Listeria* offer novel tools for diagnostics and biocontrol / S. Hagens, M.J. Loessner // Front. Microbiol. - 2014. - No. 5. - P. 159.
9. Lin, D.M. Phage therapy: An alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance / D.M. Lin, B. Koskella, H.C. Lin // World J. Gastrointest. Pharmacol. Ther. - 2017. - No. 8. - P. 162-173.
10. Aleshkin, A.V. Possibilities of using bacteriophages as probiotic means of decontamination in the field of nutrition / A.V. Aleshkin, M.V. Zeigarnik // Issues of dietology. - 2012. - Volume 2, №4. - P.24 - 34.
11. Vasiliev, D.A. Isolation of bacteriophages of *Listeria* genus bacteria / D.A. Vasiliev, E.N. Kovaleva, E.V. Suldina // Infection and immunity. - 2014. - September, special issue. - P. 69-70.
12. Isolation of listeriosis bacteriophages and study of their basic biological properties / E.V. Suldina, E.N. Kovaleva, D.A. Vasiliev, B.I. Shmorgun // Agrarian Scientific Journal. - 2015. - No. 3. - P. 37-41.
13. Isolation of *Listeria monocytogenes* bacteriophages by induction method / E.N. Kovaleva, D.A. Vasiliev, S.N. Zolotukhin, E.V. Suldina, M.A. Imamov, I.G. Shvidenko // Vestnik of Ulyanovsk State Agricultural Academy. - 2013. - No. 1. - P. 76-80.