

УДК 578

УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДОВ ВЫДЕЛЕНИЯ ФАГОВ ЛИСТЕРИЙ

*Коцур М.Д., магистрант 3 года обучения,
Гранкина А.С., магистрант 2 года обучения,
Родионова А.В., Родионова И.В., магистранты
1 года обучения ФВМиБ
Научные руководители – Сульдина Е.В., ассистент,
Васильев Д.А., доктор биологических наук, профессор
ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ*

Ключевые слова: *выделение фагов, фотореактивация, бактериальные клетки.*

Данная работа посвящена усовершенствованию методов выделения фагов листерий.

Исследования проводятся при поддержке Фонда содействия инновациям в соответствии с договором №13730ГУ/2018 от 01.04.2019.

Listeria monocytogenes является причиной возникновения листериоза у животных и человека. В настоящее время данное заболевание все чаще регистрируется в виде пищевой токсикоинфекции. Это обусловлено повсеместным распространением листерий в природе, полиморфизмом клинических признаков болезни, высоким уровнем летальности при генерализованных формах инфекции, возрастающими объемами оборота кормов и пищевых продуктов (в частности продуктов быстрого питания).

Нами были подобраны и проверены 3 схемы выделения бактериофагов. В процессе работы некоторые параметры подбирались нами экспериментально, в частности это касается состава субстрата, расстояния до источника света и времени облучения.

Основываясь на литературных данных в данной схеме, мы подвергали облучению газон культуры тест-штамма *L.monocytogenes* на мясопептонном агаре. После получасового подсушивания в термостате при температуре 37°C на бактериальный газон в чашках Петри воздействовали УФ-лучами излучением с длиной волны 254 нм с расстояния 1,0 м в течение 5 минут.

Подвергнутую облучению чашку термостатировали 24 ч при температуре 38°C. Через указанное время, чашку просматривали на

наличие бактерий. На поверхности агара наблюдался рост отдельных колоний (рис.1-2). Затем при помощи шпателя Дригальского растирали выросшую бактериальную массу по поверхности среды до однородного слоя, после чего повторно облучали чашки с тест-штаммом, но уже в течение 10 минут с последующим инкубированием при вышеописанных условиях. Действия повторяли в третий раз увеличивая время облучения еще на 5 минут и инкубировали чашки 24 ч при 28 °С.

Затем содержимое чашек смывали с поверхности МПА при помощи стерильного МПБ или физраствора в количестве 5,0 мл, пропускали полученную суспензию через бактериальные фильтры (0,2 мкм) и исследовали фильтрат на наличие фаговых корпускул модифицированным методом Отто.

С помощью данной схемы выделить бактериофаги листерий нам не удалось.

Применяя данную схему, мы опирались на опыт Sword С. Р. и Pickett М. J. Облучению подвергали свежеприготовленный газон на МПА приготовленный из выращенной в течении ночи при 37°С культуры тест-штамма *L.monocytogenes*, с использованием различной экспозиции (с): 20; 40; 60; 120; 180, при этом чашку с газоном помещали на расстоянии 45 см от источника света. Процедуру проводили в полумраке, чтобы избежать фотореактивации. Облученную таким образом чашку инкубировали при 28°С в течение 18-24 ч, после чего проводили смыв культуры с поверхности агара стерильным МПБ, фильтровали полученную суспензию через бактериальный фильтр (0,2 мкм) в стерильную пробирку. Исследовали фильтрат на наличие фага модифицированным методом Отто.

С помощью данной схемы выделить бактериофаги листерий нам не удалось.

В данном случае качестве тест-штамма для оптимизации параметров индукции использовали штамм *L.monocytogenes* – 80П, индикаторным служил референс-штамм *L.monocytogenes* 56.

Облучению подвергали 4-х часовую бульонную культуру тест-штамма *L.monocytogenes* – 80П, выращенную при 37°С. 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 об-

лучения 50 мкл культуры вносили в мясопептонный 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 с индикаторным штаммом модифицированным методом Отто. Учет результатов осуществляли после 18- часового инкубирования в термостате при $28 \pm 1^\circ\text{C}$. Присутствие бактериофага, определяли по наличию участков лизиса на равномерном газоне культуры индикаторного штамма.

При отсутствии зон лизиса на фоне бактериального роста в первые сутки, наблюдение за посевами продолжали до 5 суток.

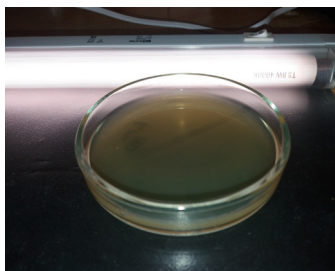


Рисунок 1 - Наличие зоны лизиса бактериофага серии УлГАУ L.m 1 на газоне индикаторных культур

Фаголизаты, полученные после обработки лизогенных бактерий индуцирующими агентами, представляли собой смесь фаговых частиц, обладающих недостаточной активностью, в связи с чем возникла необходимость получения чистых линий бактериальных вирусов. Выделение однородной популяции листериозных бактериофагов добивались при помощи метода непрерывного пассирования (6-10 пассажей) материала из изолированной колонии с индикаторной культурой на плотной питательной среде. Пассирование фагов продолжали до тех пор, пока на газоне чувствительной культуры не образовывались однородные по морфологии бляшкина протяжении 3-5 последовательных пассажей (рис. 1).

Библиографический список:

1. Выделение бактериофагов бактерий рода *Listeria* / Д.А. Васильев, Е.Н. Ковалева, Е.В. Сульдина // Инфекция и иммунитет. – 2014. – сентябрь, специальный выпуск – С. 69-70.
2. 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.
3. Генетические механизмы вирулентности *Listeria monocytogenes*. Генетика, 2001, 37:286-293.
4. ГОСТ Р 51921-2002. Продукты пищевые. Методы выделения и определения бактерий *Listeria monocytogenes*. Госстандарт России. Москва. 2002. с.17.
5. Ермолаева С.А., Тартаковский И.С. Регуляция экспрессии факторов вирулентности у *Listeria monocytogenes*. Журн. микробиол., 2001, 3:106-110.
6. Ефимочкина Н.Р. Молекулярно-генетические методы в идентификации пищевых патогенных бактерий. / ж. Вопросы питания, 2007, № 2, с. 4-15.

IMPROVEMENT OF THE METHODS OF ISOLATION OF PHYSICS OF HYSTERIES

Kotsur M.D, Grankina A.S, Rodionova A.V, Rodionova I.V

Key words: *phage isolation, photoreactivation, bacterial cells.*

*This work is devoted to the improvement of methods for isolating phages of *Listeria*.*