



УДК 663.18

БИОТЕХНОЛОГИЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ БАКТЕРИОФАГОВ

О.В. Решетникова

BIOTECHNOLOGY OF CULTIVATION OF BACTERIOPHAGES

O.V. Reshetnikova

Аннотация. Биотехнология производства препаратов бактериофагов основана на использовании бактериальных клеток, в которых бактериофаги размножаются. Для заражения бактериальных клеток к растущей в жидкой среде культуре чувствительных бактерий в небольшом количестве добавляют частицы вирулентного бактериофага. Длительность периода, от начала заражения клеток бактерий до их лизиса, зависит от природы бактериофага, бактерий и условий культивирования. Развитие вирулентного бактериофага в восприимчивой бактериальной клетке проходит несколько стадий: от прикрепления бактериофага к клетке бактерии, проникновения ДНК бактериофага внутрь клетки микроорганизма, синтеза белковых оболочек новых вирусных частиц до высвобождения новых частиц бактериофагов при лизисе бактериальной клетки, которые заражают другие клетки бактерий. Препараты бактериофагов получают лабораторными и промышленными способами.

Ключевые слова: *бактериофаги; бактерии; культивирование; промышленное производство; биотехнологический процесс.*

Abstract. The biotechnology of the production of bacteriophage preparations is based on the use of bacterial cells in which bacteriophages multiply. To infect bacterial cells with a growing culture of sensitive bacteria in small quantities, particles of the virulent bacteriophage are added in a small amount. The length of the period, from the onset of infection of bacterial cells to their lysis, depends on the nature of the bacteriophage, the bacteria and the conditions of cultivation. The development of a virulent bacteriophage in a susceptible bacterial cell goes through several stages: from attaching the bacteriophage to the bacterial cell, penetrating the bacteriophage DNA into the cell of the microorganism, synthesizing the protein envelopes of the new virus particles, before releasing new bacteriophage particles during lysis of the bacterial cell that infect other bacterial cells. Preparations of bacteriophages are obtained by laboratory and industrial methods.

Key words: *bacteriophages; bacteria; cultivation; industrial production; biotechnological process.*

Биотехнологические процессы связаны с жизнедеятельностью различных групп микроорганизмов: бактерий, вирусов, дрожжей, микроскопических грибов. Культивирование вирусов бактерий (бактериофагов) отличается простотой, коротким периодом генерации, высоким выходом новых частиц, возможностью точного количественного учета, что способствует изучению структуры вирусных частиц и механизмов их взаимодействия с бактериальной клеткой [1].

Бактериофаги получают в жидком и сухом виде лабораторным и промышленным способом. Технологический процесс производства жидких бактериофагов состоит из пяти этапов: 1) подбора штаммов для производства данного вида бактериофага; 2) получение маточных бактериофагов; 3) приготовление серии жидкого бактериофага; 4) контроля готового препарата на стерильность, безвредность, литическую активность; 5) этикетирование, упаковка препарата.

В лабораторных условиях бактериофаги получают путем фильтрации лизированных бульонных культур бактерий через мелкопористые бактериальные фильтры. Для выделения бактериофага исследуемый материал (воду, гной, испражнения, почву и др.) засевают в жидкую питательную среду, наиболее благоприятную для развития тех микроорганизмов, против которых действует бактериофаг. Среду оставляют в термостате на несколько часов. Иногда производят предварительное обогащение питательной среды чистой культурой соответствующего микроба, не выделяющего бактериофаг. Помутневшую питательную среду пропускают через бумажный и бактериальный фильтр, асбестовые пластины, керамические свечи. Полученный фильтрат проверяют на присутствие бактериофага путем засева совместно с соответствующей микробной культурой на плотные (методом стекающей капли – проба Отто) или жидкие питательные среды. После стадии инкубации в течение восемнадцати часов при наличии бактериофага на поверхности агар-агара появляется налет культуры, а на месте растекающейся капли, в зависимости от содержания частиц бактериофага в фильтрате, бактериальный рост полностью отсутствует или наблюдаются округлые стерильные пятна – колонии бактериофага. На жидкой питательной среде присутствие бактериофага обуславливает просветление культуры. Для выделения чистой культуры бактериофага материал из отдельного стерильного пятна переносят бактериологической иглой в суспензию молодой микробной культуры, повторяя операцию выделения пять-десять раз для гарантии чистоты бактериофага. Материал из последнего стерильного пятна засевают вместе с чувствительными микробами на жидкую питательную среду. После инкубации в течение 6-18 часов культуру фильтруют, проводят несколько пассажей для увеличения количества корпускул бактериофагов и получают чистую культуру бактериофага. Выделенный из внешней среды, бактериофаг, культивируемый в лабораторных условиях на соответствующей культуре бактерий, называется маточным штаммом соответствующего бактериофага.

Промышленная технология получения бактериофагов включает следующие этапы: 1) выделение бактериофагов из лизогенных культур бактерий (из внешней среды, от людей и животных); 2) приготовление суспензии бактериофагов путем смыва их частиц с поверхности негативной колонии, образовавшейся после лизиса бактерий на плотной питательной среде; 3) титрование бактериофагов методом агаровых слоев или методом Аппельмана; 4) внесение суспензии бактериофага в молодую культуру бактерий для получения биопрепарата; 5) очистка биопрепарата от питательной среды с использованием центрифугирования, капельного диализа, фильтрации в агар-агар; 6) приготовление концентрированных суспензий бактериофагов; 7) расфасовка, упаковка, маркировка; 8) контроль качества готовых препаратов [2].

В производственных условиях для изготовления препарата бактериофага применяются апробированные штаммы бактериофагов и культуры соответствующих микробов, обладающих типичными морфологическими, биохимическими и серологическими свойствами. Штаммы бактериофагов (музейные, рабочие) на производстве называют маточными бактериофагами. Музейные производственные штаммы бактериофагов ежегодно обновляются путем выделения новых или пассажами имеющихся штаммов бактериофага через организм больного, а также адаптацией к свежевыделенным, резистентным к данному бактериофагу культурам. Маточный бактериофаг размножается и пассируется только на соответствующей культуре в жидкой питательной среде, например, брюшнотифозный бактериофаг пассируется на культуре брюшнотифозной палочки в бульоне Мартена. Рабочий маточный бактериофаг готовится из очередной серии музейного штамма бактериофага, отдельно на каждом из производственных штаммов микробов. Препарат бактериофага представляет собой фильтрат бульонной культуры соответствующих лизированных микробов. Он содержит большое количество размножившихся бактериофагов, обладающих специфиче-

скими лизирующими свойствами. Промышленное производство бактериофагов осуществляется в реакторах, емкостью от 250 до 1 тыс. л., с применением аэрации, стимулирующей развитие микроорганизмов. Для производства бактериофага используется рабочая маточная раса и соответствующие культуры микробов. В биореакторе, например, для изготовления брюшнотифозного и дизентерийного бактериофага используется жидкая питательная среда Мартена или Хоттингера, рН 7,4-7,6, стерилизуемая при температуре 110 °С в течение 40 минут. После стерилизации среда охлаждается до 39 °С и засеивается соответствующей микробной культурой и маточным бактериофагом. Для засева используют агаровые культуры, которые прибавляются из расчета 50 млн. микробных тел на 1 мл среды. Бактериофаг добавляется в количестве не более 0,3 % по отношению к объему питательной среды. Среду с засеянными в ней культурой и бактериофагом оставляют при температуре 37 °С на 6-18 часов. Бактериофаги активно размножаются внутри бактериальных клеток, увеличиваясь в количестве и вызывая их лизис, что внешне проявляется полным просветлением среды. К полученному раствору лизата добавляют консервант (фенол 0,25 % или хинозол 0,01 %), примерно через два часа содержимое реактора фильтруется через бактериальные фильтры для удаления оставшихся микробных клеток. Полученный препарат представляет собой прозрачную жидкость желтого цвета большей или меньшей интенсивности окраски.

Контроль бактериофаговых препаратов проводят на чистоту, активность, специфичность, стерильность, безвредность, литическую активность (вирулентность).

Стерильность проверяют высевом на питательные среды, культивированием в термостате при температуре 37 °С для выявления бактериальной микрофлоры и при 24 °С - для выявления грибковой флоры. Препарат считается годным, если через восемь суток в средах не обнаруживается рост микроорганизмов. При выявлении роста бактерий или грибов в одной из пробирок проводят повторный контроль из удвоенного количества образцов. При повторном проросте сред препарат бракуют.

Активность и специфичность бактериофагов устанавливают на жидких и твердых питательных средах титрованием с соответствующим видом бактерий. Если результаты проверки не соответствуют требованиям инструкции по изготовлению и контролю, такой препарат не подлежит выпуску.

Безвредность препарата проверяют путем введения лабораторным животным, например, брюшнотифозный и дизентерийный бактериофаги вводят подкожно трем мышам по 1 мл, или кролику внутривенно 5 мл. Наблюдение за животными ведется в течение трех-четырех суток; если препарат безвреден, животные остаются здоровыми и бодрыми.

Литическая активность бактериофага (вирулентность) определяется методом титрования на жидкой и плотной питательной среде. Определение вирулентности бактериофагов методом Аппельмана проводится на жидких питательных средах путем установления максимального разведения, вызывающего полный лизис бульонной культуры бактерий. Титр бактериофага выражается максимальным разведением, при котором произошел полный лизис соответствующей культуры, например, титр бактериофага, давшего лизис в первых семи пробирках ряда, равен 10^{-7} . Определение вирулентности на плотной питательной среде методом Отто (стекающей капли) или капельный метод заключается во внесении капли исследуемого бактериофага определенного разведения на засеянный сплошным газоном соответствующей культуры с последующим термостатированием. Результат учитывается по степени лизиса и обозначается плюсами (табл.).

Таблица – Определение вирулентности (литической активности) бактериофагов разными методами

Степень лизиса	Метод Аппельмана на жидкой питательной среде	Метод Отто на плотной питательной среде
++++	абсолютная прозрачность среды, равная стерильному бульону	полный лизис, на месте закапывания бактериофага культура не растет
+++	почти полная прозрачность, лишь незначительно отличающаяся от стерильного бульона	лизис с наличием единичных колоний культуры
++	муть, значительная по сравнению со стерильным бульоном, но незначительная по сравнению с контролем	лизис в виде сливных участков с островками роста культуры
+	явная муть, но более слабая, чем в контроле	лизис в виде отдельных стерильных пятен на сплошном газоне культуры
-	муть, как в контроле	сплошной рост культуры, не обнаруживается ни одного стерильного пятна

За титр бактериофага при определении методом Аппельмана принимают то наибольшее разведение его, которое вызывает полное растворение соответствующих микробов. Бактериофаги выпускают с определенными титрами, не ниже установленных по инструкции. Производственные штаммы, содержащие Vi-антиген, должны лизироваться маточным бактериофагом в титре не менее 10^{-8} по методу Аппельмана; содержащие 0-антиген, не менее 10^{-6} . Например, титр брюшнотифозного бактериофага со всеми штаммами, входящими в титрование, должен быть не ниже 10^{-7} для штаммов, находящихся в Vi-форме, не ниже 10^{-6} для штаммов, находящихся в 0-форме. После проведения контроля бактериофаг разливается во флаконы нейтрального стекла (по 25, 50 и 100 мл) с резиновой пробкой соответствующего размера, залитые смолкой. Срок годности брюшнотифозного, стафилококкового и стрептококкового бактериофагов – один год, некоторых – два года.

Технологический процесс производства сухих бактериофагов включает: 1) работу с производственными штаммами бактерий; 2) получение маточных бактериофагов; 3) приготовление серии жидкого бактериофага; 4) получение серии сухого бактериофага; 5) контроля качества готового препарата; 6) этикетирование, упаковка препарата. Для получения сухих препаратов бактериофагов, жидкий фаголизат осаждается серноокислым аммонием. Выпавший осадок отделяется от жидкой части, к сырой массе добавляется в качестве стабилизатора глюконат кальция (9 %), смесь тщательно растирается, замораживается при температуре минус 30 °С и высушивается под вакуумом. Выпускается сухой бактериофаг в таблетках, которые содержат стабилизированную субстанцию фаголизата, таблеточную смесь (глюкозу, глюконат кальция, тальк, стеарин) и покрыты защитной кислотоустойчивой оболочкой из ацетилцеллюлозы. Одна таблетка сухого бактериофага соответствует 20-25 мл жидкого. К сухим бактериофагам предъявляются в отношении стерильности и безвредности те же требования, что и к жидким. Титр сухих бактериофагов устанавливается в соответствии с их лизирующей активностью, по отношению к разным видам и типам микробов. Срок годности сухих бактериофагов 1 год.

Выявление фаговых частиц и определение их количества. Число бактериофагов или зараженных бактериальных клеток в суспензии определяют внесением разведенной суспензии на чашку Петри с агар-агаром, поверхность которого покрыта разбавленной суспензией чувствительных бактерий. После инкубации поверхность чашки будет покрыта сплошным слоем бактерий, за исключением мест, где были внесены частицы бактериофага или зараженные клетки бактерий. Вокруг таких точек пленка бактерий разрушается, образуются прозрачные зоны лизиса – бляшки. Для определе-

ния числа частиц бактериофагов, содержащихся в суспензии, избирательно убивают присутствующие в ней зараженные клетки хлороформом, к которому бактериофаги устойчивы.

Выделение и очистка бактериофагов. Для выделения бактериофагов, которые способны развиваться в определенных видах или штаммах бактерий используют метод подсчета числа бляшек. Для этого пробу материала из природного местообитания бактерии встряхивают с водой, освобождают суспензию от бактерий, пропуская ее через мембранный фильтр или обрабатывая хлороформом; аликвоты смешивают с суспензией бактерии и высевают на чашки с агар-агаром. Бляшка, которая выявляется на чашках, соответствует присутствующей в природном материале бактериофагу. Бактериофаг из отдельной бляшки выделяют прикосновением к ней стерильной иглой и суспензируют прилипший к игле материал в небольшом объеме стерильного раствора. В суспензии количество бактериофагов будет содержаться от 10^4 до 10^6 частиц бактериофагов. Очистку бактериофагов осуществляют последовательным выделением из отдельной бляшки.

Для получения больших количеств бактериофага для химического или физического исследования заражают бактериофагом растущую в жидкой среде в экспоненциальной фазе культуру бактерий. В результате нескольких циклов развития бактериофага большинство или все клетки культуры бактерий лизируются. Оставшиеся в культуре клетки и их обломки удаляют низкоскоростным центрифугированием, получившуюся жидкость стерилизуют фильтрованием или хлороформом. Стерильный лизат содержит от 10^9 до 10^{12} частиц бактериофагов в 1 мл, растворимый материал, фракцию частиц, которые освобождаются из клеток при лизисе. Ультрацентрифугирование используют для окончательной очистки бактериофагов, предварительно вирусные частицы осаждают сульфатом аммония или другими веществами.

Высокая специфичность некоторых штаммов бактериофагов позволяет использовать их для диагностики инфекционных заболеваний, индикации патогенных микроорганизмов в медицине, ветеринарии, фитопатологии. С помощью фагоиндикации устанавливают природу возбудителя инфекции, когда другие методы, например, серологические, оказываются неэффективными. Бактериофаги применяются в борьбе с бактериальными вредителями технических брожений, в производстве ферментов, для лечения и профилактики ряда инфекционных заболеваний. Бактериофаги используются в научных исследованиях, как экспериментальная модель в генной инженерии, например для создания библиотек генов, молекулярной биологии, биохимии, биофизике.

ЛИТЕРАТУРА

1. Тихонов И.В., Рубан Е.А., Грязнева Т.Н. и др. Биотехнология. СПб.: ГИОРД, 2008. 704 с.
2. Бирюков В.В. Основы промышленной биотехнологии. М.: КолосС, 2004. 296 с.

REFERENCES

1. Tikhonov I.V., Ruban E.A., Gryazneva T.N. and others. *Biotehnologiya* [Biotechnology]. St. Petersburg: GIORД, 2008. 704 p.
2. Biryukov V.V. *Osnovy promyshlennoj biotehnologii* [Fundamentals of industrial biotechnology]. Moscow: KolosS, 2004. 296 p.



ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРЕ

Решетникова Ольга Васильевна

Лужский институт (филиал) ЛГУ имени А.С. Пушкина, г. Луга, Россия, кандидат биологических наук, доцент, заведующий кафедрой биотехнологии, технологии производства и переработки сельскохозяйственной продукции

E-mail: olga.resh56@yandex.ru

Reshetnikova Olga Vasilievna

Luga Institute (branch) of Pushkin Leningrad State University, Luga, Russia, Candidate of Biological Sciences (Ph.D), Head of the Department of Biotechnology, the production of technology and the processing of the agricultural production,

E-mail: olga.resh56@yandex.ru

Корреспондентский почтовый адрес и телефон для контактов с автором статьи:
188230, г. Луга, проспект Володарского 52 лит. А, каб. 107. Решетникова О.В.
8 (921) 922-08-44, olga.resh56@yandex.ru