

УДК 619:579

**ИЗМЕНЕНИЕ ЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ БАКТЕРИОФАГОВ РОДА
PROVIDENCIA ПРИ ХРАНЕНИИ
CHANGE LYTIC ACTIVITY KIND PROVIDENCIA STORAGE BACTERIOPHAGES**

**Д.А. Васильев, Н.Г. Барт, С.Н. Золотухин, Д.Ю. Акимов
N.G. Bart, S.N. Zolotukhin, D.A. Vasilyev, D.Yu. Akimov**

**Научно-исследовательский инновационный центр микробиологии и
биотехнологии Ульяновской ГСХА
The research innovation centre of microbiology and biotechnology
Ulyanovsk state academy of Agriculture**

Study of changes in lytic activity of bacteriophages in storage due to the devising of optimal storage conditions and multiplicity of reseeded of production strains, and with a shelf life of phage preparations. In our study was a task - to study changes in the activity of bacteriophage genus Providencia in storage.

Изучение изменения литической активности бактериофагов при хранении связано с изысканием оптимальных условий хранения и кратности пересева производственных штаммов, а также со сроком годности фаговых препаратов.

В результате проведенных исследований нами были выделены 12 бактериофагов рода *Providencia*, устойчивых к хлороформу – 11 и к температуре – 1, образующих прозрачные колонии различного диаметра от 1,0 до 5,0 мм или стерильные пятна в виде зон лизиса, диаметром от 5,0 до 9,0 мм. Литическая активность выделенных фагов по методу Аппельмана составляет от 10^{-6} до 10^{-10} , по методу Грация – от 1×10^9 до 1×10^{11} .

Литическую активность селекционированных штаммов определяли на плотных (по Грация) и в жидких питательных средах (по Аппельману).

Исследовали 2 штамма бактериофагов с наибольшей литической активностью F-67 УГСХА и F-87 УГСХА, активных в отношении бактерий рода *Providencia rettgeri*. Фаги хранили во флаконах емкостью 10 мл в условиях холодильника в виде лизатов бульонных культур без консерванта при температуре 4-6⁰С. Литическую активность определяли по истечении каждых 6-х месяцев в течение 24 месяцев, т.е. было проведено 4 опыта.

В основу метода для определения литической активности фагов положена схема, предложенная Грация (1936). Наличие фага в фильтрате выявляли путем высева на плотные питательные среды (1,5% мясопептонный агар) методом агаровых слоев.

Сущность метода заключается в следующем: 1,5% мясопептонный агар с генцианвиолетом накануне опыта разлили по чашкам по 25-30 мл.

Чашки, прикрытые стерильной бумагой, высушивали под бактерицидной лампой в течение нескольких часов, затем закрывали крышками и в перевернутом виде оставляли на ночь при комнатной температуре для полного высушивания агара в чашках, так как малейшее увлажнение может исказить результаты опыта. Предварительно разлитый в пробирку 0,7% агар в количестве 2,5 мл расплавляли и остужали до 46-47⁰С. 1 мл исследуемого фильтрата вносили в 2,5 мл 0,7% агара, туда же вносили 0,2 мл индикаторной культуры *Providencia rettgeri* № 104а и 102д.

Смесь осторожными движениями распределяли по поверхности 1,5% агара, для затвердения чашки оставляли на столе в течение 30 минут, а затем выдерживали в термостате при 37⁰С в течение 20-24 часов. При наличии фага на чашках обнаруживали негативные колонии или зоны лизиса.

Определение литической активности бактериофагов по методу Аппельмана (выражается степенью разведения). Готовили ряд пробирок из нейтрального стекла одинакового диаметра со стерильным МПБ по 4,5 мл. В первую пробирку вносили 0,5 мл фага. Затем делали последовательные разведения, перенося отдельными пипетками из пробирки в пробирку по 0,5 мл бактериофага. Использовали 10 пробирок. Из последней пробирки 0,5 мл выливали в дезраствор, затем во все пробирки вносили по 0,2 мл 18 часовой индикаторной бульонной культуры. 11 и 12 пробирки являются контрольными, в первой из них находится бульон и культура без фага, во второй – один бульон (контроль на стерильность). Все 12 пробирок помещали в термостат при 37°C на 4 часа. Титр фага устанавливали по последней, прозрачной пробирке ряда и выражали разведением фага.

В результате проведенных исследований было установлено следующее: через каждые 6 месяцев исследуемые бактериофаги F-67 УГСХА и F-87 УГСХА литическую активность практически не меняли.

Литическая активность фагов *Providencia*

Фаги	Сроки	Литическая активность по Аппельману	Литическая активность по Грациа
F-67 УГСХА	Июль 2007	$10^{-7} - 10^{-9}$	1×10^{10}
	Январь 2008	$10^{-7} - 10^{-9}$	1×10^{10}
	Июль 2008	$10^{-6} - 10^{-8}$	1×10^9
	Январь 2009	$10^{-6} - 10^{-8}$	1×10^9
F-87 УГСХА	Декабрь 2007	$10^{-8} - 10^{-10}$	1×10^{11}
	Июнь 2008	$10^{-8} - 10^{-10}$	1×10^{11}
	Декабрь 2008	$10^{-8} - 10^{-10}$	1×10^{11}
	Июнь 2009	$10^{-8} - 10^{-10}$	1×10^{11}

Анализируя результаты проведенных исследований, можно сделать вывод, что разные штаммы селекционированных нами фагов бактерий рода *Providencia rettgeri* обладали высокой литической активностью, бактериофаги практически не теряли свою активность в процессе долгого хранения. Таким образом, целесообразно использовать для конструирования лечебно-профилактических и диагностических фаговых препаратов данные штаммы, так как они не изменили литическую активность по истечении 24 месяцев.

Литература

1. Адамс М. Бактериофаги. – М., 1961. – С. 521.
2. Ганюшкин В.Я. Бактериофаги сальмонелл и их применение в ветеринарии // Учебное пособие. – Ульяновск. – 1988. – С. 45.
3. Гольдфарб Д.М. Бактериофагия // М.: Медгиз. – 1961. – С. 297.
4. Ревенко И.П. Бактериофаги и их использование в ветеринарной практике // - Киев: Урожай, - 1978. – С. 88.