

OPTIMIZATION OF THE SUBSTRATE TO IMPROVE BIOCONVERSION SOLID WASTES LIVESTOCK

Mukhitova M.E., Ignatkin D.S., Baeva T.G.

Keywords: *vermicultura, processing of waste, biohumus.*

Work is devoted to an assessment of substrata for vermicultural. Investigated a gain of biomass and survival vermicultura in different compositions of a substratum.

УДК 619:578

ЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ БАКТЕРИОФАГОВ БАКТЕРИЙ AEROMONAS HYDROPHILA

*Насибуллин И.Р., соискатель,**

*Викторов Д.А., кандидат биологических наук, старший научный сотрудник,**

*Васильев Д.А., доктор биологических наук, профессор,**

*Нафеев А.А., доктор медицинских наук, профессор**

*Швиденко И.Г., доктор медицинских наук, профессор***

**ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина»*

***ГБОУ ВПО «Саратовский ГМУ имени В.И. Разумовского»*

Ключевые слова: *Aeromonas hydrophila*, бактериофаги, диагностика, изолят фагов, биологические свойства, литическая активность.

*Статья посвящена методам изучения литической активности бактериофагов бактерий *Aeromonas hydrophila*, выделенных из объектов окружающей среды Ульяновской области. Выделенные бактериофаги проявили различную литическую активность, варьирующую в пределах от 10^{-5} до 10^{-8} по методу Анпельмана и от $5,8 \times 10^5$ до $2,5 \times 10^8$ БОЕ/мл по методу Грациа.*

Введение. Литическая активность является одним из решающих критериев при селекции бактериофагов и их включения в состав биопрепаратов для индикации и идентификации микроорганизмов, а также для деконтаминации [3,4]. Литическая активность бактериофага оценивается по его способности вызывать лизис бактериальной культуры на жидких или плотных питательных средах. При определении литической активности по методу Аппельмана, её выражают тем максимальным разведением, в котором испытуемый бактериофаг проявил свое литическое действие [1,2,6,7]. Более точным методом оценки активности бактериофага является определение количества бляшкообразующих единиц (БОЕ) фага в 1 мл суспензии (метод Грациа) [3,4]. Активность бактериофага определяется в конкретных, стандартных условиях. Бактериофаг по отношению к одной и той же культуре, но при отличающихся условиях, так же как и при испытании его в одинаковых условиях на разных штаммах одного и того же вида бактерий, может проявлять разную литическую активность и формировать неодинаковое число бляшек (негативных колоний) на плотной питательной среде [4,7].

Материалы и методы исследований. В работе были использованы: 1 референс-штамм *Aeromonas hydrophila* Ahd, полученный из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы ФГБОУ ВПО «Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия им. П.А. Столыпина», 14 полевых штаммов *Aeromonas hydrophila* и 5 штаммов бактериофагов, выделенных нами из объектов окружающей среды (озер и рек) Ульяновской области. Культуры бактерий *Aeromonas hydrophila* для определения литической активности бактериофагов выращивали на стандартном мясопептонном бульоне в течение 18-24 часов. Литическую активность селекционированных бактериофагов определяли по методам Аппельмана и Грациа [1,2,3,4,6].

Метод Аппельмана. В ряд пробирок из нейтрального стекла одинакового диаметра наливали по 4,5 мл бульона. В первую пробирку вносили 0,5 мл исследуемого бактериофага. Затем делали последовательные разведения, перенося отдельными стерильными пипетками из пробирки в пробирку по 0,5 мл суспензии. Использовали 10 пробирок. Из последней пробирки 0,5 мл выливали в дезраствор. Затем во все пробирки вносили по 0,2 мл 18-часовой бульонной индикаторной культуры. 11-я и 12-я пробирки являются контрольными: в первой из них находится бульон и культура (без фага), во второй - бульон (контроль на стерильность). Все 12 пробирок помещали в термостат при 30 °С на 18 часов.

Таблица 1 – Результаты исследований литической активности фагов бактерий *Aeromonas hydrophila*

№ пп	Штамм фага	Титр по Appel'manu	Титр по Грациа, БОЕ/мл
1	Фаг F-43УГСХА	10^{-8}	$2,5 \times 10^8 \pm 0,2 \times 10^8$
2	Фаг 1р-УГСХА	10^{-6}	$4,2 \times 10^6 \pm 0,3 \times 10^6$
3	Фаг F43g-УГСХА	10^{-7}	$3,7 \times 10^7 \pm 0,5 \times 10^7$
4	Фаг 13а-УГСХА	10^{-5}	$5,8 \times 10^5 \pm 0,7 \times 10^5$
5	Фаг Ahd-УГСХА	10^{-8}	$1,5 \times 10^8 \pm 0,4 \times 10^8$

Титр фага устанавливали по последней прозрачной пробирке ряда и выражали разведением фага [3,7]. Результаты исследований представлены в таблице 1.

Метод агаровых слоев по Грациа. Мясопептонный агар 1,5% концентрации с генцианвиолетом (1,0-5,0 мг/л, для ингибирования посторонней микрофлоры) накануне опыта разливали по чашкам Петри в количестве 25-30 мл. Чашки, прикрытые стерильной бумагой, подсушивали в термостате или под бактерицидной лампой в течение нескольких часов. Это необходимо для абсолютной сухости чашек, так малейшее их увлажнение может исказить результаты количественного изучения фага. Далее 0,7% питательный агар в количестве 2,5 мл, предварительно разлитый в стерильные пробирки, расплавляли и остужали до 46-47 °С. Разведение исследуемого фага в количестве 1 мл помещали в 2,5 мл 0,7% агара, туда же вносили 0,2 мл суточной индикаторной культуры, содержимое быстро и тщательно перемешивали вращением пробирки между ладонями и выливали на поверхность 1,5% агара в чашке Петри. Смесь осторожными движениями распределяли по поверхности агара, чашки для затвердения оставляли на горизонтальной поверхности на 30-40 минут, затем инкубировали в термостате в течение 18-20 часов при 30 °С. После инкубации в термостате подсчитывали количество негативных колоний и умножали полученное число на степень разведения [2,3,4,6,7,8]. Результаты исследований представлены в таблице 1.

Закключение. Из данных таблицы 1 следует, что литическая активность бактериофагов бактерий *Aeromonas hydrophila* по Appel'manu находится в пределах от 10^{-5} до 10^{-8} , а по Грациа – от $5,8 \times 10^5$ до $2,5 \times 10^8$ БОЕ/мл. Максимальный титр наблюдается у бактериофага F-43УГСХА: по Appel'manu 10^{-8} , по Грациа $2,5 \times 10^8$ БОЕ/мл.

Библиографический список:

1. Васильева Ю.Б. Фаги бактерий *Bordetella bronchiseptica*: свойства и перспективы применения // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии.-2013.-№3(23).-С.44-49.
2. Викторов Д.А. Выделение и изучение биологических свойств бактериофагов *Pseudomonas fluorescens* // Д.А. Викторов, А.М. Артамонов, Д.А. Васильев // Ветеринария и кормление.- Москва: «ВЕТКОРМ», 2012.-№5.- С.8-9.
3. Ганюшкин В. Я. Бактериофаги сальмонелл и их применение в ветеринарии. Учебное пособие. – Ульяновск. 1988. – С. 12-16.
4. Гольдфарб Д. М. Бактериофагия. – М.: Медгиз, 1961. – С. 14-17.
5. Горшков И.Г. Сравнительный анализ роста бактерий родов *Aeromonas* и *Pseudomonas* на средах с красителями / И.Г. Горшков, Н.Г. Куклина, Д.А. Викторов, Д.А. Васильев // Вестник ветеринарии.- Ставрополь: «Энтропос», 2012.-№63(4/2012).- С.38-39.
6. Золотухин С. Н. Бактериофаги *M. morgani* и их применение при желудочно-кишечных заболеваниях поросят // Автореферат дис. канд. вет. наук.- Ульяновск, 1994.
7. Насибуллин И.Р. Выделение фагов бактерий *Aeromonas hydrophila* и изучение их биологических свойств / И.Р. Насибуллин, Д.А. Викторов, Д.А. Васильев, А.А. Нафеев, И.Г. Швиденко // Вестник ветеринарии. – Ставрополь: «Энтропос», 2013. – № 66 (3/2013). – С. 8-10.
8. Ревенко И. П. Бактериофаги и их использование в ветеринарной практике. – Киев: Урожай, 1978. – С. 18-21.

**LYTIC ACTIVITY OF BACTERIOPHAGES
BACTERIA AEROMONAS HYDROPHILA**

Nasibullin I.R. , Vasiliev D.A. , Vectors D.A. , Nafeev A.A., Shvidenko I.G.

Keywords : *Aeromonas hydrophila, bacteriophages , diagnostics, isolate phages , biological properties , lytic activity.*

Article is devoted to the methods of study of the lytic activity of bacteriophages bacteria Aeromonas hydrophila, isolated from environmental objects Ulyanovsk region. Isolated phages showed different lytic activity varies in the range from 10^5 to 10^8 by the method of Appelman and $5,8 \times 10^5$ to $2,5 \times 10^8$ PFU/ml by the method of Gracia.