

1. Определение титра бактериофага

Титр бактериофага - это количество активных фаговых частиц в единице объема исследуемого материала. Для определения титра бактериофага наиболее широко в практике работы с бактериофагами применяется метод агаровых слоев, предложенный А. Грациа (A. Gratia) в 1936 г. Этот метод отличается простотой выполнения и точностью получаемых результатов и с успехом используется также и для выделения бактериофагов.

Сущность метода состоит в том, что суспензию бактериофага смешивают с культурой чувствительных бактерий, вносят в агар низкой концентрации («мягкий агар») и наслаивают на поверхность ранее подготовленного 1,5% питательного агара в чашке Петри. В качестве верхнего слоя в классическом методе Грациа использовался водный («голодный») 0,6% агар. В настоящее время для этих целей чаще всего применяют 0,7% питательный агар. При инкубации в течение 6 - 18 ч бактерии размножаются внутри верхнего «мягкого» слоя агара в виде множества колоний, получая питание из нижнего слоя 1,5% питательного агара, который применяется в качестве подложки. Низкая концентрация агара в верхнем слое создает пониженную вязкость, что способствует хорошей диффузии фаговых частиц и инфицированию ими бактериальных клеток. Инфицированные бактерии подвергаются лизису, в результате чего появляется потомство фага, которое вновь заражает находящиеся в непосредственной близости с ними бактерии. Образование негативной колонии для фагов Т-группы вызвано только одной частицей бактериофага и, следовательно, число негативных колоний служит количественным показателем содержания бляшкообразующих единиц в исследуемом образце.

Культура чувствительных к фагу бактерий используется в логарифмической фазе роста в минимальном количестве, обеспечивающем получение сплошного газона бактерий. Соотношение числа фаговых частиц к числу бактериальных клеток (*множественность инфекции*) для каждой системы фаг-бактерия подбирается экспериментально с таким расчетом, чтобы на одной чашке образовывалось 50 - 100 негативных колоний.

Для титрования бактериофага может быть использован также однослойный метод, который состоит в том, что на поверхность чашки с питательным агаром вносят суспензию бактерий и суспензию бактериофага и смесь распределяют стеклянным шпателем. Однако этот метод уступает в точности методу агаровых слоев и поэтому не нашел широкого

применения.

Техника титрования и культивирования бактериофагов

Для определения титра бактериофага производят последовательное разведение исходной фаговой суспензии в буферном растворе либо в бульоне (шаг разведения - 10^{-1}). Для каждого разведения используют отдельную пипетку, а смесь интенсивно перемешивают. Из суспензии каждого разведения делают "высев" фага на газон чувствительных бактерий *E. coli* В (рис. 3). Для этого 1 мл разведенного фага вносят в пробирку с 3 мл расплавленного и охлажденного до 48 - 50 °С «мягкого агара». Затем в каждую пробирку добавляют 0,1 мл культуры чувствительного микроорганизма (*E. coli* В), находящегося в логарифмической фазе роста. Содержимое пробирки перемешивают, вращая пробирку между ладонями, избегая образования пузырей, и быстро выливают на поверхность агаризованной (1,5 %) питательной среды в чашке Петри и равномерно распределяют по ней, осторожно покачивая чашку. При титровании методом агаровых слоев следует засеять параллельно не менее двух чашек одного и того же разведения фага. После застывания верхнего слоя чашки переворачивают крышками вниз и помещают в термостат при температуре, оптимальной для развития чувствительных бактерий. Учет результатов производят через 18 - 20 часов инкубирования.

Количество негативных колоний подсчитывают аналогично подсчету колоний бактерий, а титр фага определяют по формуле:

$$N = \frac{n \cdot D}{V}, \text{ где}$$

N – количество фаговых частиц в 1 мл исследуемого материала,

n – среднее количество негативных колоний на чашку,

D – номер разведения,

V – объем высеваемой пробы, мл.

В том случае, если необходимо определить множественность инфекции параллельно проводят определение титра жизнеспособных клеток бактерий *E. coli* В в 1 мл питательного бульона. Для этого делают разведение исходной суспензии бактериальных клеток до 10^{-6} и производят ее высев (0,1 мл) параллельно на 2 чашки. После инкубирования при 37 °С в течение 24 ч подсчитывают количество образовавшихся колоний на чашке Петри и определяют титр клеток.

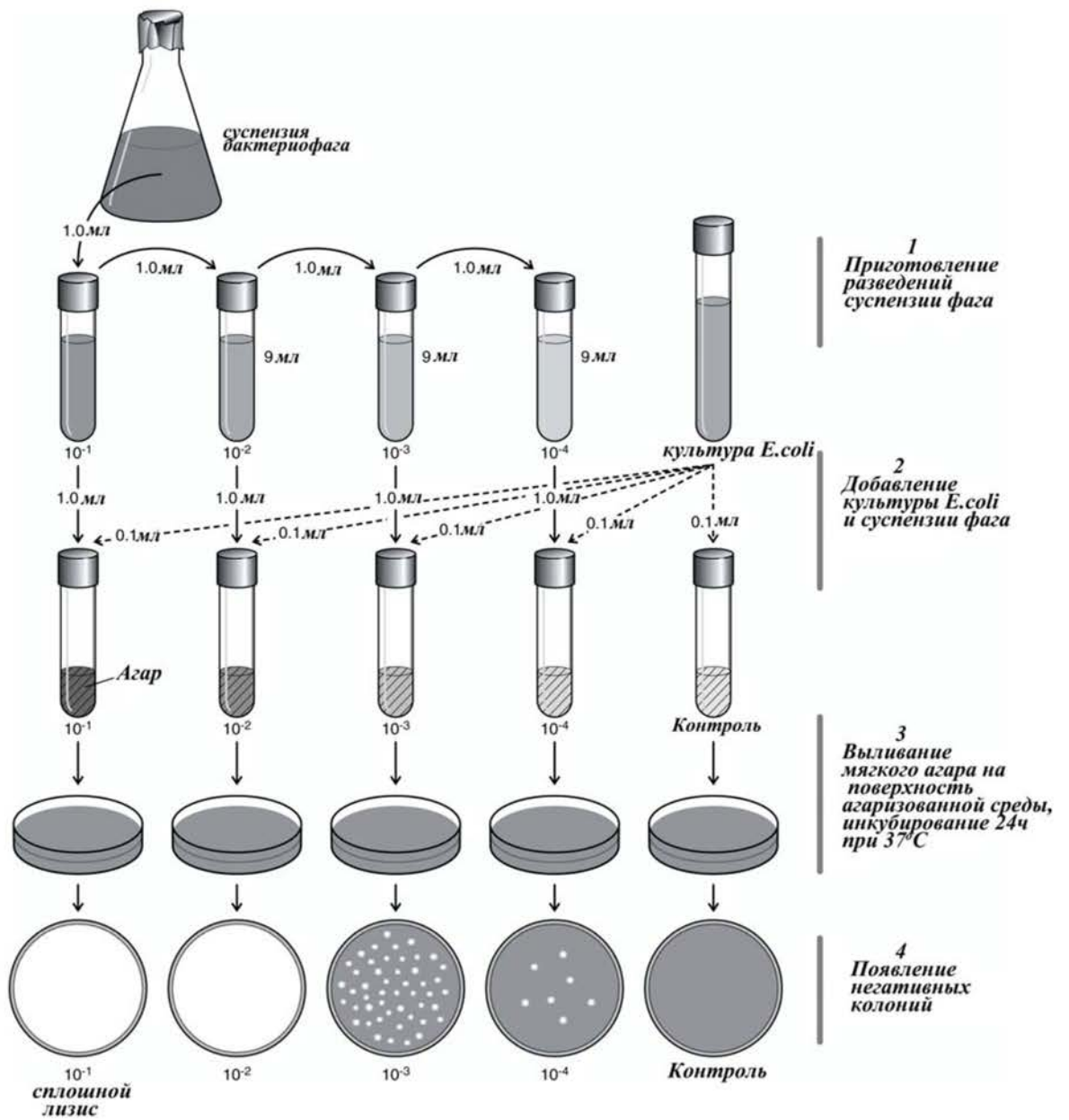


Рис. 3. Определение титра бактериофага.