

Выживаемость бактериофагов фитопатогенных бактерий при криоконсервации и лиофилизации

А.Д. ГЕРАСИМОВИЧ, Г.И. НОВИК

Институт микробиологии НАН Беларуси, г. Минск

Survival Rate of Bacteriophages of Phytopathogenic Bacteria after Cryopreservation and Freeze-Drying

A.D. GERASIMOVICH, G.I. NOVIK

Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

В промышленности и сельском хозяйстве интерес к бактериофагам обусловлен их использованием для контроля популяций бактерий, приносящих вред на производствах и поражающих сельскохозяйственные растения. Использование различных биопрепаратов для контроля таких бактерий является одним из перспективных методов биологической защиты растений от инфекционных заболеваний. Для успешной разработки биопрепаратов необходимо поддержание данных микроорганизмов в жизнеспособном состоянии в течение длительного времени. В связи с этим важна разработка эффективных методов консервирования бактериофагов.

Для изучения выживаемости фагов BV-50, BV-51, BV-52 и BV-53 (из фонда Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов Института микробиологии НАН Беларуси) при криоконсервировании исследовали влияние различных скоростей охлаждения (4, 100 и 400 град/мин) и криопротекторов (10%-й глицерол и 5%-й диметилсульфоксид) на жизнеспособность бактериофагов. При исследовании влияния лиофилизации на жизнеспособность бактериофагов лизаты смешивали с обезжиренным молоком в конечной концентрации 10% и помещали в ампулы в количестве 200 мкл. Лيوфилизацию осуществляли в установке для сублимационного высушивания «Modulyo 4K» («Edwards»). Исследовали выживаемость бактериальных вирусов при длительном хранении в лиофилизированном и замороженном состоянии.

В результате исследований показано, что наибольший уровень выживаемости достигается при замораживании фагов со скоростью охлаждения 400 град/мин и составляет 61–76%. В других вариантах опыта титр вирусов снижался на 1 порядок. Наиболее выраженными криозащитными свойствами обладает глицерол. Выживаемость бактериофагов в данных условиях увеличивается на 8–17%.

Лيوфилизация обеспечивает выживаемость исследуемых фагов на уровне 70%. В среднем количество жизнеспособных вирионов составляет 10^8 – 10^9 БОЕ/мл. Титр наиболее чувствительных фагов снижается на 1–2 порядка. При длительном хранении фагов (в течение 6 месяцев) установлено, что оптимальным для фагов Pf-1, Pf-2, Pf-3 является хранение при -70°C , а для фага Pf-4 – -20°C . Наибольшей устойчивостью при хранении в лиофилизированном состоянии обладают бактериофаги Pf-1, Pf-2 и Pf-4.

Таким образом, оптимальным режимом длительного хранения бактериофагов является замораживание со сверхбыстрой скоростью охлаждения с последующим хранением фагов Pf-1, Pf-2 и Pf-3 при температуре -70°C , а фага Pf-4 – при -20°C . Лيوфилизация обеспечивает меньшую выживаемость фагов, но также может использоваться.

In industry and agriculture the interest to bacteriophages is stipulated by their application in controlling the populations of bacteria, making harm in industries and injuring the agricultural plants. Application of different biopreparations to control these bacteria is one of the most perspective methods of biological protection of plants from infection diseases. For successful developing of biopreparations it is necessary to maintain these microorganisms in viable state for a long time period. In this connection the developing of effective methods of bacteriophages' cryopreservation is important.

To study the survival rate of phages BV-50, BV-51, BV-52 and BV-53 (from the Belarusian collection of non-pathogenic microorganisms at the Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus) during cryopreservation there was studied the effect of different cooling rates (4, 100 and 400 deg/min) as well as the effect of cryoprotectants (10% glycerol and 5% dimethyl sulfoxide) on viability of bacteriophages. When investigating the effect of freeze-drying on viability of bacteriophages the lysates were mixed with skimmed milk in final concentration of 10% and placed into the ampoules in the amount of 200 ml. Lyophilization was performed by means of the Modulyo 4K freeze-dryer (Edwards, UK). The survival rate of bacterial viruses after long-term storage in frozen-dried and frozen states was studied.

As a result of the investigations it has been shown that the highest survival rate is achieved when freezing the phages with cooling rate of 400 deg/min and makes 61–76%. In other experimental variants the titre of viruses reduced by 1 order. Glycerol possesses the most manifested cryoprotective properties. Survival rate of bacteriophages under these conditions increases by 8–17%.

Freeze-drying provides the survival rate of the studied phages at the level of 70%. In average the number of viable virions makes 10^8 – 10^9 PFU/ml. The titre of most sensitive phages reduces by 1–2 orders. During long-term storage of phages (for 6 months) it has been established that the optimal for phages Pf-1, Pf-2, Pf-3 is the storage at -70°C and -20°C for the phage Pf-4. The highest survival after storage in frozen-dried state was found in bacteriophages Pf-1, Pf-2 and Pf-4.

Thus an optimal regimen of long-term storage of bacteriophages is freezing with ultra-rapid cooling rate with following storage of the phages Pf-1, Pf-2 and Pf-3 at -70°C and at -20°C for Pf-3 phage. Freeze-drying provides lower survival rate of phages, but also can be used.