

Изучение биологических свойств маточных культур холерных бактериофагов Rostov-13 и Rostov-M3 в жидкой и лиофилизированной форме

М.П.Погожова¹, Е.А.Глазкова², К.С.Гумаюнова², А.В.Комиссаров², М.В.Овчинникова², Н.Е.Гаевская¹,
А.В.Тюрина¹, Ю.В.Сизова¹, И.А.Иванова¹

¹ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Российская Федерация;

²ФКУН «Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов, Российская Федерация

Цель исследования. Сравнить биологические свойства холерных бактериофагов Rostov-13 и Rostov-M3 в жидкой форме и в форме лиофилизата.

Материалы и методы. Использовали стерильные фильтраты фаголизатов бульонных культур холерных бактериофагов Rostov-13 и Rostov-M3, а также их сублимационно высушенные субстанции с применением пептон-желатиновой среды высушивания (пептон 5% и желатин 1%). Жидкие и сухие формы маточных культур бактериофагов хранили по 1 мл в ампулах вместимостью 5 мл.

Результаты. Показатели скорости адсорбции отличаются достаточно высокими значениями у обоих исследованных фагов (от 10^{-6} мл/мин до 10^{-7} мл/мин). Экспериментально доказано оптимальное значение множественности инфекции, которое составляет 1:100 (фаг/бактериальная клетка). Установлено, что репликативные циклы бактериофагов должны осуществляться в течение 3 ч (для Rostov-13) и 6 ч (для Rostov-M3). Определена длительность латентного периода в отношении вышеуказанных фагов, которая составила 50 и 120 мин соответственно. Выявлено, что бактериофаг Rostov-13 обладает большей урожайностью в сравнении с бактериофагом Rostov-M3 (300 и 50 фаговых частиц на одну бактериальную клетку соответственно). Исследования длительности латентного периода и урожайности дают основные заключения, что значения данных параметров являются допустимыми для конструирования биопрепаратов.

Заключение. Результаты, полученные при сравнении жидких бактериофагов и их лиофилизатов, сопоставимы. Показано, что лиофилизация является эффективным методом сохранения свойств фагов. Эти данные крайне важны для проведения исследований по разработке технологии производства биологических препаратов, включающих холерные бактериофаги Rostov-13 и Rostov-M3.

Ключевые слова: бактериофаги, биологические свойства, одиночный цикл развития, лиофилизаты, сравнительное изучение характеристик

Для цитирования: Погожова М.П., Глазкова Е.А., Гумаюнова К.С., Комиссаров А.В., Овчинникова М.В., Гаевская Н.Е., Тюрина А.В., Сизова Ю.В., Иванова И.А. Изучение биологических свойств маточных культур холерных бактериофагов Rostov-13 и Rostov-M3 в жидкой и лиофилизированной форме. Бактериология. 2026; 11(1): 42–53. DOI: 10.20953/2500-1027-2026-1-42-53

Study of biological properties of uterine cultures of cholera bacteriophages Rostov-13 and Rostov-M3 in liquid and lyophilized form

M.P.Pogozhova¹, E.A.Glazkova², K.S.Gumayunova², A.V.Komissarov², M.V.Ovchinnikova², N.E.Gaevskaya¹,
A.V.Tyurina¹, Yu.V.Sizova¹, I.A.Ivanova¹

¹Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute of the Rosпотребнадзор, Rostov-on-Don, Russian Federation;

²Russian Anti-Plague Institute "Microbe" of the Rosпотребнадзор, Saratov, Russian Federation

Objective. To compare the biological properties of cholera bacteriophages Rostov-13 and Rostov-M3 in liquid form and in lyophilized form.

Materials and methods. Sterile filtrates of phagolysates of broth cultures of cholera bacteriophages Rostov-13 and Rostov-M3, as well as their freeze-dried substances using peptone-gelatin drying medium (peptone 5% and gelatin 1%) were used. Liquid and dry forms of uterine cultures of bacteriophages were stored in ampoules with a capacity of 5 ml by 1 ml.

Для корреспонденции:

Погожова Марина Павловна, научный сотрудник лаборатории бактериофагов ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора

Адрес: 344002, Ростов-на-Дону, ул. М.Горького, 117

Телефон: (863) 240-9133

E-mail: pogojova_mp@antiplague.ru

ORCID: 0000-0001-9779-3577

Статья поступила 20.08.2025, принята к печати 30.03.2026

For correspondence:

Marina P. Pogozhova, Researcher, Laboratory of Bacteriophages, Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rosпотребнадзор

Address: 17 M.Gorky str., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation

Phone: (863) 240-9133

E-mail: pogojova_mp@antiplague.ru

ORCID: 0000-0001-9779-3577

The article was received 20.08.2025, accepted for publication 30.03.2027

Results. The adsorption rate indicators are distinguished by fairly high values for the two phages studied (from 10^6 ml/min to 10^7 ml/min). The optimal value of the multiplicity of infection has been experimentally proven to be 1:100 (phage/bacterial cell). It was established that the replicative cycles of bacteriophages should be carried out within 3 hours (for Rostov-13) and 6 hours (for Rostov-M3). The duration of the latent period in relation to the above-mentioned phages was determined to be 50 and 120 minutes, respectively. It was found that the Rostov-13 bacteriophage has a higher yield compared to the Rostov-M3 bacteriophage (300 and 50 phage particles per bacterial cell). The study of the duration of the latent period and productivity provides grounds to conclude that the values of these parameters are acceptable for the design of biopreparations.

Conclusion. The results obtained when comparing liquid bacteriophages and their lyophilizates are comparable. It is shown that lyophilization is an effective method for preserving the properties of phages. These data are extremely important for conducting research on the development of technology for the production of biological preparations, including cholera bacteriophages Rostov-13 and Rostov-M3.

Key words: biological properties, single development cycle, bacteriophages, lyophilizates, comparative study of characteristics

For citation: Pogozhova M.P., Glazkova E.A., Gumayunova K.S., Komissarov A.V., Ovchinnikova M.V., Gaevskaya N.E., Tyurina A.V., Sizova Yu.V., Ivanova I.A. Study of biological properties of uterine cultures of cholera bacteriophages Rostov-13 and Rostov-M3 in liquid and lyophilized form *Bacteriology*. 2026; 11(1): 42–53. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2026-1-42-53

В XXI веке продолжается седьмая пандемия холеры, в ходе которой с 2001 по 2022 г. зарегистрировано 6 932 703 случаев холеры в 129 странах. События по холере, произошедшие в 2010 г. в регионе Карибского бассейна, на Гаити, напомнили о социальной значимости этой опасной инфекционной болезни, которая может быть занесена на любой континент, в любую страну мира и, при наличии предпосылок для распространения возбудителя инфекции, какковыми являются социальные и природные условия, может наносить значительный экономический ущерб [1].

Распространение штаммов *Vibrio cholerae*, обладающих множественной антибиотикорезистентностью, резко ограничивает выбор эффективных средств этиотропной терапии холеры, подчеркивая важность оптимизации современного лечения и предотвращения контаминации возбудителем. В связи с этим актуальны исследования бактериофагов, преимуществом которых является способность поражать как чувствительные, так и полиантибиотикорезистентные штаммы возбудителей инфекции [1].

В 2020-х гг. нашего столетия учеными ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора проведены исследования по отбору бактериофагов, перспективных для лечения и профилактики холеры. Показаны возможность применения и эффективность жидкого экспериментального препарата, состоящего из вибриофагов Rostov-13 и Rostov-M3, активных в отношении *V. cholerae* O1 [2, 3], а также комплексного противохолерного препарата на основе упомянутых фагов и иммуноэнтросорбентов [4]. Эффективная технология получения вышеназванных бактериофагов требует полного знания ряда биологических характеристик, которые на тот момент были еще не исследованы. Актуальность разработки лечебно-профилактических препаратов бактериофагов и технологий их производства обозначена в Стратегии предупреждения распространения антимикробной резистентности в Российской Федерации на период до 2030 г. [5].

Производство препарата бактериофагов, осуществляемое с использованием технологического этапа культивирования микроорганизмов, требует наличия банка маточных культур бактериальных вирусов. Штаммы монофагов хранят, как правило, в жидкой форме в течение длительного временного промежутка, что может привести к снижению или полной утрате свойств культуры. Эффективным методом сохранения свойств микроорганизмов служит лиофили-

зация [6, 7], дающая возможность хранить сублимационно высушенные биологические препараты без снижения их активности. Правилами проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза определено, что «...хранение производственной коллекции бактериофагов осуществляется в жидком состоянии при температуре от 2 до 8°C в течение 5 лет с ежегодным пересевом на бактериальных штаммах или в лиофилизированном состоянии...» [8]. Авторами статьи ранее получены лиофилизаты бактериофагов Rostov-13 и Rostov-M3. Для верификации сохранности свойств фагов после различных технологических манипуляций целесообразно проведение дополнительных исследований [9, 10].

В доступной литературе отсутствуют сведения о таких биологических характеристиках бактериофагов Rostov-13 и Rostov-M3, как скорость адсорбции на бактериальной клетке, множественность инфекции, длительность латентного периода, урожайность и оптимальное время репликации на индикаторных нетоксигенных штаммах. Также не менее важно оценить влияние сублимационного высушивания на сохранность вышеназванных свойств. Решение обозначенных вопросов является целью данного исследования.

Материалы и методы

Все исследования с использованием патогенных биологических агентов проводили в соответствии с нормативными документами [11].

Холерные бактериофаги

Rostov-13. Вирулентный фаг. Класс *Caudoviricetes*, семейство *Autographiviridae*, относится к морфотипу C (подовирус). Образует прозрачные негативные колонии диаметром 2–5 мм. Имеет многогранную головку 48,26 × 47,15 нм, короткий несократимый хвост 13,78 нм. Устойчив к действию хинозола в концентрации 0,01% и к действию хлороформа в соотношении 1:10. Оценка литической активности была проведена ранее на 60 штаммах *V. cholerae* O1 El Tor и 30 штаммах биовара classical. Бактериофаг лизирует 97% штаммов биовара El Tor и 54,5% штаммов биовара classical. Бактериофаг обладает строгой специфичностью (не лизирует близкородственные бактерии). Геном бактериофага представлен линейной двухцепочечной ДНК длиной 36326 п.н. с содержанием G+C 42%. Имеет 44 открытые рамки считыва-

ния (ORF). В геноме присутствуют ORF, кодирующие литические ферменты: эндолизины и пептидогликанлизирующий фермент трансгликозилаза, а также генетические детерминанты метаболизма нуклеотидов, репликации и репарации ДНК: белки хвостовых структур и сборки капсида, ДНК-праймаза/хеликаза, ДНК-направленная ДНК-полимераза, ДНК-лигаза, эндонуклеаза I, экзонуклеаза, терминаза большая (gp19) и малая (gp18) субъединицы (Genbank: OK169294-OK169295).

Rostov-M3. Вирулентный фаг. Класс *Caudoviricetes*, семейство не установлено, относится к морфотипу А (миовирусы). Образует круглые прозрачные негативные колонии размером 1,5–2 мм. Имеет многогранную головку 45,1 × 53,3 нм, короткий сократимый хвост 11,3 нм. Устойчив к действию хинозола в концентрации 0,01% в мл и к действию хлороформа в соотношении 1:10. Оценка литической активности была проведена ранее на 60 штаммах *V. cholerae* O1 El Tor и 30 штаммах биовара classical. Бактериофаг лизирует 83,3% штаммов биовара classical и 43,3% штаммов биовара El Tor. Бактериофаг обладает строгой специфичностью (не лизирует близкородственные бактерии). Геном бактериофага состоит из 46 669 пар нуклеотидов (п.н.) с содержанием G+C 45,6%. Имеет 50 ORF. В геноме присутствуют ORF, кодирующие генетические детерминанты метаболизма нуклеотидов, репликации и репарации ДНК: белки хвостовых структур и сборки капсида, а также литические ферменты, такие как предполагаемый белок хвостового отростка/лизозима (Genbank: MN379460-MN379463).

Штаммы холерного вибриона

В качестве индикаторных штаммов холерного вибриона при накоплении бактериофага и определении количества жизнеспособных фаговых частиц использовали: для Rostov-13 – *V. cholerae* O1 El Tor Ogawa P-13169 (KM 199), для Rostov-M3 – *V. cholerae* O1 El Tor Ogawa 20554 (KM 2157), полученные из лаборатории «Коллекция патогенных микроорганизмов» ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора и из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов ФКУН «Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора.

Определение концентрации фаговых частиц в препаратах осуществляли методом агаровых слоев согласно нормативным документам [12, 13]. При титровании параллельно засеивали по 4 чашки с фагом из одного и того же разведения. Титр определяли путем подсчета числа негативных колоний на параллельных чашках и умножали на показатель разведения, выражая в количестве бляшкообразующих единиц (БОЕ), образовавшихся на плотной питательной среде в 1 мл фаголизата ($n \cdot 10^x$ БОЕ/мл).

Для определения скорости адсорбции фага на бактериальной клетке использовали ранее предложенные методические приемы [9, 14, 15]. В пробу добавляли 0,5 мл суспензии индикаторного штамма *V. cholerae* до конечной концентрации $5 \cdot 10^8$ КОЕ/мл и 0,5 мл соответствующего бактериофага до конечной концентрации для Rostov-13 – $5-9 \cdot 10^7$, для Rostov-M3 – $2-5 \cdot 10^6$ БОЕ/мл и инкубировали при температуре 20–22°C. Образцы в объеме 0,1 мл отбирали через определенные промежутки времени (1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 мин), добавляли хлороформ в

соотношении 1:10 для инактивации бактериальной культуры, затем центрифугировали в течение 2 мин при 4800 g на центрифуге MPW-251 (MPW Med, Польша). После центрифугирования надосадочную жидкость титровали по Грациа для определения неадсорбированных фагов. Количественно полученные результаты оценивали константой скорости адсорбции ($K_{\text{адс}}$, мл/мин), вычисленной по формуле (1):

$$K_{\text{адс}} = \frac{2,3 \times \log P_0 / P_t}{B \times t} \quad (1)$$

где B – количество жизнеспособных холерных вибрионов, на которых происходит адсорбция, КОЕ/мл;

P_0 – исходный титр фага, БОЕ/мл;

P_t – титр фага через время t (число неадсорбированных фаговых частиц), БОЕ/мл.

Целью определения множественности инфекции являлось установление оптимального соотношения фаг / бактериальная клетка в жидкой питательной среде с целью получения максимальной концентрации фаговых частиц. Для этого в бульон Хоттингера pH $7,6 \pm 0,1$ засеивали бактериофаг и культуру холерных вибрионов в разных соотношениях. Начальная концентрация бактериофагов составила: для Rostov-13 – $5-9 \cdot 10^7$, для Rostov-M3 – $2-5 \cdot 10^6$ БОЕ/мл, для индикаторного штамма *V. cholerae* – $5 \cdot 10^8$ КОЕ/мл. Пробы отбирали через 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 4; 6 и 24 ч инкубирования при температуре $37 \pm 1^\circ\text{C}$ и проверяли титр фага методом агаровых слоев.

Определение длительности латентного периода и урожайности бактериофагов осуществляли при найденном оптимальном значении множественности инфекции. В пробу с бульоном Хоттингера pH $7,6 \pm 0,1$ добавляли суспензию индикаторного штамма *V. cholerae* до конечной концентрации $5 \cdot 10^8$ КОЕ/мл и соответствующего бактериофага до конечной концентрации для Rostov-13 – $5-9 \cdot 10^7$, для Rostov-M3 – $2-5 \cdot 10^6$ БОЕ/мл, далее инкубировали при температуре $37 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение определенного ранее времени адсорбции, затем центрифугировали в течение 2 мин при 4800 g на центрифуге MPW-251 (MPW Med, Польша). Удаляли супернатант и ресуспендировали осадок в 100 мл бульона Хоттингера pH $7,6 \pm 0,1$, далее титровали 0,5 мл суспензии по Грациа, принимая полученные результаты за начало определения (время 0 мин). Затем инкубировали в течение оптимального времени для накопления бактериофага в шейкере-инкубаторе ES-20/60 (Biosan, Латвия) при температуре $37 \pm 1^\circ\text{C}$ и 100 об./мин. Отбирали 0,5 мл полученной суспензии через разные промежутки времени и титровали методом агаровых слоев. Латентный период определяли как интервал минимального времени между адсорбцией фага на клетке-хозяине и освобождением новых фаговых частиц. Урожайность рассчитывали как отношение среднего максимального количества высвободившихся частиц в конце размножения к среднему значению фаговых частиц во время латентного периода.

Статистическую обработку результатов экспериментов осуществляли при помощи программ BioStat 2009 (Analyst-Soft, Inc., США) и Microsoft Excel 2016. Результаты представляли как средний титр бактериофага (среднее значение из 3–4 повторностей (n) и стандартное отклонение $M \pm SD$, округляя M до первого знака после запятой, SD – до второго знака после запятой).

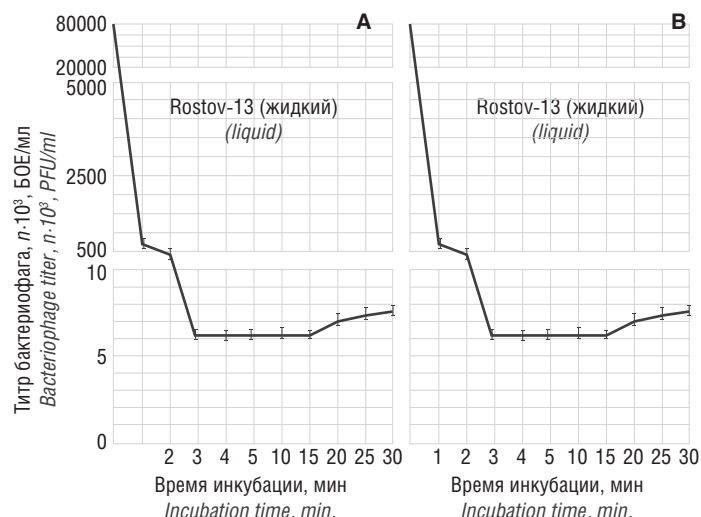


Рис. 1. Адсорбция бактериофага Rostov-13 ($n = 4$, $M \pm SD$): жидкая (А) и сухая (В) формы маточной культуры бактериофага.
 Fig. 1. Adsorption of the Rostov-13 bacteriophage ($n = 4$, $M \pm SD$): liquid (A) and dry (B) form of the uterine culture of the bacteriophage.

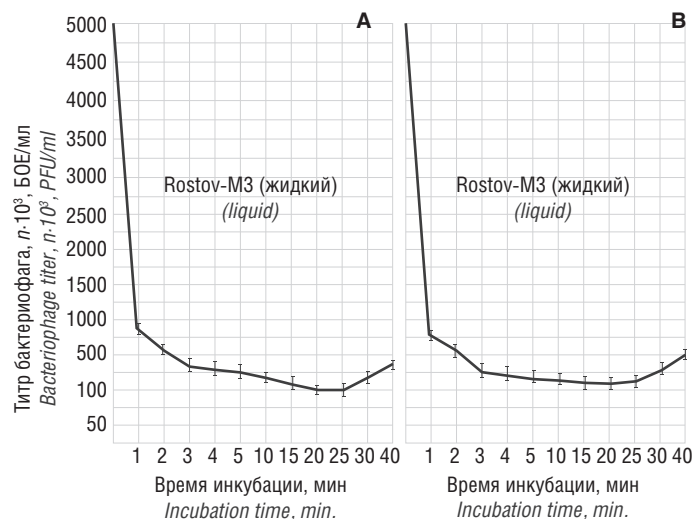


Рис. 2. Результаты определения скорости адсорбции бактериофага Rostov-M3 ($n = 4$, $M \pm SD$): жидкая (А) и сухая (В) формы маточной культуры бактериофага.
 Fig. 2. Results of determination of the adsorption rate of the Rostov-M3 bacteriophage ($n = 4$, $M \pm SD$): liquid (A) and dry (B) form of the uterine culture of the bacteriophage.

Результаты исследования и их обсуждение

Основными биологическими свойствами бактериофагов, которые определяют корректность организации технологического процесса накопления препарата, являются: скорость адсорбции; множественность инфекции и время репликативного цикла вируса; длительность латентного периода; урожайность (величина выхода фаговых частиц из одной инфицированной бактериальной клетки). При этом две последние характеристики являются обязательными согласно решению Евразийского экономического союза [8].

Определение скорости адсорбции бактериофагов

Результаты определения скорости адсорбции бактериофагов Rostov-13 и Rostov-M3 представлены на рис. 1 и 2 соответственно.

Анализ данных показал, что при использовании как жидкой, так и сухой форм маточной культуры бактериофага Rostov-13 результаты практически не отличаются (рис. 1). При его взаимодействии с клетками *V. cholerae* O1 El Tor Ogawa P-13169 за первые 2 мин адсорбируется >90% фаговых частиц у обеих форм препарата. В течение этого времени обнаружены незначительные различия по титру фагов: за 1-ю минуту данный показатель составил для жидкой формы – $6,5 \cdot 10^5$ БОЕ/мл, для сухой формы – $7,5 \cdot 10^5$ БОЕ/мл; по окончании 2-й минуты – $4 \cdot 10^5$ БОЕ/мл и $6 \cdot 10^5$ БОЕ/мл соответственно. Полная адсорбция фаговых частиц происходит в течение 15 мин у обеих форм препарата, после чего начинается медленное постепенное увеличение концентрации фаговых частиц. $K_{\text{адс}}$ составляет $1,2 \cdot 10^{-9}$ мл/мин для двух форм препарата.

В результате определения скорости адсорбции бактериофага Rostov-M3 (рис. 2) выявлено, что адсорбция >90% фаговых частиц с клетками *V. cholerae* O1 El Tor Ogawa 20554 происходит в первые 2 мин их взаимодействия. За данный промежуток выявлены статистически незначимые различия по титру бактериофагов (за 1-ю минуту – $8 \cdot 10^5$ БОЕ/мл и $6 \cdot 10^5$ БОЕ/мл для жидкой и сухой форм соответственно, по окончании 2-й минуты – $7 \cdot 10^5$ БОЕ/мл и $5,5 \cdot 10^5$ БОЕ/мл). Полная адсорбция происходит в течение 30 мин (это выявлено у двух форм препарата), по истечении этого срока начинается медленное увеличение титра бактериофага. Вычисленное по

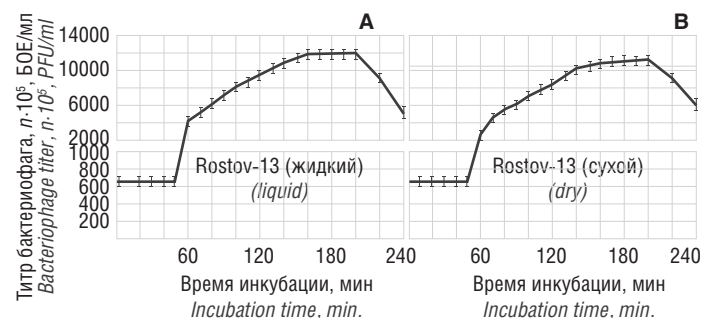


Рис. 3. Результаты определения длительности латентного периода бактериофага Rostov-13: при использовании жидкой (А) и сухой (В) формы маточной культуры бактериофага.
 Fig. 3. Results of determining the duration of the latency period of the Rostov-13 bacteriophage: when using the liquid (A) and dry (B) form of the uterine culture of the bacteriophage.

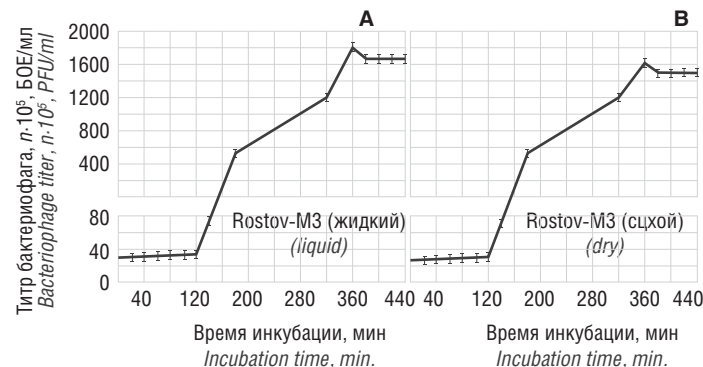


Рис. 4. Результаты определения длительности латентного периода бактериофага Rostov-M3: при использовании жидкой (А) и сухой (В) формы маточной культуры бактериофага.
 Fig. 4. Results of determining the duration of the latency period of the Rostov-M3: when using the liquid (A) and dry (B) form of the uterine culture of the bacteriophage.

Таблица. Результаты определения множественности инфекции фагов Rostov-13 и Rostov-M3
 Table. Results of determining the multiplicity of infection of the Rostov-13 and Rostov-M3 phages

Соотношение фаг/бактериальная клетка / The ratio phage/bacterial culture	Время инкубирования, ч / Incubation time, h	Фаг / Phage	Форма препарата / Preparation form	Внешний вид культуральной жидкости / appearance of culture liquid	Концентрация фага, БОЕ/мл (n = 3, M ± SD) / Phage concentration, PFU/mL (n = 3, M ± SD)
100:1	0,5 1	Rostov-13	Жидкая / Liquid	Прозрачный / Transparent	$1,3 \pm 0,10 \times 10^3$
			Сухая / Dry	Прозрачный / Transparent	$9,5 \pm 0,00 \times 10^2$
		Rostov-M3	Жидкая / Liquid	Прозрачный / Transparent	$5,1 \pm 0,17 \times 10^2$
			Сухая / Dry	Прозрачный / Transparent	$5,0 \pm 0,20 \times 10^2$
		Rostov-13	Жидкая / Liquid	Прозрачный / Transparent	$2,9 \pm 0,12 \times 10^5$
			Сухая / Dry	Прозрачный / Transparent	$1,7 \pm 0,25 \times 10^5$
	Rostov-M3	Жидкая / Liquid	Прозрачный / Transparent	$6,4 \pm 0,27 \times 10^3$	
		Сухая / Dry	Прозрачный / Transparent	$6,2 \pm 0,10 \times 10^3$	
	1,5	Rostov-13	Жидкая / Liquid	Прозрачный / Transparent	$1,2 \pm 0,12 \times 10^6$
			Сухая / Dry	Прозрачный / Transparent	$1,1 \pm 0,15 \times 10^6$
		Rostov-M3	Жидкая / Liquid	Прозрачный / Transparent	$8,6 \pm 0,22 \times 10^3$
			Сухая / Dry	Прозрачный / Transparent	$8,5 \pm 0,22 \times 10^3$
		Rostov-13	Жидкая / Liquid	Прозрачный / Transparent	$1,4 \pm 0,17 \times 10^7$
			Сухая / Dry	Прозрачный / Transparent	$1,0 \pm 0,0 \times 10^7$
	Rostov-M3	Жидкая / Liquid	Прозрачный / Transparent	$1,2 \pm 0,15 \times 10^4$	
		Сухая / Dry	Прозрачный / Transparent	$1,0 \pm 0,17 \times 10^4$	
	2,5	Rostov-13	Жидкая / Liquid	Прозрачный / Transparent	$2,2 \pm 0,12 \times 10^7$
			Сухая / Dry	Прозрачный / Transparent	$1,4 \pm 0,24 \times 10^7$
		Rostov-M3	Жидкая / Liquid	Прозрачный / Transparent	$1,7 \pm 0,10 \times 10^5$
			Сухая / Dry	Прозрачный / Transparent	$1,4 \pm 0,23 \times 10^5$
		Rostov-13	Жидкая / Liquid	Прозрачный / Transparent	$2,4 \pm 0,25 \times 10^7$
			Сухая / Dry	Прозрачный / Transparent	$1,8 \pm 0,10 \times 10^7$
	Rostov-M3	Жидкая / Liquid	Прозрачный / Transparent	$2,1 \pm 0,12 \times 10^5$	
		Сухая / Dry	Прозрачный / Transparent	$2,0 \pm 0,15 \times 10^5$	
3	Rostov-13	Жидкая / Liquid	Прозрачный / Transparent	$1,9 \pm 0,22 \times 10^6$	
		Сухая / Dry	Прозрачный / Transparent	$1,7 \pm 0,27 \times 10^6$	
	Rostov-M3	Жидкая / Liquid	Прозрачный / Transparent	$2,9 \pm 0,10 \times 10^5$	
		Сухая / Dry	Прозрачный / Transparent	$2,6 \pm 0,15 \times 10^5$	
	Rostov-13	Жидкая / Liquid	Легкая опалесценция / Light opalescence	$4,5 \pm 0,22 \times 10^6$	
		Сухая / Dry	Легкая опалесценция / Light opalescence	$4,0 \pm 0,17 \times 10^6$	
Rostov-M3	Жидкая / Liquid	Легкая опалесценция / Light opalescence	$3,4 \pm 0,22 \times 10^5$		
	Сухая / Dry	Легкая опалесценция / Light opalescence	$3,2 \pm 0,10 \times 10^5$		
24	Rostov-13	Жидкая / Liquid	Опалесценция / Opalescence	$3,8 \pm 0,15 \times 10^5$	
		Сухая / Dry	Опалесценция / Opalescence	$2,9 \pm 0,22 \times 10^5$	
	Rostov-M3	Жидкая / Liquid	Опалесценция / Opalescence	$3,2 \pm 0,14 \times 10^5$	
		Сухая / Dry	Опалесценция / Opalescence	$3,0 \pm 0,0 \times 10^5$	

формуле (1) значение константы скорости адсорбции $K_{адс}$ составляет $9,7 \cdot 10^{-9}$ мл/мин (для двух форм препарата).

Несмотря на несущественные, на наш взгляд, различия численных величин, полученные данные по динамике адсорбции фагов свидетельствуют о правильности их выбора для терапии и профилактики холеры. Это заключение основывается на мнении ряда исследователей, согласно которому бактериофаги, как кандидаты в терапевтические, должны в количестве не менее 70% адсорбироваться в первые 10 мин (у бактериофагов Rostov-13 и Rostov-M3 адсорб-

ция >90% фаговых частиц происходит в течение 2 мин), а константа скорости адсорбции считается приемлемой, если составляет 10^{-8} – 10^{-9} мл/мин (у бактериофагов Rostov-13 и Rostov-M3 данная характеристика определена как $1,2 \cdot 10^{-9}$ и $9,7 \cdot 10^{-9}$ мл/мин соответственно) [15, 16].

Определение множественности инфекции бактериофагов

Для определения множественности инфекции Rostov-13 и Rostov-M3 были использованы различные соотношения фаг/

Таблица. Продолжение.

Соотношение фаг/бактериальная клетка / The ratio phage/ bacterial culture	Время инкубирования, ч / Incubation time, h	Фаг / Phage	Форма препарата / Preparation form	Внешний вид культуральной жидкости / appearance of culture liquid	Концентрация фага, БОЕ/мл (n = 3, M ± SD) / Phage concentration, PFU/mL (n = 3, M ± SD)
10:1	0,5	Rostov-13	Жидкая / Liquid	Прозрачный / Transparent	$8,0 \pm 0,12 \times 10^2$
			Сухая / Dry	Прозрачный / Transparent	$7,2 \pm 0,15 \times 10^2$
	Rostov-M3	Жидкая / Liquid	Прозрачный / Transparent	$6,1 \pm 0,22 \times 10^3$	
		Сухая / Dry	Прозрачный / Transparent	$6,0 \pm 0,12 \times 10^3$	
	1	Rostov-13	Жидкая / Liquid	Прозрачный / Transparent	$6,8 \pm 0,25 \times 10^4$
			Сухая / Dry	Прозрачный / Transparent	$6,1 \pm 0,1 \times 10^4$
	Rostov-M3	Жидкая / Liquid	Прозрачный / Transparent	$5,5 \pm 0,20 \times 10^4$	
		Сухая / Dry	Прозрачный / Transparent	$5,2 \pm 0,22 \times 10^4$	
	1,5	Rostov-13	Жидкая / Liquid	Прозрачный / Transparent	$5,4 \pm 0,12 \times 10^5$
			Сухая / Dry	Прозрачный / Transparent	$4,8 \pm 0,12 \times 10^5$
	Rostov-M3	Жидкая / Liquid	Прозрачный / Transparent	$6,7 \pm 0,23 \times 10^4$	
		Сухая / Dry	Прозрачный / Transparent	$6,4 \pm 0,17 \times 10^4$	
	2	Rostov-13	Жидкая / Liquid	Прозрачный / Transparent	$7,0 \pm 0,1 \times 10^6$
			Сухая / Dry	Прозрачный / Transparent	$6,2 \pm 0,14 \times 10^6$
	Rostov-M3	Жидкая / Liquid	Прозрачный / Transparent	$7,2 \pm 0,10 \times 10^4$	
		Сухая / Dry	Прозрачный / Transparent	$7,0 \pm 0,15 \times 10^4$	
	2,5	Rostov-13	Жидкая / Liquid	Прозрачный / Transparent	$1,5 \pm 0,25 \times 10^7$
			Сухая / Dry	Прозрачный / Transparent	$1,1 \pm 0,14 \times 10^7$
	Rostov-M3	Жидкая / Liquid	Прозрачный / Transparent	$9,4 \pm 0,12 \times 10^5$	
		Сухая / Dry	Прозрачный / Transparent	$9,1 \pm 0,15 \times 10^5$	
	3	Rostov-13	Жидкая / Liquid	Прозрачный / Transparent	$1,8 \pm 0,17 \times 10^7$
			Сухая / Dry	Прозрачный / Transparent	$1,2 \pm 0,0 \times 10^7$
	Rostov-M3	Жидкая / Liquid	Прозрачный / Transparent	$1,1 \pm 0,22 \times 10^6$	
		Сухая / Dry	Прозрачный / Transparent	$1,0 \pm 0,10 \times 10^6$	
4	Rostov-13	Жидкая / Liquid	Прозрачный / Transparent	$4,6 \pm 0,15 \times 10^6$	
		Сухая / Dry	Прозрачный / Transparent	$4,3 \pm 0,17 \times 10^6$	
Rostov-M3	Жидкая / Liquid	Легкая опалесценция / Light opalescence	$1,8 \pm 0,15 \times 10^6$		
	Сухая / Dry	Легкая опалесценция / Light opalescence	$1,6 \pm 0,00 \times 10^6$		
6	Rostov-13	Жидкая / Liquid	Легкая опалесценция / Light opalescence	$2,7 \pm 0,27 \times 10^6$	
		Сухая / Dry	Легкая опалесценция / Light opalescence	$2,2 \pm 0,12 \times 10^6$	
Rostov-M3	Жидкая / Liquid	Легкая опалесценция / Light opalescence	$2,4 \pm 0,31 \times 10^6$		
	Сухая / Dry	Легкая опалесценция / Light opalescence	$2,1 \pm 0,10 \times 10^6$		
24	Rostov-13	Жидкая / Liquid	Опалесценция / Opalescence	$1,6 \pm 0,12 \times 10^5$	
		Сухая / Dry	Опалесценция / Opalescence	$1,2 \pm 0,15 \times 10^5$	
Rostov-M3	Жидкая / Liquid	Опалесценция / Opalescence	$2,0 \pm 0,22 \times 10^6$		
	Сухая / Dry	Опалесценция / Opalescence	$1,9 \pm 0,14 \times 10^6$		

бактериальная клетка, а именно 100:1, 10:1, 1:1, 1:10, 1:100 и 1:200. Одновременно оценивали внешний вид культуральной жидкости, титр фага как для жидкой, так и лиофилизированной форм препаратов в различные промежутки времени – от 30 мин до 24 ч.

Анализ данных таблицы позволяет сделать следующие выводы. Численные значения множественности инфекции для бактериофагов Rostov-13 и Rostov-M3 как в жидкой, так и сухой маточной культуре остаются практически одинаковыми. В течение 3 ч инкубации Rostov-13 количество фаговых частиц нарастает, достигая своего максимума к 3-му

часу. Это наблюдается при всех значениях множественности инфекции. Дальнейшее продолжение приводит к уменьшению концентрации БОЕ, уменьшению прозрачности культуральной жидкости вплоть до ее опалесценции.

Для Rostov-M3 выявлена отличная от Rostov-13 закономерность: начиная с 6-го часа инкубации происходит помутнение культуральной жидкости, продолжающееся вплоть до 24 ч (у Rostov-13 наблюдалась лишь легкая опалесценция), но при этом происходило повышение титра фага, достигающее максимума именно к 6-му часу инкубации. Дальнейшее продолжение инкубации приводит к уменьшению БОЕ и

Таблица. Продолжение.

Соотношение фаг/бактериальная клетка / The ratio phage/bacterial culture	Время инкубирования, ч / Incubation time, h	Фаг / Phage	Форма препарата / Preparation form	Внешний вид культуральной жидкости / appearance of culture liquid	Концентрация фага, БОЕ/мл (n = 3, M ± SD) / Phage concentration, PFU/mL (n = 3, M ± SD)
1:1	0,5	Rostov-13	Жидкая / Liquid	Прозрачный / Transparent	$5,0 \pm 0,27 \times 10^9$
			Сухая / Dry	Прозрачный / Transparent	$4,8 \pm 0,15 \times 10^9$
	Rostov-M3	Жидкая / Liquid	Прозрачный / Transparent	$4,8 \pm 0,0 \times 10^4$	
		Сухая / Dry	Прозрачный / Transparent	$4,5 \pm 0,12 \times 10^4$	
	1	Rostov-13	Жидкая / Liquid	Прозрачный / Transparent	$7,0 \pm 0,12 \times 10^5$
			Сухая / Dry	Прозрачный / Transparent	$6,7 \pm 0,2 \times 10^5$
	Rostov-M3	Жидкая / Liquid	Прозрачный / Transparent	$2,2 \pm 0,12 \times 10^5$	
		Сухая / Dry	Прозрачный / Transparent	$2,1 \pm 0,15 \times 10^5$	
	1,5	Rostov-13	Жидкая / Liquid	Прозрачный / Transparent	$3,4 \pm 0,17 \times 10^6$
			Сухая / Dry	Прозрачный / Transparent	$3,0 \pm 0,10 \times 10^6$
	Rostov-M3	Жидкая / Liquid	Прозрачный / Transparent	$3,4 \pm 0,22 \times 10^5$	
		Сухая / Dry	Прозрачный / Transparent	$3,2 \pm 0,17 \times 10^5$	
	2	Rostov-13	Жидкая / Liquid	Прозрачный / Transparent	$2,8 \pm 0,15 \times 10^7$
			Сухая / Dry	Прозрачный / Transparent	$2,1 \pm 0,0 \times 10^7$
	Rostov-M3	Жидкая / Liquid	Прозрачный / Transparent	$3,9 \pm 0,20 \times 10^5$	
		Сухая / Dry	Прозрачный / Transparent	$3,7 \pm 0,17 \times 10^5$	
	2,5	Rostov-13	Жидкая / Liquid	Прозрачный / Transparent	$8,9 \pm 0,15 \times 10^7$
			Сухая / Dry	Прозрачный / Transparent	$8,0 \pm 0,0 \times 10^7$
	Rostov-M3	Жидкая / Liquid	Прозрачный / Transparent	$5,0 \pm 0,27 \times 10^6$	
		Сухая / Dry	Прозрачный / Transparent	$4,9 \pm 0,12 \times 10^6$	
	3	Rostov-13	Жидкая / Liquid	Прозрачный / Transparent	$1,2 \pm 0,15 \times 10^8$
			Сухая / Dry	Прозрачный / Transparent	$9,7 \pm 0,22 \times 10^7$
	Rostov-M3	Жидкая / Liquid	Прозрачный / Transparent	$6,5 \pm 0,12 \times 10^6$	
		Сухая / Dry	Прозрачный / Transparent	$6,3 \pm 0,15 \times 10^6$	
4	Rostov-13	Жидкая / Liquid	Прозрачный / Transparent	$3,5 \pm 0,41 \times 10^7$	
		Сухая / Dry	Прозрачный / Transparent	$3,0 \pm 0,12 \times 10^7$	
Rostov-M3	Жидкая / Liquid	Легкая опалесценция / Light opalescence	$7,3 \pm 0,10 \times 10^6$		
	Сухая / Dry	Легкая опалесценция / Light opalescence	$7,0 \pm 0,17 \times 10^6$		
6	Rostov-13	Жидкая / Liquid	Легкая опалесценция / Light opalescence	$3,1 \pm 0,15 \times 10^6$	
		Сухая / Dry	Легкая опалесценция / Light opalescence	$2,9 \pm 0,22 \times 10^6$	
Rostov-M3	Жидкая / Liquid	Опалесценция / Opalescence	$8,6 \pm 0,12 \times 10^6$		
	Сухая / Dry	Опалесценция / Opalescence	$8,4 \pm 0,17 \times 10^6$		
24	Rostov-13	Жидкая / Liquid	Опалесценция / Opalescence	$1,0 \pm 0,15 \times 10^5$	
		Сухая / Dry	Опалесценция / Opalescence	$9,3 \pm 0,0 \times 10^4$	
Rostov-M3	Жидкая / Liquid	Мутный / Cloudy	$8,2 \pm 0,10 \times 10^6$		
	Сухая / Dry	Мутный / Cloudy	$8,0 \pm 0,32 \times 10^6$		

сохранению мутности культуральной жидкости. Это наблюдается при всех значениях множественности инфекции.

Оптимально для Rostov-13 соотношение фаг / бактериальная клетка 1/100, время инкубации – 3 ч, при которых зафиксировано максимальное количество фаговых частиц – $1,34-1,2 \cdot 10^9$ БОЕ/мл, а для Rostov-M3: соотношение фаг / бактериальная клетка 1/100, время инкубации – 6 ч, при которых максимальное количество фаговых частиц составляет $2,0-1,8 \cdot 10^8$ БОЕ/мл. Полученные данные экспериментально обоснованных значений оптимальной множественности инфекции и продолжительности процесса инкубации

целесообразно использовать в технологии производства биологических препаратов, имеющих в своем составе холерные бактериофаги Rostov-13 и Rostov-M3.

Определение длительности латентного периода и урожайности бактериофагов

Латентный период бактериофагов Rostov-13 и Rostov-M3 визуализирован на рис. 3 и 4 соответственно. Длительность латентного периода у фага Rostov-13 (рис. 3) составляет 50 мин как для жидкой, так и для сухой формы препарата. Среднее количество высвобождающихся фагов из одной хозяй-

Таблица. Продолжение.

Соотношение фаг/бактериальная клетка / The ratio phage/bacterial culture	Время инкубирования, ч / Incubation time, h	Фаг / Phage	Форма препарата / Preparation form	Внешний вид культуральной жидкости / appearance of culture liquid	Концентрация фага, БОЕ/мл (n = 3, M ± SD) / Phage concentration, PFU/mL (n = 3, M ± SD)
1:10	0,5	Rostov-13	Жидкая / Liquid	Прозрачный / Transparent	$2,5 \pm 0,15 \times 10^4$
			Сухая / Dry	Прозрачный / Transparent	$2,2 \pm 0,17 \times 10^4$
	Rostov-M3	Жидкая / Liquid	Прозрачный / Transparent	$3,5 \pm 0,22 \times 10^4$	
		Сухая / Dry	Прозрачный / Transparent	$3,3 \pm 0,25 \times 10^4$	
	1	Rostov-13	Жидкая / Liquid	Прозрачный / Transparent	$1,8 \pm 0,10 \times 10^6$
			Сухая / Dry	Прозрачный / Transparent	$1,3 \pm 0,17 \times 10^6$
	Rostov-M3	Жидкая / Liquid	Прозрачный / Transparent	$1,2 \pm 0,17 \times 10^5$	
		Сухая / Dry	Прозрачный / Transparent	$1,2 \pm 0,10 \times 10^5$	
	1,5	Rostov-13	Жидкая / Liquid	Прозрачный / Transparent	$1,0 \pm 0,15 \times 10^7$
			Сухая / Dry	Прозрачный / Transparent	$9,7 \pm 0,28 \times 10^6$
	Rostov-M3	Жидкая / Liquid	Прозрачный / Transparent	$1,8 \pm 0,25 \times 10^5$	
		Сухая / Dry	Прозрачный / Transparent	$1,4 \pm 0,0 \times 10^5$	
	2	Rostov-13	Жидкая / Liquid	Прозрачный / Transparent	$5,6 \pm 0,17 \times 10^7$
			Сухая / Dry	Прозрачный / Transparent	$5,0 \pm 0,15 \times 10^7$
	Rostov-M3	Жидкая / Liquid	Прозрачный / Transparent	$2,2 \pm 0,20 \times 10^5$	
		Сухая / Dry	Прозрачный / Transparent	$2,0 \pm 0,10 \times 10^5$	
	2,5	Rostov-13	Жидкая / Liquid	Прозрачный / Transparent	$1,6 \pm 0,17 \times 10^8$
			Сухая / Dry	Прозрачный / Transparent	$1,1 \pm 0,12 \times 10^8$
	Rostov-M3	Жидкая / Liquid	Прозрачный / Transparent	$4,2 \pm 0,22 \times 10^6$	
		Сухая / Dry	Прозрачный / Transparent	$4,0 \pm 0,15 \times 10^6$	
	3	Rostov-13	Жидкая / Liquid	Прозрачный / Transparent	$2,2 \pm 0,22 \times 10^8$
			Сухая / Dry	Прозрачный / Transparent	$2,0 \pm 0,20 \times 10^8$
	Rostov-M3	Жидкая / Liquid	Легкая опалесценция / Light opalescence	$5,0 \pm 0,33 \times 10^6$	
		Сухая / Dry	Легкая опалесценция / Light opalescence	$5,2 \pm 0,17 \times 10^6$	
4	Rostov-13	Жидкая / Liquid	Прозрачный / Transparent	$6,3 \pm 0,12 \times 10^7$	
		Сухая / Dry	Прозрачный / Transparent	$6,1 \pm 0,0 \times 10^7$	
Rostov-M3	Жидкая / Liquid	Опалесценция / Opalescence	$8,4 \pm 0,15 \times 10^6$		
	Сухая / Dry	Опалесценция / Opalescence	$8,0 \pm 0,22 \times 10^6$		
6	Rostov-13	Жидкая / Liquid	Легкая опалесценция / Light opalescence	$4,6 \pm 0,10 \times 10^7$	
		Сухая / Dry	Легкая опалесценция / Light opalescence	$4,1 \pm 0,15 \times 10^7$	
Rostov-M3	Жидкая / Liquid	Мутный / Cloudy	$1,2 \pm 0,22 \times 10^7$		
	Сухая / Dry	Мутный / Cloudy	$1,0 \pm 0,15 \times 10^7$		
24	Rostov-13	Жидкая / Liquid	Опалесценция / Opalescence	$1,7 \pm 0,12 \times 10^6$	
		Сухая / Dry	Опалесценция / Opalescence	$1,2 \pm 0,15 \times 10^6$	
Rostov-M3	Жидкая / Liquid	Мутный / Cloudy	$1,1 \pm 0,15 \times 10^7$		
	Сухая / Dry	Мутный / Cloudy	$1,2 \pm 0,10 \times 10^7$		

ской клетки (урожайность) определено как 300 и 275 вирусных частиц для жидкого препарата и лиофилизата соответственно. На рис. 4 видно, что длительность латентного периода бактериофага Rostov-M3 составляет 120 мин как для жидкой, так и для сухой формы препарата. Урожайность определена как 50 и 55 вирусных частиц на одну бактериальную клетку для жидкого бактериофага и лиофилизата соответственно.

Полученные результаты показывают, что урожайность бактериофага Rostov-M3 ниже, чем у Rostov-13. Однако из монографии Васильева с соавт. следует, что для бактериофагов ряда бактерий урожайность в пределах от 50 до 240

вирусных частиц является допустимой при конструировании биопрепаратов [15]. Примерно такой же вывод был сделан при исследовании биологических и геномных характеристик фага Ec2-7 с антимикробной активностью против STEC-штаммов *Escherichia coli*. Авторы констатировали, что выход 56 ± 8 вирионов на клетку является достаточным для конструирования препарата на основе фага Ec2-7 с целью фаготерапии и биоконтроля *E. coli* [18].

Единое мнение об оптимальном значении длительности латентного периода для лечебно-профилактических бактериофагов среди исследователей отсутствует. На наш взгляд,

Таблица. Продолжение.

Соотношение фаг/бактериальная клетка / The ratio phage/bacterial culture	Время инкубирования, ч / Incubation time, h	Фаг / Phage	Форма препарата / Preparation form	Внешний вид культуральной жидкости / appearance of culture liquid	Концентрация фага, БОЕ/мл (n = 3, M ± SD) / Phage concentration, PFU/mL (n = 3, M ± SD)
1:100	0,5	Rostov-13	Жидкая / Liquid	Прозрачный / Transparent	1,5 ± 0,12 × 10 ⁵
			Сухая / Dry	Прозрачный / Transparent	1,1 ± 0,15 × 10 ⁵
	Rostov-M3	Жидкая / Liquid	Прозрачный / Transparent	6,9 ± 0,22 × 10 ⁴	
		Сухая / Dry	Прозрачный / Transparent	6,6 ± 0,00 × 10 ⁴	
	1	Rostov-13	Жидкая / Liquid	Прозрачный / Transparent	2 ± 0,25 × 10 ⁷
			Сухая / Dry	Прозрачный / Transparent	1,8 ± 0,12 × 10 ⁷
	Rostov-M3	Жидкая / Liquid	Прозрачный / Transparent	7,5 ± 0,12 × 10 ⁵	
		Сухая / Dry	Прозрачный / Transparent	7,2 ± 0,27 × 10 ⁵	
	1,5	Rostov-13	Жидкая / Liquid	Прозрачный / Transparent	1,9 ± 0,15 × 10 ⁸
			Сухая / Dry	Прозрачный / Transparent	1,4 ± 0,10 × 10 ⁸
	Rostov-M3	Жидкая / Liquid	Прозрачный / Transparent	2,9 ± 0,17 × 10 ⁶	
		Сухая / Dry	Прозрачный / Transparent	2,8 ± 0,22 × 10 ⁶	
	2	Rostov-13	Жидкая / Liquid	Прозрачный / Transparent	3,5 ± 0,37 × 10 ⁸
			Сухая / Dry	Прозрачный / Transparent	3,3 ± 0,12 × 10 ⁸
	Rostov-M3	Жидкая / Liquid	Прозрачный / Transparent	4,3 ± 0,10 × 10 ⁶	
		Сухая / Dry	Прозрачный / Transparent	4,0 ± 0,25 × 10 ⁶	
	2,5	Rostov-13	Жидкая / Liquid	Прозрачный / Transparent	8,6 ± 0,22 × 10 ⁸
			Сухая / Dry	Прозрачный / Transparent	8,4 ± 0,15 × 10 ⁸
	Rostov-M3	Жидкая / Liquid	Легкая опалесценция / Light opalescence	3,2 ± 0,12 × 10 ⁷	
		Сухая / Dry	Легкая опалесценция / Light opalescence	3,1 ± 0,22 × 10 ⁷	
	3	Rostov-13	Жидкая / Liquid	Прозрачный / Transparent	1,3 ± 0,10 × 10 ⁹
			Сухая / Dry	Прозрачный / Transparent	1,2 ± 0,00 × 10 ⁹
	Rostov-M3	Жидкая / Liquid	Опалесценция / Opalescence	4,5 ± 0,27 × 10 ⁷	
		Сухая / Dry	Опалесценция / Opalescence	4,0 ± 0,12 × 10 ⁷	
4	Rostov-13	Жидкая / Liquid	Прозрачный / Transparent	3,5 ± 0,10 × 10 ⁸	
		Сухая / Dry	Прозрачный / Transparent	3,1 ± 0,17 × 10 ⁸	
Rostov-M3	Жидкая / Liquid	Опалесценция / Opalescence	6,8 ± 0,15 × 10 ⁷		
	Сухая / Dry	Опалесценция / Opalescence	6,5 ± 0,22 × 10 ⁷		
6	Rostov-13	Жидкая / Liquid	Легкая опалесценция / Light opalescence	5,1 ± 0,17 × 10 ⁷	
		Сухая / Dry	Легкая опалесценция / Light opalescence	4,9 ± 0,22 × 10 ⁷	
Rostov-M3	Жидкая / Liquid	Мутный / Cloudy	2,0 ± 0,25 × 10 ⁸		
	Сухая / Dry	Мутный / Cloudy	1,8 ± 0,15 × 10 ⁸		
24	Rostov-13	Жидкая / Liquid	Опалесценция / Opalescence	2,2 ± 0,12 × 10 ⁶	
		Сухая / Dry	Опалесценция / Opalescence	1,7 ± 0,27 × 10 ⁶	
Rostov-M3	Жидкая / Liquid	Мутный / Cloudy	8,4 ± 0,27 × 10 ⁷		
	Сухая / Dry	Мутный / Cloudy	8,0 ± 0,22 × 10 ⁷		
1:200	3	Rostov-13	Жидкая / Liquid	Прозрачный / Transparent	2,2 ± 0,22 × 10 ⁷
			Сухая / Dry	Прозрачный / Transparent	2,0 ± 0,17 × 10 ⁷
	Rostov-M3	Жидкая / Liquid	Опалесценция / Opalescence	8,6 ± 0,20 × 10 ⁵	
		Сухая / Dry	Опалесценция / Opalescence	8,3 ± 0,12 × 10 ⁵	
	6	Rostov-13	Жидкая / Liquid	Легкая опалесценция / Light opalescence	9,4 ± 0,33 × 10 ⁵
			Сухая / Dry	Легкая опалесценция / Light opalescence	9,8 ± 0,22 × 10 ⁵
Rostov-M3	Жидкая / Liquid	Мутный / Cloudy	5,8 ± 0,28 × 10 ⁶		
Сухая / Dry	Мутный / Cloudy	5,4 ± 0,22 × 10 ⁶			

здесь уместно процитировать мнение Manohar et al.: «... латентный период у терапевтических бактериофагов обычно составляет от 11 до 65 мин, при этом для эффективных литических фагов обычно требуется 30–60 мин» [19]. В контексте вышеизложенного обращает на себя внимание довольно высокое значение длительности латентного периода для Rostov-M3, составляющее 120 мин. Без сомнения, меньшая длительность латентного периода для лечебно-профилактических бактериофагов предпочтительнее в силу того, что чем раньше бактериофаг начнет освобождаться из инфицированной клетки, тем больше будет терапевтический эффект.

Относительно недавние исследования, проведенные Гаевской, выявили значения данной характеристики для 22 штаммов холерных бактериофагов от 60 до 72 мин [20]. Также необходимо отметить, что длительность латентного периода для фагов *Lactobacillus casei* (возбудителя язвы вульвы Липшютца) составляет от 100 до 220 мин [21].

На основании вышеизложенного мы считаем, что значения длительности латентного периода у бактериофагов Rostov-13 и Rostov-M3 являются допустимыми для конструирования биопрепаратов.

Заключение

При определении скорости адсорбции у двух исследованных фагов установлены достаточно высокие значения, в частности, константы скорости адсорбции $K_{\text{адс}}$ колебались в пределах 10^{-9} мл/мин.

Оценка множественности инфекции показала, что для накопления бактериофагов Rostov-13 и Rostov-M3 оптимальным является соотношение фаг / бактериальная культура 1:100. Эффективное время инкубации смеси, при котором получен максимальный титр, составляет 3 ч для Rostov-13 и 6 ч для Rostov-M3. Исследования длительности латентного периода и урожайности дают основание констатировать, что при таких показателях у фагов возможно их использование для конструирования биопрепаратов. Результаты, полученные при сравнении одиночного цикла развития жидких бактериофагов и их лиофилизатов, сопоставимы.

Таким образом, подтверждено, что лиофилизация является эффективным методом сохранения свойств фагов. Основным практически значимым итогом проведенных исследований является возможность увеличения «выхода» холерных бактериофагов Rostov-13 и Rostov-M3 на стадии их репродукции, в основном за счет экспериментально обоснованных значений оптимальной множественности инфекции. Немаловажное практическое значение также имеет определенное опытным путем эффективное время инкубации. Знание этих параметров играет значительную роль при разработке технологии производства лечебно-профилактических препаратов на основе бактериофагов. Существенным подспорьем при будущем возможном лицензировании производства являются полученные сведения о таких характеристиках, как длительность латентного периода и урожайность, знание которых является обязательным согласно Решению Евразийского экономического союза №89 от 3 ноября 2016 г. «Об утверждении правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза» [8]. Доказан-

ные достаточно высокая адсорбционная способность, довольно непродолжительный латентный период исследованных препаратов, наряду с другими ранее исследованными свойствами [21], должны позволить обеспечить их эффективность при терапевтическом применении.

Информация о финансировании

Исследование выполнено в рамках НИР 228-4-24 «Разработка экспериментального сочетанного лечебно-профилактического препарата против холеры на основе иммуноглобулинового комплекса и коктейля бактериофагов» (2024–2027 гг.) № гос. учета 124020200007-2.

Financial support

The study was carried out within the framework of research work 228-4-24 “Development of an experimental combined therapeutic and prophylactic drug against cholera based on an immunoglobulin complex and a cocktail of bacteriophages” (2024–2027 гг.) State Registration No 124020200007-2.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interest.

Вклад авторов

Все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.

Author contribution

All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published and agree to be accountable for all aspects of the work.

Литература

1. Холера. Эпидемиология, диагностика, клиника, лечение, профилактика (к 90-летию ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора): [монография]: для врачей-эпидемиологов, микробиологов и студентов медицинских вузов. Под ред. Поповой АЮ, Кутырева ВВ; Федер. служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. Ростов-на-Дону: Мини Тайп, 2024.
2. Гаевская НЕ, Кудрякова ТА, Македонова ЛД, Качкина ГВ, Алиева АА, Саямов СР. Отбор бактериофагов для лечения экспериментальной холеры, вызванной классическими холерными вибрионами. Современные наукоемкие технологии. 2004;3:11-15.
3. Тюрина АВ, Гаевская НЕ, Иванова ИА, Погожова МП, Сизова ЮВ, Филиппенко АВ, и др. Фармакокинетика и антимикробное действие экспериментального препарата на основе холерных бактериофагов на модели белых мышей. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А.Овчинникова. 2024;20(3):28-33.
4. Овчинникова МВ, Глазкова ЕА, Гумаюнова КС, Комиссаров АВ, Никифоров АК, Тюрина АВ, и др. Разработка экспериментального противохолерного препарата на основе бактериофагов, иммуноглобулина и энтеросорбента. Биотехнология. 2025;41(6):1-13. DOI: 10.56304/S0234275825060109
5. Распоряжение Правительства Российской Федерации от 16 августа 2024 г. №2214-р «О плане мероприятий на 2025–2030 гг. по реализации Стратегии предупреждения распространения антимикробной резистентности в РФ на

- период до 2030 г.». Документы ленты ПРАЙМ: ГАРАНТ.РУ [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/409448585/?ysclid=mm3f0sxd5719684998> (дата обращения: 26.06.2025).
6. Нежута АА, Сервис ЕС. Разработка научно-обоснованных режимов сублимационной сушки биопрепаратов. Биотехнология. 2001;6:59-67.
7. Семакова АП, Кудрявцева ОМ, Попова ПЮ, Комиссаров АВ, Микшис НИ. Стабилизация путем лиофилизации иммуногенных антигенов *Bacillus anthracis* в составе прототипа рекомбинантной вакцины против сибирской язвы. Биотехнология. 2017;33(3):57-65.
8. Решение Совета Евразийской экономической комиссии «Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза» от 03.11.2016 №89 (с изм. и допол. в ред. от 22.01.2025). Электронный фонд правовых и нормативнотехнических документов. Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/456026116> (дата обращения: 06.08.2025).
9. Каттер Э, Сулаквелидзе А. Бактериофаги: Биология и практическое применение. Пер. с англ. коллектив переводчиков; науч. ред. Летаров АВ. М.: Научный мир, 2012.
10. Сinyaгина ЮВ, Овчинникова МВ, Зинина ОС, Гумаюнова КС, Никифоров АК. Современный обзор производства диагностических и лечебно-профилактических бактериофагов. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А.Овчинникова. 2022;18(4):62-71.
11. Санитарные правила и нормы САНПИН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней». КонсультантПлюс [Электронный ресурс]. Режим доступа: https://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_377388/dd6027e5f754deb456b92412779a367f72245983/ (дата обращения: 25.06.2025).
12. ОФС.1.7.1.0002.15. Общая фармакопейная статья. Бактериофаги (утв. и введена в действие Приказом Минздрава России от 31.10.2018 №749) («Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV издание. Том II») [Электронный ресурс]. Режим доступа: https://meganorm.ru/mega_doc/norm/gosudarstvennaya-farmakopeya/2/ofs_1_7_1_0002_15_obshchaya_farmakopeynaya_statya.html?ysclid=mm3fj82vwn195910953 (дата обращения: 26.06.2025).
13. МР 4.2.0263-21 Методы работы с бактериофагами микроорганизмов I–IV групп патогенности – Информпроект Групп [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://informproekt.ru/docs/1304363785/?ysclid=mm3fmqyn3c327001330> (дата обращения: 26.06.2025).
14. Пименов НВ. Разработка средств и совершенствование методов лечения и профилактики сальмонеллеза птиц. Автореф. дисс. ... докт. биол. наук. М., 2012.
15. Разработка биотехнологических параметров создания бактериофаговых препаратов для деконтаминации микрофлоры, вызывающей порчу пищевого сырья животного происхождения и мясных, рыбных, молочных продуктов (биопроцессинг): научная монография. Васильев ДА, Феоктистова НА, Алешкин АВ, Золотухин СН, Мастиленко АВ, Киселева ИА, и др.; Министерство сельского хозяйства Российской Федерации, ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ. Ульяновск: Ульяновский ГАУ, 2019.
16. Bull JJ, Gill JJ. The habits of highly effective phages: population dynamics as a framework for identifying therapeutic phages. Front Microbiol. 2014 Nov 18;5:618. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00618
17. Levin BR, Stewart FM, Chao L. Resource-limited growth, competition and predation: a model and experimental studies with bacteria and bacteriophage. American Naturalist. 1977;97:3-24. DOI: 10.1086/283134
18. Зулькарнеев ЭР, Пименов НВ. Биологическая и геномная характеристика фага Eс2-7 с антимикробной активностью против STEC-штаммов *Escherichia coli*. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2025;43(3):31-35. DOI: 10.17116/molgen20254303131
19. Manohar P, Tamhankar AJ, Lundborg CS, Nachimuthu R. Therapeutic Characterization and Efficacy of Bacteriophage Cocktails Infecting *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Enterobacter* Species. Front Microbiol. 2019 Mar 21;10:574. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00574
20. Гаевская НЕ. Характеристика биологических свойств бактериофагов холерных и паразитических вибрионов. Дисс. ... канд. мед. наук. Ростов-на-Дону, 2013.
21. Горина ВА. Проблемные вопросы биологии молочнокислых бактерий [монография]. Симферополь: «Таврия плюс», 2000.
22. Тюрина АВ. Основные аспекты разработки экспериментального профилактического препарата на основе холерных бактериофагов. Дисс. ... канд. биол. наук. М., 2025.

References

1. Cholera. Epidemiology, diagnostics, clinical features, treatment, prevention (on the 90th anniversary of the Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor): [monograph]: for epidemiologists, microbiologists and students of medical universities. Edited by Popova AYu, Kutryev VV; Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Wellbeing. Rostov-on-Don: Mini Type, 2024. (In Russian).
2. Gaevskaya NE, Kudryakova TA, Makedonova LD, Kachkina GV, Alieva AA, Sayamov SR. Selection of bakteriofags for treatment of an experimental cholera, caused classical cholera vibriions. Modern high-tech technologies. 2004;3:11-15. (In Russian).
3. Tyurina AV, Gaevskaya NE, Ivanova IA, Pogozhova MP, Sizova YuV, Filippenko AV, et al. Pharmacokinetics and antimicrobial action of an experimental drug based on cholera bacteriophages on a model of white mice. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology n.a. Yu.A.Ovchinnikov. 2024;20(3):28-33. (In Russian).
4. Ovchinnikova MV, Glazkova EA, Gumayunova KS, Komissarov AV, Nikiforov AK, Tyurina AV, et al. Development of an experimental anti-cholera drug based on bacteriophages, immunoglobulin, and enterosorbent. Biotechnology. 2025;41(6):1-13. DOI: 10.56304/S0234275825060109 (In Russian).
5. Order of the Government of the Russian Federation dated 25.09.2017 № 2045-r «On approval of the Strategy for the Prevention of the Spread of Antimicrobial Resistance in the Russian Federation for the Period up to 2030 and the action plan for its implementation with a draft report to the President of the Russian Federation on this issue». (In Russian).
6. Nezhuta AA, Serbis ES. Development of scientifically based modes of freezedrying of biological products. Biotechnology. 2001;6:59-67. (In Russian).
7. Semakova AP, Kudryavtseva OM, Popova PYu, Komissarov AV, Mikshis NI. Stabilization by lyophilization of immunogenic antigens of *Bacillus anthracis*, as part of a prototype recombinant vaccine against anthrax. Biotechnology. 2017;33(3):57-65. (In Russian).
8. Decision of the Council of the Eurasian Economic Commission "On approval of the Rules for conducting research on biological medicinal products of the Eurasian Economic Union" dated 03.11.2016 No 89 (as amended and supplemented on 22.01.2025). Electronic fund of legal and regulatory documents. Available at: <https://docs.cntd.ru/document/456026116> (accessed 06.08.2025). (In Russian).
9. Katter E, Sulakvelidze A. Bacteriophages: Biology and practical application. – Trans. from English by a team of translators; scientific editor Letarov AV. M.: Scientific World, 2012. (In Russian).
10. Sinyagina YuV, Ovchinnikova MV, Zinina OS, Gumayunova KS, Nikiforov AK. A modern review of the production of diagnostic and therapeutic bacteriophages. Bulletin of Biotechnology and Physico-Chemical Biology n.a. Yu.A.Ovchinnikov. 2022;18(4):62-71. (In Russian).
11. Sanitary rules and regulations SANPIN 3.3686-21 "Sanitary and epidemiological requirements for the prevention of infectious diseases". ConsultantPlus [Electronic resource]. Available at: https://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_377388/dd6027e5f754deb456b92412779a367f72245983/ (accessed 06/25/2025). (In Russian).

12. OFS.1.7.1.0002.15. General pharmacopoeial article. Bacteriophages (approved and put into effect by Order of the Ministry of Health of Russia dated October 31, 2018 No 749) (State Pharmacopoeia of the Russian Federation. XIV edition. Volume II) [Electronic resource]. Available at: https://meganorm.ru/mega_doc/norm/gosudarstvennaya-farmakopeya/2/ofs_1_7_1_0002_15_obshchaya_farmakopeynaya_statya.html?ysclid=mm3fj82vwn195910953 (accessed June 26, 2025). (In Russian).
13. MR 4.2.0263-21 Methods of working with bacteriophages of microorganisms of pathogenicity groups I–IV – Informproekt Group [Electronic resource]. Available at: <https://informproekt.ru/docs/1304363785/?ysclid=mm3fmqyn3c327001330> (accessed 06/26/2025) (In Russian).
14. Pimenov NV. Development of means and improvement of methods for treatment and prevention of salmonellosis in birds. Diss. ... Doctor of Biological Sciences. M., 2012. (In Russian).
15. Development of biotechnological parameters for the creation of bacteriophage preparations for the decontamination of microflora causing spoilage of food raw materials of animal origin and meat, fish, dairy products (bioprocessing): scientific monograph. Vasil'ev DA, Feoktistova NA, Aleshkin AV, Zolotuhin SN, Mastilenko AV, Kiseleva IA, et al.; Ministry of Agriculture of the Russian Federation, Ulyanovsk State Agrarian University. Ulyanovsk: Ulyanovsk State Agrarian University, 2019. (In Russian).
16. Bull JJ, Gill JJ. The habits of highly effective phages: population dynamics as a framework for identifying therapeutic phages. *Front Microbiol.* 2014 Nov 18;5:618. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00618
17. Levin BR, Stewart FM, Chao L. Resource-limited growth, competition and predation: a model and experimental studies with bacteria and bacteriophage. *American Naturalist.* 1977;97:3-24. DOI: 10.1086/283134
18. Zulkarneev ER, Pimenov NV. Biological and genomic characterisation of phage Ec2-7 with antimicrobial activity against STEC strains *Escherichia coli*. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology.* 2025;43(3):31-35. DOI: 10.17116/molgen20254303131. (In Russian).
19. Manohar P, Tamhankar AJ, Lundborg CS, Nachimuthu R. Therapeutic Characterization and Efficacy of Bacteriophage Cocktails Infecting *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Enterobacter* Species. *Front Microbiol.* 2019 Mar 21;10:574. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00574
20. Gaevskaya NE. Characteristics of the biological properties of bacteriophages of cholera and parahemolytic vibrios. Diss. ... Cand. Medical Sciences. Rostov-on-Don, 2013. (In Russian).
21. Gorina VA. Problematic issues of biology of lactic acid bacteria [monograph]. Simferopol: Tavria Plus, 2000. (In Russian).
22. Tyurina AV. The main aspects of the development of an experimental preventive drug based on cholera bacteriophages. Diss. ... Cand. Biol. Sciences. M., 2025. (In Russian).

Информация о соавторах:

Глазкова Екатерина Алексеевна, младший научный сотрудник отдела экспериментальных фармацевтических форм ФКУН «Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0002-5959-3491

Гумаюнова Кристина Сергеевна, научный сотрудник лаборатории диагностических препаратов ФКУН «Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0002-1341-3037

Комиссаров Александр Владимирович, доктор биологических наук, профессор, заведующий отделом экспериментальных фармацевтических форм ФКУН «Российский противочумный институт «Микроб»
ORCID: 0000-0002-1609-0384

Овчинникова Мария Владимировна, кандидат биологических наук, заведующая отделом диагностических препаратов ФКУН «Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0002-1736-7453

Гаевская Наталья Евгеньевна, кандидат медицинских наук, директор ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0002-0762-3628

Тюрина Анна Владимировна, научный сотрудник лаборатории бактериофагов ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0002-9359-3997

Сизова Юлия Владимировна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории бактериофагов ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0002-7831-7767

Иванова Инна Александровна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории иммунологии ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0001-7068-4071

Information about co-authors:

Ekaterina A. Glazkova, Junior Research officer, Department of Experimental Pharmaceutical Forms, Russian Anti-Plague Institute "Microbe" of the Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0002-5959-3491

Kristina S. Gumayunova, Researcher, Laboratory of diagnostic drugs, Russian Anti-Plague Institute "Microbe" of the Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0002-1341-3037

Alexander V. Komissarov, PhD, DSc (Biological Sciences), Professor, Head of the Department of Experimental Pharmaceutical Forms, Russian Anti-Plague Institute "Microbe" of the Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0002-1609-0384

Maria V. Ovchinnikova, PhD in Biological Sciences, Head of the department, Russian Anti-Plague Institute "Microbe" of the Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0002-1736-7453

Natal'ja E. Gaevskaya, PhD, MD, Director, Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0002-0762-3628

Anna V. Tyurina, research officer, Laboratory of bacteriophages, Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0002-9359-3997

Yulia V. Sizova, PhD in Biological Sciences, leading Researcher, Laboratory of bacteriophages Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0002-7831-7767

Inna A. Ivanova, PhD in Biological Sciences, leading researcher officer, Laboratory of Immunology, Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0001-7068-4071