

ных заболеваний телят // Вестник сельскохозяйственной науки. – 1989. - №9. – С.105-110.

7. Мищенко В.А. и др. Некоторые аспекты патогенеза диареи новорожденных телят // Ветеринария. - 1999. - №9. – С. 20-23.

8. Золотухин С.Н., Пульчеровская Л.П., Кирьянова Н.А., Васильев Д.А. Выделение фагов бактерий рода *Citrobacter* из объектов внешней среды и патологического материала // «Вестник УГСХА», Сборник научных трудов, Ульяновск, - 2002. - С. 29-32.

9. Золотухин С.Н. Бактериофаги *M.morganii* и их применение при желудочно-кишечных заболеваниях поросят // Автореферат дис. канд. вет. наук. - Ульяновск, 1994.

10. Изучение основных биологических свойств бактериофагов *Bordetella bronchiseptica*, выделенных методом индукции / Д.А. Васильев [и др.] // Вестник УГСХА. – 2011. - №1(13) – С. 59-63

BIOLOGICAL PROPERTIES OF BACTERIOPHAGES *CITROBACTER*

Pulcherovskaya L.P., Efreytorova E.O., Zolotukhin S.N., Vasilev D.A.

Key words: *bacteriophages, negative colony, lytic activity, specificity of bacteriophages, bacteria of the genus Citrobacter.*

Studied phages of bacteria of the genus Citrobacter had colonies of four types, characterized by a diverse range of lytic activity and specific in regard to bacteria of the genus Citrobacter and non-active to the representatives of bacteria of other genus and families.

УДК 619:579

ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ ВЫДЕЛЕННЫХ БАКТЕРИОФАГОВ БАКТЕРИЙ РОДА *CITROBACTER*

*Пульчеровская Л.П., кандидат биологических наук, доцент,
pulcherovskaya.lidia@yandex.ru*

Ефрейторова Е.О., аспирант

Золотухин С. Н., доктор биологических наук, профессор,

Васильев Д. А., доктор биологических наук, профессор

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

432017, г. Ульяновск, бульвар Новый Венец, 1.

Ключевые слова: *Бактериофаги, электронная микроскопия, вирион, бактерии рода Citrobacter, морфология фагов.*

В соответствии с морфологическими параметрами изучаемые нами фаги бактерий рода Citrobacter №1, №2 и №3 согласно Международной классификации и номенклатуре вирусов относятся к семейству Myoviridae, а по классификации А.С. Тихоненко - к V морфологической группе: “Фаги с отростком сложного строения, чехол которого способен к сокращению”

Бактериофаги представляют собой наиболее многочисленную, широко распростра-

ненную в биосфере и, предположительно, наиболее эволюционно древнюю группу вирусов. В природных условиях фаги встречаются в тех местах, где есть чувствительные к ним бактерии. [6]

Предположение, что бактериофаги имеют корпускулярную природу, было высказано еще д'Эреллем на основании их способности образовывать на бактериальных газонах собственные негативные колонии ограниченных размеров. Позже это предположение было подтверждено при исследовании очищенных фагофильтратов в темном поле микроскопа, при их ультрацентрифугировании и ультрафильтрации через специально градуированные коллоидные фильтры. Но только изобретение электронного микроскопа позволило увидеть фаги. Так, уже в начале 40-х годов Х. Руска (H. Ruska) показал, что в фаголизатах дизентерийных бактерий, кишечной палочки, протей, стафилококков и стрептококков содержатся особые тельца, состоящие из головки и более или менее длинного хвоста. [4,7]

Дальнейшее усовершенствование электронного микроскопа с постоянным повышением его разрешающей способности дало возможность многим исследователям более точно уяснить общую морфологию различных фагов, изучить отдельные детали их структуры и процессы размножения в бактериальной клетке. Особенно ценным в этом отношении явилось применение методов так называемого негативного контрастирования препаратов с помощью растворов фосфорно-вольфрамовой кислоты, урацил-ацетата и некоторых других веществ, а также получение ультратонких срезов зараженных фагами бактериальных клеток. Очень полезным для изучения фагов в процессе их взаимодействия с бактериями явилось применение сканирующего электронного микроскопа, дающего особо рельефные изображения.

С помощью электронного микроскопа установлено, что фаг состоит из головки и отростка (хвоста). Размеры фагов колеблются от 20 до 200 им. Отросток состоит из внутреннего стержня и наружного сокращающегося футляра. На дистальном конце отростка расположена базальная пластинка с зубцами, от которых отходят длинные нити. Базальная пластинка и нити осуществляют процесс адсорбции частицы фага на бактериальной клетке. [4]

Материалом для электронно-микроскопических исследований использовали лизаты бульонных культур *C. freundii* № 9, *C. freundii* № 16 и *C. amalonaticus* № 11 с бактериофагами №1, №2, №3 в титре от 3×10^9 до 4×10^9 фаговых корпускул в 1 мл (по Грациа), выделенные нами бактериофаги бактерий рода *Citrobacter* из сточных вод Ульяновской и Самарской областей.

Подготовку препаратов для электронной микроскопии проводили осаждением вирусных частиц в режиме низкоскоростного центрифугирования. В процессе центрифугирования вирусодержащей суспензии происходит образование новой фазы - осадка из белковых макромолекул. Захват осадком вирусных частиц, которые сами по себе в данных условиях осадков не образуют, характеризуется как метод концентрирования за счет соосаждения.

С этой целью суспензии фага в объеме 1 мл предварительно осветляли на центрифуге при 500 g в течение 10 мин. Затем надосадочную водную фазу повторно центрифугировали при 2000 g в течение 30 мин. Из пробирки полностью сливали жидкость, а образовавшийся осадок ресуспендировали в 30-50 мкл буферного раствора pH 7,3-7,5. Вирусные частицы, соосаждаясь с белковыми макромолекулами, в данном режиме центрифугирования образуют концентрированную суспензию в 10-20 раз. Данная методика отработана для работы с вирусами животных и успешно применяется при подготовке препаратов для электронной микроскопии (Пономарев, Андреева, Артамонова, 2002).

Вирусные препараты наносили на поддерживающие угольно-парлодионовые пленки-подложки для электронно-микроскопических исследований. Контрастирование вирионов проводили с использованием 4% раствора фосфорно-вольфрамовой кислоты pH 6,8. Исследова-

ния проводили на электронном микроскопе JEM-100B (Япония). Размеры вирионов определяли на измерительном микроскопе МИР-12т непосредственно с негативных фотопластинок. В результате проведенных исследований было установлено, что вирионы фага имеют структуры, состоящие из головки в форме растянутого многогранника с отростком. У основной массы вирионов чехол находится в растянутом состоянии, что характерно для интактных частиц. Чехол отростка на всем протяжении прямой и имеет цилиндрическую форму.

Единичные вирионы имеют отросток в сокращенном состоянии, то есть чехол отростка укорачивается и расширяется. При этом просматривается внутренний стержень отростка. Вирусные частицы фагов №2 и №3 имеют следующие размеры: диаметр головки: 100 нм и длина отростка – 135 нм. Отношение высоты головки к её диаметру у фагов равно 1,28, что позволяет заключить о растянутости многогранника частиц данных фагов. Корпускулы фага №1 имеют более симметричную головку, её длина равна 74 нм, диаметр 68 нм. Отношение высоты головки к её диаметру равно 1,08. Длина отростка 115 нм и длина сокращённого чехла отростка 60 нм.

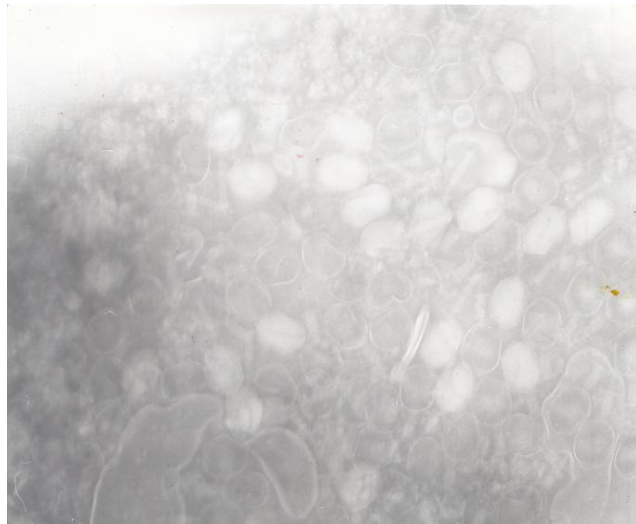
Вирусные частицы выделенных нами бактериофагов имеют форму аналогичную фагам, изученным Т.А. Хакшевой с соавт. (1985).

Таким образом, в соответствии с морфологическими параметрами изучаемые нами фаги №1, №2 и №3 согласно Международной классификации и номенклатуре вирусов относятся к семейству *Myoviridae* [8], а по классификации А.С. Тихоненко - к V морфологической группе: “Фаги с отростком сложного строения, чехол которого способен к сокращению” [5]. К названной группе относятся ДНК-содержащие фаги булавовидной формы, но имеющие мощный отросток сложного строения. Он состоит из наружного сокращающегося чехла, внутреннего жесткого полого стержня и хорошо выраженной базальной пластинки. Последняя в свою очередь имеет ряд элементов типа выростов с шипами или зубьями на концах и почти у всех фагов снабжена длинными нитями. При сокращении чехол отростка расширяется и укорачивается, обнажая дистальный конец внутреннего стержня, который может проникать через клеточную стенку бактерий. У некоторых фагов пятой группы, кроме перечисленных элементов, обнаружены дополнительные структуры в виде воротничка или муфты в месте прикрепления отростка к головке и т. п. [1,2,3,6]

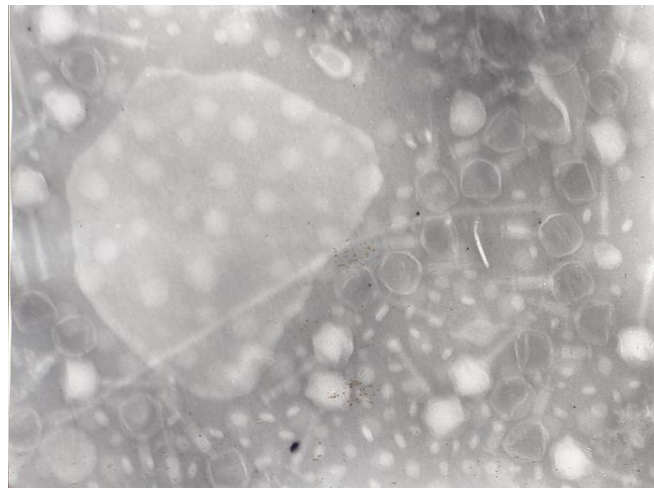
Морфология исследуемых фагов представлена на рисунках 1, 2 и 3.



Рис. 1 - Электронная микрофотография. Морфология бактериофага С-52 УГСХА x 167 000



**Рис. 2 - Электронная микрофотография. Морфология бактериофага С-61 УГСХА
x 167 000**



**Рис. 3 - Электронная микрофотография. Морфология бактериофага С-66 УГСХА
x 167 000**

Библиографический список

1. Ляшенко Е. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов *Klebsiella*, конструирование на их основе биопрепарата // Автореферат дис. канд. вет. наук. - Саратов, 2006.
2. Молофеева Н.И. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов *Escherichia coli* O157 и их применение в диагностике // Автореферат дис. канд. биол. наук. - Саратов, 2004.
3. Пульчеровская Л.П.. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов *Citrobacter* и их применение в диагностике // Автореферат дис. канд. вет. наук. - Саратов, 2004.
4. Ревенко И.П. Бактериофаги и их использование в ветеринарной практике // – Киев: Урожай, - 1978. – С. 88.

5. Тихоненко А.С. Ультраструктура вирусов бактерий // М.: Наука, 1968. – С. 89 .
6. Феоктистова Н.А. Выделение и изучение биологических свойств фагов бактерий рода *Proteus*, конструирование на их основе биопрепарата и разработка параметров его практического применения // Автореферат дис. канд. вет. наук. - Саратов, 2006.
7. Хакешева Т.А. Фаги цитробактера // Автореферат канд. дис. – М. – 1985.
8. Murphy F.A. Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses // Spingerverlag Wien New York. – 1995. – P. 586.

ELECTRON MICROSCOPY OF ALLOCATED BACTERIOPHAGES OF BACTERIA OF THE GENUS *CITROBACTER*

Pulcherovskaya L.P., Efreytorova E.O., Zolotukhin S.N., Vasilev D.A.

Key words: *bacteriophages, electronic microscopy, virion, bacteria of the genus Citrobacter, morphology of phages.*

In accordance with the morphological parameters the studied phages of bacteria of the genus Citrobacter №1, №2 and №3 according to the International classification and nomenclature of viruses belong to the family Myoviride , and on the classification of A.S. Tikhonenko - to V morphological group: "Phages with the outgrowth of complex structure, whose pouch is able to contract "

УДК 578: 615.03

ВЫДЕЛЕНИЕ, БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И ЛЕЧЕБНАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ БАКТЕРИОФАГА ЕСД4 ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ *ESCHERICHIA COLI* O104:H4-ИНФЕКЦИИ.

*Светоч Э.А. **, доктор ветеринарных наук, профессор,
тел. (4967)-36-00-79; svetoch@obolensk.org

*Веровкин В.В. **, кандидат медицинских наук,
*Воложанцев Н.В. **, кандидат биологических наук,
тел. (4967)-36-01-47; nikvol@obolensk.org

*Борзилов А.И. **, кандидат медицинских наук,
тел. (4967) 36 01 47, borzilov@obolensk.org

*Борзенков В.Н. **, кандидат медицинских наук,
*Коробова О.В. **, кандидат медицинских наук,
*Комбарова Т.И. **,

*Красильникова В.М. **, кандидат биологических наук, *Мякинина В.П. **,
*Баннов В.А. **,

*Денисенко Е.А. **,

*Теймуразов М.Г. **, кандидат биологических наук,

*Коровкин С.А. ***, доктор медицинских наук, профессор,
тел.(495) 917-41-49, korovkin09@mail.ru