

bacteria. W. Va. Agr. Exp. Sta. Bull., 1939, 287.

3. Золотухин С.Н., Кузнецов А.Ю., Васильев Д.А., Каврук Л.С. Методические рекомендации по индикации и идентификации энтеробактерий вида *Morganella morganii* в патологическом материале, кормах, пищевом сырье и объектах внешней среды с применением специфических бактериофагов // Утверждены Отделением ветеринарной медицины РАСХН 4 октября 2004 года. Москва.- 2005. - С. 16.

4. Лабинская, А.С. Микробиология с техникой микробиологических исследований / А.С. Лабинская. – М.: Медицина – 1978. – С.394.

5. Общая и санитарная микробиология с техникой микробиологических исследований / под ред. А.С. Лабинской, Л.П. Блинковой, А.С. Ещиной // Учебное пособие – М.: Медицина, 2004. – С.576.

## STUDY OF CULTURAL PROPERTIES BACTERIA ERWINIA HERBICOLA

*Mastilenko A.V., Chernyh A.A., Molofeeva N.I., Vasilev D.A.*

**Key words:** *bacteria, morphology, cultural properties, phytopathogenic bacteria.*

*This article describes morphological, cultural and biochemical properties of bacteria of the genus Erwinia.*

УДК 619:578

## СООТНОШЕНИЕ БАКТЕРИОФАГОВ В БИОПРЕПАРАТЕ ПОЛИФАГА

*А.Г. Шестаков, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник ФГБОУ ВПО «УлГУ», E-mail: [andrewsh@newmail.ru](mailto:andrewsh@newmail.ru)*

*Н.И. Молофеева, кандидат биологических наук, доцент ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина»,.*

*Тел. 8-927-819-21-40. E-mail: [pulcherovskaya.lidia.@yandex.ru](mailto:pulcherovskaya.lidia.@yandex.ru)*

*Л.П. Пульчеровская, кандидат биологических наук, доцент ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина»,.*

*Тел. 8-927-819-21-40. E-mail: [pulcherovskaya.lidia.@yandex.ru](mailto:pulcherovskaya.lidia.@yandex.ru)*

*С.Н. Золотухин, доктор биологических наук, профессор ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина», Тел. 8-927-270-34-80.*

*E-mail: [fvm.zol@yandex.ru](mailto:fvm.zol@yandex.ru)*

*Д.А. Васильев, доктор биологических наук, профессор ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина», Тел. 8-927-270-34-80..*

*E-mail: [dav\\_ul@yandex.ru](mailto:dav_ul@yandex.ru)*

*Е.Н. Семанина, кандидат биологических наук., Тел. 8-909-360-61-64*

*Е.Г. Семанин, м.н.с. ФГБОУ ВПО «УлГУ», Тел. 8-927-830-00-90.*

**Ключевые слова:** биопрепарат, бактериофаги, фаголизат, бактерии, титр бактериофага, спектр действия бактериофагов.

В статье описано соотношение бактериофагов в биопреparate полифага. Подобраны оптимальные количественные и качественные показатели соотношения монофаговых фаголизатов в биопреparate. Определено количество бактериофагов в монофаговых фаголизатах после изготовления биопреparate полифага. Исследован спектр действия бактериофагов в биопреparate полифага по отношению к чувствительным бактериям.

**Введение.** Сферы применения биопрепаратов полифагов достаточно широки, для того чтобы сконцентрировать на них внимание современных исследователей. Бактериофаги используются в диагностике, лечении и профилактике бактериальных инфекций. Приведем некоторые примеры применения бактериофагов.

Фагодиагностика основана на специфической способности фагов, взаимодействовать с определёнными видами (идентификация) или типами (фаготипирование) бактерий, в результате чего происходит их лизис. Феномен лизиса является основой для использования фага в диагностических целях, Метод фагодиагностики широко используется в лабораторной практике для идентификации различных видов микроорганизмов. Реакция нарастания титра фага остается положительной значительно дольше, вплоть до полной ликвидации местных проявлений болезни. По данной реакции предложены методические рекомендации для индикации бактерий: *E. coli* 0157 (Золотухин, Молофеева, Васильев, Каврук; 2005), *Citrobactera* (Золотухин, Пульчеровская, Васильев, Каврук; 2005), *Morganella* (Золотухин, Кузнецов, Васильев, Каврук; 2005).

**Материалы и методы.** Штаммы бактерий родов *Echerichia*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, мясо-пептонный бульон, мясо-пептонный агар, лабораторное оборудование, методические рекомендации по индикации вышеуказанных бактерий.

**Результаты исследований и их обсуждение.** Для изготовления лечебно-профилактического препарата против колибактериоза телят из изученных штаммов фагов были отобраны изоляты, способные за время пятиминутного контакта фага с клетками эшерихий адсорбироваться в количестве 86-91% фаговых частиц, и имели скорость адсорбции  $5,9 \times 10^{-8} - 9,4 \times 10^{-9}$  см/мин.

Диапазон литического действия по отношению к возбудителям колибактериоза телят различных серологических O-групп составил от 24 до 52%. Латентный период внутриклеточного развития у них был равен 21-26 минутам, а средняя урожайность 126-262 фаговых частицы на одну инфицированную бактерию (Ленев, Малахов, 1988). При лечении детей больных иерсиниозом использовали поливалентный иерсиниозный бактериофаг (Галкина, Феоклистова, 2000).

Биопрепараты бактериофагов представляют собой фильтраты полностью лизированной тем или иным фагом соответствующей бульонной культуры бактерий. Полифаги – биопрепараты, которые содержат в своем составе от двух и более бактериофагов. Монофаговые фаголизаты изготавливают из бактериофагов как выделенных из очага бактериальных инфекций и внешней среды, так и из самих бактериальных клеток, под действием различных индуцирующих факторов (Васильев Д.А., Семанина Е.Н., Золотухин С.Н., Хайруллин И.Н., Васильева Ю.Б., Шестаков А.Г.; 2011). Технология изготовления

монофаговых фаголизатов достаточно хорошо изучена и зависит лишь от биологических свойств самих бактериофагов. Иначе обстоит дело с биопрепаратами, в состав которых входит целый набор бактериофагов.

Таким образом, при возрастающем интересе к бактериофагам, возникает целый ряд вопросов об оптимальном содержании монофаговых фаголизатов в составе биопрепарата полифага.

Основные параметры изготовления монофаговых фаголизатов – соотношение бактериофага и чувствительной к нему культуры (среднее значение для всех бактериофагов составляет 1:2), pH среды культивирования (среднее значение для всех бактериофагов составляет 7,0), время культивирования системы бактериофаг и чувствительная бактерия (среднее значение для всех бактериофагов составляет 8 часов).

Изначально готовили монофаговые фаголизаты с титром не меньше  $10^9$  вирионов в 1 мл. Для этого 4500 мл МПБ готовили согласно прописи и автоклавировали при 1,1 атм. Питательный бульон разливали на 42 колбы по 100 мл в каждую. Количество питательного бульона рассчитывали на три варианта смеси биопрепарата полифага. Первый вариант содержал 21 бактериофаг, второй вариант содержал только бактериофаги кишечной группы, в количестве 14 штаммов и третий вариант содержал бактериофаги неферментирующих бактерий в количестве 7 штаммов. В связи с этим в каждые две колбы вносили по одному штамму бактериофага в количестве 4,5 мл с содержанием вирионов  $10^9$  в 1 мл и чувствительные штаммы бактерий в количестве 9 мл с содержанием  $10^9$  микробных клеток в 1мл. Культивирование проводили при оптимальной для различных штаммов бактерий температуре в течение 8 часов. Параллельно ставили три колбы, с бактериями различной температуры культивирования, для контроля лизиса. Спустя указанное время отмечали просветление бульона в колбах с бактериофагами и помутнение в контрольных колбах. Колбы с фаголизатом обрабатывали хлороформом в соотношении 1:10 в течение 30 минут при комнатной температуре. Колбы оставляли при комнатной температуре для осаждения бактериальных клеток на 2 часа.

Далее чувствительные бактерии для каждого штамма бактериофага выращивали на плотной среде в виде сплошного газона. Затем делали смывы с чашек Петри стерильным физиологическим раствором, содержащим 8,5% NaCl, в стерильные колбы объемом 500 мл. После смыва, объем физраствора с взвесью бактерий доводили до 90 мл, с содержанием  $10^9$  микробных клеток в 1 мл. Вносили фаголизаты (прозрачный верхний слой бульона) из колб, обработанных хлороформом, специфично для каждого вида бактерий в количестве 45 мл. Дополнительно в суспензию бактериофагов и бактериальных клеток в физиологическом растворе объемом 135мл вносили  $\text{CaCl}_2$  и  $\text{MgCl}_2$  в количествах 0,3г/л. Колбы культивировали при оптимальной температуре для каждого вида бактерий в течение 8 часов. Далее, полученные фаголизаты обрабатывали хлороформом в соотношении 1:10, с последующим отстаиванием осадка в течение 2 часов. Надосадочную жидкость в объеме 100 мл переносили в стерильные колбы и производили подсчет фаговых частиц в 1 мл полученных монофаговых фаголизатов по методу Грациа. Результаты представлены в таблице №1.

**Таблица 1. Количество фаговых частиц в 1 мл полученных монофаговых фаголизатов**

Название фага	Литическая активность по Грациа Количество фаговых частиц в 1мл
<i>Echerichia coli</i> №1	7 x 10 <sup>8</sup>
<i>Echerichia coli</i> №4	4 x 10 <sup>8</sup>
<i>Echerichia coli</i> №9	5 x 10 <sup>9</sup>
<i>Echerichia coli</i> №18	7 x 10 <sup>9</sup>
<i>Proteus vulgaris</i> №35	6 x 10 <sup>8</sup>
<i>Proteus vulgaris</i> №44	7 x 10 <sup>9</sup>
<i>Proteus mirabilis</i> №52	8 x 10 <sup>8</sup>
<i>Klebsiella pneumoniae</i> №26	6 x 10 <sup>9</sup>
<i>Proteus vulgaris</i> №13	7 x 10 <sup>9</sup>
<i>Proteus vulgaris</i> №21	9 x 10 <sup>8</sup>
<i>Proteus mirabilis</i> №45	5 x 10 <sup>8</sup>
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> №2	3 x 10 <sup>8</sup>
<i>Yersinia enterocolitica</i> №54	7 x 10 <sup>8</sup>
<i>Yersinia enterocolitica</i> №11	2 x 10 <sup>9</sup>
<i>Pseudomonas fluorescens</i> №7	3 x 10 <sup>8</sup>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> №8	3 x 10 <sup>9</sup>
<i>Pseudomonas fluorescens</i> №65	4 x 10 <sup>9</sup>
<i>Pseudomonas fluorescens</i> №67	5 x 10 <sup>8</sup>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> №37	8 x 10 <sup>9</sup>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> №115	6 x 10 <sup>9</sup>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> №128	2 x 10 <sup>9</sup>

По данным таблицы №1, отмечено, что содержание активных фаговых частиц в 1 мл монофаговых фаголизатах различно и отличается на порядок.

При конструировании биопрепаратов полифагов полученные монофаговые фаголизаты смешивали таким образом, чтобы получить одинаковое количество активных фаговых частиц каждого штамма бактериофага в 1 мл биопрепарата полифага. Для этого, монофаговый фаголизат с содержанием наименьшего количества фаговых частиц в 1 мл брали за единицу, а фаголизат с большим содержанием активных фаговых частиц в 1 мл вносили в меньшем количестве. При конструировании биопрепарата полифага с содержанием всех монофаговых фаголизатов соблюдали следующие пропорции: бактериофаги с титром 10<sup>8</sup> вносили по 100мл, а бактериофаги с титром 10<sup>9</sup> вносили по 10мл. В аналогичных пропорциях смешивали другие варианты биопрепаратов полифагов. Биопрепарат полифага из 21 бактериофага содержал 1110мл. Биопрепарат из 14 бактериофагов бактерий семейства *Enterobacteriaceae* содержал 860мл. Биопрепарат из 7 бактериофагов бактерий рода *Pseudomonas* содержал 250мл.

Определение количества бактериофагов в монофаговых фаголизатах после изготовления биопрепарата полифага. В биопрепарате полифага состоящего из смеси

монофаговых фаголизатов в указанных выше пропорциях было определено количество жизнеспособных бактериофагов каждого вида. Для этого брали 1 мл биопрепарата полифага состоящего из 21 бактериофага и специфично для каждого штамма определяли титр, то есть содержание активных фаговых частиц в 1 мл методом Грациа. Установлено, что содержание каждого штамма бактериофага в 1 мл биопрепарата полифага составляет порядка  $10^5$  активных фаговых частиц. Подобным образом, определены титры бактериофагов в биопрепаратах полифага состоящих из 14 и 7 монофаговых фаголизатов. Установлено, что титры бактериофагов в биопрепарате, состоящем из 14 фаголизатов, составляют порядка  $10^5$  активных вирусных частиц. Титры бактериофагов состоящих из 7 фаголизатов составляют порядка  $10^6$  активных вирусных частиц. В результате полученных данных можно сделать вывод, что изготавливать биопрепараты полифага с количеством бактериофагов от 21 и выше, указанным способом не целесообразно.

**Заключение.** С целью определения спектра действия бактериофагов в биопрепарате полифага, состоящем из 21 штамма, использовали метод Отто. Для этого, каплю биопрепарата полифага наносили на сплошной газон бактериальной культуры, отдельно каждого из имеющихся штаммов бактерий. Просветление по ходу стекание капли на фоне матового газона сплошного роста бактериальной культуры указывало на лизис бактерий. Установлено, что биопрепарат полифага лизировал все штаммы бактериальных культур.

#### Библиографический список

1. Галкина Л.А., Фекистова Л.В. Результаты применения поливалентного иерсиниозного бактериофага в лечении иерсиниоза у детей // Материалы международной конференции «Инфекции, обусловленные иерсиниями (иерсиниоз, псевдотуберкулез), и другие актуальные инфекции». – Санкт-Петербург 2000. – С.11.
2. Золотухин С.Н., Кузнецов А.Ю., Васильев Д.А., Каврук Л.С. Методические рекомендации по индикации и идентификации энтеробактерий вида *Morganella morganii* в патологическом материале, кормах, пищевом сырье и объектах внешней среды с применением специфических бактериофагов // Утверждены Отделением ветеринарной медицины РАСХН 4 октября 2004 года. Москва.- 2005. - С. 16.
3. Золотухин С.Н., Молофеева Н.И., Васильев Д.А., Каврук Л.С. Методические рекомендации по индикации и идентификации энтерогеморрагической кишечной палочки *E. coli O157:H7* и *O157:H-* в патологическом материале, кормах, пищевом сырье и объектах внешней среды с применением специфических бактериофагов // Утверждены Отделением ветеринарной медицины РАСХН 4 октября 2004 года. Москва. - 2005. - С. 16.
4. Золотухин С.Н., Пульчеровская Л.П., Васильев Д.А. Бактерии рода *Citrobacter* и их бактериофаги // Вопросы микробиологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы. Сборник научных трудов. Ульяновск. - 2000. - С.53-58.
5. Ленев С.В., Малахов Ю.А. Бактериофаги энтеропатогенных эшерихий, их выделение и биологические свойства // Эпизоотология, эпидемиология, средства диагностики, терапии и специфической профилактики инфекционных болезней, общих для человека и животных. / Материалы Всесоюзной конференции. - Львов. – 1988. - С.375.
6. Васильев Д.А., Семанина Е.Н., Золотухин С.Н., Хайруллин И.Н., Васильева Ю.Б., Шестаков А.Г. Изучение основных биологических свойств бактериофагов *Bordetella bronchiseptica*, выделенных методом индукции // Вестник Ульяновской государственной

## THE RATIO OF BACTERIOPHAGES IN THE BIOLOGICS POLYPHAGES

*Shestakov A.G., Molofeeva N.I., Pulcherovskaya L.P.,  
Zolotukhin S. N., Vasilyev D.A., Semanina E.H., Semanin E.G.*

**Key words:** *biological product, bacteriophages, phageslisates, bacteria, titer bacterio.*

*In article the ratio of bacteriophages in a polyphage biological product is described. Optimum quantitative and quality indicators of a ratio monofagovy phageslisates in a biological product are picked up. The quantity of bacteriophages in monofagovy phageslisates after manufacturing of a biological product of a polyphage is defined. The range of action of bacteriophages in a polyphage biological product in relation to sensitive bacteria is investigated.*

УДК 619:616-07

## ТРАВМАТИЧЕСКИЙ РЕТИКУЛИТ У КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

*Н.К.Шишков, кандидат ветеринарных наук, доцент ФГБОУ ВПО “Ульяновская ГСХА им.  
П.А.Столыпина” тел. 8(8422)55-95-31, Shishkov-1957@mail.ru*  
*А.Н.Казимир, кандидат ветеринарных наук, доцент ФГБОУ ВПО “Ульяновская ГСХА им.  
П.А.Столыпина” тел. 8(8422)55-95-31, Kazimir61@inbox.ru*  
*А.З.Мухитов, кандидат ветеринарных наук, доцент ФГБОУ ВПО “Ульяновская ГСХА им.  
П.А.Столыпина” тел. 8(8422)55-95-31, Muhitov.asgat@yandex.ru*

**Ключевые слова:** *сетка, ретикулит, металлоиндикатор, магнитный зонд, зондирование, металлоносительство.*

*Работа посвящена изучению металлоносительства у крупного рогатого скота в условиях хозяйства. Проведены диагностические, лечебные и профилактические мероприятия при травматическом ретикулите у дойных коров.*

**Введение.** По литературным данным известно, что большинство молочных коров (55-87%) являются ретикулометаллоносителями. Острые инородные металлические предметы вместе с кормом попадают в сетку, где вызывают её воспаление – ретикулит. Под действием сокращений преджелудков эти предметы травмируют органы брюшной (брюшину, печень, селезенку, диафрагму, кишечник) или грудной (легкие, сердце) полостей [1,2,3,4].

Основной причиной болезни является заглатывание с кормом острых металлических предметов. Заглатыванию посторонних предметов способствует