

направленность, что и кальция. Содержание фосфора в костной ткани свиней за 270 суток постнатального развития увеличилось во всех группах подопытных животных с 5,06 – 6,31 г/100 г до 6,50 – 6,90 г/100 г натуральной ткани. В то же время можно отметить тенденцию более высокого содержания фосфора в ткани костей скелета поросят II опытной группы по сравнению с I группой. Следовательно, введение в рацион свиней полисолей способствовало более активному отложению фосфора в кости скелета свиней.

Концентрация фосфора в ткани трубчатых костей свиней III опытной группы была на 24,7%

($P < 0,001$), 18,89% ($P < 0,1$). 12,83% ($P > 0,05$) и 6,15% ($P < 0,001$) выше, чем в I группе в 1, 60, 105 и 270 суточном возрасте соответственно. В то же время прослеживалась тенденция более активного отложения фосфора в костную ткань свиней III группы по сравнению со II группой.

Таким образом, включение в рацион растущего молодняка свиней кремнеземистого мергеля способствует увеличению концентрации коллагеновых белков и повышению зрелости костной ткани, оптимизирует в ней содержание кальция и фосфора.

Литература

1. Буров А.И., Буров Г.А. Применение клиноптилолита Сокирницкого месторождения в качестве подкормки поросят-отъемышей. Тр. Симп. По применению природных цеолитов в животноводстве и птицеводстве. – Тбилиси: Мецниерсба, 1984, – с. 60 – 61.
2. Улитко В.Е., Жилочкина Т.И., Козлов В.В. Влияние добавки в рацион цеолитов Сиуч-Юшанского месторождения на биохимические показатели крови кур родительского стада. /Вестник УГСХА, 2001, №1, с. 113 – 115.
3. Кальницкий Б.Д. Методы биохимического анализа. – Боровск, 1997. – 356с.
4. Панин Л.Е., Третьякова Т.А., Розуменко А.А. Влияние хонгурина как кормовой добавки на показатели обмена веществ кур. /Сб. научн. Трудов: Физико-химические и медико-биологические свойства природных цеолитов. – Новосибирск, 1990, – с.67 – 71.
5. Саметова С.С., Резвухин А.И. Микроэлементный состав мяса бройлеров, выращенных на кормах с добавлением природных цеолитов. /Теоретические и прикладные проблемы внедрения природных цеолитов в народное хозяйство РСФСР. – Кемерово, 1988, – с. 108 – 112
6. Якимов А.В. и др. Агротерминальные ресурсы Татарстана и перспективы их использования. – Казань: Изд – во «ФЕН», 2002, – с. 272.

УДК 619:578

ПОИСК БАКТЕРИОФАГОВ БАКТЕРИЙ РОДА *PROTEUS* И СЕЛЕКЦИЯ КЛОНОВ ФАГОВ

Н.А.Феоктистова, С.Н.Золотухин, Д.А.Васильев, А.В.Тарасова, Ульяновская ГСХА

В настоящее время лабораторная диагностика заболеваний, вызываемых протейями, основана на выделении чистой культуры микроорганизмов и их идентификации по общепринятым тестам. Этот метод трудоемок, недостаточно чувствителен и требует затрат времени, питательных сред и реактивов. Поэтому перед исследователями стоит задача изыскания более простого и доступного для любых лабораторий метода индикации и идентификации названных микроорганизмов.

В ветеринарной практике для ускоренного обнаружения некоторых микроорганизмов в патологическом материале и объектах внешней среды предложены индикаторные бактериофаги с использованием реакции нарастания титра фага РНФ (Д.М. Гольдфарб, 1961; В.Я. Ганюшкин, 1988). Метод индикации и идентификации микроорганизмов с помощью бактериофагов специфичен, не требует больших затрат времени, материалов и общедоступен.

Цель наших исследований - выделение фагов бактерий рода *Proteus* по методикам, предложенным

С. Лурия, Д. Дарнеллом (1970), И.П. Ревенко (1978), Д.М. Гольфарбом (1961), Л.И. Адельсоном (1962).

Первым этапом нашей работы была попытка выделить бактериофаги бактерий рода *Proteus* из имеющихся у нас 26 штаммов бактерий *Proteus*. Мы рассчитывали обнаружить лизогенные культуры, так как бактериофаги, выделенные из таких культур, обладают более выраженной специфичностью (В.В. Бабков, Э.К. Ленц, 1973; Т.Ч. Жугова, 1985).

Из имеющихся у нас 26 культур бактерий рода *Proteus* мы пробовали выделить бактериофаги различными методами. Все штаммы, изученные нами, исследовались как индикаторные и как "лизогенные".

В первой серии опытов использовали методику, предложенную С. Лурия, Д. Дарнеллом (1970), для выделения бактериофагов энтеробактерий из бактерий без воздействия на них индуцирующего фактора.

Сущность методики: в 1,0 литровую колбу, содержащую 0,5 литра мясоептонного бульона, добавляли по 1,0 мл 18-ти часовых культур всех име-

ющихся у нас штаммов *Proteus*. Колбу поставили в термостат при 37°C на 24 часа. Затем смесь бактерий центрифугировали при 2000 об/мин в течение 30 минут, затем прогревали на водяной бане при 58-60°C в течение 30 минут. Надосадочную жидкость исследовали на наличие фага методом агаровых слоев по Грациа (1936) на имеющихся у нас штаммах *Proteus*.

Метод посева агаровыми слоями по Грациа (1936). Накануне опыта по чашкам разливали 1,5% мясо-пептонный агар. Перед использованием чашки подсушивали в термостате 15-20 минут. Индикаторные выращивались в условиях термостата в течение 18-20 часов при 37°C на мясо-пептонном бульоне. Стерильно подготовленный 0,7% мясо-пептонный агар, разлитый в пробирки по 2,5 мл, расплавляли и остужали до 46-48°C. Исследуемую на бактериофаг смесь в количестве 1,0 мл помещали в 2,5 мл 0,7% мясо-пептонного агара, туда же вносили 0,2 мл индикаторной культуры. Все быстро и тщательно перемешивали вращением пробирки в ладонях и выливали на поверхность 1,5% МПА. Смесь осторожными движениями распределяли по поверхности мясо-пептонного агара, чашки оставляли на горизонтальной поверхности с приоткрытыми крышками на 30 минут до полного застывания агара, затем инкубировали в термостате при 37°C в течение 18-20 часов.

Результаты проведенных исследований свидетельствуют, что в опытах по выделению бактериофагов из культур бактерий рода *Proteus* без воздействия на них индуцирующего фактора не было обнаружено свободного фага.

Во второй серии опытов на культуры бактерий рода *Proteus*, исследуемые как "лизогенные", воздействовали индуцирующим фактором, затем фильтровали через бактериальные свечи Шамберлана L-3 (И.П. Ревенко, 1978). В качестве индуцирующего фактора применяли воздействие на бактерии ультрафиолетовыми лучами, в течение 15, 30 и 45 секунд при помощи прибора "Изольда" с ртутной лампой ДРБ8, 18,0%, мощности которой приходится на область 254 нм.

Полученный фильтрат исследовали на наличие фага на имеющихся культурах *Proteus* методом агаровых слоев по Грациа (1936): накануне опыта по чашкам разливали 1,5% мясо-пептонный агар. Перед использованием чашки подсушивали в термостате 15-20 минут. Индикаторные и исследуемые культуры выращивались 18-20 часов при 37°C на мясо-пептонном бульоне. Стерильно подготовленный 0,7% агар, разлитый в пробирки по 2,5 мл, расплавляли и остужали до 46-48°C. Исследуемый фильтрат в количестве 1,0 мл помещали в 2,5 мл 0,7% агара, туда же вносили 0,2 мл индикаторной культуры. Все быстро и тщательно перемешивали вращением пробирки в ладонях и выливали на поверхность 1,5% МПА. Смесь осторожными движениями распределяли по поверхности агара, чашки оставлялись на горизонтальной поверхности с приоткрытыми крышками на 30 минут до полного застывания агара, затем инкубировали в термостате при 37°C в течение 18-20 часов.

Результаты исследований свидетельствуют, что нам не удалось выделить бактериофаги бактерий рода *Proteus* из имеющихся у нас штаммов бакте-

рий *Proteus*, из чего можно сделать вывод о том, что воздействие индуцирующего фактора на бактерии рода *Proteus* в наших опытах не привело к появлению свободного фага.

Резюмируя полученные данные, можно утверждать, что мы не обнаружили явления перехода профага в свободный фаг у имеющихся штаммов бактерий рода *Proteus* по вышеизложенным методикам.

Дальнейшие исследования были посвящены выделению бактериофагов *Proteus* из объектов внешней среды по методике, описанной Д.М. Гольфарбом (1961) и усовершенствованной Л.И. Адельсоном (1962). Для проведения исследований мы брали сточные воды из общественных туалетов, фекалии животных в свиноводческих хозяйствах, на молочно-товарных фермах и в частных хозяйствах Ульяновской и Самарской областей.

Твердые фекалии (в количестве 10 грамм) предварительно хорошо растирали в ступке с небольшим количеством стерильного мясо-пептонного бульона. Затем исследуемый материал вносили в колбу с 100 мл стерильного мясо-пептонного агара, добавляли по 1,0 мл 18-ти часовых бульонных культур бактерий рода *Proteus* (26 штаммов). Таким образом, каждая проба фекалий испытывалась на наличие фагов ко всем имеющимся культурам *Proteus*. Смесь тщательно перемешивали и ставили в термостат на 62 часа при температуре 37°C. После выдерживания смеси исследуемого материала с мясо-пептонным бульоном в термостате, ее фильтровали через вату и фильтровальную бумагу, чтобы освободиться от крупных частиц, а затем освобождали от бактерий. Для этого смесь центрифугировали в течение 30 минут при 1000 об/мин. Центрифугат разливали на 2 пробирки: одну из которых прогревали на водяной бане в течение 30 минут при температуре 60°C, а другую обрабатывали хлороформом в соотношении 1:10 при постоянном встряхивании в шуттель-аппарате в течение 15 минут. После осаждения хлороформа надосадочную жидкость исследовали на наличие фага методом агаровых слоев по Грациа (1936). Аналогичным методом исследовали прогретую смесь.

Сточные воды фильтровали через бумажный фильтр для освобождения от механических примесей. В колбу, содержащую стерильный МПБ в количестве 10 миллилитров вносили 100 мл фильтрата сточных вод и по 1,0 мл бульонных суточных культур всех имеющихся у нас штаммов бактерий *Proteus* (26 штаммов). Таким образом, каждая проба сточной воды испытывалась на наличие фагов ко всем имеющимся культурам *Proteus*. Колбу помещали в термостат и инкубировали в течение 24 часов при 37°C. После этого содержимое колбы разливали в стерильные пробирки, центрифугировали при 1000 об/мин в течение 30 минут, затем делили смесь на две пробирки: одну прогревали в водяной бане при 58-60°C в течение 30 минут, а другую обрабатывали хлороформом в соотношении 1:10 при постоянном встряхивании в шуттель-аппарате в течение 15 минут. После осаждения хлороформа надосадочную жидкость исследовали на наличие фага методом агаровых слоев по Грациа (1936). Аналогичным методом исследовали прогретую смесь.

Чашки ставили в термостат на 18-20 часов при 37°C. Наличие негативных колоний или зон лизи-

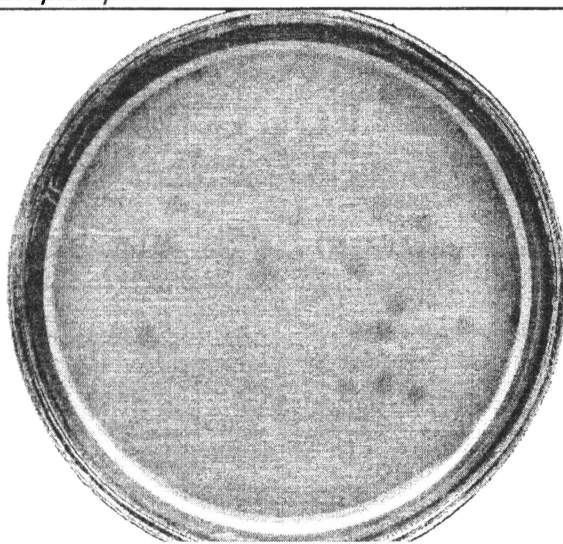


Рис.1. Негативные колонии фага бактерий рода *Proteus*

са на газоне роста индикаторной культуры свидетельствовало о присутствии в исследуемом материале бактериофага (рисунок).

Негативные колонии отвивали в МПБ с индикаторными культурами. Для этого в две пробирки с 4,5 мл мясопептонного бульона (рН 7,4-7,6) добавляли стерильной пипеткой 0,2 мл 18-ти часовой бульонной индикаторной культуры *Proteus*. В одну из пробирок отвивали негативную колонию, а вторая пробирка служила контролем. Посевы помещали в термостат и инкубировали их при 37°C до выраженного помутнения контроля. Затем содержимое опытной пробирки освобождали от микробных клеток прогреванием в водяной бане при 58-60°C в течение 30 минут. Прогретый фильтрат переносили стерильной пипеткой в пробирку и использовали для проведения пассирования фага.

Селекцию бактериофагов и повышение их литической активности проводили с помощью пассирования фага на индикаторной культуре с периодической отливкой типичных негативных колоний по методике, описанной и использованной И.М. Габриловичем (1992), С.Н. Золотухиным (1994).

Для этого исследуемый бактериофаг заседали по методу агаровых слоёв по Грациа (1936), используя разведения 10-6, 10-7, 10-8, 10-9, 10-10, чтобы на питательной среде сформировались отдельные негативные колонии. После 24-часового культивирования в термостате одну негативную колонию, рас-

положенную от других не менее чем в 10 мм, отвивали бактериологической петлёй на мясопептонный бульон, туда же вносили индикаторную культуру *Proteus* в количестве 0,2 мл. Одновременно ставился контроль: мясопептонный бульон, засеянный индикаторной культурой *Proteus* в количестве 0,2 мл. Опытные пробирки культивировали в термостате при 37°C в течение 4 часов. Полученный фаголизат прогревали в водяной бане при 58-60°C в течение 30 минут и исследовали методом агаровых слоёв по Грациа (1936), затем отбирали негативную идентичную исходной, с которой вновь проводили такую же операцию.

Для получения чистой линии фага проводили до пяти пассажей из изолированных негативных колоний. В результате исследований 20 проб сточных вод и 12 проб фекалий нам удалось по указанной схеме выявить 22 изолята протейных бактериофагов.

Мы изучили различные методы выделения бактериофагов и, резюмируя полученные данные, можно утверждать, что мы не обнаружили явления перехода профага в свободный фаг у имеющихся штаммов бактерий рода *Proteus* по методикам, предложенным С. Лурия, Д. Дарнеллом (1970), И.П. Ревенко (1978). Положительные результаты были получены при использовании методики, описанной Д.М. Гольфарбом (1961) и усовершенствованной Л.И. Адельсоном (1962).

Литература

1. Адельсон Л.И. Бактериофаги, активные по отношению к энтеропатогенным кишечным палочкам // Вопросы микробиологической диагностики и бактериофагии.-1962. -С. 184-194.
2. Бабков В.В., Ленц Э.К. О лизогении среди энтеропатогенных кишечных палочек серологических групп O111: B4, O26:B6 и O124; B17//Сб. кафедры микробиологии 1 Лен. Мед. ин-та им.акад. И.П. Павлова «Проблемы бактериофагии и биологии кишечных бактерий». - Л.,1973. - С.163.
3. Габрилович И.М. Биологические свойства бактериофагов *Serratia marcescens* //Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. - 1992. -С.10-12.
4. Гольфарб Д.М. Бактериофагия // М.: Медгиз. 1961. - С. 297.
5. Жугова Т.Ч. Бактериофаги *Yersinia enterocolitica* // Автореф. дис. канд. мед. наук. - Минск, 1985.
6. Золотухин С.Н. Бактериофаги *M.morganii* и их применение при желудочно-кишечных заболеваниях поросят / Автореферат дис. канд. вет. наук. - Ульяновск, 1994.
7. Ревенко И.П. Бактериофаги и их использование в ветеринарной практике // - Киев: Урожай, - 1978. - С. 88.