

В нашей работе мы планируем провести дальнейшее исследование структуры и механизмов функционирования адсорбционного аппарата этих необычных вирусов, что, весьма вероятно, приблизит нас к пониманию закономерностей взаимодействий бактериофагов и бактерий и механизмов возникновения форм бактерий, устойчивых к фаговой инфекции.

**Библиографический список**

1. Golomidova A, Kulikov E, Isaeva A, Manykin A, Letarov A. The diversity of coliphages and coliforms in horse feces reveals a complex pattern of ecological interactions // *Appl Environ Microbiol.* 2007. Т. 73. №19. – С. 5975-81.
2. Kulikov E, Kropinski AM, Golomidova A, Lingohr E, Govorun V, Serebryakova M, Prokhorov N, Letarova M, Manykin A, Strotskaya A, Letarov A. Isolation and characterization of a novel indigenous intestinal N4-related coliphage vB\_EcoP\_G7C // *Virology.* 2012. Т. 426. №2. – С. 93-9.

**MECHANISMS OF INTERACTIONS OF VB\_ECOP\_G7C  
BACTERIOPHAGE AND ITS RELATIVES WITH ESCHERICHIA COLI  
AT EARLY STAGES OF INFECTION**

*Prokhorov N.S., Kulikov E.E., Golomidova A.K., Letarov A.V.*

**Key words:** *N4-related, coliphages, virus-host interactions, mechanisms of phage adsorption, vB\_EcoP\_G7C*

*This paper is devoted to analysis of mechanisms of interactions between indigenous intestinal N4-related bacteriophages, vB\_EcoP\_G7C mostly, and E. coli cells at early stages of phage infection. It was elucidated that phages of that group utilize very unusual among podoviruses mechanism of host recognition in which two types of short tail fibers serve sequentially as prime and second receptor recognition proteins ensuring irreversible binding of a virus particle to bacterial cell outer membrane.*

УДК 619:578

**БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙТВА БАКТЕРИОФАГОВ CITROBACTER**

*Пульчеровская Л.П., кандидат биологических наук, доцент,  
[pulcherovskaya.lidia@yandex.ru](mailto: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, негативные колонии, литическая активность, специфичность бактериофагов, бактерии рода Citrobacter.*

*Изученные фаги бактерий рода Citrobacter имели колонии четырех типов, характеризовались различным спектром литической активности и явились специфичными по отно-*

шению к бактериям рода *Citrobacter* и не активны к представителям бактерий других родов и семейств.

Особое место в этиологии массовых заболеваний новорожденных животных занимает условно-патогенная микрофлора, которая в отличие от возбудителей «классических» инфекций (н-р: листериоза, лептоспироза и др.) ежедневно поступает с экскрементами клинически здорового маточного поголовья (животных-бактерионосителей). К данной группе и относятся бактерии рода *Citrobacter*.

Согласно литературным данным бактерии рода *Citrobacter* выделяются из фекалий больных диареей сельскохозяйственных животных [5,6], являются причиной гибели диких животных [7],

Основой идентификации цитробактеров является изучение ферментативных свойств и антигенной структуры. Бактериальная диагностика длительна и трудоемка. В связи с этим возникла необходимость в поиске альтернативных методов лабораторной диагностики менее трудоемких, более быстрых и доступных. Одним из таких методов является фагодиагностика [1,2,3,4,9]. Для индикации и идентификации микроорганизмов с помощью бактериофагов необходимо иметь набор фагов с определенными биологическими свойствами.

Мы выделили бактериофаги из объектов окружающей среды Ульяновской и Самарской областей. Перед нами стояла задача – изучить основные свойства выделенных бактериофагов.

**Материалы и методы.** Материалом для исследований послужили 13 штаммов бактерий рода *Citrobacter* и 23 бактериофага бактерий рода *Citrobacter*. Чистые линии фагов получали по методике описанной И.М. Габриловичем (1992), С.Н.Золотухиным (1999).

При изучении свойств выделенных бактериофагов были использованы методы: определение морфологии, спектра литической активности и специфичности выделенных фагов описанными М.Адамс (1961); В.Я.Ганюшкин (1988), С.Н.Золотухиным (1999).

**Результаты проведенных исследований.** В результате проведенных исследований была изучена морфология 23 термостабильных расс фагов, обладающих способностью на индикаторных культурах цитробактера образовывать негативные колонии различных типов. Результаты представлены в таблице 1.

Из таблицы видно, что образовавшиеся колонии можно разделить на четыре типа: 1-й – мелкие полупрозрачные с ровными краями до 1 мм в диаметре; 2-й – прозрачные негативные колонии до 2-3мм; 3-й – прозрачные негативные колонии 2-3 мм с зоной неполного лизиса по периферии и 4-й – стерильные пятна 5,0-10,0 мм с зоной неполного лизиса по периферии, ширина зоны 0,5-1 мм.

**Таблица 1 - Морфология негативных колоний выделенных бактериофагов**

Фаг	Бактериальная культура <i>Citrobacter</i>	Наличие негативных колоний или зон лизиса
1.	<i>C.amalonaticus</i> №2	Прозрачные негативные колонии, округлые с ровными краями, 1,5-2,0
2.	<i>C.amalonaticus</i> №2	Прозрачные негативные колонии, с ровными краями, 5,0-8,0
3.	<i>C.freundii</i> № 9	Полупрозрачные негативные колонии с ровными краями, 0,5-1,0
4.	<i>C.amalonaticus</i> №11	Полупрозрачные негативные колонии с ровными краями, 0,5-10
5.	<i>C.amalonaticus</i> №11	
6.	<i>C.freundii</i> №1	Прозрачные негативные колонии с ровными краями, 2,0-2,2
7.	<i>C.freundii</i> №1	Прозрачные округлые негативные колонии с ровными краями, 0,5-1,0
8.	<i>C.diversus</i> №4	Полупрозрачные негативные колонии с ровными краями 1,0-1,3
9.	<i>C.freundii</i> №16	Прозрачные округлые негативные колонии с ровными краями, 1,0-1,5
10.	<i>C.amalonaticus</i> № 11	Прозрачные округлые негативные колонии с ровными краями, 0,5-1,0
11.	<i>C.amalonaticus</i> №11	Прозрачные негативные колонии с ровными краями, 2,0-3,0 и зоной неполного лизиса по периферии
12.	<i>C.freundii</i> №1	Прозрачные негативные колонии с ровными краями, 1,0-1,5
13.	<i>C.freundii</i> №1	Полупрозрачные негативные колонии с ровными краями, 0,5-1,0
14.	<i>C.diversus</i> №4	Прозрачные негативные колонии с ровными краями, 0,2-0,7
15.	<i>C.freundii</i> №16	Прозрачные негативные колонии с ровными краями, 1,0-1,5
16.	<i>C.amalonaticus</i> №11	Прозрачные негативные колонии с ровными краями, 0,5
17.	<i>C.freundii</i> №1	Прозрачные негативные колонии с ровными краями 1,0-1,5
18.	<i>C.freundii</i> №1	Прозрачные негативные колонии с ровными краями, 1,0
19.	<i>C.amalonaticus</i> №2	Прозрачные округлые негативные колонии с ровными краями, 1,0-1,5
20.	<i>C.freundii</i> №9	Прозрачные негативные колонии размером 3, 0- 10,0 и зоной неполного лизиса 0,5-1,0.
21.	<i>C.diversus</i> №4	Прозрачные негативные колонии с ровными краями, 2,5-4,0
22.	<i>C.amalonaticus</i> №11	Прозрачные негативные колонии с ровными краями, 2,0-2,5
23.	<i>C.freundii</i> №16	Прозрачные негативные колонии с ровными краями, 1,5-2,3

Для получения чистой линии фага проводили от 5 до 7 пассажей из изолированных негативных колоний.

Выделенные бактериофаги обладали разной литической активностью. Литическая активность бактериофагов оценивается по способности фага вызывать лизис бактериальной культуры в жидких или плотных питательных средах и выражается это тем максимальным

разведением, в котором исследуемый бактериофаг проявлял свое литическое действие. Результаты представлены в таблице 2.

**Таблица 2 -Литическая активность и место выделения фагов бактерий рода *Citrobacter***

Место выделения	фаг	Литическая активность	
		По Грациа	По Аппельману
Самарская обл.	1	$3 \times 10^9$	$10^{-3} \times 10^{-4}$
	2	$3,2 \times 10^9$	$10^{-3} \times 10^{-4}$
	3	$1 \times 10^9$	$10^{-5}$
	4	$1,5 \times 10^9$	$10^{-4}$
	5	$2 \times 10^6$	$10^{-3} - 10^{-4}$
Самарская обл.	6	$2 \times 10^8$	$10^{-6} - 10^{-7}$
	7	$1,6 \times 10^8$	$10^{-5}$
	8	$2 \times 10^8$	$10^{-8} - 10^{-9}$
	9	$3 \times 10^8$	$10^{-7} - 10^{-8}$
	10	$2 \times 10^8$	$10^{-4} - 10^{-5}$
	11	$2 \times 10^9$	$10^{-6} - 10^{-7}$
	12	$2 \times 10^9$	$10^{-5}$
Ульяновская обл.	13	$1 \times 10^8$	$10^{-7}$
	14	$1 \times 10^8$	$10^{-6}$
	15	$6 \times 10^8$	$10^{-6}$
	16	$1,3 \times 10^9$	$10^{-7}$
	17	$2,3 \times 10^9$	$10^{-7}$
	18	$4 \times 10^8$	$10^{-5}$
Ульяновская обл.	19	$1 \times 10^7$	$10^{-3}$
	20	$2 \times 10^8$	$10^{-3}$
	21	$2 \times 10^7$	$10^{-3}$
	22	$5 \times 10^8$	$10^{-6}$
	23	$4 \times 10^8$	$10^{-6}$

Спектр литической активности является также характерной особенностью штаммов фага и его используют для их идентификации [8].

Для изучения спектра литической активности 23 штаммов выделенных и селекционированных бактериофагов использовали 13 штаммов бактерий рода *Citrobacter*. Исследования проводили методом нанесения фага на газон бактериальной культуры. Опыты показали, что изученные фаги характеризуются различным спектром литической активности. Результаты представлены в таблице 3.

Видовая специфичность фагов используется широко в практике для дифференциации бактерий. Эта способность фагов определяется, прежде всего, сродством их к рецепторам лизируемых бактерий.

Определение видовой специфичности бактериофагов проводили на агаровых средах путем нанесения фага на газон культуры.

Изучение специфичности цитробактерных бактериофагов проводили по отношению к представителям других семейств и родов с использованием штаммов: *E.coli* - 46 штаммов, *Proteus spp.* - 6 штаммов, *Morganella spp.* - 6 штаммов, *Klebsiella spp.* - 4 штамма, *Salmonella spp.* - 6 штаммов, *Enterobacter spp.* - 4 штамма, *Y.enterocolitica* - 12 штаммов, *Staphylococcus spp.* - 3 штамма, *Streptococcus spp.* - 2 штамма, *Pseudomonas aureginisa* - 4 штамма, *Bacillus cereus* - 3 штамма.

**Таблица 3 - Спектр литической активности цитробактерных фагов по отношению к штаммам бактерий *Citrobacter***

№ фага	Количество испытанных штаммов	Из них чувствительных к фагу	№ лизируемых штаммов	% лизируемых штаммов
1	13	3	2,11,10	23,1%
2	13	2	2,11	15,4%
3	13	1	9	7,7%
4	13	2	11,16	15,4%
5	13	3	16, 11,10	23,1%
6	13	5	1, 9, 4, 16,6	41,5%
7	13	5	1,4, 16,6,10	41,5%
8	13	5	1,4,16, 6,12	41,5%
9	13	7	1,4,16,6, 101/57,11,12	53,8%
10	13	6	2,9,16,7,12, 13	46,1%
11	13	3	1,7,11	23,1%
12	13	4	1,4,16,11	30,8%
13	13	4	1,4,16,6	30,8%
14	13	5	1,9,4, 16,6	41,5%
15	13	4	3,4,16,6	30,8%
16	13	2	11,10	15,7%
17	13	5	1,4,16,11,10	41,5%
18	13	5	1,4,16,7,10	41,5%
19	13	3	2,9,16	23,1%
20	13	7	16,1, 11,8,101/57,12,7	53,8%
21	13	5	1,4,16,6,7	41,5%
22	13	1	11	7,7
23	13	5	1,4,16,6,13	41,5%

В результате изучения специфичности цитробактерных бактериофагов по отношению к представителям других семейств и родов установлено, что данные фаги не лизировали ни одну из испытываемых культур. На основании полученных результатов можно сделать вывод, о том, что выделенные фаги являются специфичными по отношению к бактериям рода *Citrobacter* и не активны к представителям бактерий других родов и семейств.

**Библиографический список**

1. Адамс М. Бактериофаги. – Москва, 1961. – с. 15-44.
2. Гольдфарб Д.М. Бактериофагия. // -М.: Медгиз. –1961. –297С.
3. Ганюшкин В.Я. Бактериофаги сальмонелл и их применение в ветеринарии. Учебное пособие. – Ульяновск, 1988. – с. 45-49.
4. Пульчеровская Л.П., Золотухин С.Н., 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. Пульчеровская Л.П., Золотухин С.Н., Васильев Д.А. Выделение и селекция бактериофагов рода *Citrobacter*. //Вестник ветеринарии., Выпуск V., Оренбург, - 2002. - С. 85-88.
6. Воронин Е.С., Дервишов Д.А. и др. Этиология и профилактика желудочно-кишеч-

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](mailto: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-