

чувствительны к сибиреязвенным фагам.

Таким образом, путем слияния протопластов, штаммов *Bacillus anthracis* 34F2, устойчивых к стрептомицину (1000 мкг/мл) и *Bacillus cereus* GP-7, устойчивых к тетрациклину (150 мкг/мл) получены рекомбинантные клоны, устойчивые к 2-м антибиотикам - стрептомицину (1000 мкг/мл) и тетрациклину (150 мкг/мл). Они имеют большое сходство по биологическим свойствам с родительским штаммом *Bacillus cereus* GP-7 (характер роста на МПА, способность к росту при 45°C, отсутствие чувствительности к сибиреязвенным фагам, отсутствие антигенных структур, характерных для *Bacillus anthracis*) и некоторое сходство с исходным штаммом *Bacillus anthracis* по морфологии клеток, отсутствию подвижности и гемолитической активности.

В результате проведенных исследований доказана возможность появления межвидовых рекомбинантов путем слияния протопластов *Bacillus anthracis* и *Bacillus cereus*. Рекомбинантные клоны имели свойства обоих родителей.

УДК 57

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СПОСОБНОСТИ ПРОТОПЛАСТОВ БАЦИЛЛ К РЕВЕРСИИ

С.В.Мерчина, Г.Ф.Архипова, Д.А.Васильев

Следующая серия экспериментов была посвящена определению способности протопластов, получившихся из клеток *Bacillus cereus* и *Bacillus anthracis*, реверсировать в нормальные бактериальные формы. Для определения способности протопластов реверсировать в исходные бактериальные формы суспензию разводили в гипертонической среде и из различных разведений делали высевы на плотную агаризованную среду (ДМ-3).

По данным литературы, способность протопластов к регенерации определяется степенью гидратации среды. Регенерацию протопластов мы проводили в условиях полужидкого (0,8%) агара, так как при этом наблюдается более интенсивная аэрация и более мягкое прорастание регенерированных протопластов. Подсчет образующихся бактериальных колоний производили через 24 часа инкубирования при t° 37°C.

Уровень реверсии мы определяли, исходя из разницы в числе колоний, образовавшихся на регенерационной среде и формирующихся на МПА после осмотического шока, отнесенной к первоначальному количеству бактерий в культуре.

Было установлено, что наиболее высокий процент регенерации протопластов наблюдали при применении среды Алфолди, использовании лизоцима в концентрации 1 мг/мл, и он достигал 6,5%. Более высокие

концентрации лизоцима (5 и 10 мг/мл) снижали уровень реверсии протопластов (табл. 1).

В среде СММ, несмотря на высокий процент протопластообразования, уровень реверсии протопластов в исходную бациллярную форму был низким и составлял 0,06 - 0,08%.

1. Образование протопластов в среде Алфолди и их реверсия в бактериальные формы

Показатели	Концентрация лизоцима (мг/мл)			
	1	2	5	10
Число кл/мл в исходной культуре	1·10 ⁷	1·10 ⁷	1·10 ⁷	1·10 ⁷
Число кл/мл после шока	4·10 ⁴	3·10 ⁴	2·10 ⁴	3·10 ⁴
Число после реверсии	5·10 ⁵	2,6·10 ⁵	6·10 ⁴	4·10 ⁴
% сформировавшихся протопластов	99,8	99,5	99,87	99,7
% реверсии	6,5	3,5	0,4	0,1

2. Условия образования протопластов

Среда для выращивания клеток	ДМ-3 (жидкая), Чанг-Козн, (1979) 0,25 М сукцинат натрия, pH-7,3 0,5% гидролизат казеина 10% дрожжевой экстракт 3,5% K ₂ HPO ₄ +1,5% KH ₂ PO ₄ 50% глюкоза IMMgCb
Среда для пропластирования	Алфолди (1976 г.) NH ₄ Cl - 1 г Na ₂ SO ₄ ·10H ₂ O - 300 мг трис- 12 г сахара - 69 мг KCl -35 мг MgCl ₂ ·5H ₂ O - 4,20 г NaCl- 38 мг
Концентрация лизоцима	1-2 мг/мл
Время инкубации клеток с лизоцимом	1 час, 37°C
Регенерационная среда	ДМ-3 (твердая), Чанг - Козн, 1979

Таким образом, нами выбран оптимальный метод получения протопластов, который включает следующие основные этапы:

- выращивание клеток бактерий в жидкой питательной среде (ДМ-3) до середины логарифмической фазы роста с применением шуттель-аппарата;
- использование гипертонической среды Алфолди для образования протопластов;
- обработка бактериальной суспензии лизоцимом в концентрации 1-2

мг/мл и инкубация их в течение 1 часа при t° - 37 $^{\circ}$ C;

- контроль образования протопластов с помощью фазово-контрастной микроскопии.

Исходя из вышеизложенного, можно сделать вывод о том, что наиболее подходящими условиями для образования протопластов из бактериальных штаммов *Bacillus cereus* GP-7 и *Bacillus anthracis* 34F2 являются: среда Алфолди, концентрация лизоцима = 1 мг/мл; время инкубирования с лизоцимом 1 час., при t° = 37 $^{\circ}$ C. В этих условиях образование протопластов достигает 99,5 - 99,9% и процент их реверсии составляет 6,5% (таблица 2).

УДК 636.22.087.72

ПРОДУКТИВНОСТЬ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ СОСТОЯНИЕ КОРОВ ПРИ РАЗНЫХ ТИПАХ КОРМЛЕНИЯ И ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В РАЦИОНАХ МЕСТНЫХ ПРИРОДНЫХ ТУФОВ

Л.А.Пыхтина, д.с.-х.н, В.Е.Улитко, д.с.-х.н., В.В.Козлов, к.с.-х.н.

В наращивании производства молока большая роль отводится интенсификации животноводства. Несмотря на достаточно высокий генетический потенциал продуктивности районированных пород животных, достичь его полной реализации при сложившихся технологиях их кормления, производства и заготовки кормов невозможно. Вследствие низкого качества заготавливаемых объемистых кормов в структуре рационов животных за последние десятилетия неуклонно возрастает доля концентратов и уже достигла уровня 35-45%. Поэтому изыскание методов повышения энергетической ценности и эффективности использования объемистых кормов, оптимизации типов кормления с учетом природно-климатических условий и кормовой базы региона, неременное условие увеличения коэффициента их продуктивного действия (КПД) и снижения остроты проблемы дефицита зерновых кормов. (В.В. Щеглов и др., 1990, А.П. Калашников и др., 1995; Н.Г. Макарец, 1999.) В Средневолжском регионе, как зоне рискованного земледелия, в отличие от других, из каждых пяти лет – один-два и даже три года бывают засушливыми, что ухудшает структуру и полноценность кормовой базы, так как в ней преобладает кукурузный силос в силу того, что кукуруза, как имеющая длительный вегетационный период, гарантирует в любой год урожайность зеленой массы в пределах 200-350 ц/га, тогда как кормовые культуры с коротким вегетационным периодом или выгорают или не дают ожидаемого урожая.

Вместе с тем раннее наступление заморозков вынуждает убирать кукурузу в ранней фазе ее развития, что обуславливает получение силоса с большой влажностью, кислого и с низкой энергопротеиновой питатель-