

A.K. Dnekeshev - candidate of veterinary sciences, associate professor
West Kazakhstan Agro-Technical University Zhangir Khan
Samalek_0312 @ mail ru.

Keywords: morphometry, arteries, limbs, camel, foot.

The article gives the projections of the major arteries in the pasterns and toes in the Bactrian camel-based topographic and anatomic study. The projections of the main arteries in the pasterns should be considered during various surgical procedures in the distal thoracic limbs, as well as the application of intravascular injection, as one of the most effective methods of treatment for necrotic processes in the sole-Bactrian camel.

УДК 602.3:579.8

Научные исследования проводятся при финансовой поддержке государства в лице Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках реализации федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы (соглашение от №8267 от 10.08.2012).

ОСНОВНЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ФАГОВ БАКТЕРИЙ VACILLUS MYCOIDES

Н.А. Феоктисова, кандидат биологических наук, доцент

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

тел. 8(8422) 55-95-47, feokna@yandex.ru

В.А. Макеев, аспирант

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

тел. 8(8422) 55-95-47, usxa@yandex.ru

Д.А. Васильев, доктор биологических наук, профессор

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

8(8422) 55-95-47, dav_ul@mail.ru

А.В. Алешкин, доктор биологических наук

Московский НИИЭиМ им. Г.Н. Габричевского»

8-495-452-18-16, ava@gabri.ru

Ключевые слова. Бактериофаги, *Vacillus mycoides*, биопрепарат, литическая активность, спектр литического действия, специфичность действия, изменение литической активности при хранении.

В статье дана характеристика основных биологических свойств бактериофагов *Vacillus mycoides* (литическая активность, спектр литического действия, специфичность действия, изменение литической активности при хранении), изучение которых необходимо для конструирования биопрепарата для фагоиндикации и

Введение. Создание биопрепарата для фагоиндикации и фагоидентификации бактерий *Bacillus mycoides* в пищевом сырье на основе бактериофагов подразумевает изучение таких биологических свойств, как литическая активность, спектр литического действия, специфичность в пределах вида и изменение литической активности при хранении [3,5].

Литическая активность бактериофага оценивается по его способности вызывать лизис бактериальной культуры в жидких или плотных питательных средах и выражает это тем максимальным разведением, в котором испытуемый бактериофаг проявил свое литическое действие. Более точным методом оценки литической активности бактериофага является определение количества активных корпускул фага в единице объема. Однако, этот показатель относительный, так как активность фага зависит от различных условий, основными из которых являются биологические особенности бактериальной клетки, которые в свою очередь зависят от физических свойств среды, ее химического состава, окружающей температуры и так далее. Поэтому активность фага всегда определяется в конкретных, стандартных условиях [4]. Видовая специфичность фагов используется в практике для дифференциации бактерий. Эта способность фагов определяется, прежде всего, родством их к рецепторам лизируемых бактерий [2]. Так как для разработки технологических параметров изготовления биопрепарата на основе фагов необходимо изучить изменение литической активности при хранении, так как срок годности биопрепарата начинает исчисляться с момента наработки фага и его укупоривания в герметично закрытые флаконы [7].

Целью наших исследований было изучение основных биологических свойств бактериофагов *Bacillus mycoides* (литическая активность, спектр литической активности, специфичность действия, изменение литической активности при хранении).

Материалы и методы исследований. В работе было использовано 12 штаммов бактерий *Bacillus mycoides*, 1 из них референс – штамм (*Bacillus mycoides* 537), 78 штаммов бактерий *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus mesentericus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*, полученных из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина». Изучались биологические свойства 5 изолятов бактериофагов *Bacillus mycoides*, выделенных из объектов санитарного надзора Ульяновской и Самарской областей, Краснодарского края по методикам, предложенным Д.М. Гольдфарбом [2], И.П. Ревенко [6], В.Я. Ганюшкиным [1], С.Н. Золотухиным [3].

Результаты собственных исследований и их обсуждение

Изучения литической активности селекционированных фагов *Bacillus mycoides* проводили методом агаровых слоев (Gracia, 1936) [6]. Определение этого показателя необходимо для создания биопрепарата, сохраняющего свою литическую активность в течение 12 месяцев. Накануне опыта по чашкам Петри разливали 1,5% мясопептонный агар в ламинарном боксе. Перед использованием чашки дополнительно подсушивали в термостате при 37 °С 15-20 минут. Индикаторные культуры *Bacillus mycoides* выращивались в условиях термостата в течение 18-20 часов при 37 °С на мясо-пептонном бульоне. Стерильный 0,7% мясопептонный агар, разлитый в пробирки по 2,5 мл, расплавляли на

водяной бане и остужали до 46-48 °С. Исследуемый на присутствие бактериофага субстрат в количестве 1,0 мл помещали в 2,5 мл 0,7% мясоептонного агара, туда же вносили 0,2 мл индикаторной культуры. Все быстро и тщательно перемешивали вращением пробирки в ладонях и выливали на поверхность 1,5% мясоептонного агара. Смесь осторожными движениями распределяли по поверхности мясоептонного агара, чашки Петри оставляли на горизонтальной поверхности стола до полного застывания мясоептонного агара, затем инкубировали посевы в термостате при 37 °С в течение 18 часов. Экспериментальным путем установлено, что литическая активность фагов колеблется в диапазоне от 10^6 до 10^{12} БОЕ/мл.

Результаты исследований представлены в таблице 1.

Важной характеристикой фагов *Bacillus mycoides* является диапазон их действия на штаммы бактерий в пределах вида. Этот показатель чрезвычайно важен для создания диагностического препарата, способного лизировать строго бактерии *Bacillus mycoides*, выделенные из различных источников. Для изучения спектра литического действия селекционированных фагов использовали 10 штаммов бактерий *Bacillus mycoides*, выделенных нами их проб пищевого сырья и продуктов питания и 1 штамм, полученный из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина». Исследования проводили методом нанесения фага на газон бактериальной культуры методом «стекающая капля». Экспериментальным путем установлено, что изучаемые специфические бактериофаги имеют различный диапазон действия по отношению к 12 изучаемым штаммам *Bacillus mycoides* (рис. 1). Опыты демонстрируют, что наиболее широким спектром литического действия по отношению к изучаемым культурам обладают штаммы фагов В.мус–3 и В.мус–5 серии УГСХА, совокупный процент лизиса которых составил 91,7 %. Вышеназванные фаги обладают перекрестным лизисом, в данном случае они лизируют следующие штаммы *Bacillus mycoides*, выделенные нами из пищевого сырья: ***Bacillus mycoides* 1 (пряности – мускатный орех), *Bacillus mycoides* 2 (картофель), *Bacillus mycoides* 5 (лук репчатый), *Bacillus mycoides* 6 (рыба прудовая), *Bacillus mycoides* Н (пряности – корица) и референс-штамм *Bacillus mycoides* 537.**

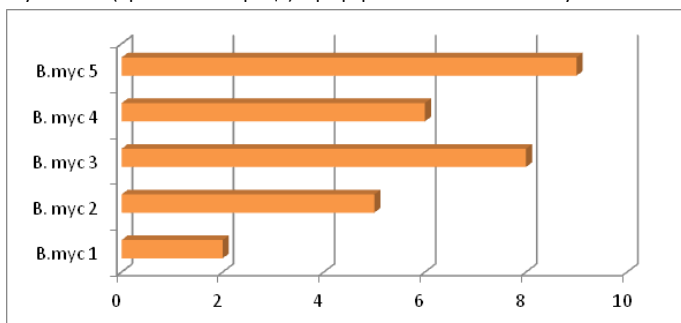


Рис. 1. – Спектр литического действия фагов *Bacillus mycoides*

Важнейшей характеристикой фага, входящего в состав биопрепарата для индикации и идентификации бактерий, является его специфичность в пределах вида. Изучение

специфичности 5 выделенных изолятов бактериофагов *Bacillus mycooides* мы проводили на культурах гомологичного рода: *Bacillus subtilis* – 25 штаммов, *Bacillus mesentericus* – 20 штаммов, *Bacillus megaterium* – 4 штаммов, *Bacillus cereus* – 25 штаммов, *Bacillus thuringiensis* – 4 штамма. Эксперимент ставили, используя методику, описанную С.Н. Золотухиным (2007).

Таблица 1. Результаты исследований спектра литического действия и литической активности фагов бактерий *Bacillus mycooides*

№	Фаги	Количество лизированных культур <i>Bacillus mycooides</i> , шт	Процент лизируемых культур, %	Количество корпускул в 1 мл фага (по Грациа), БОЕ
1	В мус–1 УГСХА	2	16,7	$1,5 \times 10^9 \pm 0,4 \times 10^9$
2	В мус–2 УГСХА	5	41,7	$2,3 \times 10^6 \pm 0,7 \times 10^6$
3	В мус–3 УГСХА	8	66,7	$6,2 \times 10^{12} \pm 0,8 \times 10^{12}$
4	В мус–4 УГСХА	6	50,0	$7,8 \times 10^8 \pm 0,2 \times 10^8$
5	В мус–5 УГСХА	9	75,0	$1,6 \times 10^{10} \pm 0,6 \times 10^{10}$
Совокупный процент лизиса			91,7	

На чашки Петри с разлитым в нее 1,5% накануне мясопептонным агаром наносили газон культуры вышеназванных видов бактерий рода *Bacillus*. Бактериальный газон подсушивали в условиях термостата в течение 20-30 минут при 37 °С. Затем чашку Петри с подготовленным газоном делили на три сектора: две «опытных» дорожки и контроль на механическое повреждение газона. На «опытные» дорожки наносили по 1-2 капли исследуемого бактериофага *Bacillus mycooides*, на «контрольную» дорожку – стерильный мясопептонный бульон в том же количестве, что и бактериофаги. Посевы помещали в термостат на 18 часов инкубации при 37 °С.

На чашках Петри, засеянных культурами *Bacillus subtilis*, *Bacillus mesentericus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, зон лизиса, при нанесении селекционированных нами фагов *Bacillus mycooides* В.мус–3 и В.мус–5 серии УГСХА на газон культур, обнаружено при визуальном осмотре не было. Полученные результаты свидетельствуют, что выделенные и селекционированные нами бактериофаги, строго специфичны в пределах вида *Bacillus mycooides* и могут быть компонентами биопрепарата для индикации и идентификации бактерий *Bacillus mycooides*.

Для конструирования биопрепарата нами было отобрано два фага В.мус–3 и В.мус–5 серии УГСХА, которые характеризовались высокими титрами литической активности и максимально широким совокупным спектром литического действия (рис. 2).

Последующие эксперименты были направлены на изучение изменения литической активности укупоренных во флаконы бактериофагов В.мус–3 и В.мус–5 серии УГСХА, хранящихся в условиях холодильника в течение 12 месяцев. Показатели литической активности фагов при хранении определяется по классической методике определения активности методом агаровых слоев (Gracia, 1936) [3]. Для получения достоверных

данных каждый эксперимент проводили троекратно и результаты исследований подвергли статистической обработке. Эталонные культуры бактерий *Bacillus mycooides* выращивали на мясо-пептонном бульоне в течение 18 часов в термостате при 37 °С. Результаты исследований представлены в таблице 2.

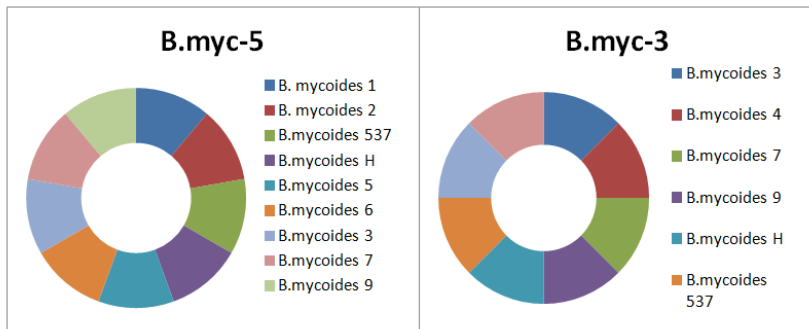


Рис. 2. – Диапазон лизиса фагов В.мус-3 и В.мус-5 серии УГСХА

Опытным путем установлено, что в течение 3 месяцев показатели литической активности исследуемых бактериофагов В.мус–3 и В.мус–5 серии УГСХА оставались без изменений, $6,2 \times 10^{12} \pm 0,8 \times 10^{12}$ и $1,6 \times 10^{10} \pm 0,6 \times 10^{10}$ БОЕ/мл фаголизата, соответственно.

Через 6 месяцев литическая активность снижалась и составила у фага В.мус–3 $4,7 \times 10^8 \pm 1,5 \times 10^8$ БОЕ/мл и у В.мус–5 УГСХА - $2,5 \times 10^8 \pm 1,7 \times 10^8$ БОЕ/мл, через 9 месяцев - $0,9 \times 10^7 \pm 0,2 \times 10^7$ и $1,1 \times 10^8 \pm 0,4 \times 10^8$ БОЕ/мл, 12 месяцев - $0,4 \times 10^7 \pm 0,1 \times 10^7$ и $1,3 \times 10^7 \pm 0,5 \times 10^7$ БОЕ/мл, соответственно.

Экспериментально установлено, что пассирование бактериофагов на исходном штамме бактерий *Bacillus mycooides* в течение 7 пассажей методом агаровых слоев (Gracia, 1936)[3] восстанавливает литическую активность бактериофагов на 1 порядок.

Таблица 2. Изменение литической активности фагов В.мус-3 и В.мус-5 серии УГСХА при хранении

Бактериальная культура / название фага	Временной интервал	Литическая активность, количество корпускул в 1 мл фага, БОЕ
<i>Bacillus mycooides</i> 537/ В.мус-3 УГСХА	момент укупоривания	$6,2 \times 10^{12} \pm 0,8 \times 10^{12}$
	3 месяца	$6,2 \times 10^{12} \pm 0,8 \times 10^{12}$
	6 месяцев	$4,7 \times 10^8 \pm 1,5 \times 10^8$
	9 месяцев	$0,9 \times 10^7 \pm 0,2 \times 10^7$
	12 месяцев	$0,4 \times 10^7 \pm 0,1 \times 10^7$
<i>Bacillus mycooides</i> H / В.мус-5 УГСХА	момент укупоривания	$1,6 \times 10^{10} \pm 0,6 \times 10^{10}$

	3 месяца	$1,6 \times 10^{10} \pm 0,6 \times 10^{10}$
	6 месяцев	$2,5 \times 10^8 \pm 1,7 \times 10^8$
	9 месяцев	$1,1 \times 10^8 \pm 0,4 \times 10^8$
	12 месяцев	$1,3 \times 10^7 \pm 0,5 \times 10^7$

Заключение. Проведенные исследования по изучению основных биологических свойств фагов *Bacillus thuringiensis* принципиально важных для создания биопрепарата для фагоиндикации и фагоидентификации, показали, что изучаемые бактериофаги изменяют показатели литической активности, определяемые в стандартных условиях. Литическая активность фагов В.тмус–1 - В.тмус–5 серии УГСХА колеблется в диапазоне от 10^6 до 10^{12} БОЕ/мл. Опыты демонстрируют, что наиболее широким спектром литического действия по отношению к изучаемым культурам обладают штаммы фагов В.тмус–3 и В.тмус–5 серии УГСХА, совокупный процент лизиса исследованных штаммов *Bacillus thuringiensis* которых составил 90,9 %. Установлено, что выделенные и селекционированные нами бактериофаги, строго специфичны в пределах вида *Bacillus thuringiensis* и могут быть компонентами биопрепарата для фагоиндикации и фагоидентификации бактерий *Bacillus thuringiensis* в объектах окружающей среды и продуктах питания. Для конструирования биопрепарата на основе фагов *Bacillus thuringiensis* нами было отобрано два фага В.тмус–3 и В.тмус–5 серии УГСХА, которые характеризовались высокими титрами литической активности и максимально широким совокупным спектром литического действия. Дальнейшие эксперименты были направлены на изучение изменения литической активности укупоренных во флаконы бактериофагов В.тмус–3 и В.тмус–5 серии УГСХА, хранящихся в условиях холодильника в течение 12 месяцев. Определено, что бактериофаги в течение 12 месяцев снижали показатели литической активности с 10^{12} до 10^7 БОЕ/мл. Согласно данным С.Н. Золотухина (2007), изменение литической активности фагов в диапазоне 10^7 - 10^9 не является критическим при конструировании биопрепарата и не отразится на его способности лизировать культуры в пищевом сырье и продуктах питания при проведении исследований по их индикации и идентификации [3].

Библиографический список

1. Васильев, Д.А. Бактериофаги рода *Bacillus* / Д.А. Васильев, Н.А. Феоктистова, С.Н. Золотухин. – Ульяновск: УГСХА, 2013. – С. 23.
2. Гольдфарб, Д.М. Бактериофагия / Д.М. Гольдфарб. – М.: Медгиз, 1961. – С. 169–187.
3. Золотухин, С.Н. Создание и разработка схем применения диагностических биопрепаратов на основе выделенных и изученных бактериофагов энтеробактерий: автореф. дис. ...докт. биол. наук: 03.00.07, 03.00.23 / Золотухин Сергей Николаевич. – Ульяновск, 2007. – С.32.
4. Каттер, Э. Бактериофаги. Биология и практическое применение / Э. Каттер, А. Сулаквелидзе. – М.: Научный мир, 2012. – С. 365–369.
5. Раутенштейн, Я.И. Изменчивость *Bacillus thuringiensis*. Морфология вариантов/ Я.И. Раутенштейн // Микробиология. – 1977. – №1 (16). – С.33–41.
6. Ревенко, И.П. Бактериофаги и их использование в ветеринарной практике / И.П. Ревенко. – Киев: Урожай, 1978. – С. 41–88.
7. Юдина, М.А. Диагностика картофельной болезни хлеба, вызываемой

бактериями видов *Bacillus subtilis* и *Bacillus mesentericus* / М.А. Юдина, Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев, Е.О. Бахаровская [и др.] // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2011. – №1 (13). – С. 61–67.

BASIC BIOLOGICAL PROPERTIES PHAGES BACTERIA BACILLUS MYCOIDES

Feoktistova N.A., Makeev V.A., Vasiliev D.A., Alyoshkin A.V.

Keywords. *Bacteriophages, Bacillus mycoides, biological product, lytic activity, the spectrum of lytic action, specificity, modification of lytic activity during storage.*

The paper presents the characteristics of the basic biological properties of bacteriophages Bacillus mycoides (lytic activity, the spectrum of lytic activity, specificity, modification of lytic activity during storage), the study of which is necessary for the construction of a biological product for fagoindikatsii and fagoidentifikatsii bacteria Bacillus mycoides in food raw materials and food products.

УДК 602.3:579.8

Научные исследования проводятся при финансовой поддержке государства в лице Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках реализации федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы (соглашение от №8267 от 10.08.2012).

РАЗРАБОТКА СИСТЕМЫ ФАГОВАРОВ BACILLUS CEREUS

А.И. Калдыркаев, ассистент

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

тел. 8(8422) 55-95-47, usxa@yandex.ru

Н.А. Феоктистова, кандидат биологических наук, доцент

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

тел. 8(8422) 55-95-47, feokna@yandex.ru

Д.А. Васильев, доктор биологических наук, профессор

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

8(8422) 55-95-47, dav_ul@mail.ru

А.В. Алешкин, доктор биологических наук

Московский НИИЭиМ им. Г.Н. Габричевского»

8-495-452-18-16, ava@gabri.ru

С.В. Мерчина, кандидат биологических наук, доцент

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