

УДК 619:578.832.1

Сырым Н.С., Еспембетов Б.А., Тургенбаев К.А., Сансызбай А.Р.

РГП "Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности" РК

ПОДБОР ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ МИКОБАКТЕРИОФАГОВ

Аннотация

В статье представлены результаты исследований, по подбору питательных сред обеспечивающие максимальный бактериальный рост и создающие условия для оптимальной активности для выделения микобактериофагов (МБфагов).

Ключевые слова: микобактерий, туберкулез, микобактериофаг, жидкая и плотная питательная среда, культуры микобактерий.

Введение

Попытки применения фагов во фтизиатрической практике предпринимались достаточно давно, но появление более эффективных в отношении микобактерий туберкулеза по сравнению с бактериофагами противотуберкулезных препаратов в значительной степени уменьшило интерес исследователей в этой области [1, 2]. Однако, возросшая частота лекарственно устойчивых штаммов микобактерий туберкулеза к противотуберкулезным препаратам делает в настоящее время тему изучения МБфагов вновь актуальной [3, 4].

Для выделения МБфагов должны быть созданы условия, обеспечивающие лизирование фагом микобактерий. Одним из этих условий является применение оптимальной питательной среды, обеспечивающей максимальный бактериальный рост создающей условия для оптимальной активности фага [5, 6].

Питательные среды являются основой при микробиологической работе, которые создают оптимальные условия для жизнедеятельности микробов и их качество нередко определяет результаты исследования. Поэтому при подборе сред следует учитывать как требования микробов в отношении веществ, необходимых для поддержания их жизнедеятельности, так и их возможность осуществлять в данных условиях обмен веществ между клеткой и средой.

На основаниях наблюдений исследователей в данной области, роль питательной среды является наиболее важной. Если условия для образования фага неблагоприятны, например старая питательная среда, тогда в основном появляются бляшки меньшего размера и неодинаковой величины. Поэтому очистка фагов может осуществляться только при одинаковых условиях. Морфология бляшек может измениться даже при использовании новой серии какой-либо составной части питательной среды. Нередко применение глицерина различной степени очистки приводило к изменению морфологии, а недостаточно очищенный глицерин может даже задерживать размножение фага. Морфология бляшек также изменяется, если поливалентные фаги действуют на разные виды микобактерий [7, 8].

Nnatko [9], наблюдал, что с повышением концентрации агара снижалось количество и размеры бляшек. Ю.К. Вейсфейллер [10], установил, что в модифицированной среде Dubos, содержащей 1,1% агара, количество и размеры бляшек увеличиваются по сравнению с той же средой, содержащей 1,5% агара. Hercik [11], считает, что морфология бляшек отражает взаимодействие фага и бактерии и поэтому заслуживает большое внимание в будущем. Ю.К. Вейсфейллер [10], подчеркивает большое влияния состава

питательной среды и техники посева на морфологию бляшек.

На сегодняшний день существуют большое количество питательных сред для культивирования микобактерий.

В связи с этим, для достижения поставленной цели необходимо было выбрать жидкие и плотные стандартные питательные среды для выделения микобактериофагов туберкулеза разных видов.

Материалы и методы исследований

Для выполнения исследований были использованы: пробы, взятые из объектов внешней среды и биологический материал. В качестве индикаторных тест-культур были использованы культуры микобактерий – *M. bovis*-8, *M. scrofulaceum*, *M. avium*, *M. phlei*, *M. smegmatis*, *M. intracellulare*, выделенные в разные годы из патологического материала и объектах внешней среды.

Для культивирования микобактерий и МБфага были использованы питательные среды: Dubos Broth Base, Dubos Oleic Agar Base, Kirschner Medium Base - Modified, Middlebrook 7H10 Agar Base, Peizer TB Medium Base, Lowenstein Jensen medium base и Sauton's Fluid Medium.

Результаты исследований и их обсуждения

В начале опыта нами были приготовлены различные питательные среды:

- плотные: Dubos Oleic Agar Base, Middlebrook 7H10 Agar Base, Peizer TB Medium Base, Lowenstein Jensen medium base с добавками стимуляторы роста: Middlebrook growth supplement, Oleic albumin supplement (рисунок 1).

- жидкие: Dubos Broth Base, Sauton's Fluid Medium, Kirschner Medium Base - Modified (рисунок 2);

- полужидкая среда Школьниковой в модификации Дорожковой И.Р. (ДИР);



Рисунок 1 - Плотные питательные среды

Для исследования полученных фильтратов на наличие МБфагов, их одномоментно посеяли на выше указанные жидкие и твердые питательные среды.

Обнаружение фага на плотных средах. Тест-культуры микобактерий засеивали "газоном" на поверхность сред: Dubos Oleic Agar Base, Middlebrook Agar Base, Peizer TB Medium Base, Lowenstein Jensen medium base в чашках Петри. Посев подсушивали в боксе биологической безопасности 30 мин при открытой крышке, после чего на него наносили каплю изучаемых фаголизатов.



Sauton's Fluid Medium



Dubos Broth Base и Kirschner Medium Base - Modified



Полужидкая среда ДИР

Рисунок 2- Жидкие питательные среды

Через несколько минут, когда жидкость впиталась, чашки помещали в термостат до появления лизиса в том месте, куда была нанесена капля фаголизатов. Результаты представлены на рисунке 4.

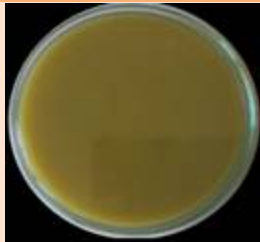
Название питательных сред	Фаголизис методом стекающей капли	
Peizer TB Medium Base		
Lowenstein Jensen medium base		
Dubos Oleic Agar Base		
Middlebrook 7H10		

Рисунок 4 - Подбор плотных питательных сред для обнаружения МБфагов

Как видно из рисунка 4, при сравнении плотных питательных сред для выделения МБфагов обнаружено, что использовании яичных питательных сред Peizer TB Medium Base и Lowenstein Jensen medium base при просмотре в проходящем свете вероятность обнаружения зоны лизиса уменьшается. Это объясняется тем, что питательные среды Lowenstein Jensen medium base и Peizer TB Medium Base не прозрачные, имеют цвет от голубовато-зеленого до рыжевато-коричневого цвета и имеют в составе яичные массы.

Проанализировав составы используемых плотных агаровых питательных сред для выделения МБфагов, выбрали наиболее подходящие известные среды Dubos Oleic Agar Base и Middlebrook 7H10 с добавками. Указанные питательные среды, в отличие от яичных сред - прозрачные, которые не содержат в составе фракции яичного желтка, что способствует прохождению света, что в конечном итоге обеспечивает четкую визуализацию при наличии зон лизиса микобактериофага.

Обнаружение фага в жидких средах. В две пробирки содержащих одинаковый объем питательных сред (Dubos Broth Base, Sauton's Fluid Medium, Kirschner Medium Base - Modi-fied) вносили по одной капле тест-культур: в одну из них добавляли исследуемый фаг, а вторая пробирка служила контролем роста культуры. Пробирки помещали в термостат до помутнения сред. Учет результатов производили только при наличии роста культуры в контроле, фактором который являлось помутнение среды. Отсутствие видимого роста или последующее просветление среды в пробирке с исследуемым материалом свидетельствовала о присутствии фага. Результаты представлены на рисунках 5 и 6.



Рисунок 5 - Рост на среде Dubos Broth Base



Рисунок 6 - Рост на среде Kirschner Medium Base

Как видно из рисунков 5 и 6, первая пробирка, слева в которую был внесен фаг, оставалась прозрачной, что указывает на его литическое действие, а в контрольной пробирке справа наблюдается помутнение питательной среды, что показывает рост микобактерий туберкулеза.

Выводы

Анализ литературных и собственных исследований свидетельствует о целесообразности применения для обнаружения фагов, прозрачные агаровые питательные среды, поскольку на них лучше видны зоны лизиса культуры в сравнении с яичными плотными питательными средами. Нами для дальнейшего использования были отобраны из плотных питательных сред: Dubos Oleic Agar Base, Middlebrook Agar Base с добавками, а из жидких питательных сред: Dubos Broth Base и Kirschner Medium.

Таким образом, для выращивания МБфагов были подобраны питательные среды, обеспечивающей максимальный бактериальный рост и создающей условия для оптимальной активности Мфага.

Литература

1. Красильников И.В. Препараты бактериофагов: краткий обзор современного состояния и перспектив развития / И. В. Красильников, К. А. Лыско, Е. В. Отрашевская [и др.] // Сибирский медицинский журнал.-2011.-№2-2.-Том 26.-С. 33-37.
2. Hendrix R.W. (2002) Bacteriophages: evolution of the majority. Theor Popul Biol 61: 471–480 [PubMed]
3. Jacobs-Sera D., Marinelli L.J., Bowman C, Broussard G.W., Guerrero Bustamante C, et al. (2012) On the nature of mycobacteriophage diversity and host preference. Virology 434: 187–201.
4. Piuri M., Jacobs W.R. Jr, Hatfull G.F. (2009) Fluoro mycobacteriophages for rapid, specific, and sensitive antibiotic susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis. PLOS ONE 4: e4870 doi:10.1371/journal.pone.0004870.
5. Gan Y. Characterization and classification of Bo4 as a cluster G mycobacteriophage that can infect and lyse M. Tuberculosis / Y. Gan, T. Wu // Arch. Microbiol. – 2014. – Vol.196, №3. – P. 209-218.
6. Rondyn L. Evaluation of fluoro mycobacteriophages for detecting drug resistance in Mycobacterium tuberculosis / L. Rondón, M. Piuri, W.R. Jr. Jacobs // J Clin Microbiol. – 2011. – Vol.49, №5. – P.1838-1842.
7. Габрилович И.М. Общая характеристика бактериофагов / Основы бактериофаги. - Минск.-1973.-С.5-24.
8. Васильев Д.А. Золотухин С.М. (Бактериофаги микроорганизмов, важных для растений, животных и человека./Монография с редактированием Васильевой, Золотухина С.М. Ульяновск, 2013 г., 311 стр.)
9. Hnatko, S.I. 1952. Concentric ring formation about plaques of M. phlei bacteriophage. Can. J. Public Health 43:54-59.
10. Вейсфейллер Ю.К. Биология и изменчивость микобактерий туберкулеза и атипичные микобактерии. Будапешт, 1975, С.274-295.
11. Hercik, F. 1959. Biophysik der Bakteriophagen. VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin. [German; Biophysics of Bacteriophages] OCLC 15258981.

Сырым Н.С., Еспембетов Б.А., Тургенбаев К.А., Сансызбай А.Р.

МИКОБАКТЕРИОФАГТЫ ОҚШАУЛАУ ҮШІН ҚОРЕКТІК ОРТАНЫ ТАҢДАУ

Аңдатпа

Мақалада микобактериофагты оқшаулау үшін оңтайлы белсенді жағдай жасайтын және бактерияның жоғары деңгейге өсуін қамтамасыз ететін қоректік ортаны таңдаудың зерттеу нәтижелері келтірілген.

Кілт сөздер: mycobacterium, tuberculosis, mycobacteriophage, сұйық және тығыз қоректік орта, микобактериялардың өсінділері.

Syrym N.S., Yespembetov B.A., Turgenbaev K.A., Sansyzbai A.R.

SELECTION OF NUTRIENT MEDIUM FOR ALLOTMENT MYCOBACTERIOPHAGES

Abstract

The article presents the results of research on the selection of nutrient media providing maximum bacterial growth and creating conditions for optimal activity for the isolation of mycobacteriophages

Key words: mycobacterium, tuberculosis, mycobacteriophage, liquid and dense nutrient medium, cultures of mycobacteria.

UDK 636.59: 636.5: 636.08

Shameyeva U., Janabekova G.K., Zhumageldiyev A.A., Khussainov D.M., Turabekov M.R.

Kazakh national agrarian university, Almaty

INFLUENCE OF FEED ADDITIVE ON EFFECTIVENESS OF INCUBATION OF EGGS OF THE BLACK AFRICAN OSTRICH

Annotation

The article presents the results of studying the egg-laying and incubation of eggs of the black African ostrich with the use of feed additives. In the experiment, females of a black African ostrich of 18 months of age were used, of which two groups of analogues of 12 individuals were formed. The daily diet of each ostrich included concentrated feed at the rate of 10 g / kg of live weight, crushed corn and corn silage 17 g / kg, alfalfa hay 20 g / kg, main food (green parts of plants) 13-20 g / kg live weight. Birds of the first group were control and took the accepted ration of feeding, ostriches of the second group additionally received the feed additive developed by us at the rate of 15 g / kg of feed. The experiment lasted for 140 days.

Key words: Ostrich egg, fitter additive, reproduction, incubator, hatchability.

Introduction

The effectiveness of breeding ostriches on farms largely depends on the level of their fertility. Increase in fertility is relevant for all bird species, even for chickens domesticated for another 4-7 thousand years before our era [1].

Ostriches, when breeding on farms in favorable conditions of feeding and keeping, lay at least 40 eggs per reproductive season [2].

So, for 20 weeks, or 140 days of the breeding season, the ostrich female can theoretically destroy 70 eggs, because it is physiologically able to lay only one egg in two days. As is known [2, 3], the process of egg formation (from ovulation to demolition) in ostriches lasts an average of two days (48 hours), while in other species of birds (chickens, turkeys, ducks, geese, etc.) only a day (an average of 24 hours). Therefore, the production of 30 eggs from 70 theoretically possible ostrich females over a 20-week breeding season (the egg-laying intensity is about 43% on average per season) should be considered a relatively good result. For example, from the geese of some heavy species, up to 20 eggs are produced in a 20-week breeding season (egg-laying rate is only 14.3%), although this species of bird is domesticated according to some estimates [3] even earlier than chickens. The ostriches, which are relatively newly domesticated (in 1864) and another half-wild bird, are used for the production of delicatessen on an industrial basis since about 1990 in the Republic of South Africa, Israel, the USA and some other countries, and since 2001 in Kazakhstan [2, 4].

For the production of hatching eggs, ostriches are used in breeding herds from 12 to 17 years [5,6]. The interval between generations in ostrich farming is 5-6 years, while in the chicken farming or in turkey breeding, for example, no more than 1 year. Therefore, not all methods and techniques used in traditional poultry farming in breeding for egg production increase are equally effective in ostrich farming, which indicates the need for their improvement or the development of new technical solutions in this special field of knowledge. It should also be noted that the duration of the reproductive season in ostriches can be up to 6-9 months (24-36 weeks) per year. According to the results of egg production, during the breeding season, the best layers for