

Еспембетов Б.А.*¹, Булатов Е.А.¹, Сармыкова М.К.¹, Серікбай Е.Б.¹, Самбетбаев А.А.²

¹РГП «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности»,
Жамбылская область, Кордайский район, пгт. Гвардейский, Казахстан,
*espembetov@mail.ru

²Казахский национальный аграрный исследовательский университет, г. Алматы, Казахстан

ВЫДЕЛЕНИЕ БАКТЕРИОФАГОВ ПРОТИВ ВОЗБУДИТЕЛЯ МЫТА ЛОШАДЕЙ - *STREPTOCOCCUS EQUI* И ИЗУЧЕНИЕ ИХ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ

Аннотация

Изучение биологических свойств мытного фага - это важный этап при создании биопрепаратов, фагоиндикации и идентификации бактерий. Главным признаком воздействия фага на чувствительной бактерии является их лизис, сопровождающийся выходом в среду новых вирионов фага.

Целью исследований является получение бактериофага для терапии мыта лошадей.

Новизной данной работы является то, что впервые в Казахстане проводятся исследования по изучению биологических свойств бактериофагов для терапии мыта лошадей, выделенных объектов внешней среды и биоматериала из хозяйств Алматинской области.

Объектами исследования служили бактериофаги, выделенные из образцов внешней среды, всего исследовано 19 проб. Для изучения биологических свойств в качестве индикаторных тест-культур были использована штамм *Str.equi*.

Все изучаемые фаги имели титр 10^7 - 10^9 по Аппельману и 10^9 - 10^{10} по Грациа, обладали выраженной специфичностью в отношении к *Streptococcus equi* и не проявляли активности в отношении *Streptococcus aureus* и *Escherichia coli*, они сохраняли литическую активность в течение 2 месяцев, были устойчивы к нагреванию в пределах 60°C - 95°C в течение 30 мин. Фаги были устойчивы к действию 10% раствора хлороформа в течение 45 мин.

Ключевые слова: мыт лошадей, бактериофаг, биологический материал, тест-штаммы, *Streptococcus equi*, объекты внешней среды, мутация, вакцина.

Введение

В Казахстане мыт является наиболее распространенной и наносящей значительный экономический ущерб болезнью табунных лошадей. При этом, среди лошадей заболевание мытом составляет до 48% из 100 возможных нозологических форм [1, 2, 3].

Департамент ветеринарии МСХ РК, начиная с 2007 года, существенно сократил применение иммунобиологических препаратов, в том числе, и противомытной вакцины.

В сложившейся ситуации коневодческие хозяйства страны стали использовать антибиотики. Нерациональное использование последних привело к появлению мультирезистентных, мутированных штаммов *Str.equi* (*Streptococcus equi*). Пассируясь среди неиммунного поголовья эти мутированные штаммы стали стабильными. В случае заражения ими у лошадей наблюдают нетипичную для мыта клиническую картину – отсутствие набухания подчелюстного лимфатического узла при высокой смертности заболевших, достигающей до 55-60%. Применение старых, оправдавших себя ранее, методов терапии не дают желаемого эффекта, так как вследствие мутаций у мытного стрептококка изменяются культуральные, морфологические, биохимические, а главное вирулентные свойства [4, 5, 6].

Между тем, в последние годы ряд авторов, в целях лечения различного рода микробных инфекций, таких, как дизентерия, стрептококковые, раневые и другие инфекции рекомендуют использовать препараты бактериофагов. На основании накопленного опыта, они все больше убеждаются в терапевтической эффективности бактериофагов по сравнению

с антибиотиками. Поэтому одним из основных и эффективных способов предотвращения мыта лошадей является своевременная и эффективная терапия, основанная на использовании современных препаратов – бактериофагов. В сложившейся ситуации, получение бактериофагов для терапии мыта лошадей, направленных на усовершенствование методов лечения мутированных штаммов *Str.equi* является теоретически оправданным и научно-обоснованным. При этом, данный шаг совпадает со стратегией Правительства РК, взявшего курс на по сдерживанию устойчивости к традиционным противобактериальным препаратам и производству новых терапевтических средств [7, 8].

В связи с вышеизложенным, усовершенствование терапии мыта лошадей путем внедрения новых методов лечения, с использованием бактериофагов против эпизоотических штаммов *Str.equi*, выделенных на территории Республики Казахстан является актуальной задачей и имеет большое научное значение и представляет огромный интерес для ветеринарной лабораторной практики [9].

Новизной работы является то, что впервые в Казахстане проводятся исследования по получению бактериофагов для терапии мыта лошадей, выделенных объектов внешней среды и биоматериала из коневодческих хозяйств. Бактериофаги по сравнению с антибиотиками обладают рядом преимуществ, они сами по себе нетоксичны и непатогенны для животных, и потому их можно вводить в больших количествах, не причиняя вреда организму реципиента.

Использование бактериофагов для лечения инфекционных заболеваний стимулирует факторы специфического и неспецифического иммунитета, что особенно эффективно для лечения хронических воспалительных заболеваний на фоне иммунодепрессивных состояний, бактерионосительства.

Объекты и методы исследований

Экспериментальная часть исследований проводилась в лаборатории микробиологии РГП «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности». Выполнение НИР

При работе с бактериофагами были использованы следующие методы:

Метод выделения бактериофагов;

Метод Аппельмана (серийных разведений);

Метод Грация (агаровых слоев);

Титрование фага на твердых средах;

Метод фаготипирования бактерий.

Для культивирования бактерий и их фагов были использованы питательные среды ГРМ агар и ГРМ бульон.

Результаты исследований

Образцы из объектов внешней среды привезенные из хозяйств Алматинской области - навески (100 г) почвы и навоза после тщательного растирания в стерильных фарфоровых ступках переносили в колбы, содержащие 150 мл ГРМ бульона, а также пробы из сточных вод (120 мл), Смывы из объектов внешней среды вносили в колбы, содержащие 30 мл (5-икратно концентрированной) этих же сред.

В колбах материал помещали в термостат для инкубирования в течение 3-х дней при 37°. Инкубируемый материал обогащали еженедельно 1 см³ густой взвеси тест - культур *Str.equi* выращенный на ГРМ бульоне.

Колбы ежедневно взбалтывали с целью улучшения аэрации инкубируемой смеси. По окончании срока инкубации очищали от механических примесей путем фильтрования через ватно-марлевый фильтр, надосадочную жидкость сливали в центрифужные пробирки и центрифугировали при 2500 об/мин, в течение 20 мин, затем фильтровали через стерилизующие фильтры *Steril filtrations system* CN - 115 ml 0,2. Полученный таким образом фильтрат исследовали на наличие в нем стрептофагов. В результате проведенных исследований в отношении бактерий выделено 6 бактериофагов в отношении *Str.equi*. объекты выделения бактериофагов приведены в **таблице 1**.

Таблица 1 - Объекты выделения бактериофагов из хозяйств Алматинской области

п/п	Название выделенных фагов	Источник выделения
1	<i>Str.equi</i> фаг № 1	Стоки из мест табунного содержания лошадей
2	<i>Str.equi</i> фаг № 5	Навоз из мест табунного содержания лошадей
3	<i>Str.equi</i> фаг № 6	Навоз из мест табунного содержания лошадей
4	<i>Str.equi</i> фаг № 10	Почва из мест табунного содержания лошадей
5	<i>Str.equi</i> фаг № 11	Почва в мест табунного содержания лошадей
6	<i>Str.equi</i> фаг № 16	Смывы объектов внешней среды

Как видно из таблицы 1, по отработанной нами методике выделены 6 фагов, из объектов окружающей среды.

Разработка режимов фильтрации фаголизатов

Фаголизат, приготовленный на питательном ГРМ бульоне, в котором инактивировали температурой 60°C – 65°C, в объеме 100 мл помещали в емкость аппарата с приемником для отфильтрованной жидкости, оснащенном свечами Шамберлана L-3 и подключали вакуумный насос для создания разрежения в приемной камере, при температуре 20°C, в течение 60 мин. По мере накопления жидкости в приемной камере, очищенный фаголизат сливали в стерильную емкость. Очищенный таким образом фаголизат микроскопировали, с применением окраски по Граму и засеивали на питательный агар с целью обнаружения жизнеспособных клеток, способных формировать колонии. Параллельно 100 мл очищенного фаголизата ставили в термостат при 30°C на 48 часов для контроля стерильности. С целью чистоты эксперимента в фаголизат, вносили культуру бактериальных клеток *Str.equi* и подвергали фильтрации, и помещали в термостат при 30°C на 48 час. Жизнеспособность бактериофагов и количество вирионов в фаголизате после фильтрации проверяли и сравнивали с исходным, методом агаровых слоев по Грация. Исследованы все выделенные бактериофаги *Str.equi*.

В результате полученных данных установлено, что титр исследуемых бактериофагов не изменился. После 48 часов термостатирования фаголизат, в который добавили культуры *Str.equi* и не подвергали фильтрации, помутнел. Другие фаголизаты остались прозрачными. На ГРМ агаре роста не обнаружено, что свидетельствует об отсутствии жизнеспособных клеток в отфильтрованном фаголизате. При микроскопии отфильтрованного фаголизата клеток не обнаружено.

Обработка режимов центрифугирования фаголизатов

Фаголизат, приготовленный на ГРМ бульоне, в котором инактивировали температурой 60°C – 65°C, центрифугировали в течение 10, 20, 30 минут при различной скорости вращения ротора 1500 об/мин, 3000 об/мин, 6000 об/мин, 9000 об/мин. После завершения центрифугирования определяли жизнеспособность бактериофагов методом агаровых слоев по Грация и производили микроскопирование фаголизата. Результаты представлены в **таблице 2**.

Таблица 2 – присутствие бактериальных клеток в мазках фаголизатов, окрашенных по Граму, при различных режимах центрифугирования

Время центрифугирования мин	Скорость вращения центрифуги об/мин			
	1500	3000	6000	9000
10	+	+	+	-
20	+	+	-	-
30	+	-	-	-

Примечание: + присутствие бактериальных клеток в поле зрения;
отсутствие бактериальных клеток в поле зрения.

В результате разработки режимов центрифугирования установлено, что наиболее оптимальным режимом центрифугирования является 30 минутная экспозиция при 6000 об/мин. Данный режим можно использовать также для центрифуг с объемом свыше 6 литров. Центрифуги с объемом свыше 6 литров, при указанных выше режимах, можно использовать в производстве биопрепарата полифага.

Количественное соотношение фага и культуры при культивировании

При исследовании условий культивирования выделенных бактериофагов бактерий *Str.equi* необходимо было выяснить оптимальное количественное соотношение фага и бактериальной культуры, для производства диагностического препарата. В отдельные опытные пробирки, содержащие стерильный 1,5% ГРМ бульон в объеме 4,5 мл (рН 7,0-7,0), вносили по 0,2 мл каждого выделенных фагов, затем в пробирки вносили 24 часовые культуры *Str.equi*, сначала 0,2 мл, затем 0,4 мл и т.д. постепенно доводя объем культуры до 2,5 мл. Параллельно ставился контроль. Для этого в пробирку, содержащую 1,5% РРМ бульон в объеме 4,5 мл (рН 7,0-7,0), вносили культуру бактерий *Str.equi* по 0,2 мл. Пробирки помещали в термостат и культивировали при температуре 37°C.

В результате проведенных исследований было установлено, что для бактериофагов бактерий *Str.equi* усредненным оптимальным соотношением бактериофага и культуры является соотношение 1:2, т.е. 0,2 мл фага к 0,4 мл тест - культуры *Str.equi*.

Исследование рН среды

Известно, что рН среды культивирования влияет на взаимодействие фага с бактериальными клетками. В наших экспериментах, значение рН в кислую сторону регулировали соляной кислотой, в щелочную гидроксидом натрия.

В опытные пробирки, содержащие стерильный 1,5% ГРМ бульон в объеме 4,5 мл вносили по 0,4 мл суточной культуры *Str.equi*. и по 0,2 мл выделенных бактериофагов, рН среды доводили до 3,0. Параллельно ставился контроль. Для этого, в пробирки, содержащие 1,5% ГРМ бульон в объеме 4,5 мл, вносили суточную культуру *Str.equi* по 0,2 мл. Пробирки помещали в термостат и культивировали при температуре: 35°C в течение 6 часов. Далее опыт повторяли, но уже культивирование проводили при значениях рН 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0 соответственно. Помутнение пробирки указывало на отсутствие лизиса, просветление в сравнении с контролем на наличие лизиса. Установлено, что выделенные 3 бактериофага бактерий *Str.equi* (фаги №1, 3 и 4), дали лизис при значении рН 7,0. При значениях рН 6,0 и 8,0 лизис наблюдался лишь у остальных 2 фагов, а при остальных значениях лизис не наступал. Решено в дальнейшей работе для культивирования бактериофагов *Str.equi* использовать значение рН 7,0.

Морфология негативных колоний выделенных бактериофагов бактерий

Бактериофаги *Str.equi* фаг №1, *Str.equi* фаг №6 имеют диаметр 3-4 мм. Бактериофаги *Str.equi* фаг №5, *Str.equi* фаг №10, *Str.equi* фаг №16 имеют диаметр негативных колоний 1-4 мм. Бактериофаги *Str.equi* фаг №11 имеет диаметр негативных колоний 1,5 мм и полностью прозрачны.

Биологические исследование полученных фильтратов производили на агаровой ГРМ среде, Суспензию *Str.equi* в количестве 0,2 см³ вносили в чашки Петри и растирали стеклянным шпателем по поверхности агаровых сред до полного впитывания. Затем чашки делили на 5 сектора и в каждый из них помещали по одной капле фильтрата. После подсыхания капель, чашки Петри переворачивали вверх дном и помещали в термостат при температуре 37°C. Просмотр чашек Петри осуществляли ежедневно в течение 2-х дней.

Литическую активность селекционированных бактериофагов определяли по методу Аппельмана и Грация. Определение литической активности бактериофагов методом Грация (определении количества активных фаговых частиц в 1 мл субстрата) проводили путем внесения образца в полужидкий агар (0,7%), содержащий чувствительную к фагу культуру, с последующим наслоением смеси на плотный ГРМ агар (1,5%) в чашке Петри, термостатированием и подсчетом количества негативных колоний. Бактериофаги проявили разную литическую активность на культурах бактериальных клеток как в жидкой среде, так

и на плотной среде. [9] Литическая активность выделенных бактериофагов по методу Аппельмана и титры фагов по Грациа представлены в **таблице 3**.

Таблица 3 – Литическая активность стрептофагов по Аппельману и титры фагов по Грациа в отношении к *Str. equi*

Вид бактериофага активных в отношении бактерий	Литическая активность по Аппельману	Литическая активность по Грациа. Количество фаговых частиц в 1мл
<i>Str.equi</i> фаг № 1	10^{-8}	3×10^8
<i>Str.equi</i> фаг № 5	10^{-5}	4×10^8
<i>Str.equi</i> фаг № 6	10^{-5}	5×10^9
<i>Str.equi</i> фаг № 10	10^{-7}	2×10^8
<i>Str.equi</i> фаг № 11	10^{-5}	3×10^9
<i>Str.equi</i> фаг № 16	10^{-8}	4×10^9

Нами установлено, что исследуемые фаги вызывали лизис с соответствующими культурами. Литическая активность фагов составила по Аппельману 10^{-5} - 10^9 , по Грациа 2×10^8 - 6×10^9 телец в 1 см³.

Исследование времени экспозиции бактериофагов и чувствительных к ним бактерий

В пробирку с 4,5 мл ГРМ бульон добавляли 0,2 мл индикаторной культуры и 0,2 мл исследуемого фага. Параллельно ставили контроль: ГРМ бульон засеянный индикаторной культурой без фага. Посевы инкубировали при температуре 37°C в течение 10-48 часов. После наступления лизиса пробирки с фагом обрабатывали хлороформом в соотношении 1:10. Литическую активность полученных фаголизатов исследовали методами Аппельмана и Грациа.

Установлено, что оптимальное время пассажа при температуре 37°C для выделенных фагов бактерий *Str.equi* различно. Оптимальное время экспозиции составило 22 и 30 часов для выделенных фагов. За это время происходит лизис индикаторной культуры (просветление среды по сравнению с контролем), литическая активность фагов составила от 10^{-8} до 10^{-9} по методу Аппельмана и от 7×10^8 до 4×10^9 по методу Грациа.

Время экспозиции фагов и чувствительных бактерий *Str.equi* кратное 10 и 23 часам не подходит культивирования системы фаг-бактерия, в связи с тем, что титр фага или не нарастает, или исчезает. При экспозиции фага с чувствительными бактериями в течение 14 часов происходит повторная адсорбция бактериофагов на бактериальных рецепторах, что приводит к снижению титра фага в фаголизатах. Результаты определения оптимального времени экспозиции фага и чувствительных бактерий представлены в **таблице 4**.

Таблица 4 – Оптимальное время экспозиции бактериофагов и чувствительных бактерий

Название фага	Оптимальное время экспозиции, час
<i>Str.equi</i> фаг №1	24
<i>Str.equi</i> фаг №5	26
<i>Str.equi</i> фаг №6	26
<i>Str.equi</i> фаг №10	28
<i>Str.equi</i> фаг №11	28
<i>Str.equi</i> фаг №16	29

По результатам полученных данных, для продолжения дальнейших исследований, решено выбрать время экспозиции бактериофагов и чувствительных бактерий 24 часов. Указанное время не влияет на качество фаголизатов и при этом не изменяет технологических режимов работы с фаголизатами.

Специфичность стрептококковых бактериофагов установлена классическим способом. Полученный фаголизат обрабатывали хлороформом и параллельно пропускали через стерилизующие фильтры для сохранения хлороформ-чувствительных фаговых частиц. Активность стрептофагов, подвергнутых температурной обработке, количество активных корпускул в 1 см³ стрептофагов (таблица 4).

Далее обработанных фаголизатов центрифугировали и исследовали по методу агаровых слоев. Наличие полноценного бактериофагов определяли визуально, осматривая бактериальный газон на предмет зон лизиса (негативных колоний), хорошо видимых на матовом фоне глубинного роста бактерий.

Специфичность выделенных фагов в отношении 3-х видов бактерий была изучена по их литической способности путем накапывания одной капли фаголизата на свежеприготовленные газоны исследуемых культур (таблица 5).

Таблица 5 - Специфичность стрептофагов в отношении к *Str.equi*

Виды стрептофагов	Виды бактерий			
	<i>Streptococcus equi</i>	<i>Streptococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	Контроль активности фагов
<i>Str.equi</i> фаг № 1	+	-	-	-
<i>Str.equi</i> фаг № 5	+	-	-	-
<i>Str.equi</i> фаг № 6	+	-	-	-
<i>Str.equi</i> фаг № 10	+	-	-	-
<i>Str.equi</i> фаг № 11	+	-	-	-
<i>Str.equi</i> фаг № 16	+	-	-	-
Примечание: «-» - отсутствие лизиса, «+» - лизис.				

Как видно из таблицы, стрептофагов специфичны в отношении к *Str.equi*. Степень устойчивости бактериофагов и клеток хозяев к инактивирующим факторам физического воздействия имеет теоретическое и практическое значение, поэтому при изучении биологических свойств фагов определение их чувствительности к таким агентам является обязательным.

Были проведены исследования по изучению термоустойчивости выделенных бактериофагов семейства *Enterobacteriaceae* и рода *Pseudomonas*.

Бактериофаги разводили 1:10 в МПБ (pH 7,4). Затем пробирки с разведенными фагами прогревали в ультратермостате при температуре от 60°C до 100°C с интервалом 5°C в течение 30 минут. Параллельно ставили контроль – фаги, разведенные 1:10 без прогревания. Количество негативных колоний определяли в 1 мл методом агаровых слоев по методу Грациа.

Прогревание фагов при 60-65°C не оказало значительного влияния на содержание активных корпускул фага в 1 мл. На МПА в чашках отмечался полный лизис индикаторной культуры. При прогревании до 70°C активность данного бактериофага начала снижаться, на газоне роста индикаторной культуры формировался разреженный рост негативных колоний. При прогревании фага при температуре 80°C количество негативных колоний насчитывалось 7×10^3 - 5×10^5 корпускул фага. Бактериофаги сохраняли свои исходные показатели титра при 60°C - 65°C. Затем, при каждом повышении температурного режима, наблюдалось снижение титра, а при прогревании выше 80°C, в 1 мл фаголизата активных корпускул фагов, по показателям негативных колоний не обнаружили (таблица 6).

Таблица 6 - Температурная устойчивость стрептофагов

Виды стрептофагов	Температурный режим, °C						
	60-65	65-70	70-75	75-80	80-85	85-90	90-95
<i>Str.equi</i> фаг № 1	9x10 ⁹	4x10 ¹⁰	1x10 ⁹	2 x 10 ⁹	1,1 x10 ⁹	1 x 10 ⁷	1x10 ⁷
<i>Str.equi</i> фаг № 5	4x10 ⁷	7x10 ⁸	8x10 ⁸	2 x10 ⁸	3 x 10 ⁸	1 x 10 ⁷	1x10 ⁷
<i>Str.equi</i> фаг № 6	1,7x10 ⁶	2x10 ⁵	2x10 ⁵	3 x10 ⁶	2 x 10 ⁵	2,6 x 10 ⁶	2x10 ⁵
<i>Str.equi</i> фаг № 10	1,2x10 ⁴	7x10 ⁵	7 x 10 ⁵	1,9 x10 ⁴	1,7 x 10 ⁵	1,7 x 10 ⁴	1,7x10 ⁴
<i>Str.equi</i> фаг № 11	3 x 10 ⁸	2x10 ⁸	2 x 10 ⁸	1,7x10 ⁷	1,7x10 ⁵	1,5x10 ⁸	1,1x10 ⁵
<i>Str.equi</i> фаг № 16	6 x 10 ⁷	4 x 10 ⁴	1 x 10 ⁴	3 x 10 ²	1,2x10 ⁴	3x10 ⁷	1 x 10 ⁷
Контроль активности фагов	4x10 ⁹	3,6 x10 ⁸	3,1 x 10 ⁸	1,4x10 ⁹	1,3x10 ⁷	1,0x10 ⁷	1,0 x10 ¹⁰

В результате исследований температурной устойчивости нами было установлено, что прогревание фагов в течение 30 мин при 60°C не оказывало влияния на их активность. Дальнейшее повышение температуры до 65-75°C приводит к потере активности фагов, температура в пределах 90-95°C вызывает полную инактивацию фагов.

Бактериофаги обычно устойчивее к хлороформу, чем клетки микроорганизмов, поэтому данный химический агент является хорошим средством для освобождения фаголизата от жизнеспособных бактерий. Для определения устойчивости фагов к воздействию хлороформа фаголизат обрабатывали хлороформом в соотношении 1:10 при постоянном встряхивании в течение 40 мин, активность фагов проверяли методом агаровых слоев через каждые 10 мин (таблица 7).

Таблица 7 - Устойчивость стрептофагов к воздействию хлороформа

Стрептофаги	Активность МБфагов после обработки хлороформом, количество активных корпускул в 1 см ³				Контроль активности
	10 мин	20 мин	30 мин	40 мин	
<i>Str.equi</i> фаг № 1	+	+	+	+	9x10 ⁹
<i>Str.equi</i> фаг № 5	+	+	+	+	4x10 ⁷
<i>Str.equi</i> фаг № 6	+	+	+	+	1,7x10 ⁶
<i>Str.equi</i> фаг № 10	+	+	+	+	1,2x10 ⁴
<i>Str.equi</i> фаг № 11	+	+	+	+	3 x 10 ⁸
<i>Str.equi</i> фаг № 16	+	+	+	+	6 x 10 ⁷

Таким образом, были выделены и изучены основные биологические свойства (морфология негативных колоний, литическая активность, спектр литической активности, температурная устойчивость и устойчивость к хлороформу) выделенных стрептофагов.

Выводы

В результате проведенных исследований в отношении бактерий *Str.equi* выделено и изучена 16 бактериофагов. Полученные результаты показали, что исследуемые стрептофаги являются специфичными по отношению к *Str.equi*.

В качестве физического фактора мы изучали действие высокой температуры на бактериофаги, а в качестве химического - действие хлороформа. В результате исследований температурной устойчивости нами было установлено, что прогревание фагов в течение 30 мин при 60°C не оказывало влияния на их активность. Дальнейшее повышение температуры до 65-75°C приводит к потере активности фагов, температура в пределах 92-95°C вызывает полную инактивацию фагов. Для определения устойчивости фагов к воздействию хлоро-

форма фаголизат обрабатывали хлороформом в соотношении 1:10 при постоянном встряхивании в течение 40 мин, активность фагов проверяли методом агаровых слоев через каждые 10 мин. В результате все фаги были устойчивыми к хлороформу.

Благодарность

Выражаем благодарность Комитету науки Министерства образования и науки Республики Казахстан: за финансирование грантового проекта ИРН АР 08855635 «Получение бактериофага для терапии мыта лошадей» 2020-2022 гг.

Список литературы

1. Сансызбаев А.Р. Мыт лошадей в Казахстане, (распространение, свойства возбудителя, разработка средств специфической профилактики и лечения). Автореф. Дис. д-ра вет.наук.- М., 1993. - С.41.
2. Бижанов А.Б. Роль стрептококков группы С в инфекционной патологии лошадей / А.Б. Бижанов, А.Р. Сансызбаев, Ш.О. Токеев // Вестн. Сельхознауки Казахстана. 1994. - №6. - С. 121-123.
3. Кайыпбай Б.Б. Лечение смешанного течения мыта и пастереллеза лошадей: автореф. ... канд. вет. наук. –Алматы, 2003. –27 с.
4. Lindahl Susanne. Streptococcus equi subsp. equi and Streptococcus equi subsp. Zooepidemicus. Doctoral Thesis. Swedish University of Agricultural Sciences. U., 2013. С. 75.
5. Бактериофаги: биология и применение / Ред.: Каттер Э., А. Сулаквелидзе. М.: Научный мир. 2012.
6. Еспембетов Б.А., Сырым Н.С., Шестаков А.Г., Васильев Д.А. Монография: «Практическое применение бактериофагов на территории РК». Ульяновск. 2019 г. 624 с.
7. Материалы международной научно-практической конференции «Бактериофаги: Теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности» / – Ульяновск: ГСХА им. П.А. Столыпина, 2013. – т. II – 182 с.
8. Сырым Н.С, Еспембетов Б.А. Подбор питательных сред для выделения микобактериофагов. «Ізденістер, нәтижелер – Исследования, результаты». №1(77) 2018. ISSN 2304-334-02. С.483-488.
9. Сырым Н.С., Еспембетов Б.А., Зинина Н.Н., Сансызбай А.Р., Нусупова С.Т. Биологические и молекулярно-генетические свойства эпизоотической культуры streptococcus equi, выделенной из патологического материала жеребенка. «Ізденістер, нәтижелер – Исследования, результаты». №4, 2020. ISSN 2304-334-02. С. 82-88.

References

1. Sansyzbaev A.R. Myt loshadei v Kazakhstane, (rasprostranenie, svoistva vozbuditelia, razrabotka sredstv spetsificheskoi profilaktiki i lecheniia). Avtoref. Dis. d-ra vet.nauk.- М., 1993. - S. 41.
2. Bizhanov A.B. Rol streptokokkov gruppy S v infektsionnoi patologii loshadei / A.B. Bizhanov, A.R. Sansyzbaev, Sh.O. Tokeev // Vestn. Selkhoznauki Kazakhstana. 1994. - №6. - S. 121-123.
3. Kaiypbai B.B. Lechenie smeshannogo techeniia myta i pasterelleza loshadei: avtoref. ... kand. vet. nauk. –Almaty, 2003. –27 s.
4. Lindahl Susanne. Streptococcus equi subsp. equi and Streptococcus equi subsp. Zooepidemicus. Doctoral Thesis. Swedish University of Agricultural Sciences. U., 2013. С. 75.
5. Bakteriofagi: biologii i primeneniye /Red.: Katter E., A. Sulakvelidze. M.: Nauchnyi mir. 2012.
6. Espembetov B.A., Syrym N.S., Shestakov A.G., Vasilev D.A. Monografiia: «Prakticheskoe primeneniye bakteriofagov na territorii RK». Ulianovsk. 2019 g. 624 s.

7. Materialy mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii «Bakteriofagi: Teoreticheskie i prakticheskie aspekty primeneniia v meditsine, veterinarii i pishchevoi promyshlennosti» / – Ulianovsk: GSKhA im. P.A. Stolypina, 2013. – Т. II – 182 s.

8. Syrym N.S., Espembetov B.A. Podbor pitatelnykh sred dlia vydeleniia mikobakteriofagov. «Izdenister, nәtizheler – Issledovaniia, rezultaty». №1(77) 2018. ISSN 2304-334-02. S.483-488.

9. Syrym N.S., Espembetov B.A., Zinina N.N., Sansyzbai A.R., Nusupova S.T. Biologicheskie i molekuliarno-geneticheskie svoistva epizooticheskoi kultury streptococcus equi, vydelennoi iz patologicheskogo materiala zherebenka. «Izdenister, nәtizheler – Issledovaniia, rezultaty». №4, 2020. ISSN 2304-334-02. S.82-88.

**Еспембетов Б.А.*¹, Булатов Е.А.¹, Сармыкова М.К.¹,
Серікбай Е.Б.¹, Самбетбаев А.А.²**

¹РМК «Биологиялық қауіпсіздік проблемалары ғылыми-зерттеу институты»,
Жамбыл облысы, Қордай ауданы, кмт. Гвардейск, Қазақстан, *espembetov@mail.ru,

²Қазақ ұлттық аграрлық зерттеу университеті, Алматы қаласы, Қазақстан.

ЖЫЛҚЫЛАРДЫ САҚАУЫНЫҢ STREPTOCOCCUS EQUI - ҚОЗДЫРҒЫШЫНА ҚАРСЫ БАКТЕРИОФАГТАРДЫ ОҚШАУЛАУ ЖӘНЕ ОЛАРДЫҢ БИОЛОГИЯЛЫҚ ҚАСИЕТТЕРІН ЗЕРТТЕУ

Аңдатпа

Биологиялық препараттарды жасауда, бактерияларды бөліп, ажыратуда сақау фагының биологиялық қасиеттерін зерттеу маңызды кезең болып табылады. Фагтың сезімтал бактерияларға әсер етуінің басты белгісі олардың лизисі болып табылады, ол қоректік ортаға фагтардың жаңа вириондарының шағуымен бірге жүреді.

Осы жұмыстың жаңалығы Қазақстанда алғаш рет Алматы облысының шаруашылықтарынан бөлінген сыртқы орта объектілері мен биоматериалдарды, жылқы малын емдеу үшін бактериофагтардың биологиялық қасиеттерін зерттеу.

Зерттелген барлық фагтар: Аппелман әдістемесі бойынша 10^7 - 10^9 және Грация әдістемесі бойынша 10^9 - 10^{10} титрге тең болды, *Streptococcus equi* - ге қатысты айқын белсенділік танытса, ал *Streptococcus aureus* және *Escherichia coli*-ге қатысты белсенділік танытпады, олар 2 ай бойы литикалық белсенділіктерін сақтап, 30 минут бойы 60°C-95°C арасында қызуға төзімді болды. Сақау фагтары 45 минут ішінде 10% хлороформ ерітіндісіне төзімді болды.

Кілт сөздер: жылқылардың сақау ауруы, бактериофаг, биологиялық материал, тест-штамдар, *Streptococcus equi*, сыртқы орта объектілері, мутация, екпе.

Yespembetov B.A.*¹, Bulatov E.A.¹, Sarmykova M.K., Serikbay E.B.¹, Sambetbaev A.A.²

¹RSE «Research Institute of biological safety problems», Zhambyl region, Kordaysky district,
village. Guards, Kazakhstan, *espembetov@mail.ru,

²«Kazakh national agrarian research university», Almaty, Kazakhstan

ISOLATION OF BACTERIOPHAGES AGAINST THE CAUSATIVE AGENT OF HORSE STRANGLES -STREPTOCOCCUS EQUI AND STUDY OF THEIR BIOLOGICAL PROPERTIES

Abstract

The study of the biological properties of the washing phage is an important stage in the creation of biological products, phagoindication and identification of bacteria. The main sign of the

phage's effect on sensitive bacteria is their lysis, accompanied by the release of new phage virions into the environment.

The novelty of this work is that for the first time in Kazakhstan, research is being conducted to study the biological properties of bacteriophages for the treatment of horse soap, isolated environmental objects and biomaterial from farms in the Almaty region.

All the studied phages had a titer of 10^7 - 10^9 according to Appelman and 10^9 - 10^{10} according to

Grazia, had a pronounced specificity in relation to *Streptococcus equi* and did not show activity against *Streptococcus aureus* and *Escherichia coli*, they retained lytic activity for 2 months, were resistant to heating in the range of 60°C-95°C for 30 minutes. The phages were resistant to 10% chloroform solution for 45 min.

Key words: horse soap, bacteriophage, biological material, test strains, *Streptococcus equi*, environmental objects, mutation, vaccine.