# САЛЬНИКОВА МАРИНА МИХАЙЛОВНА

# ВОЗДЕЙСТВИЕ АНТИБИОТИКОВ, ТЕПЛА И ГАММА-ОБЛУЧЕНИЯ НА УЛЬТРАТОНКОЕ СТРОЕНИЕ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ НЕКРОБАКТЕРИОЗА И БРУЦЕЛЛЕЗА

06.02.02 — Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология 03.03.04 — Клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Работа выполнена в ФГБУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности» (г. Казань).

Научные руководители: - доктор биологических наук,

чл.-корр. РАСХН, профессор **Иванов Аркадий Васильевич** 

- кандидат ветеринарных наук, с.н.с.

Саитов Вадим Расимович

Официальные оппоненты: - доктор биологических наук, профессор

кафедры биологии и методики преподавания Чувашского государственного педагогического

университета им. И.Я. Яковлева Воронов Леонид Николаевич

- доктор биологических наук, доцент кафедры ветеринарно-санитарной экспертизы Казанской государственной академии ветеринарной медицины

Юсупова Галия Расыховна

Ведущее учреждение: Государственное научное учреждение

«Институт экспериментальной ветеринарии

Сибири и Дальнего Востока», ГНУ ИЭВСиДВ СО РАСХН

Защита диссертации состоится «14» мая 2013 г. в 10.00 часов на заседании диссертационного совета Д-220.012.01 при ФГБУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности» (420075, г. Казань, Научный городок-2).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «ФЦТРБ-ВНИВИ».

Автореферат разослан «....» апреля 2013 г. и размещен на официальных сайтах ФГБУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» <u>www.vnivi.ru</u> и ВАК РФ <u>vak.ed.gov.ru.</u>

Ученый секретарь диссертационного совета, кандидат ветеринарных наук

В.И. Степанов

#### 1 ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Несмотря на достигнутые успехи в лечении и профилактике многих заболеваний бактериальной этиологии, ряд медиковетеринарных проблем, связанных с ними, прежде всего из-за недостаточной изученности сложных механизмов коэволюционных взаимоотношений микроба и хозяина, остаются актуальными и по настоящее время.

Некробактериоз и бруцеллез наиболее распространенные инфекции животных и человека, представляющие реальную угрозу их здоровью. Особо опасен бруцеллез - заболевание, создающее серьезные проблемы в эпидемиологическом и эпизоотологическом аспектах мирового масштаба (М.И. Гулюкин и др., 2008; М.М. Желудков и др., 2008; А.В. Иванов и др., 2010; М.J. Corbel 1997, Boschiroli M.L. e.a., 2001; Dal S. Elmas, 2012; S.C. Olsen, 2013).

В системе противоэпизоотических мероприятий при многих инфекционных заболеваниях животных специфическая профилактика играла и продолжает играть существенную роль. Однако, следует отметить, что существующие меры борьбы с некробактериозом и бруцеллезом животных с применением тех или вакцин требуют в ряде случаев принципиального совершенствования (А.А. Самоловов, 1991, 1998; П.К. Аракелян, 1997).

В этой связи, комплексное изучение свойств грамотрицательных бактерий, вызывающих данные инфекции, приобретает особую актуальность (И.А. Косилов, 1992; С.К. Димов, 1995; В.В. Сочнев и др., 1995, 1998; А.Н. Панин и др., 1998; А.В. Жаров и др., 2003; К.М. Салмаков и др., 2005; Д.А. Хузин, Х.Н. Макаев и др., 2010; F. Zhang et al, 2006; О. Megged et al, 2013; и мн. др.).

При этом принципиальной становится необходимость расшифровки механизмов внутренней перестройки бактериальных клеток, обуславливающих их устойчивость к антибактериальным средствам. В целях получения объективной информации по этому поводу электронная микроскопия является одним из эффективных инструментов исследователей.

Результаты анализа научной литературы в области биологических исследований свидетельствуют о возрастающем интересе к использованию микроскопических \_ технологий трансмиссионной электронной микроскопии, сканирующей конфокальной микроскопии (А.В. Феофанов, 2007; Д.Г. Смирнов, 2007; В.Р. Саитов и др., 2011; М. Hartmann et al, 2010). Выявляемые электронно-микроскопическими методами критерии, осуществлять общую морфологическую оценку (состояние нуклеоида, мембран, цитоплазмы, наличие особых структур, например, пилей), в значительной мере дополняют их физиологические характеристики на разных стадиях развития, объективно выявлять и наглядно демонстрировать на ультраструктурном уровне «морфологический ответ» различных факторов. Полученные воздействии данные использовать в процессе создания новых вакцинных и диагностических препаратов, или совершенствования существующих.

**Цель и задачи исследований.** Целью работы являлось изучение биологических свойств и ультраструктурных особенностей возбудителей некробактериоза и бруцеллеза с учетом воздействия на них антибиотиков, теплового и гамма-излучающего факторов.

В соответствии с целью решали следующие задачи:

- 1. Изучить биологические свойства и субмикроскопическую организацию штаммов *Fusobacterium necrophorum* «8TS630501», «12TSK630501», используя различные методы световой и электронной микроскопии.
- 2. Изучить ультратонкие изменения штамма *Fusobacterium necrophorum* «8TS630501» при воздействии антибиотиков с разными механизмами действия.
- 3. Изучить биологические свойства и охарактеризовать субмикроскопическую организацию вакцинных штаммов Brucella melitensis Rev-1, Brucella abortus штаммов 82 и R-1096.
- 4. Изучить ультратонкие изменения бруцелл при воздействии антибиотиков, температуры и гамма-облучения.

**Научная новизна**. При проведении экспериментальных исследований по теме диссертации впервые:

- 1. Изучена ультраструктура клеток штаммов *Fusobacterium necrophorum* «8TS630501», «12TSK630501», выявлены морфологические изменения периплазматического пространства клеток фузобактерий во время их роста, наличие везикул внешней мембраны на клеточной поверхности, способность клеток к адгезии.
- 2. Проведен анализ жизнеспособности и изменений ультраструктуры клеток фузобактерий при воздействии антибиотиков цефтиофура натрия, тилозина тартрата и фосфомицина в зависимости от механизма их действия.
- 3. Изучена ультраструктура клеток вакцинных штаммов *Brucella melitensis* Rev-1 (S колонии), *Brucella abortus* штаммов 82 (SR форма колоний) и R-1096 (R колонии), идентифицированы везикулы внешней мембраны. У клеток *Brucella melitensis* Rev-1 и *Brucella abortus* R-1096 выявлены придатки клеточной поверхности, которые, с учетом имеющихся литературных данных, можно охарактеризовать, как пили (фимбрии) алгезивного типа.
- 4. Выявлена ультраструктура бруцелл, с учетом воздействия температуры, гамма-облучения и антибиотиков. Получены данные, которые вносят существенный вклад в обоснование механизмов возникновения и сохранения устойчивости бруцелл к тетрациклину.

**Теоретическая и практическая значимость работы**. Полученные экспериментальные данные вносят существенный вклад в изучение ультраструктурных особенностей возбудителей некробактериоза и бруцеллеза с учетом воздействия на них антибиотиков, теплового и гамма-излучающего факторов и могут быть использованы при разработке и совершенствовании вакцинных и диагностических препаратов, схем их

применения не только при указанных болезнях, но и служить основой для дальнейших исследований при других инфекциях животных.

«Методические Представленные В работе рекомендации ПО электронно-микроскопическим исследованиям биологических объектов» научно-исследовательских быть применены В лабораториях, направлениями биологических занимающихся различными дисциплин (микробиологией, цитологией, эмбриологией и т.д.).

#### Основные положения, выносимые на защиту:

- Биологические свойства и субмикроскопическая организация штаммов *Fusobacterium necrophorum* «8TS630501» и «12TSK630501», морфологический процесс изменения периплазматического пространства клеток фузобактерий и образование везикул внешней мембраны на клеточной поверхности во время их роста.
- Ультраструктура клеток вакцинных штаммов бруцелл. Выявление на внешней поверхности бактериальных клеток везикул внешней мембраны и придатков, идентифицированных, как пили.
- Ультратонкие изменения бруцелл и фузобактерий при воздействии антибиотиков, температуры и гамма-облучения.

Апробация материалов диссертации. Основные материалы диссертационной работы доложены, обсуждены и одобрены на ежегодных заседаниях ученого совета ФГБУ ФЦТРБ «ВНИВИ» по итогам НИР (Казань, 2008 - 2012), а также на международных конференциях, «Биотехнология: токсикологическая радиационная и биологическая безопасность» (Казань, 2010) и «Актуальные проблемы сельского хозяйства горных территорий» (Горно-Алтайск, 2011).

**Публикация результатов исследований**. По материалам диссертации опубликовано 6 научных работ, в том числе 2 статьи в рекомендованных ВАК изданиях, а также методические рекомендации и методическое пособие, рассмотренные и утвержденные РАСХН.

**Объём и структура работы**. Диссертация изложена на 140 страницах компьютерного текста и состоит из общей характеристики работы, обзора литературы, методов и результатов собственных исследований, обсуждения, выводов, практических предложений и списка литературы. Работа иллюстрирована 53 рисунками и содержит 4 таблицы. Список литературы включает 181 литературных источника, в том числе 95 зарубежных авторов.

# 2 СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ 2.1 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

# 2.1.1 Бактериальные штаммы и условия культивирования

Работа выполнена в лабораториях электронной микроскопии, биотехнологии и изучению бруцеллеза Федерального центра токсикологической, радиационной и биологической безопасности (ФЦТРБ-ВНИВИ) в период с 2009 по 2013 год по теме «Биологическая безопасность» № гос. рег. 01200202602

 $\Phi$ узобактерии. Для исследований были выбраны Fusobacterium necrophorum «8TS630501» и «12TSK630501», выделенные из патологического материала от больных животных в неблагополучных по некробактериозу хозяйствах: депонированные в ГНЦ ВБ «Вектор» НИИ ККМ. Для электронно-микроскопических исследований были использованы одно или двухсуточные культуры этих штаммов, выращенные в жидкой питательной среде на основе ФГПЭМ (ферментативный гидролизатплацентарной эмбрионально-маточной массы) с добавлением 0,5% глюкозы и 10% нормальной сыворотки крупного рогатого скота. Бактериальную суспензию культур F. necrophorum с концентрацией 30 млрд. м.к./мл готовили на физиологическом растворе по оптическому стандарту мутности, полученному из ГНИИСК им. Л.А. Тарасевича. Осадок культуры, полученный центрифугированием при 5000 об/мин в течение 15 мин, промывали трижды.

Бруцеллы. Для исследований использовали культуры вакцинных штаммов Brucella abortus 82, R-1096 и Brucella melitensis Rev-1. Для электронно-микроскопических исследований культуру выращивали течение 2 – 3 суток на питательной среде ППГА (печеночный агар). Бактериальную суспензию готовили на физиологическом растворе в концентрации 10 млрд. м.к./мл. Осадок культуры, полученный центрифугированием при 5000 об/мин в течение 15 мин однократно промывали.

### 2.1.2 Антибиотики, используемые в работе

На *Fusobacterium necrophorum* «8TS630501» и «12TSK630501» проверяли действие противомикробной активности антибиотиков цефтиофур натрия, тилозина тартрата и фосфомицина. Противомикробной действие антибиотика окситетрациклина изучали на культуре исходного штамма *Brucella abortus* 82 и тетрациклинустойчивого – 82Tr.

### 2.1.3 Физические факторы, используемые в работе

Инактивацию проводили на штаммах B. abortus 82 и B. melitensis Rev-1. Гамма-инактивированную культуру получали облучением на гаммаустановке «Исследователь»,  $Co^{60}$  с мощностью экспозиционной дозы 7,14х10-2 Кл/кг·сек. Тепловую обработку проводили при t -  $80^{\circ}$ C, 30 мин на водяной бане. После воздействия физическими факторами осуществляли оценку жизнеспособности.

### 2.1.4 Микробиологические методы анализа

Фузобактерии. При изучении культурально-морфологических и биохимических свойств указанных штаммов фузобактерий применяли следующие тесты: окрашивание и микроскопия мазков; выращивание культур в среде Китт-Тароцци, определение сахаролитических свойств и определение активности штамма при подкожном заражении суточной бульонной культурой белых мышей.

Оценку противомикробной активности антибиотиков цефтиофур натрия, тилозина тартрата и фосфомицина на *Fusobacterium necrophorum* штаммов «8TS630501» и «12TSK630501» проводили согласно методикам,

предложенным Г.Н. Першиным (1975) и Ф.И. Коган (1972). При этом использовали разведения на физрастворе каждого ИЗ антибиотиков по активно действующему веществу с концентрацией от 0,12 до 125 мкг/мл. Активность антибиотиков определяли в условиях термостата (37°C). Для этого в бактериологические пробирки с одинаковыми объемами (по 2 мл) растворов испытуемых антибиотиков с концентрацией от 0,12 до 125 мкг/мл вливали по 2 мл баксуспензии в концентрации 30 млрд. м.к./мл тщательно встряхивали и помещали в термостат на 30 минут. Контролем служили пробы без антибиотиков. С целью учета противомикробного действия, из каждой пробы через 30 мин контакта исследуемого антибиотика Fusobacterium necrophorum штаммов «12TSK630501» осуществляли высевы на среду Китт-Тароцци с добавлением сыворотки крови крупного скота. нормальной рогатого инкубировали в течение 7 суток, учитывая рост бактерий. Во всех случаях бактерицидность антибиотиков оценивали на основании отсутствия или наличия роста культуры F. necrophorum в посевах на указанной среде.

Для приготовление образцов для электронной микроскопии использовали суспензию фузобактерий штамма «8TS630501» из пробирок с концентрацией 31,5 и 125 мкг/мл каждого антибиотика.

культурально-морфологических Бруцеллы. При изучении биохимических свойств указанных штаммов бруцелл применяли следующие тесты: окрашивание и микроскопия мазков; выращивание культур на печёночно-пептонном глюкозо-глицериновом агаре и бульоне (ППГГА, ППГГБ, рН 6,8-7,2); определение потребности в углекислом газе (СО2); образование сероводорода (H2S); фаготипирование; способность роста на средах с пенициллином, а также с эритритолом; пробы термоагглютинации и акрифлавином; окрашивание колоний ПО Уайт-Вилсону; агглютинабельность бруцеллезных S-R-В И антисыворотках монорецепторных «А» и «М» - сыворотках; способность роста на средах с красками фуксин и тионин.

Оценку противомикробной активности антибиотика тетрациклина проверяли на культуре исходного штамма *Brucella abortus* 82 и *Brucella abortus* 82 Тг. Использовали раствор окситетрациклина для инъекций на физрастворе в концентрациях 15 и 30 мкг/мл. В пробирках смешивали равные количества баксуспензии в концентрации 10 млрд. м.к./мл культуры бруцелл и раствора антибиотика, выдерживали при комнатной температуре в течение 30 мин, 1 и 2 часов.

#### 2.1.5 Светооптический метод исследования

Окрашивание мазков осуществляли по Граму. Просмотр мазков под микроскопом Axio Imager A2 Carl Zeiss (Германия) на базе лаборатории электронной микроскопии кафедры зоологии беспозвоночных и функциональной гистологии К(П)ФУ.

2.1.6 Методы приготовления электронно-микроскопических препаратов и условия микроскопирования

*Метод* негативного контрастирования. Каплю исследуемой баксуспензии наносили на медные сетки, покрытые формваровой пленкой, контрастировали 2% водным раствором уранилацетата 1 мин при комнатной температуре, промывали дистиллированной водой, просушивали, а затем просматривали на электронном микроскопе JEM 100CX-2 («Jeol» Japan).

Метод ультратонких срезов. Осадок культуры, центрифугированием, заключали в агар-агар (Иванов А.В. и др., 2011). Кусочки, заключенной в агар-агар культуры, вырезали и фиксировали в 1% растворе глутарового альдегида (SERVA, Германия) на 0,1 М фосфатном буфере рН 7,4 течение 12 ч в холодильнике с последующей фиксацией в 2% растворе четырехокиси осмия (Московский химзавод) на том же буфере в течение 2 ч при комнатной температуре. После дегидратации образцы заключали в смесь эпоновых (Epon-812, MNA, DDSA) смол (SERVA, Германия). Ультратонкие срезы получали на ультрамикротоме LKB-3 и изучали в электронном микроскопе JEM 100CX-2 («Jeol» Japan). Съемку проводили на фототехническую пленку AGFA ORTHOCHROMATIC. Для получения микрофотографий негативы сканировали на сканере EPSON PERFECTION 4990 PHOTO с разрешением 600 dpi.

Метод сканирующей электронной микроскопии. Осадок культуры фиксировали, обезвоживали, высушивали путем перехода критической точки и напыляли золотом. После этого объект просматривали под сканирующим электронным микроскопом LEO -1420 Carl Zeiss (Германия) в ЦКП ИБВВ (Институт биологии внутренних вод) РАН, п. Борок, Ярославской области.

иммуноцитохимических исследований. Осадок фиксировали 2% параформальдегид, 0,5% раствор глутарового альдегида на 0,1 М фосфатном буфере рН 7,4 с добавлением 0,1 М сахарозы, с постфиксацией в 1% растворе четырехокиси осмия с добавлением 0,1 М сахарозы на том же буфере в течение 1 ч при комнатной температуре. Для сохранения антигенной активности в тканях в качестве смолы для пропитки клеток использовали LRWhite Resin (TED PELLA, INC). В работе первичные антигену использовали кроличьи антитела К necrophorum «8TS630501», полученные в лаборатории Fusobacterium биотехнологии ФГБУ «ФЦТРБ – ВНИВИ», и вторичные антикроличьи антитела (TED PELLA. INC.), конъюгированные с коллоидным золотом (5 нанометров диаметре), любезно предоставленные сотрудниками лаборатории электронной микроскопии ИББР Казанского научного центра РАН. Иммуноцитохимические реакции проводили на ультратонких срезах, монтированных на никелевые сетки, покрытые формваровой пленкой по общепринятой схеме.

# 2.2 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЕДОВАНИЙ

# 2.2.1 Исследования возбудителей некробактериоза

# 2.2.1.1 Культурально-биохимические свойства фузобактерий

Наблюдениями установлено, что начальная стадия роста бактерий в среде на основе ФГМПЭМ происходила в нижних слоях, а затем перерастала в верхние слои питательной среды. У всех культур отмечалось

газообразование, интенсивность которого варьировала в зависимости от штамма. Максимальное накопление бактериальной массы регистрировали через 18 часов культивирования. Изучение биохимических свойств показало, что штаммы «8TS630501» и «12TSK630501» продуцировали индол и сероводород. Анализ сахаролитических свойств выявил, что штаммы «8TS630501» и «12TSK630501» расщепляли: глюкозу, лактозу, галактозу, дульцит, раффинозу, манит и сахарозу. Среды с содержанием мальтозы и глицерина оставались без изменения. Арабинозу ферментировал только штамм «8TS630501».

При светооптическом исследовании фузобактерий регистрировали палочковидные клетки различной длины (рис. 1, 1A). Многие клетки, удерживаясь друг за друга терминальными участками, формируют длинные нити. В цитоплазме просматривается зернистость темно-фиолетового цвета.

### 2.2.1.2 Негативное контрастирование

Методом негативного контрастирования, установили: ширина обоих штаммов колеблется от 0,3 до 0,67 мкм, штамм «8TS630501» достигает длины до 25 мкм, а штамм «12TSK630501» - 12 мкм, что в 2 раза короче.

клеточной поверхности наблюдали шарообразные везикулы внешней мембраны. На препаратах содержимое некоторых клеток не просматривается, ЭТИ клетки, как правило, короче, округлыми терминальными участками, вероятно, они находятся на фазе активного роста. Среди их внутреннего содержимого, встречается агрегат РНП (рис. 2, 3). В других клетках хорошо различимо очень плотное внутреннее содержимое, с периплазматическим пространством, которое образует измененным выпячивания в сторону цитоплазмы. Эти клетки, вероятно, находятся на стадии стационарного роста. Анализ образцов показывает, что фузобактерии обычно образуют скопления. Размеры клеток, с измененным перипластом, реформируются в сторону увеличения длины и небольшого уменьшения ширины. Количество клеток на стационарной стадии развития в культуре временем культивирования. Вокруг vвеличивается co таких обнаруживали больше везикул и пузырьков, наблюдали и свободное выделение внутреннего содержимого через разрывы клеточной стенки в окружающую среду.

# 2.2.1.3 Сканирующая электронная микроскопия

На микроснимках, полученных методом сканирующей электронной микроскопии, обращают на себя внимание сферические везикулы и пузырьки, которые располагаются вокруг клеток или непосредственно на их поверхности. Размеры малых везикул варьируются от 80 до 170 нм, пузырьки имеют размеры от 250 до 600 нм. Можно наблюдать процесс формирования таких везикул (рис. 4). При увеличении времени культивирования до 2 суток увеличивается количество везикул и пузырьков, клетки становятся закрученными.

В культуре фузобактерий, отдельно расположенные клетки являются редкостью, обнаруживается склонность к образованию скоплений, из-за способности склеиваться друг с другом. Вероятно, способность клеток к

слипанию, проявляется из-за наличия адгезивных белков в клеточных стенках фузобактерий.

### 2.2.1.4 Трансмиссионная электронная микроскопия

Электронно-микроскопическими исследованиями образцов по методу ультратонких срезов регистрировали клетки фузобактерий палочковидной формы. На снимках были обнаружены гантелевидные делящиеся бактерии, в которых хорошо идентифицировалась перетяжка.

Внеклеточные структуры. Вокруг клеток или в непосредственной близости с наружной мембраной клеточной стенки были видны сферические везикулы, ограниченные мембраной размером 45 — 250 нм с электронносветлым содержимым, которые, вероятно, отшнуровываются от внешней мембраны клеточной стенки.

Строение клеточной стенки и плазматической мембраны. На ультратонких срезах (рис. 5) просматривается извилистая многослойная клеточная стенка и плазматическая мембрана. Между клеточной стенкой и плазмалеммой имеется периплазматическое пространство. Клеточная стенка фузобактерий имеет план строения идентичный всем грамотрицательным бактериям. Иммуноцитохимическими методами на ультратонких срезах выявили, что антиген штамма Fusobacterium necrophorum «8TS630501» находится в составе наружной мембраны клеточной стенки.

Периплазматическое пространство. На ультратонких срезах (рис. 5-7), как и на препаратах, подготовленных методом негативного контрастирования (рис. 2, 3), прослеживали картину процесса изменения периплазматического пространства клеток фузобактерий. По мере роста клеток происходит неравномерное увеличение периплазматического пространства (рис. 7) во внутреннюю часть клетки, при этом ширина перипласта достигает 0,1 - 0,2 мкм. Причем клетки штамма «12TSK630501» в большей степени подвержены изменению. При морфометрическом подсчете с помощью программы Axio Vision Rel. 4.8 Carl Zeiss (Германия) площадь периплазматического пространства на ультратонких срезах клеток штамма «12TSK630501» увеличивается во время роста на 43%, а у клеток штамма «8TS630501» всего лишь на 14,7%.

*Нуклеоид*. В зоне нуклеоида (рис. 5) отчетливо просматриваются нити ДНК. Цитоплазма в области нуклеоида имеет среднюю электронную плотность, мало рибосом, полисом и полностью отсутствуют включения.

Цитоплазма. Ультраструктура фузобактерий очень цитоплазмы гетероморфна. Гиалоплазма характеризуется высокой электронной плотностью и наличием мелкогранулярных компонентов. При изучении ультратонкого строения фузобактерий мы обнаружили структуры, которую интерпретировали как рибонуклеопротеидный (РНП) агрегат. Агрегат РНП (рис. 5, 6) фузобактерий имеет размеры 0.2 - 0.3 мкм и очень плотную структуру, это делает его видимым не только на ультратонких срезах, но и при негативном контрастированиии и световой микроскопии, видимо, это самые плотные участки клетки. По периферии в большом количестве

#### Световая микроскопия

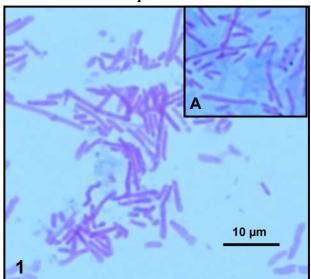
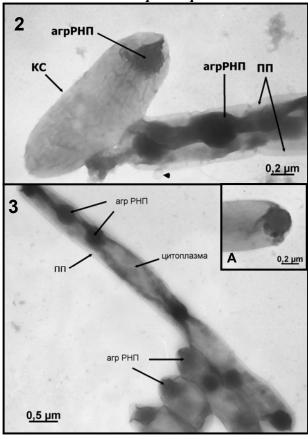


Рис. 1. Fusobacterium necrophorum штамм «8TS630501» 6 часов культивирования. Рис. 1А. штамм «12TSK630501» 22 часа культивирования, просматривается зернистость.

Рис. 2. *F. necrophorum* «8TS630501». Короткая стрелка – везикула внешней мембраны.

Рис. 3. F. necrophorum «12TSK630501». Рис. 3A. Участок клетки с агрегатом РНП.

## Негативное контрастирование



#### Сканирующая электронная микроскопия

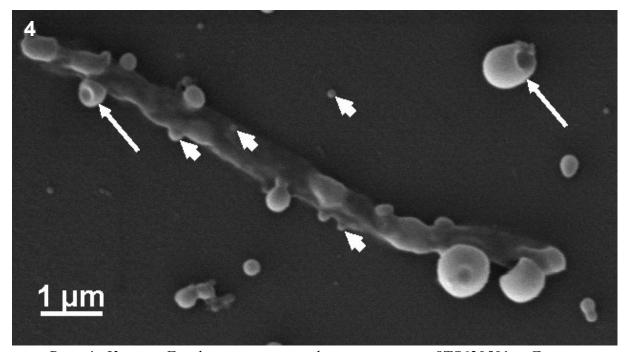
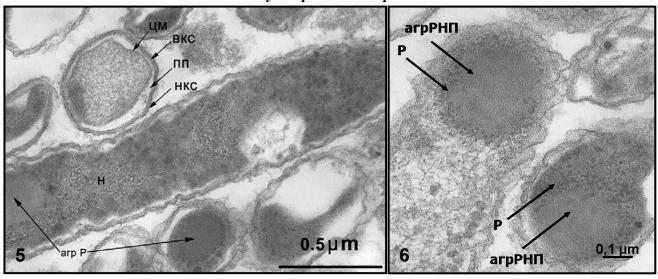


Рис. 4. Клетки *Fusobacterium necrophorum* штамма «8TS630501». Двухсуточная культура. Короткие стрелки показывают везикулы внешней мембраны, длинные стрелки – крупные пузыри.

 $Условные обозначения: \Pi\Pi$  - периплазматическое пространство, KC – клеточная стенка, агрРНП – агрегат рибонуклеопротеидов.

#### Метод ультратонких срезов



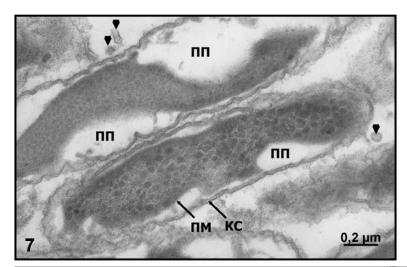


Рис. 5-7. Fusobacterium necrophorum «12TSK630501».

Рис. 5. Продольные и поперечные срезы клеток.

Рис. 6. Участок клетки с агрегатом РНП.

Рис. 7. Клетки с измененным периплазматическим пространством. Короткие стрелки показывают везикулы внешней мембраны.

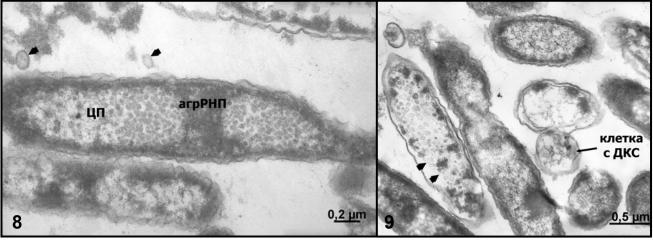


Рис. 8. *F. necrophorum* штамма *«8TS630501»* после воздействия цефтиофура натрия 31,2 мкг/мл 30 мин. Стрелками указаны везикулы внешней мембраны.

Рис. 9. *F. песторногит* штамма *«8ТS630501»* после воздействия цефтиофура натрия 125 мкг/мл 30 мин. Короткие стрелки указывают разрыв плазматической мембраны.

Условные обозначения: ЦП — цитоплазма, ВКС — внутренний слой клеточной стенки; НКС - наружная мембрана клеточной стенки; КС — клеточная стенка; Н — нуклеоид; ПП — периплазматическое пространство; ПМ — плазматическая мембрана, агрРНП — агрегат рибонуклеонротеидов, ДКС — дефект клеточной стенки.

#### Метод ультратонких срезов

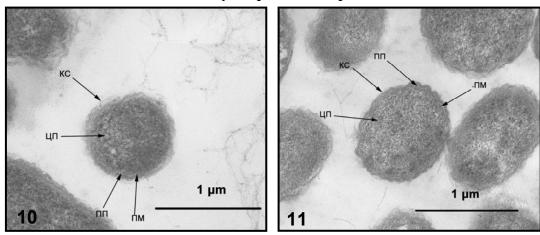


Рис. 10. Brucella melitensis штамм Rev-1. Puc.11. B. abortus штамм R-1096.

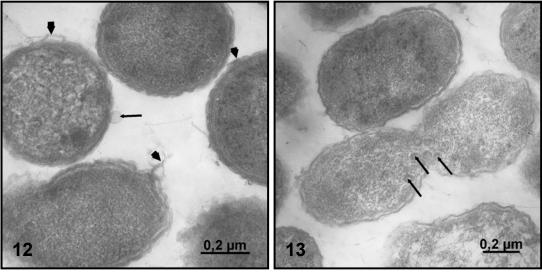


Рис. 12. *В. abortus* штамм R-1096. Длинной стрелкой указана везикула внешней мембраны, короткими - показаны пили. Рис. 13. *Brucella abortus* штамм R-1096. Стрелками указаны внутрицитоплазматические мембранные образования.

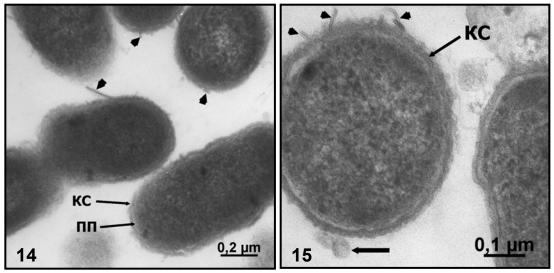


Рис. 14, 15. *В. melitensis* Rev 1. Короткие стрелки показывают придатки клеточной поверхности – пили, длинная стрелка – везикулы внешней мембраны.

 $\it Условные \ oбозначения: \ \Pi - \$  цитоплазма,  $\it \Pi\Pi - \$  периплазматическое пространство;  $\it KC- \$  клеточная стенка;  $\it \PiM- \$  плазматическая мембрана,  $\it BK- \$  включения.

#### Метод ультратонких срезов

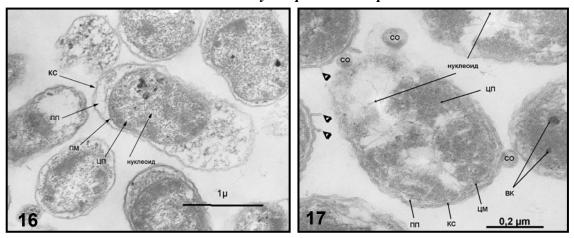


Рис. 16, 17. *В. melitensis* штамма Rev -1 после гамма-облучения (Рис. 16) и термообработки (Рис. 17). Короткие стрелки показывают придатки клеточной поверхности - пили.

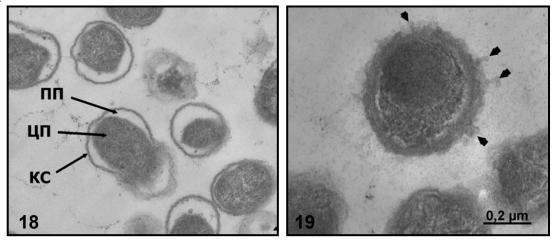


Рис. 18, 19. Исходного штамм B. abortus 82 после выдерживания в среде с тетрациклином 30 мкг/мл 30 мин (Рис. 18) и 1 час (Рис. 19). Короткие стрелки показывают мелкие везикулы внешней мембраны.

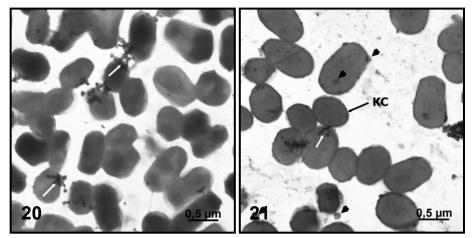


Рис. 20, 21. Исходный штамм B. abortus 82 (Рис.20) и тетрациклинрезистентный . B. abortus 82 Tr (Рис. 21) после выдерживания в среде с тетрациклином 15мкг/мл 30 мин. Белые длинные стрелки показывают частицы антибиотика.

Условные обозначения: КС — клеточная стенка, ЦП — цитоплазма, ПП - периплазматическое пространство; КС — клеточная стенка; ПМ — плазматическая мембрана; СО — везикулы внешней мембраны.

располагаются рибосомы (25 нм) и полирибосомы, возможно, РНК-полимеразы, и, здесь идут процессы транскрипции и трансляции.

В фузобактериях с измененной формой перипласта, т.е. клетки на стационарной фазе, отмечается уплотнение цитоплазмы, но при этом клетки выглядят функционально активными, просматривается нуклеоид, несколько структур агрегата РНП, сохраняются все виды зернистости.

Итак, электронно-микроскопические исследования образцов по методу показали клеточную ультратонких срезов стенку характерную грамотрицательных микроорганизмов, внешней везикулы Цитоплазма содержит включения и агрегат РНП. Кроме этого, отмечены морфологические периплазматического изменения пространства фузобактерий по мере роста клеток.

2.2.1.5 Оценка жизнеспособности фузобактерий при воздействии антибиотиков

Установлено, что наиболее высокую антимикробную активность проявил антибиотик цефтиофур натрия, механизм действия которого связан с ингибированием процесса синтеза клеточной стенки (табл. 1). Ингибитор синтеза белка антибиотик тилозин тартрат оказался менее эффективным для *Fusobacterium necrophorum* штаммов «8TS630501» и «12TSK630501». Фосфомицин по своей активности занял промежуточное положение.

Таблица 1. Оценка антимикробной активности АБС.

Антибактер- иальные средства (АБС)	Штамм	Количество активно действующего вещества субстанции антибиотиков (мкг/мл), экспозиция 30 минут										Контроль
		125	62,5	31,2	15,6	7,8	3,9	1,8	0,45	0,23	0,12	Ко
Цефтиофур натрия	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Тилозин тартрат	8	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	12	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
Фосфо- мицин	8	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
	12	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+

Примечание: «-» отсутствие роста бактерий; «+» наличие роста.

При изучении влияния антибиотиков на ультраструктуру F. necrophorum штамма «8TS630501», отмечен морфологический ответ после апробации всех антибиотиков. Максимальные изменения ультраструктуры отмечены после воздействия антибиотиком цефтиофур натрия (рис. 8, 9). Результаты изучения ультраструктурной картины постантибиотического эффекта при воздействии антибиотиков на фузобактерии показала, что на первых этапах происходят изменения цитоплазмы, конденсирование внутрицитоплазматических компонентов, что влечет за собой постепенное ингибирование белоксинтезирующего комплекса. Вероятно затем идет

нарушение фибриллярных структур ДНК и соответственно процессов деления клеток. Параллельно с этими явлениями дестабилизируется проницаемость клеточной мембраны, что в конечном итоге, приводит к увеличению периплазматического пространства, разрывам плазматической мембраны клетки и лизису клеток.

### 2.2.2 Исследования возбудителей бруцеллеза

2.2.2.1 Культурально-биохимические свойства вакцинных штаммов B.abortus 82, R-1096 и B.melitensis Rev 1

Исследования показали, что по окраске колоний и другим культурально-биохимическим свойствам штаммы *B. abortus* 82 – в SR – форме, *B. melitensis* Rev 1 находятся в S- форме, и имеют соответствующие признаки. Вакцинный штамм *B. abortus* R-1096 находится в стабильной R-форме. По основным свойствам он соответствует характеристикам бруцелл в R-форме. Его минимальная инфицирующая доза для морских свинок 1000 м.к., а у вирулентных штаммов 5 м.к. т.е. в 200 раз больше.

### 2.2.2.2 Ультратонкое строение бруцелл

Электронно-микроскопическому исследованию методом получения ультратонких срезов подвергли клетки вакцинных штаммов *Brucella melitensis* Rev-1 (S – колонии), *Brucella abortus* штаммов 82 (SR форма колоний) и R-1096 (R – колонии).

Внеклеточные структуры. Вокруг клеток или в непосредственной близости от наружной мембраны клеточной стенки были видны ограниченные мембраной сферические пузырьки (рис. 12, 15) размером 85 — 200 нм с электронносветлым содержимым, которые, вероятно, отшнуровываются от внешней мембраны клеточной стенки.

Придатки клеточной поверхности. На внешней поверхности клеток просматриваются мембраноподобные образования, возможно (с учетом имеющихся литературных данных), пили (фимбрии) (рис. 12, 14, 15), длиной до 20 – 90 нм, и шириной 7-8 нм. На сечении клетки можно наблюдать до 10-12 клеточных придатков. Они чаще обнаруживаются на поверхности штамма Brucella melitensis штамм Rev-1, в меньшем количестве они имеются у Brucella abortus штамма R-1096. Можно предположить, что ранее жгутики и пили не удавалось наблюдать у бруцелл в связи со сложностями их выявления из-за короткого периода (в начале экспоненциальной фазы роста в богатых жидкостью средах), в течение которого транскрибируются гены, необходимые для синтеза данных субъединиц.

Строение клеточной стенки и плазматической мембраны. На микрофотографиях хорошо просматривается извилистая многослойная клеточная стенка и ровная цитоплазматическая мембрана, которые окружают бактериальные клетки, характерные для грамотрицательных микроорганизмов (рис. 10, 11, 15).

*Цитоплазма*. Ультраструктура цитоплазмы бактерий *Brucella* обладает высокой электронной плотностью и заполнена рибосомами и полирибосомами. Включений мало, встречаются округлые мелкие плотные

осмиофильные гранулы размером 20 — 50 нм. В цитоплазме, в непосредственной близости к плазматической мембране нами обнаружены округлые мембранные структуры, которые чаще собраны в группы. Скопления внутрицитоплазматических мембранных структур отмечено в области перетяжки (рис. 13).

*Нуклеоид*. В области нуклеоида некоторых клеток просматриваются нити ДНК на фоне темной цитоплазмы. Нити ДНК не всегда были видны изза плотности цитоплазмы или плоскости прошедшего среза.

### 2.2.2.3 Ультратонкое строение бруцелл после гамма-облучения

Для изучения влияния ионизирующего воздействия были выбраны γ-инактивированные вакцины, полученные на основе штаммов *B. abortus* 82 и *B. melitensis* Rev-1. Установлено, что размеры бактериальных клеток обоих штаммов после инактивации гамма – излучением не изменялись. Однако на этом фоне у бактерий отмечали выравнивание клеточной стенки с внешней и внутренней сторон наружной мембраны, а также меньшее количество или полное отсутствие электронноплотного материала. На наружной мембране клеточной стенки *B. melitensis* Rev-1 просматриваются предполагаемые пили. У *В. abortus* 82 данные структуры не обнаружены (рис. 16).

При инактивировании происходит неравномерное увеличение просветление периплазматического пространства. Перипласт заполнен электроннопрозрачным или хлопьевидным содержимым. В отдельных его участках появляются осмиофильные гранулы, их особенно много со стороны цитоплазматической мембраны. В некоторых зонах клеток можно наблюдали потерю целостности плазмалеммы клеточной стенки. ИЛИ инактивированной культуре встречаются протопласты и сферопласты. Цитоплазма бактериальных гамма-облученных клеток просветляется и уменьшается количество свободных рибосом. В просветленных участках цитоплазмы четко просматривали сеть из нитей ДНК. В структуре цитоплазмы определяли плотные осмиофильные включения размером 40-50нм в отдельных местах клетки. На микрофотографиях среди клеток наблюдали крупные (85-200 нм) мембрано-ограниченные сферические везикулы.

# 2.2.2.4 Ультратонкое строение бруцелл после тепловой обработки

Для изучения влияния температурного шока были выбраны вакцинные штаммы *В. abortus* 82 и *В. melitensis* Rev-1. Размер клеток практически не меняется, клеточная стенка теряет извилистость, и ее структура повторяет строение клеточной стенки как у гамма-облученных клеток. У штамма *В. melitensis* Rev-1 на внешней стороне клеточной поверхности отмечали придатки — предполагаемые пили. Периплазматическое пространство просветляется и уменьшается. Это приводит к тому, что не всегда можно рассмотреть границу между клеточной стенкой и плазматической мембраной (рис. 17). В культуре обнаруживаются сферопласты.

В бактериальных клетках после теплового шока происходит нарушение структуры цитоплазмы. Конденсированное содержимое цитоплазмы в виде электронноплотных участков неравномерно распределено в клетках. Также

просматриваются редкие фибриллярные структуры ДНК, полирибосомы и рибосомы не обнаруживали. Также отмечали накопление осмиофильных включений размером 40 - 50 нм. В среде между бактериями и в непосредственной близости с клеточной стенкой на микрофотографиях наблюдаются ограниченные мембраной сферические крупные (85-200 нм) везикулы, которые имеются и в исходной культуре. Кроме этого отмечены одиночные мелкие везикулы размером от 15 до 25 нм.

В среде, окружающей бактериальные клетки после облучения и теплового воздействия, встречали фрагменты клеточных мембран, что не обнаруживали в культурах исходных штаммов.

### 2.2.2.5 Оценка жизнеспособности бруцелл при воздействии антибиотиков

Исследования антимикробной активности проведены на двух штаммах бруцелл: исходном *B. abortus* 82 и тетрациклинустойчивом *B. abortus* 82Tr. В опыте был задействован тетрациклин, в основе противомикробного действия которого лежит подавление белкового синтеза. Бактерицидную активность тетрациклина к испытуемым штаммам бруцелл, оценивали в двух концентрациях 15, 30 мкг/мл, но в трех экспозициях – 30 мин, 1, 2 ч (табл. 2).

**Таблица 2.** Оценка жизнеспособности бруцелл при воздействии антибиотика тетрациклина

Время	30 M	инут	1 •	нас	2 часа				
Концен-	15	30	15	30	15	30			
трация	мкг/мл	мкг/мл	мкг/мл	мкг/мл	мкг/мл	мкг/мл			
B. abortus	обильный	рост	обильный	рост	обильный	рост			
82	рост	+	рост	++	рост	+++			
B. abortus 82TR	обильный рост								

В ходе исследований установили, что антибиотик тетрациклин in vitro в отношении штамма B. abortus 82 проявил различную активность. В разведении 15 мкг/на мл везде наблюдался обильный рост колоний бруцелл. В то время как разведение 30 мкг/мл, оказалось более губительным. Но больший интерес вызвал выявленный факт влияния продолжительности экспозиции на дальнейшую жизнеспособность бактерий. Через 30 мин у B. abortus 82 выявлялся рост отдельных колоний на «+», через час рост колоний на «++», а через 2 ч уже умеренный рост на «+++».

В отношении *В. abortus* 82 Тг проведенные исследования подтвердили заявленную устойчивость данного штамма к тетрациклину. Во всех вариантах после воздействия антибиотика в представленных концентрациях и экспозициях происходил обильный рост колоний.

# 2.2.2.6 Влияние антибиотиков на ультраструктуру бруцелл

Для изучения морфологической структуры штаммов *В. abortus* 82 (контрольного) и *В. abortus* 82 Тг (тетрациклинустойчивого) при воздействии антибиотиков использовали тетрациклин, который считается одним из наиболее эффективных против бруцелл (Д.К. Новиков, 2010).

Контрольная культура исходного штамма *Brucella abortus* 82 имела ультраструктуру, характерную для клеток этого штамма: плотная

цитоплазма, тонкое ровное периплазматическое пространство с плотным содержимым. Вокруг клеток отмечали мембрано-ограниченные пузырьки диаметром в среднем 100-120 нм.

Ультратонкое строение штамма *В. abortus* 82 Тг характеризуется более округлыми клетками, плотной цитоплазмой и клеточной стенкой. Размеры клеток немного изменяются в сторону увеличения их ширины. При этом, увеличивается не только плотность клеточной стенки, но и ее ширина. Размер клеточной стенки с учетом пептидогликанового слоя и наружных полисахаридных компонентов достигает до 28-29 нм, что на 5-8 нм превышает толщину клеточной стенки исходного штамма. Эти различия особенно четко просматривали на препаратах, приготовленных методом негативного контрастирования. Вокруг бактерий отмечали мембраноограниченные пузырьки диаметром в среднем 100-120 нм, а непосредственно на клеточной мембране - очень мелкие немногочисленные везикулы в диаметре 15-20 нм. В культуре встречаются делящиеся клетки и клетки с дефектом клеточной стенки.

После культивирования клеток *B. abortus* 82 исходного штамма в среде, содержащей антибиотик тетрациклин в концентрации 15 мкг/мл и экспозициях 30 мин и 1 ч, отмечены незначительные изменения в структуре бактериальных клеток (рис. 20).

При экспозиции клеток штамма *B. abortus* 82 Tr в среде с той же концентрацией (15 мкг/мл) антибактериального средства 30 мин клеточная стенка бруцелл становится более плотной, что хорошо просматривается на препаратах, полученных методом негативного контрастирования (рис. 21). Клетки становятся более округлыми, имеют плотную цитоплазму. В среде наблюдали антибиотик, количество везикул не меняется. В культуре встречали делящиеся клетки. Через 1 ч эксперимента на поверхности клеток появляется незначительное количество мелких везикул, окруженных мембраной с электроннопрозрачным содержимым размером 15-20 нм. Цитоплазма плотная, нуклеоид у большинства клеток не просматривается. Вокруг бактерий обнаруживали везикулы диаметром в среднем 100-120 нм. В культуре регистрировали делящиеся клетки, клетки с дефектом клеточной стенки.

После выдерживания клеток исходного штамма *В. abortus* 82 в среде, содержащей тетрациклин (30 мкг/мл), в экспозициях 30 мин и 1 ч, отмечен неожиданный «морфологический ответ». На микрофотографиях бруцелл через 30 мин влияния антибиотика вся популяция клеток приобретает округлую, чаще неправильную форму (рис. 18). Увеличенное, неправильной формы, электронносветлое периплазматическое пространство, цитоплазма очень плотная, нити ДНК не просматриваются. В среде, окружающей клетки, присутствует электронноплотное мелкогранулярное вещество, вероятно, скопление антибиотика.

На ультратонких срезах клеток контрольного штамма *В. abortus* 82 после воздействия тетрациклином (30 мкг/мл) в течении 1 ч наблюдали восстановительный эффект. Большая часть клеток имела форму и размеры,

соответствующие норме. Ультраструктура характеризуется плотной цитоплазмой, периплазматическое пространство тонкое электронноплотное, у некоторых клеток оно остается электроннопрозрачным, но повторяет контур клетки (рис.19). Самым примечательным является тот факт, что большая часть клеток окружена очень мелкими мембрано-ограниченными везикулами диаметром в среднем 20 нм. Такие везикулы могут собираться группами. И вокруг одной бактерии можно наблюдать несколько мест образования одиночных везикул или их цепочек.

Анализ ультратонкого строения штамма *Brucella abortus* 82 Тг после выдерживания в среде, содержащий антибиотик тетрациклин в концентрации 30 мкг/мл, экспозиции 30 мин и 1 ч, не выявил явного «морфологического ответа» клеток популяции.

Таким образом, образование мелких везикул в небольшом количестве отмечено при термообработке бруцелл и гамма-облучении. Очень активная секреция на клеточной поверхности бруцелл обнаружена после воздействия антибиотика. После выдерживания культуры штамма *В. abortus* 82 в растворе тетрациклина в концентрации 30 мкг/мл в течение 1 ч обнаруживали вокруг клеток большое количество везикул размером 15-25 нм. Посев этих клеток на питательную среду зарегистрировали рост колоний на «++». Тогда как 30-тиминутная экспозиция (тетрациклин 30 мкг/мл) приводит к росту отдельных колоний культуры на «+» и к серьезным нарушениям ультраструктуры клеток. Мы предполагаем, что более длинный период времени воздействия антибиотика (1 час) позволяет отдельным клеткам популяции адаптироваться от стресса, вероятно, за счет выведения антибиотика, либо его метаболитов из клетки путем образования везикул внешней мембраны.

#### 3 ВЫВОДЫ

- 1. Изучение культурально биохимических свойств *Fusobacterium песторногит* показало, что начальная стадия роста бактерий штаммов «8TS630501» и «12TSK630501» в среде на основе ФГМПЭМ происходила в нижних слоях, а затем перерастала в верхние слои питательной среды. Фузобактерии продуцируют индол и сероводород, ферментируют углеводы и многоатомные спирты. По результатам исследования культуральнобиохимических свойств бруцелл отмечено, что штаммы находятся: *В. abortus* 82 в SR –форме, *В. melitensis* Rev 1 в S- форме, и имеют соответствующие признаки. По основным признакам вакцинный штамм *В. abortus* R-1096 соответствует стабильной R-форме.
- 2. С помощью электронной микроскопии установлено, что клетки F. «8TS630501» «12TSK630501» necrophorum штаммов И имеют Использование палочковидную форму. метода негативного контрастирования показало, что размеры клеток указанных штаммов F. necrophorum «8TS630501» и «12TSK630501» по ширине существенно не отличаются - 0,3-0,67 мкм. По длине представители штамма «8TS630501» более чем в два раза превышают бактерии штамма «12TSK630501», и достигают 25 мкм. Веретенообразные или колбовидные расширения в исследуемых нами штаммах не обнаружены. Установлено образование

фузобактериями в результате проявления их адгезивных свойств нитевидных скоплений, которых при увеличении времени культивирования становится больше.

- 3. На поверхности фузобактерий обнаружены везикулы внешней мембраны размерами 45-250 нм, известные в научной литературе как источники патогенных факторов. Зафиксированы происходящие во время роста клеток изменения периплазматического пространства, а также наличие агрегата РНП, который в структуре клетки создает зернистость, видимую под световым микроскопом.
- 4. Более высокая устойчивость ко всем испытанным антибиотикам с различными механизмами действия в выбранных дозах проявилась у штамма «8TS630501» *F. necrophorum*. Наиболее эффективным антибиотиком, вызывающим выраженные морфологические изменения в структуре клеток *F. necrophorum*, оказался цефтиофур натрия. Постантибиотический эффект ультраструктурно подтвержден в следующей последовательности: просветление цитоплазмы; конденсирование внутрицитоплазматических компонентов; фрагментирование ДНК и нарушение процессов деления клеток; увеличение периплазматического пространства, лизис клеток.
- 5. Метод ультратонких срезов показал, что клетки вакцинных штаммов *Brucella melitensis* Rev-1 (S колонии), *Brucella abortus* штаммов 82 (SR форма колоний) и R-1096 (R колонии) имеют шаровидную или палочковидную формы, размеры 0,3-0,6 на 0,8-2,5 мкм. Разницы в строении клеточной стенки у типичных и диссоциированных форм не обнаружено.
- 6. У бруцелл штамма *B. melitensis* Rev-1(S-форма) и штамма *B. abortus* R-1096 (R-форма) впервые обнаружены придатки клеточной поверхности, которые идентифицированы как пили (фимбрии), длиной до 20-90 нм, шириной 7-8 нм. Факт отсутствия таких придатков, у штамма *B. abortus* 82 (RS-форма) требует дополнительных исследований.
- 7. Ультраструктурный анализ показал, что инактивация бруцелл гаммаоблучением приводила лишь к увеличению периплазматического пространства и просветлению цитоплазмы, тогда как при воздействии тепла происходили более глубокие изменения - нарушение белок-синтезирующего комплекса клетки и фрагментирование структур ДНК.
- 8. На поверхности бактериальных клеток штамма *В. abortus* 82 после воздействия на них тетрациклина установлено образование везикул внешней мембраны и их активная секреция, которые можно отнести к адаптационным защитным механизмам, обеспечивающим выживание бактериальной клетки и даже приобретение устойчивости к данному антибиотику. Это в определенной степени подтверждается сравнением полученных данных с результатами исследований жизнеспособности и ультраструктуры бруцелл при воздействии тетрациклина на штамм *В. abortus* 82Tr с заявленной устойчивостью к указанному антибиотику.

### 4 ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. Результаты изучения биологических свойств и ультраструктурных особенностей возбудителей некробактериоза и бруцеллеза, с учетом

воздействия на них антибиотиков, теплового и гамма-излучающего факторов, рекомендуется использовать в процессе разработки новых вакцинных и антибактериальных препаратов при указанных инфекциях, а также в качестве методической и методологической основы — в дальнейших научных исследованиях, направленных на расшифровку ультраструктуры возбудителей других инфекционных болезней животных, в целях совершенствования средств и методов их лечения и профилактики.

2. Основные положения диссертационной работы рекомендуется использовать на курсах повышения квалификации и в учебном процессе ВУЗов биологического и зооветеринарного профиля.

## СПИСОК РАБОТ ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

- 1. Д.А. Электронно-микроскопические Хузин, исследования производственных штаммов Fusobacterium necrophorum «8TS630501» и «12TSK630501»./ Д.А. Хузин, **М.М. Сальникова**, В.Р. Саитов и др.// Материалы международной научно-практической конференции, посвященной 50-летию Федерального токсикологической. Центра радиационной И биологической безопасности «Биотехнология: токсикологическая радиационная и биологическая безопасность», Казань. -2010. – C. C. 346-352.
- 2. Иванов А.В. Методические рекомендации по электронно-микроскопическим исследованиям биологических объектов / А.В. Иванов, А.А. Иванов, А.Н. Чернов, **М.М. Сальникова** и др.// Методические рекомендации. М. «Росинформагротех». 2011. 67с.
- 3. Иванов, А.В. Болезни копытец крупного рогатого скота и меры борьбы с ними / А.В. Иванов, Д.А. Хузин, К.Х. Папуниди, **М.М. Сальникова**, В.Р. Саитов // Материалы III й Международной научнопрактической конференции «Актуальные проблемы сельского хозяйства горных территорий» Горно-Алтайск: РИО ГАГУ. 2011. С 132-137.
- 4. **Сальникова, М.М.** Изучение ультратонкого строения живых и инактивированных культур *Brucella melitensis и Brucella abortus* / М.М. Сальникова, В.Р. Саитов, Г.М. Сафина, И.Ф. Рахматуллин, М.А. Косарев, А.М. Фомин // М.: **«Достижения АПК».** 2012. №3. С. 80-82. \*
- 5. **Сальникова, М.М.** Ультратонкое строение возбудителя некробактериоза *Fusobacterium necrophorum* / М.М. Сальникова, В.Р. Саитов, И.Ф. Рахматуллин, Д.А. Хузин, Х.Н. Макаев // **Ветеринарная патология**. М.: 2012. №2 (40). С. 52-58.\*
- 6. Иванов, А.В. Подготовка образцов для трансмиссионной электронной микроскопии, применяемой при токсикологических исследованиях: компьютеризация расчетов / А.В. Иванов, К.Х. Папуниди, А.А. Иванов, В.Р. Саитов, К.А. Осянин, М.М. Сальникова и др.// Методическое пособие. Казань. 2012. 31 с.
  - \* публикации в журналах, рекомендуемых ВАК России