DOI <https://doi.org/10.18551/rjoas.2017-03.23>

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ
ДЛЯ ТИПИРОВАНИЯ CLOSTRIDIUM PERFRINGENS**
THE USE OF MOLECULAR GENETIC TECHNIQUES FOR THE TYPING
OF CLOSTRIDIUM PERFRINGENS

Козлова А.Д., Горбачева Н.С., Клименкова О.В., научные сотрудники
Kozlova A.D., Gorbacheva N.S., Klimenkova O.V., Researchers
**Всероссийский государственный центр качества и стандартизации
лекарственных средств для животных и кормов, Москва, Россия**
All-Russian State Research Institute for Control Standardization and
Certification of Veterinary Preparations, Moscow, Russia

Лаишевцев А.И., Капустин А.В., научные сотрудники
Laishevtcev A.I., Kapustin A.V., Researchers
**Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной
ветеринарии имени Я.Р. Коваленко, Москва, Россия**
All-Russian Research Institute of Experimental Veterinary Medicine
named after Y.R. Kovalenko, Moscow, Russia

Яцентюк С.П.*, кандидат биологических наук, научный сотрудник
Yatsentyuk S.P., Candidate of Biological Sciences, Researcher
**Всероссийский государственный центр качества и стандартизации
лекарственных средств для животных и кормов, Москва, Россия**
All-Russian State Research Institute for Control Standardization and
Certification of Veterinary Preparations, Moscow, Russia

*E-mail: pcr-lab@vgnki.ru

АННОТАЦИЯ

Определение типа *Cl.perfringens* является важной задачей для изучения развития эпизоотологического процесса и необходимым критерием отбора штаммов для разработки эффективных вакцин. Идентификация токсинов является трудоёмкой, дорогостоящей и достаточно длительной процедурой, к тому же не всегда позволяющей получить точные результаты. Нами показана возможность типирования *Cl.perfringens* молекулярно-биологическими методами. Для подтверждения чувствительности и специфичности метода была проведена идентификация штаммов *Clostridium spp.*, а также проведено ПЦР-исследование изолятов, выделенных из патологического материала при клостридиозных инфекциях КРС в 2016 году.

ABSTRACT

Cl.perfringens characterization is very important for studying the epizootic process and necessary for selecting strains for the effective vaccines. Toxins identification by neutralization reaction is time-consuming, expensive and long-term research, sometimes without accurate results. Molecular typing of *Cl.perfringens* strains was made on collections of microorganisms with high sensitivity and specificity. Cultures of *Clostridium spp.* isolated from pathological material in 2016 were studied by PCR method as well.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА

Clostridium perfringens, определение токсинов, полимеразная цепная реакция, штаммы.

KEY WORDS

Clostridium perfringens, toxin identification, PCR, strains.

Анаэробные микроорганизмы, возбудители клостридиозов, широко распространены в природе. Основным резервуаром их является почва, а также кишечник животных и человека.

Все патогенные клостридии обладают способностью образовывать споры, расти в анаэробных условиях, вырабатывать экзотоксины. Образующиеся в процессе роста культур высокоактивные токсины являются основным фактором воздействия на организм, но также имеются и другие факторы патогенности, в частности гиалуронидаза, лецитиназа, коллагеназа, гемолизины и др.

Несмотря на широкое применение средств специфической профилактики, химиотерапевтических препаратов и антибиотиков, клостридиозы продолжают оставаться серьезной проблемой и наносят значительный экономический ущерб. Концентратный тип кормления при выращивании крупного рогатого скота приводит к нарушению обмена веществ, ацидозу, и быстрому развитию различных инфекций, в том числе клостридиозов [2, 3].

Наиболее широко распространенным видом клостридий является *Cl.perfringens*. Существует пять типов возбудителя: А, В, С, D, Е, каждый из которых вызывает болезнь с характерными клиническими признаками. В общей сложности представители вида образуют в процессе культивирования до 17 различных токсинов, из которых преобладающее значение имеют четыре: а, b, ε и i. [12]. Некоторые штаммы *Cl.perfringens* вырабатывают дополнительные токсины, которые могут усугублять течение заболеваний. Так штаммы *Cl.perfringens* типа А продуцируют энтеротоксин, вызывающий тяжелые токсикоинфекции у людей и животных [4, 7].

Cl.perfringens тип А является убиквитарным микроорганизмом, широко распространенным в природе. Образует альфа-токсин невысокой активности, поэтому, как правило, вызываемые им случаи болезни проходят менее злокачественно, чем при заражении другими типами *Cl.perfringens*: смертность животных при поражении типом А не превышает 25 % [5].

Cl.perfringens тип В является возбудителем анаэробной дизентерии ягнят. Заболевание стационарно, обнаружить возбудитель в образцах почвы, где ранее не выпасали больных дизентерией овец, практически невозможно. Этот тип клостридий очень активен в плане токсинообразования, преобладающее значение имеют b- и ε-токсины. Вызываемое им заболевание опасно для новорожденных ягнят, летальность достигает 50-90 %. Характерным признаком болезни является геморрагическое воспаление кишечника с изъязвлениями. Помимо ягнят дизентерии подвержены жеребята, телята, поросята. При несоблюдении санитарных условий содержания и отсутствии профилактики в неблагополучном хозяйстве создается стационарное неблагополучие на многие годы [9,11].

Cl.perfringens тип С является возбудителем анаэробной энтеротоксемии у молодых животных. Основным типом продуцируемого токсина является b-токсин. Заболевание опасно в основном для телят и поросят, однако может наблюдаться и у взрослых животных. Заболевание носит характер энзоотий, отличить болезнь по патологоанатомическим признакам или смертности от случаев, вызванных *Cl.perfringens* типа В, без лабораторных исследований по идентификации токсинов невозможно [6].

Cl.perfringens тип D - еще один возбудитель, вызывающий энтеротоксемию у жвачных животных с характерными патологоанатомическими признаками, из-за чего болезнь получила название «мягкая почка». Основным токсином, продуцируемым этой разновидностью *Cl.perfringens*, является ε-токсин. Болезнь, вызываемая типом D, протекает спорадически и, как правило, на фоне достаточно большого количества предрасполагающих факторов, таких как концентратное кормление, перекорм, сочная зеленая трава, метеорологические условия (холодная вода, иней на траве и др.). Болеют инфекционной энтеротоксемией, вызываемой типом D, телята, поросята, кролики, лошади, но основную опасность она представляет для овец [16, 17, 18, 20].

Энтеротоксемию, вызываемую *Cl.perfringens* тип Е, отмечают у телят и ягнят. Основным токсином этого типа клостридий является i-токсин. Как и ε-токсин, он

вырабатывается в виде протоксина и активируется ферментами, но образуется только молодыми культурами в первые 3-4 часа роста, при последующем культивировании штаммов быстро разрушается.

Определение токсинов, вырабатываемых конкретным штаммом или изолятом *Cl.perfringens* является важным для прогнозирования течения заболевания. Кроме того, типирование *Cl.perfringens* является актуальной задачей для более глубокого понимания эпизоотологического процесса и может быть полезным при разработке эффективных вакцин [14,19].

Традиционно типирование *Cl.perfringens* проводится методом нейтрализации токсинов с использованием антитоксических сывороток на лабораторных животных. Также применяется метод ИФА. Однако эти методы имеют ряд ограничений. Так, например, высокий уровень энтеротоксина появляется только в момент споруляции, поэтому требуются особые условия культивирования. Использование молекулярно-генетических методов является более простым, быстрым и точным способом типирования *Cl.perfringens*.

Целью работы является разработка способа идентификации бактерий различных типов *Cl.perfringens* молекулярно-генетическими методами, и определение его специфичности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В работе использовали штаммы коллекции ФГБУ «ВГНКИ» и ФГБНУ «ВИЭВ», а также изоляты клостридий, выделенные в 2016 г. из биологического материала от КРС из одиннадцати регионов РФ: Белгородской, Иркутской, Кировской, Курской, Московской, Нижегородской, Самарской, Саратовской, Тверской, Челябинской областей и республики Мордовия.

Исследование материала проводили согласно ГОСТ 26503-85 «Животные сельскохозяйственные. Методы лабораторной диагностики клостридиозов».

Для бактериологических исследований отбирали участки тонкого отдела кишечника, пробы пораженной мышечной ткани, кусочки сердца, печени, почек, селезенки. Материал высевали на среду Китта-Тароцци для накопления, а затем на агар Шедлера с добавлением 10% крови барана для детекции возбудителя. Посевы инкубировали в анаэроостате при 37 °С, с использованием газогенераторных пакетов в течение 48-72 часов. Параллельно проводили высевы материала на МПА, МПБ, Сабуро и культивировали в стандартных условиях без создания анаэробноза для выявления сопутствующей аэробной микрофлоры.

Характерные для клостридий колонии пересеивали в две пробирки на скошенный кровяной агар, одну из которых культивировали в анаэробных, а другую аэробных условиях (контроль). Через 24-48 часов при наличии роста микрофлоры на агаре, культивируемом в анаэроостате, и отсутствии роста в контроле, из культуры готовили мазки и окрашивали их по Граму. Если исследуемая культура по морфологическим свойства представляла собой крупные Грам-положительные палочки, не контаминированные посторонней микрофлорой, проводили идентификацию микроорганизма набором «*RapID ANA II*». Для этого готовили бактериальную суспензию с концентрацией 3 ед. по МакФарланду, которую затем равномерно распределяли по лункам панели и культивировали в термостате при 37°С в течение 4-6 часов. Фиксировали изменение цвета субстратов в лунках, после чего в них дополнительно вносили реактивы «*RapID ANA II Reagent*» и «*RapID Spot Indole*». Учет проводили в течение 2 минут, после чего результаты обрабатывали в компьютерной программе и получали подтверждения идентификации вида микроорганизма.

Выделение ДНК проводили набором «Рибо-преп» (*Amplisens*, ФБУН ЦНИИЭ), согласно инструкции.

Использованные в работе олигонуклеотидные праймеры были синтезированы в ФГБУ «ВГНКИ» амидофосфитным методом на синтезаторе ASM 2000 (ООО «Биоссет» Новосибирск) по амидофосфитной схеме согласно рекомендациям производителя с

использованием стандартных амидофосфитов *dT*, *dA(Bz)*, *dG(iBu)*, *dC(Ac)*. Деблокирование олигонуклеотидов и удаление защитных групп проводили в течение 18 часов под действием насыщенного водного аммиака при 55°C.

Полимеразную цепную реакцию для определения типа клостридий проводили на амплификаторе «Терцик». Программа амплификации для всех пар праймеров: 95°C – 10 сек.; 95°C – 10 сек., 55°C – 10 сек., 72°C – 10 сек. – 42 повтора; 72°C – 2 мин. Для повышения специфичности работы праймеров и предотвращения неспецифической работы ДНК-полимеразы в реакции амплификации использовали «горячий старт». Для этого в отдельные пробирки для ПЦР вносили по 5 мкл реакционной смеси, содержащей праймеры и дезоксинуклеотидтрифосфаты, и на нее наслаивали 20-30 мкл воска. Далее на поверхность воска вносили 15 мкл буфера, содержащего ДНК-полимеразу, и 10 мкл ДНК-пробы.

Для подтверждения вида клостридий осуществляли секвенирование продуктов амплификации участка гена 16S рРНК длиной 700 п.н. Программа амплификации: 95°C – 10 сек.; 95°C – 10 сек., 60°C – 10 сек., 72°C – 10 сек. – 42 повтора; 72°C – 2 мин. Секвенирование проводили с использованием набора *BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction-100* на генетическом анализаторе *ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer*.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И АНАЛИЗ ДАННЫХ

Анализ литературы показал принципиальную возможность типирования клостридий молекулярно-генетическими методами [10,13]. На основании литературных данных и анализа нуклеотидных последовательностей, опубликованных в базе данных GenBank, были выбраны пять пар праймеров, амплифицирующих фрагменты генов α -, β -, ϵ -, ι - и энтеротоксина длиной 465 п.н., 864 п.н., 404 п.н., 263 п.н. и 370 п.н. соответственно.

Специфичность используемых праймеров была изучена с помощью интернет-сервиса *Nucleotide BLAST online*. В результате этой работы показана гомология выбранных олигонуклеотидов со специфическими мишенями и не обнаружено их значимой гомологии с нуклеотидными последовательностями других участков генома *Cl.perfringens* и других видов рода *Clostridium*, а также каких-либо других вирусов, бактерий или эукариот. Таким образом, предложенные праймеры, исходя из теоретических расчетов, должны обладать 100% специфичностью.

Был проведен ряд экспериментов по определению рабочих концентраций праймеров, обеспечивающих необходимую чувствительность анализа, и оптимизированы условия проведения ПЦР.

Специфичность выбранных олигонуклеотидов проверяли на штаммах разных видов клостридий, видовая принадлежность которых была подтверждена изучением нуклеотидной последовательности фрагмента гена 16S рРНК. Штаммы *Cl.botulinum*, *Cl.sordellii*, *Cl.histolyticum*, *Cl.haemolyticum*, *Cl.gigas*, *Cl.sporogenes*, *Cl.oedematiens*, *Cl.chauvoei*, *Cl.tetani*, *Cl.septicum* не давали продукта амплификации ни на одной из пар праймеров, подобранных на гены токсинов. У всех штаммов, относящихся к *Cl.perfringens*, наблюдали специфический продукт расчетной длины при ПЦР с праймерами на участок гена α -токсина [15].

Было исследовано 72 музейных штамма, выделенных в период с 1927 по 1971 гг, а также в 2010 г от разных видов животных. Результаты изучения штаммов *Clostridium* представлены в таблице 1.

Для 37 штаммов *Cl.perfringens* ранее проведенная серологическими методами типизация была подтверждена методом ПЦР. 7 штаммов *Cl.perfringens*, выделенных в 1936-1961 годы, тип которых ранее не был определен, были типированы с помощью разработанной ПЦР-методики: по результатам нашей работы 6 штаммов были отнесены к *Cl.perfringens* тип С и один штамм к *Cl.perfringens* тип Е (таблица 1).

Штаммы *Cl.perfringens* дополнительно были исследованы на наличие гена энтеротоксина. Ген энтеротоксина *Cpe* был выявлен не только у штаммов

Cl.perfringens типа А, но и у штаммов, относящихся к типам D и E. Подобные результаты были получены ранее в работах нескольких исследователей [1, 8]. В литературе отмечено, что ген *Cpe* выявляется в 15% штаммов *Cl.perfringens* типа С и в 25% штаммов типа D. Показано также, что *Cpe* может экспрессироваться у *Cl.perfringens* типов С и D в момент споруляции и вызывать более тяжелое течение заболевания.

Таблица 1 – Исследование штаммов *Clostridium* на наличие генов токсинов методом ПЦР

Тип <i>Clostridium</i> (по данным коллекции)	Количество штаммов (всего - 72)	Год выделения	Наличие полосы амплификации				Тип <i>Cl. perfringens</i> (по ПЦР)
			Альфа- токсин	Бета- токсин	Эпсилон- токсин	Йота- токсин	
<i>Cl.perfringens</i> тип А	16	1936-1969	+	-	-	-	А
<i>Cl.perfringens</i> тип В	2	1961,1971	+	+	+	-	В
<i>Cl.perfringens</i> тип С	8	1936-1968	+	+	-	-	С
<i>Cl.perfringens</i> тип D	8	1944-1958	+	-	+	-	D
<i>Cl.perfringens</i> тип E	3	1958-1962	+	-	-	+	E
<i>Cl.perfringens</i> тип не определен	6	1936-1971	+	+	-	-	С
<i>Cl.perfringens</i> тип не определен	1	1939	+	-	-	+	E
<i>Cl.botulinum</i>	1	1958	-	-	-	-	-
<i>Cl.chauvoei</i>	4	1931,1949	-	-	-	-	-
<i>Cl.gigas</i>	2	1955,1971	-	-	-	-	-
<i>Cl.haemolyticum</i>	3	1954,2010	-	-	-	-	-
<i>Cl.histolyticum</i>	1	1962	-	-	-	-	-
<i>Cl.oedematiens</i>	11	1932-1971	-	-	-	-	-
<i>Cl.septicum</i>	1	1942	-	-	-	-	-
<i>Cl.sordellii</i>	3	1944,1946	-	-	-	-	-
<i>Cl.sporogenes</i>	1	1927	-	-	-	-	-
<i>Cl.tetani</i>	1	1930	-	-	-	-	-

Помимо изучения хранящихся в коллекции штаммов *Cl.perfringens*, проведено исследование культур клостридий, выделенных в 2016 г. при бактериологическом исследовании 276 проб патологического материала от крупного рогатого скота с характерными клиническими признаками и патологоанатомическими изменениями. Всего было изучено 49 изолятов *Clostridium spp.* При проведении идентификации выделенных микроорганизмов с использованием тест-набора «RapiD ANA II» получены следующие результаты: наиболее часто от животных выделялась *Cl. perfringens* - 18 изолятов, *Cl.septicum* - в 13, *Cl. sordellii* - 8, *Cl.novyi* – 7, а также в единичных случаях были идентифицированы *Cl.difficile*, *Cl.butyricum*, *Cl.bif fermentans*. Таким образом, количество изолятов *Cl.perfringens* составило 39 % от общего количества.

При определении типа *Cl.perfringens* серологическими методами были получены следующие результаты (таблица 2).

Таблица 2 – Исследование изолятов *Cl.perfringens*, выделенных от крупного рогатого скота серологическим методом

п/п	Животные, возраст	<i>Cl.perfringens</i>		
		тип А	тип С	тип D
1	Телята (1-30 дней)	5	1	7
2	Коровы, а также молодняк с 30 дневного возраста	1	1	3
3	Всего	6	2	10

Как видно из представленных данных типы А и D преобладали в этиологической структуре анаэробной энтеротоксемии у новорожденных телят, также тип D являлся возбудителем токсикоинфекций у молодняка более старшего возраста и коров, в основном первотелок. Наши результаты подтверждают данные, представленные в работе 2001 года, согласно которым наиболее распространенными типами *Cl.perfringens* являются типы А и D.

Для более точной идентификации часть изолятов была подвергнута дополнительному исследованию методом ПЦР. Всего молекулярно-генетическими методами было исследовано 40 изолятов *Clostridium spp.* Из них 12 изолятов идентифицировали как *Cl.perfringens*. Результаты типирования позволили выявить принадлежность 4 изолятов к типу D и 8 изолятов - к типу A. Ген энтеротоксина *Cpe* не был выявлен ни у одного из изолятов.

В целом результаты молекулярно-генетического типирования совпали с результатами, полученными при использовании «*RapID ANA II*», однако два изолята, определенных набором «*RapID ANA II*» как *Cl.septicum* и *Cl.difficile*, были отнесены к *Cl.perfringens* тип A. Также 2 изолята, определенные набором «*RapID ANA II*» как *Cl.perfringens* тип C, были отнесены к *Cl.perfringens* тип A.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Типирование выявляемых возбудителей клостридиозов является важной задачей, так как позволяет правильно построить систему мероприятий по ликвидации и профилактике опасных, часто неизлечимых болезней. Стандартная процедура идентификации типа *Cl.perfringens* путем постановки реакции нейтрализации токсинов специфическими сыворотками является очень трудоемкой и дорогостоящей, а также требует использования достаточно большого количества лабораторных животных. Получить результат при этом можно через 48-72 часа. Поэтому предложенный нами способ идентификации различных типов *Cl.perfringens* молекулярно-генетическими методами является очень перспективным. Он позволяет быстро и точно определить принадлежность культуры, а соответственно выбрать или скорректировать ранее применяемое лечение. В результате проведенной работы показана высокая специфичность и перспективность использования ПЦР-методик для характеристики штаммов коллекций.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Afshari A., Jamshidi A., Razmyar J., Rad M. Genotyping of *Clostridium perfringens* isolated from broiler meat in northeastern of Iran / Veterinary Research Forum – 2015. – Vol. 6(4). – P.279-284
2. Baums C.G., Shotte U., Amtsberg G., Goethe R. Diagnostic multiplex PCR for toxin genotyping of *Clostridium perfringens* isolates // Vet. Microbiol., 2004; 100: 11–16.
3. Bueschel D.M., Jost B.H., Billington S.J., Trinh H.T., Songer J.G. Prevalence of *cpb2*, encoding beta2 toxin, in *Clostridium perfringens* field isolates: correlation of genotype with phenotype // Vet. Microbiol., 2003; 94: 121–129.
4. Gibert M., Jolivet-Reynaud C., Popoff M.R. Beta2 toxin, a novel toxin produced by *Clostridium perfringens* // Gene, 1997; 203: 65–73.
5. Kapustin A.V., Laishevtcev A.I. Pasteurellosis of cattle caused by *Mannheimia Haemolytica*. Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. 2016. T. 52. № 4. С. 3-1.
6. Kovaleva E.N. Ecosystems monitoring with purpose for phage detection of pathogen microorganisms as part of agricultural foresight//Advances in Environmental Biology. 2016. T. 10. № 3. С. 1-3.
7. Lebrun M., Mainil J.G., Linden A. Cattle enterotoxaemia and *Clostridium perfringens*: description, diagnosis and prophylaxis // Veterinary Record, 2010; 167: 13–22
8. Li J., Miyamoto K., Sayeed S., McClane B.A. Organization of the *cpe* Locus in CPE-Positive *Clostridium perfringens* Type C and D Isolates / PLoS One – 2010. – Vol.5(6) – e10932. doi:10.1371/journal.pone.0010932
9. Manteca C., Daube G., Jauniaux T., Linden A., Pirson V., Detilleux J., Ginter A., Coppe P., Kaeckenbeeck A., Mainil J.G. A role for the *Clostridium perfringens* beta2-toxin in bovine enterotoxaemia? // Vet. Microbiol., 2002; 86:191–202.

10. Møller K., Ahrens P. Comparison of Toxicity Neutralization-, ELISA- and PCR Tests for Typing of *Clostridium perfringens* and Detection of the Enterotoxin Gene by PCR / *Anaerobe*- 1996. – Vol. 2. – P.103-110
11. Morris W.E., Venzano A.J., Elizondo A., Vilte D.A., Mercado E.C., Fernandez-Miyakawa M.E. Necrotic enteritis in young calves // *J. Vet. Diagn. Invest.*, 2011; 23: 254–259.
12. Songer J.G. Clostridial Enteric Diseases of Domestic Animals / *Clin. Microbiol.* – 1996. – Vol. 9(2) – P.216-234
13. Uzal F.A., Plumb J.J., Blackall, L.L., Kelly W.R. PCR detection of *Clostridium perfringens* producing different toxins in faeces of goats / *Letters in Applied Microbiology* – 1997. – Vol. 25, - P.339–344
14. Капустин А.В. Этиологическое значение клостридий при инфекционных заболеваниях крупного рогатого скота//Конференция "Лекарственные препараты для животных" Москва ВГНКИ, 2011.Стр. 53-54.
15. Капустин А.В. Столбняк сельскохозяйственных животных/А.В. Капустин/Веткорм, №6, 2009. С. 55 -56.
16. Капустин, А.В. Видовой состав клостридий крупного рогатого скота /А.В. Капустин, А.В. Моторыгин, Н.К. Букова//Вестник ветеринарии. – 2013. - №64. –С. 71-73.
17. Москалева, Н.В. Диагностика и профилактика анаэробной энтеротоксемии телят, обусловленной энтеротоксином *Cl. perfringens* типа А; автореф. дис. кандид. ветеринар. наук /Н.В. Москалева. - Минск – 2001. 20с.
18. Пименов Н.В., Крупальник В.Л. Лечение молодняка сельскохозяйственных животных при респираторных болезнях инфекционной этиологии: Учебное пособие. -М.: ФГОУ ВПО МГАВМиБ, 2010. -47 с.
19. Пименов Н.В., Крупальник В.Л., Тухфатова Р.Ф. Средства и методы лечения молодняка сельскохозяйственных животных при желудочно-кишечных и респираторных болезнях смешанной этиологии. Учебное пособие. -М.: ФГБОУ ВПО МГАВМиБ. -2014. -168 с.
20. Пименов, Н.В. Этиология анаэробной энтеротоксемии у молодняка крупного рогатого скота/ Н.В. Пименов, Ю.Н. Колесникова // Труды Всероссийского совета молодых ученых и специалистов аграрных образовательных и научных учреждений. – 2015. – С. 175-178.