

УДК 619:576.851.45:636.21

**РОСТОВЫЕ ПОТЕНЦИИ *P. MULTOCIDA* СЕРОВАР В ШТАММ № 15**Сосницкий А.И., д. вет. н., доцент, [saidgaeu@mail.ru](mailto:saidgaeu@mail.ru)Днепропетровский государственный аграрно-экономический университет г.  
Днепропетровск

**Аннотация.** Были изучены ростовые потенции *P. multocida* серовар В в элективной жидкой питательной среде. Для этого методом квантально-альтернативного титрования определили динамику накопления пастерелл в течение всего жизненного цикла популяции, от фазы адаптации до перехода в состояние покоя с *tip* количеством ж.м.к.

**Ключевые слова:** *P. multocida* серовар В, квантально-альтернативное титрование, МПБ на ОПХ, кривая полинома, время генерации.

**Актуальность проблемы.** Инфекционные патологии пастереллезной этиологии факторного типа с без эстафетной передачей возбудителя в связи с особенностями патогенеза заболевания и выраженным иммунодепрессивным компонентом патогенного воздействия возбудителя очень плохо поддаются терапевтическим воздействия и наиболее эффективным способом борьбы с ними является специфическая профилактика и серотерапия в сочетании с подтитрованными антимикробными препаратами [1, 2, 5, 7].

Одним из важнейших элементов в процессе приготовления вакцин и сывороток является бактериологическая работа с высокоиммуногенными эпизоотическими штаммами возбудителя, включающая в себя наработку биомассы бактерий, необходимой для изготовления инактивированного антигенного сырья в производстве биопрепаратов. Наиболее эффективным способом производства бакмассы прокариот является глубинное культивирование в ферментерах, которое осуществляется с учетом количественных характеристик популяционного размножения бактериальных культур в элективных жидких питательных средах [2, 3, 4, 6].

*P. multocida* поливалентный возбудитель с неординарными культуральными свойствами относительно их подвиговой принадлежности, патогенности и интенсивности ростовых потенций. Изучение количественных характеристик серовара В с учетом фаз размножения популяции в динамике роста имеет научное и прикладное значение для биотехнологии противопастереллезных биопрепаратов [4-7].

Цель работы: методом квантально-альтернативного титрования определить ростовые потенции *P. multocida* серовар В в жидкой элективной среде.

**Материал и методы исследования.** В качестве объекта исследования использовали эпизоотический штамм № 15 *P. multocida* серовар В, изолированный при пастереллезном сепсисе от кролика. Культивирование возбудителя проводили общепринятыми методами в МПБ на ОПХ (основе перевара Хоттингера) при 37-38 °С.

Титрование *P. multocida* штамм № 15 осуществляли квантально-альтернативным методом, посевом последовательных десятикратных разведений бульонной культуры в объеме 0,1 см<sup>3</sup> в 4 пенициллиновых флакончиках, содержащих по 1,0 см<sup>3</sup> МПБ на ОПХ.

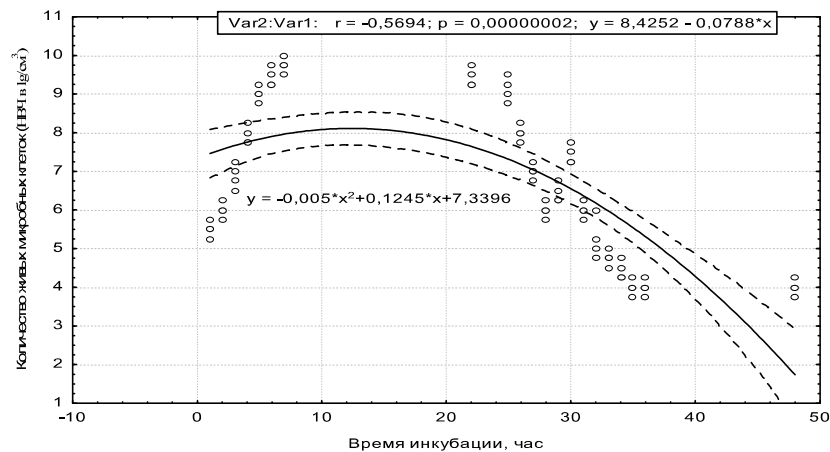
Результат учитывали в альтернативной форме – бульон мутный или прозрачный. Количество пенициллиновых флакончиков с положительными и отрицательными результатами роста бульонной культуры выражали в виде десятичных логарифмов. Накопление возбудителя определяли по методу Спирмена-Кербера в изложении И.П. Ашмарина [1962] применительно к процедуре титрования бактерий и выражали количественно в НВЧ (наиболее вероятное число). Расчет производили по формуле:  $IgP_i = IgD + d \times (\sum L_i + 0,5)$ .

**Результаты исследования.** Исходную культуру возбудителя выращивали в течение 12 час в пробирках в МПБ на ОПХ в термостате и определяли концентрацию бактерий титрованием,  $P_i = 9,25$  НВЧ  $Ig/cm^3$  ( $t = 12$  час) или  $1,78 \times 10^9$  ж.м.к./см<sup>3</sup>. В четыре литровые колбы с наполнением по 0,5 л МПБ на ОПХ внесли по 0,1 см<sup>3</sup> ростовой культуры или 0,02 % посевного инокулюма к общему объему питательной среды, что составило на 1,0 см<sup>3</sup> питательной среды 360000 ж.м.к. пастерелл или ~ 5,6  $Ig$  НВЧ. Посевы культивировали в термостате при 37-38 °С в стационарных условиях в течение 48 час. Первые 5-6 час культивирования бульон в колбах оставался прозрачным, затем появилось незначительное помутнение (слабая опалесценция), которое постепенно нарастало во времени. К 16-18 час культивирования появились «муаровые волны», при осторожном встряхивании бульона. К концу вторых суток, бульон начал просветляться и на третьи сутки на дне колб стал формироваться

слизистий осадок, при этом бульон значительно просветлел, «муаровые волны» исчезли. Феноменологические изменения бульонной культуры при стационарном выращивании являются следствием ее культуральной диссоциации, связанной со значительными изменениями физиологического состояния микробных клеток и их жизнеспособности.

Для количественной характеристики бульонной культуры возбудителя при стационарных условиях культивирования, через каждый час в течение первых 36 час инкубирования в термостате, и последний раз через 48 час, отбирали пробы бульона и титрованием определяли концентрацию пастерелл в ростовой среде. Получили последовательные данные накопления возбудителя в бульоне во времени - от  $5,5 \pm 0,1 \text{ Ig/cm}^3$  через 1 час до  $4,0 \pm 0,25 \text{ Ig/cm}^3$  через 48 час с пиковым значением  $9,75 \pm 0,1 \text{ Ig/cm}^3$  на гребне экспоненты.

Если рассматривать накопление пастерелл как биологическую функцию их физиологических потенций размножения от времени культивирования, как константного аргумента изменяющейся физиологической функции, то процесс накопления возбудителя в питательном бульоне в зависимости от фактора времени можно отобразить графически в виде кривой полинома (Рис. 1).



**Рис. 1. Накопление *P. multocida* серовар В штамм № 15 в МПБ на ОПХ в стационарных условиях культивирования**

*P. multocida* серовар В являются быстрорастущими микроорганизмами с высокой энергией роста. Расплодка пастерелл, в элективной жидкой питательной среде в стационарных условия размножения и при оптимальном температурном режиме, практически сразу вступает в экспоненциальную фазу развития, которая продолжается до 7 час культивирования и достигает тах накопления возбудителя НВЧ= $9,75 \text{ Ig/cm}^3$  или  $\approx 5,62 \times 10^9$  ж.м.к./ $\text{cm}^3$ . С 7 по 21 час культивирования, в продолжение 14 час, культура находится в стационарной фазе развития, сохраняя динамическое равновесие концентрации живых бактерий равное  $9,75 \text{ Ig/cm}^3$  НВЧ. С 22 час культура переходит в фазу отрицательного логарифмического развития. Падение концентрации вегетоспособных живых клеток пастерелл продолжается до 33 час и стабилизируется на величине НВЧ= $4,75 \text{ Ig/cm}^3$  или  $\approx 56234$  ж.м.к./ $\text{cm}^3$ , которое сохраняется до 48 час (срок наблюдения). С 28 по 30 час культивирования прекращается падение концентрации ж.м.к. пастерелл и наблюдается непрогнозируемое экспоненциальное увеличение их количества до  $7,5 \text{ Ig/cm}^3$  НВЧ, затем после 30 час прирост количества бактерий останавливается, и продолжается плавное падение концентрации возбудителя до критического состояния минимальной концентрации терминального периода наблюдения.

На основании количественной характеристики бульонной культуры *P. multocida* серовар В можно теоретически рассчитать времена деления одной популяции возбудителя, т.е. время жизненного цикла микробных клеток пастерелл, их онтогенеза или одной генерации бактерий – g.

$$\sum g (7 \text{ час} - 3 \text{ час}) = (9,75 \text{ Ig} - 6,875 \text{ Ig}) : 0,301 \text{ Ig} = 9,55 \text{ делений} / 4 \text{ час};$$

$$9,55 \text{ делений} : 4 \text{ час} = 2,3878 \text{ деления} / \text{час или } 60 \text{ мин} : 2,39 \text{ деления} = 25,1 \text{ мин} / 1 \text{ g} \approx 25 \text{ мин} / 1 \text{ g}$$

#### **Выводы**

1. *P. multocida* серовар В штамм № 15 являются быстрорастущими факультативно-анаэробными мезофильными бактериями с периодом одной генерации ~ 25 мин, в лабораторных субкультурах неприхотливыми к питательным средам. Недиссоциированные культуры на простых средах растут в S-форме. Элективной жидкой средой являются МПБ на ОПХ.

2. В МПБ на ОПХ размножение пастерелл описывается кривой полинома, где экспоненциальная фаза длится до 7 часов и после достижения тах накопления переходит в

стационарное плато, длительностью до 14 часов. Отмирание культуры происходит в течение 11 часов до концентрации  $4,0 \pm 0,3$  Ig НВЧ/см<sup>3</sup> с непрогнозируемым экспоненциальным подъемом в течение 2 час с  $6,0 \pm 0,1$  до  $7,5 \pm 0,1$  Ig НВЧ/см<sup>3</sup>.

**Литература**

1. Корнієнко, Л.Є. Інфекційні та інвазійні хвороби кролів [Текст] / Л.Є. Корнієнко, О.Б. Домбровський, С.І. Пономар та ін. – Біла Церква, 2003. – 288 с.
2. Руденко, А.Ф. Паразитоценозы животных: учебное пособие для аграрных заведений 3-4 уровня аккредитации по специальности «Ветеринарная медицина» / А.Ф. Руденко, А.И. Сосницкий, А.А. Руденко и др. – Луганск, Элтон-2, 2014. – 590 с.
3. Стегний, Б.Т. Методологические аспекты количественного определения *Pasteurella multocida* в суспензии [Текст] / Б.Т. Стегний, А.И. Сосницкий // Вет. медицина: міжвід. темат. наук. зб. - Х., 2008. - Вип. 91. - С. 454–457.
4. Шевченко, А.А. Лабораторная диагностика лабораторных болезней животных / А.А. Шевченко, Л.В. Шевченко, О.Ю. Черных и др. – Краснодар, 2009. – 575 с.
4. Brothers, M.C. Membrane interaction of *Pasteurella multocida* toxin involves sphingomyelin [Text] / MC Brothers, M. Ho, R. Maharjan [et al.] // FEBS J. – 2011. – Vol. 278 (23) – P. 4633-4648.
5. Haemorrhagic septicemia / OIE Manual of Diagnostic and Tests and Vaccines for Terrestrial Animals Fifth Edition, 2004. – V. 1. – P. 537-548.
6. Miyoshi, S. *Pasteurella multocida* pneumonia: zoonotic transmission confirmed by molecular epidemiological analysis [Text] / S. Miyoshi, H. Hamada, A. Miyoshi e.a. // Geriatr Gerontol Int. – 2012. - № 12(1). – P. 159-163.

**РОСТОВІ ПОТЕНЦІЇ P. MULTOCIDA СЕРОВАР В ШТАМ № 15**

Сосницький О.І., д. вет. н., доцент, [saidgaeu@mail.ru](mailto:saidgaeu@mail.ru)

Дніпропетровський державний аграрно-економічний університет, м. Дніпропетровськ

Анотація. Були вивчені ростові потенції *P. multocida* серовар В в елективному живильному середовищі. Для цього за допомогою методу квантально-альтернативного титрування визначили динаміку накопичення пастерел впродовж всього життєвого циклу популяції збудника, від адаптації до переходу в стан спокою з міні кількістю ж.м.к.

Ключові слова: *P. multocida* серовар В, квантально-альтернативне титрування, МПБ з ОПХ, крива поліному, термін генерації.

**РОСТОВЫЕ ПОТЕНЦИИ P. MULTOCIDA СЕРОВАР В ШТАММ № 15**

Сосницкий А.И., д. вет. н., доцент [saidgaeu@mail.ru](mailto:saidgaeu@mail.ru)

Днепропетровский государственный аграрно-экономический университет г. Днепропетровск

Аннотация. Были изучены ростовые потенции *P. multocida* серовар В в элективной жидкой питательной среде. Для этого методом квантально-альтернативного титрования определили динамику накопления пастерелл в течение всего жизненного цикла популяции, от адаптации до перехода в состояние покоя с мин количеством ж.м.к.

Экспериментально установили временные и количественные характеристики фаз развития популяции в стационарных условиях культивирования. Экспоненциальная фаза размножения длилась до 7 часов и максимальной концентрации  $9,75 \pm 0,1$  Ig НВЧ/см<sup>3</sup>, с последующим переходом кривой полинома в плато, соответствующее стационарной фазе развития, длительностью до 14 час и фазой отмирания, продолжительностью 11 часов.

Выявили непрогнозируемый кратковременный возврат экспоненциального размножения *P. multocida* в период спада количества ж.м.к. популяции с  $6,0$  до  $7,5$  Ig НВЧ/см<sup>3</sup> в течение 2 часов в виде дополнительного пика на ниспадающей кривой полинома с последующим продолжением литического уменьшения концентрации возбудителя до конечного минимального значения в  $4,0 \pm 0,3$  Ig НВЧ/см<sup>3</sup>. Полученные экспериментальные данные динамики количественных изменений размножения *P. multocida* в жидкой элективной питательной среде при стационарных условиях имеют важное значение для отработки режимов подготовки раскладки посевного материала при периодическом культивировании в ферментерах. Использование количественных данных позволяет засеивать раскладку возбудителя в ферментер на пике экспоненциальной фазы размножения культуры, когда бактерии обладают наивысшим потенциалом роста. Фаза адаптации в таком случае практически отсутствует и прокариоты продолжают размножение, пропуская период адаптивной заторможенности метаболизма.

Ключевые слова: *P. multocida* серовар В, квантально-альтернативное титрование, МПБ на ОПХ, кривая полинома, время генерації.

GROWTH ABILITY *P. MULTOCIDA* SEROVAR *B* STRAIN № 15

Sosnitskiy A.I., doctor of veterinary sciences, [saidgaeu@mail.ru](mailto:saidgaeu@mail.ru)

Dnepropetrovsk State Agrarian-economics University, Dnepropetrovsk

Summary. We studied the growth potency *P. multocida* serovar *B* in the determine the dynamics of accumulation pasteurized throughout the life cycle of a population of adaptation before moving to a standstill as the minimum amount I.m.c.

Experimental set the time and quantitative characteristics of the phases of development of the population as a stationary culture conditions. The exponential phase of reproduction lasted 7 hours and a maximum concentration of  $9,75 \pm 0,1 \lg \text{MPN} / \text{ml}^3$ , with the subsequent transition to a polynomial curve plateau corresponding to the stationary phase of development, lasting up to 14 hours and the withering away of the phase, lasting 11 hours.

Revealed unpredictable short-term return of the exponential multiplication of *P. multocida* in the downturn amount I.m.c. population from 6,0 to 7,5  $\lg \text{MPN} / \text{ml}^3$  for 2 hours in the form of an additional peak in the descending curve of the polynomial with subsequent continuation lytic reduction to a final concentration of agent in the minimum value of  $4,0 \pm 0,3 \lg \text{MPN} / \text{ml}^3$ . The experimental data of the dynamics of quantitative changes in breeding *P. multocida* elective liquid medium under stationary conditions are essential for development of training modes young culture seed in a batch cultivation in fermenters. The use of quantitative data enables sowing young culture pathogen into the fermenter at the peak of the exponential phase of reproduction of culture, when bacteria have the highest growth potential. The phase adjustment in this case is practically absent and prokaryotes continues reproduction by skipping period adaptive metabolism inhibition.

Precise quantitative characteristics of *P. multocida* serovar *B* accumulation in different positions in the growth curve makes it possible to purposefully manipulated with growth potentials of culture and seeded in a fermenter in a state of maximum exponential. In this condition, the effect will be achieved continuity of the logarithmic multiplication of bacterial cells in the population, and as a result, it will lead to a controlled reduction in terms of cultivation and production of physiologically full of culture, with distinct antigenic characteristics and fully formed specificity determinants of immunogenicity.

An important theoretical and practical aspect of return is the discovery of an additional peak of the exponential reproduction. This phenomenon has not previously been described in the deep intensive cultivation growing enzymatic mesophilic facultative anaerobic bacteria that induce acute lethal infection by the classical type of epizootic process. Secondary exponential multiplication can be used to generate additional yield of microbial cells, as well as to consider when braking phenomena of microbial growth in the event of extraordinary situations with technological equipment.

Summarizing the experimental data for the quantitative characterization of the phases of development of a microbial culture in a hospital, as a preparatory stage for seeding the fermenter, the most important is the precise definition of a temporary moment of highest energy growth *P. multocida* serovar *B* in the exponential phase of reproduction.

Key words: *P. multocida* serovar *B* - quantum alternative titration MPB on HBD, polynomial curve, generation time.

УДК 619:616.98:579.873.21:614.48

## **МОРФОГЕНЕЗ *Mycobacterium bovis* ДИСОЦІАТИВНИХ ФОРМ У ДИНАМІЦІ БАГАТОЧИСЕЛЬНИХ ПЕРЕСІВІВ**

Ткаченко О.А., д.вет.н., професор, [epizooddau@mail.ru](mailto:epizooddau@mail.ru)

Алексєва Н.В., к.вет.н., доцент, [alekseevaddau@gmail.com](mailto:alekseevaddau@gmail.com)

Дніпропетровський державний аграрно-економічний університет, м. Дніпропетровськ

**Анотація.** В статті наведені результати вивчення морфогенезу *M. bovis*-дисоціантів у динаміці багаточисельних пересівів. Встановлена безпосередня участь ультрадрібних форм (елементарних тілець) у біологічному циклі розвитку *M. bovis*-дисоціантів та доведено, що з фільтривних (ультрадрібних) форм генеруються паличкоподібні мікобактерії.

**Ключові слова:** *M. bovis*-дисоціанти, морфогенез, ультрадрібні форми, фільтривні форми, елементарні тільця