

УДК 619:57.08:579.831

О.В. КОЛЬЧИК, кандидат ветеринарних наук

О.В. ПРОХОРЯТОВА, кандидат ветеринарних наук

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» м. Харків

О.В. ГОДОВСЬКИЙ, кандидат ветеринарних наук

Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів, м Київ

ВИВЧЕННЯ ВПЛИВУ СЕРІЙНОГО ПАСАЖУВАННЯ НА БАКТЕРІАЛЬНІ АСОЦІАЦІЇ В УМОВАХ *IN VITRO*

*У статті представлені результати досліджень щодо вивчення взаємовідносин між різними видами мікроорганізмів у трьох різних природних асоціаціях за умов *in vitro* впродовж 6 пасажів. На шостому пасажі встановлена залежність біологічної активності таких мікроорганізмів як *Proteus vulgaris*, *Salmonella typhimurium* від присутності в асоціації дріжджів. Біологічна активність, таких бактерій як *Pasteurella multocida* та *Wolinella recta*, не залежала від активності накопичення дріжджів, а навпаки з пригніченням росту дріжджів біомаса пастерел та волейнел зростала.*

Ключові слова: бактеріальна асоціація, пасажування, дріжджі, біологічна активність.

Мікробні асоціації широко розповсюджені у природі (грунт, рослини, тварини, людина) і представляють собою один із найбільш перспективних напрямків досліджень. Асоціації мікроорганізмів здатні більш гнучко реагувати на екологічні фактори та зміну середовища перебування в порівнянні з дискретними формами мікробів. Переважна більшість мікробних біоценозів представляє собою симбіотичні асоціації, в яких між бактеріями складаються складні та неоднозначні зв'язки. Популяції мікроорганізмів, що вступають у складні взаємовідносини – конкурентні або кооперативні, під час заселення різних органів, тканин макроорганізму формують специфічний його «мікросимбіоценоз». Зміна вірулентності мікросимбіонтів разом з їх кількісним співвідношенням може суттєво позначитися на перебігу захворювання [1, 2, 3, 4].

Аналіз спрямованості міжмікробних взаємовідносин асоціативних мікросимбіонтів дозволяє прояснити патогенез широкого спектру захворювань. Розкриття механізмів міжмікробних взаємодій, що визначають формування і підтримання асоціативних симбіозів макроорганізму в нормі та під час патологічного стану, відкриває перспективи вирішення фундаментальних проблем мікробіології – виявлення причинно-наслідкових зв'язків формування патогенних варіантів мікросимбіонтів [2, 3]. Однак, відкритим залишається питання щодо механізму міжмікробних взаємодій патогенних бактерій з асоціантами.

Метою дослідження було вивчення впливу серійного пасажування на природні бактеріальні асоціації за умов *in vitro*.

Матеріали і методи. У трьох стаціонарних осередках цирковірус-асоційованих інфекцій свиней (ЦВІС) впродовж 6^{ти} місяців під час дослідження стандартними мікробіологічними та вірусологічним методами від свиноматок та поросят в гніздах виділяли одні й ті самі інфекційні агенти, які віднесено до трьох стійких мікробних асоціацій - (I), (II) та (III). Ідентифікацію бактерій та грибів у складі мікробних (бактеріально-грибково-вірусних) асоціацій, що виділялися з проб патологічного матеріалу від свиней, проводили за тинкторіальними властивостями та патогенними факторами бактерій та грибів згідно з діючими методичними рекомендаціями [5]. Цирковірус 2-го типу ідентифікували методом культивування в перещеплюваній лінії клітин РК-15 в присутності ДЕАЕ-декстрану за методикою Tisher'a (1989). Для виділення, культивування та вивчення культуральних, морфологічних властивостей збудників бактеріальних інфекцій використовували поживні середовища: м'ясо-пептонний бульйон (МПБ, рН 7,2-7,4), бульйон Хотингера, середовище Мартена, 2,5 % м'ясо-пептонний агар (МПА, рН 7,2-7,4), агар Ендо, модифіковане середовище Кіта-Тароці, середовище МРС-4, Блаурока агар Сабуро, середовище Плоскірева, середовище Олькеницького, цитрат Симонса, ацетатний агар з наступною ідентифікацією збудників за загальноприйнятими методами [6].

Під час ідентифікації сальмонел і ешерихій, що були виділені від загиблих і хворих тварин, керувалися тестами мінімального диференційного ряду ВООЗ, у тому числі встановлювали: рухливість, здатність утворювати сірководень та індол, ферментувати лактозу, маніт і сорбіт, за результатами реакцій з метиловим червоним, Фогес-Проскауера, здатністю утилізувати цитрат і ацетат, розщеплювати сечовину та розріджувати желатину.

Бактеріальні асоціації культивували на МПБ та МПА. Проводили пересів на МПБ, витримували у термостаті за температури (37,0±0,5) °С та умов кімнатної температури впродовж 24 год. Таким чином, проводили пересіви протягом 6 пасажів.

Для визначення співвідношення патогенної мікрофлори в асоціації на кожному пасажі висівали добову бульйонну культуру на МПА у розведеннях від 10⁻⁶ до 10⁻⁸ з послідуочим підрахунком колонієутворюючих одиниць. Загальну кількість кожного виду патогенних мікроорганізмів піддавали статистичній обробці, виражали у відсотках з подальшою реєстрацією змін процентного співвідношення бактерій, що входять до складу асоціації.

Методика підтримання та зберігання бактеріальних асоціацій першого (I) і другого (II) консорціумів патентуються.

Результати досліджень. Лабораторними дослідженнями було встановлено наступну градацію репродуктивної активності аеробних мікроорганізмів зі складу бактеріально-грибково-вірусної асоціації I в перебігу її пасажування *in vitro* впродовж 6^{ти} пасажів.

Під час кількісного обліку I мікробної асоціації на 1^{му} пасажі на МПА було встановлено, що частка *Pasteurella multocida* складала 62,1 %, *E. coli* – 18,3 %, *Proteus vulgaris* – 17,9 %, тоді як на частку дріжджів та *Streptococcus suis*

приходилося близько 0,9 % (таблиця 1). На 2^{му} пасажі встановлено активне розмноження дріжджів: їх частка у загальному обсязі культивованої на МПА мікроорганізмів асоціації I складала майже 61,7 %, тоді як *Streptococcus suis* – 19,2 %, *E. coli* – 9,7 %, *Proteus vulgaris* – 4,6 %. Цікаво, що частка *Pasteurella multocida* в складі аеробної складової мікробної асоціації на її 2-му пасажі в МПА склала лише 4,8 %, що на 57,3 % нижче ніж у попередньому пасажі.

На 3-му пасажі аеробних мікроорганізмів даної асоціації відбувалось накопичення біомаси *Streptococcus suis* – 38,9 % та *Proteus vulgaris* – 31,1 %, кількість дріжджів знижувалась до 19,8 %, кількість клітин *Pasteurella multocida* залишалась незмінною.

На 4-му суміжному пасажі I мікробної асоціації *Pasteurella multocida* знову зайняла провідне місце за репродуктивною активністю – 49,3 %, тоді як процентне співвідношення *Streptococcus suis* склало 9,7 %, *Proteus vulgaris* – 15,7 %, *E. coli* – 20,5 %, а частка дріжджів впала до 4,8 %.

Таблиця 1

Динаміка накопичення бактерій, що входили до складу I асоціації, в перебігу 6^{ти} суміжних пасажів (n=3)

Бактерії	Частка аеробних мікроорганізмів (%) в культурах I асоціації на рівні пасажів:					
	1 ^{го}	2 ^{го}	3 ^{го}	4 ^{го}	5 ^{го}	6 ^{го}
<i>Pasteurella multocida</i>	62,1±1,96*	4,8±0,30*	5,4±0,34*	49,3±1,68*	20,3±1,97*	63,4±2,58*
<i>E. coli</i>	18,3±0,71*	9,7±1,22*	4,8±0,30*	20,5±2,01*	58,1±2,18*	18,2±0,74*
<i>Proteus vulgaris</i>	17,9±1,39*	4,6±0,24*	31,1±1,31*	15,7±1,03*	20,4±2,02*	4,8±0,30*
Дріжджі	0,8±0,16*	61,7±1,48*	19,8±0,88*	4,8±0,26*	0,7±0,11*	0
<i>Streptococcus suis</i>	0,9±0,13*	19,2±0,82*	38,9±1,16*	9,7±1,22*	0,5±0,03*	13,6±1,26*
Усього	100	100	100	100	100	100

Примітка: * різниця значень показників вірогідна при $p \leq 0,05$ відносно відповідних показників у попередньому пасажі.

На 5-му пасажі спостерігали підвищення кількості бактеріальних клітин *E. coli* до 58,1 %, тоді як частка клітин *Pasteurella multocida* та *Proteus vulgaris* знизилася до 20,4 %, а клітин *Streptococcus suis* – до 0,5 % та дріжджів – до 0,7 %.

Проведення 6 пасажу I мікробної асоціації призвело до відновлення процентного співвідношення клітин *Pasteurella multocida* та *E. coli* до початкового рівня, як і в 1 пасажі: 63,4 % та 18,2 %, відповідно. Частка клітин *Streptococcus suis* склала 13,6 %, *Proteus vulgaris* – 4,8 %. Клітин дріжджів на 6-му пасажі досліджуваної асоціації не було виявлено.

Таке співвідношення накопичення мікроорганізмів в асоціації свідчило про те, що біологічна активність *Pasteurella multocida* та *E. coli* не залежала від кількості дріжджів, а також вони не конкурували між собою, але накопичення

Proteus vulgaris залежало від кількості дріжджів, так як кількість клітин протея поступово знижувалось починаючи з третього пасажу, як і кількість дріжджів.

До складу бактеріально-грибкової асоціації II мікроорганізми входили у наступному співвідношенні: *Pasteurella multocida* – 36,6 %, дріжджі – 41,5 %, *Veillonella spp.* – 11,2 %, *Streptococcus suis* та *Salmonella typhymurium* – 5,4 % (таблиця 2). Проведення 2 пасажу показало, що кількість бактеріальних клітин пастерел знижувалась на 3,7 % і дріжджів на 39,8 %, в той час як *Veillonella spp* підвищувалась до 33,6 % та *Salmonella typhymurium* до 28,6 %.

Таблиця 2

Динаміка накопичення біомаси бактерій, що входили до складу асоціації II, в перебігу 6^{ти} суміжних пасажів (n=3)

Бактерії	Частка аеробних мікроорганізмів (%) в культурах асоціації II на рівні пасажів:					
	1 ^{го}	2 ^{го}	3 ^{го}	4 ^{го}	5 ^{го}	6 ^{го}
<i>Pasteurella multocida</i>	36,6±2,46*	32,9±0,87*	16,7±1,3*	4,6±0,24*	3,4±0,32*	11,6±0,14*
Дріжджі	41,5±2,23*	1,7±0,07*	1,4±0,04*	23,1±2,31*	49,1±2,77*	0
<i>Veillonella spp.</i>	11,2±0,10*	33,6±1,63*	4,3±0,21*	27,8±1,86*	40,3±2,11*	49,3±2,79*
<i>Streptococcus suis</i>	5,3±0,21*	3,2±0,30*	45,9±2,51*	35,4±1,96*	2,1±0,04*	39,1±2,02*
<i>Salmonella typhymurium</i>	5,4±0,26*	28,6±1,84*	31,7±1,76*	10,9±1,28*	5,1±0,25*	0
Усього	100	100	100	100	100	100

Примітка: * різниця значень показників вірогідна при $p \leq 0,05$ відносно відповідних показників у попередньому пасажі.

У подальшому (3 пасаж) відбувалось накопичення біомаси *Streptococcus suis* на 42,7 % та *Salmonella typhymurium* на 3,1 % за рахунок зниження кількості *Veillonella spp.* на 29,3 % та *Pasteurella multocida* на 16,2 % порівняно з 2 пасажем. Далі, на 4-5 пасажах простежувалось пригнічення ростових процесів – у бактерій *Pasteurella multocida* до 3,4 %, *Streptococcus suis* до 2,1 % та *Salmonella typhymurium* на 5,1 %. В той же час значно підсилюється приріст дріжджів на 26,0 %, *Veillonella spp.* на 36,0 % ніж у 3 пасажі.

Культивування бактерій на 6-му пасажі призвело до повного зникнення дріжджів та сальмонел. Кількість клітин вейлонел зростала на 38,1 %, стрептококів на 33,8 %, проте кількість пастерел знизилася на 25 % у порівнянні з 1-м пасажем.

Співвідношення різних видів мікроорганізмів продовжували вивчати протягом 6 пасажів під час культивування бактеріальної асоціації III.

Реєстрували зниження накопичення бактеріальної маси вейлонел до 3-го пасажу на 36,2 %, дріжджів на 16,2 % і збільшення стрептококів на 52,4 %. Але у 6-му пасажі простежувалась тенденція до витіснення вейлонел стрептококами та

поступове зниження дріжджів впродовж 5-ти пасажів до їх витіснення у 6-му пасажі (таблиця 3).

Таблиця 3

Динаміка накопичення бактерій, що входили до складу асоціації (III), в перебігу 6^{ти} суміжних пасажів (n=3)

Бактерії	Частка аеробних мікроорганізмів (%) в культурах асоціації (I) на рівні пасажів:					
	1 ^{го}	2 ^{го}	3 ^{го}	4 ^{го}	5 ^{го}	6 ^{го}
Veillonella spp.	63,5±2,23*	44,7±2,21*	27,3±1,87*	68,8±2,58*	81,4±3,36*	28,6±1,98*
Streptococcus suis	17,9±1,39*	49,1±1,94*	70,3±2,64*	30,4±1,52*	18,1±0,73*	71,4±3,04*
Дріжджі	18,6±0,84*	6,2±1,44*	2,4±0,22*	0,8±0,02*	0,5±0,01*	0
Усього	100	100	100	100	100	100

Примітка: * різниця значень показників вірогідна при $p \leq 0,05$ відносно відповідних показників у попередньому пасажі.

Таким чином, за результатами проведених досліджень було встановлено, що в усіх трьох бактеріальних асоціаціях простежувалось коливання від зростання до зниження кількості дріжджів і повне зникнення їх у 6 пасажі.

Veillonella spp. під час культивування з 4 іншими бактеріальними агентами накопичувала приріст біомаси наприкінці пасажування. У той час, як у симбіозі з 2 бактеріальними агентами інших видів бактерій відбувалося зниження концентрації вейлонел за рахунок накопичення стрептококів.

Пасажування *Pasteurella multocida* показало, що у асоціації (I) клітини її складало близько 60 % на 1 пасажі в подальшому простежували динаміку зміни співвідношення бактерій, але на 6 пасажі її кількість знову досягала рівня 1-го пасажу.

У бактеріальній асоціації (II) реєстрували зниження клітин пастерел на 30 % у 6 пасажі за рахунок зростання стрептококів і вейлонел.

Кількість клітин сальмонел (бактеріальна асоціація II) зростала на 23,2 % у 2 пасажі та на 26,3 % у 3 пасажі. Далі простежувалось поступове зниження у наступних пасажах до повного виникнення їх у 6 пасажі.

Висновки.

1 За результатами проведених експериментів встановлені симбіотичні взаємовідносини між бактеріями різних видів та зміни їх процентного співвідношення під час сумісного культивування у трьох різних за складом асоціаціях.

2 Доведено, що стрептококи, пастерели та вейлонели здатні пригнічувати інші види бактерій.

3 Встановлено, що на шостому пасажі виявили залежність біологічної активності таких мікроорганізмів як *Proteus vulgaris*, *Salmonella typhimurium* від присутності в асоціації дріжджів. Біологічна активність, таких бактерій як *Pasteurella multocida* та *Veillonella* spp., не залежала від активності накопичення

дріжджів, а навпаки з пригніченням їх росту біомаса пастерел та вейлонел зростала.

Перспективи подальших досліджень

В подальших дослідженнях планується виявити залежність біологічної активності бактерій в асоціації з ДНК та РНК вміщуючими вірусами та дослідити вплив грибкових уражень на розвиток захворювань тварин бактеріального та вірусного походження.

Список використаної літератури

1. *Адамов А.К.* Влияние на персистенцию возбудителей инфекции особенностей взаимодействия их детерминант вирулентности с метаболическими и специфическими механизмами иммунитета [Текст] // Журн. микробиол.- 1994.- Приложение.- С.99-103.
2. *Бондаренко В.М.* Факторы патогенности бактерий и их роль в развитии инфекционного процесса [Текст] // Журн. микробиол.- 1999.- № 5.- С.34-39.
3. *Бухарин О.В.* Персистенция бактериальных патогенов как результат отношений в системе паразит-хозяин [Текст] // Журн. микробиол.- 1997.- № 4.- С.3-9.
4. *Обгольц А.А.* Механизмы персистирования бактерий [Текст] // Журн. микробиол.-1992.-№ 4.- С.70-73.
5. *Ушкалов В.О.* Настанова з бактеріологічної діагностики сальмонельозів тварин [Текст] / В.О. Ушкалов, Т.Ю. Трускова, П.П. Фукс, - ІЕКВМ, - Х., 2002. – 67 с.
6. Микробиологические и вирусологические методы исследования в ветеринарной медицине. Справочное пособие/ А.Н. Головки, В.А. Ушкалов, В.Г. Скрыпник и др. – Х. «НТМТ», 2007, - 512 с.

ИЗУЧЕНИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ РЕЕРИЙНОГО ПАССАЖИРОВАНИЯ НА БАКТЕРИАЛЬНЫЕ АСОЦІАЦІЇ В УСЛОВИЯХ *IN VITRO* / О.В. Кольчик, Е. В. Прохорятова А. В. Годовский

*В статье представлены результаты исследований изучения взаимоотношений между разными видами микроорганизмов в трех разных природных ассоциациях в условиях in vitro на протяжении 6 пассажей. На шестом пассаже установлена зависимость биологической активности таких микроорганизмов как *Proteus vulgaris*, *Salmonella typhimurium* от присутствия в ассоциации дрожжей. Биологическая активность, таких бактерий как *Pasteurella multocida* и *Wolinella recta*, не зависела от активности накопления дрожжей, а наоборот с угнетением роста дрожжей биомасса пастерел и вейлонел увеличивалась.*

Ключевые слова: бактериальная ассоциация, пассажирование, дрожжи, биологическая активность

**STUDY OF THE IMPACT OF THE SERIAL PASSAGES ON
BACTERIAL ASSOCIATIONS IN VITRO / O.V. Kolchik, E.V. Prohorjatova,
A.V. Godovskyi**

The results of research study mutual relations between the different types of microorganisms in three different natural associations in vitro for 6 passages. On the sixth pass-soot the dependence of the biological activity of microorganisms as *Proteus vulgaris*, *Salmonella typhymurium* on the presence of au-dissociation of yeast. Biological activity, such as bacteria *Pasteurella multocida* and *veillonella recta*, not dependent on the activity of the accumulation of yeast, but rather with inhibition of yeast biomass *Pasterel* and *veillonella* increased.

Ke ywords: bacterial association, passazhirovanie, yeasts, biological activity

Рецензент – кандидат ветеринарних наук **Л. М. Виговська**

Рукопис надійшов 23.09.2013р.