

ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БАКТЕРИЙ ВИДА *P. MULTOCIDA*

Хайсанова Владислава Сергеевна

Аспирант, Ульяновский государственный аграрный университет им. П.А. Столыпина
vlada240535@mail.ru

Васильев Дмитрий Аркадьевич

Д.б.н, профессор, Ульяновский государственный аграрный университет им. П.А. Столыпина
dav_ul@mail.ru

Межиева Зарина Хамзатовна

К.вет.н., Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов
bazillab@mail.ru

Шморгун Борис Игоревич

К.вет.н., Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов

STUDY OF BIOLOGICAL PROPERTIES OF *P. MULTOCIDA* BACTERIA

**V. Khaysanova
D. Vasiliev
Z. Mezhieva
B. Schmorgun**

Summary. The article is devoted to the study of the cultural, tinctorial and biochemical properties of the museum strain *P. multocida* 656, for further work with it. As a result of studying the biochemical properties, we concluded that the studied strains do not form hydrogen sulfide, give a negative Voges-Proskauer reaction, lysine decarboxylase, do not dilute gelatin, do not show hemolysis on blood agar. They have the ability to ferment sugars such as glucose, sucrose, mannitol, galactose, fructose. They show positive results on tests: ornithine decarboxylase, indole, nitrates.

Keywords: *P. multocida*, *pasteurella*, identification, tinctorial, biochemical, properties.

Аннотация. Статья посвящена изучению культуральных, тинкториальных и биохимических свойств музейного штамма *P. multocida* 656, для дальнейшей работы с бактериями указанного вида. В результате изучения биохимических свойств, сделали вывод, что изученный штамм не образует сероводород, дают отрицательную реакцию Фогес-Проскауэра, лизиндекарбоксилазу, не разжижают желатин, не показывают гемолиз на кровяном агаре. Обладают способностью ферментировать такие сахара, как глюкозу, сахарозу, маннит, галактозу, фруктозу. Показывают положительные результаты на тесты: орнитиндекарбоксилаза, индол, нитраты.

Ключевые слова: *P. multocida*, пастерелла, идентификация, тинкториальные, биохимические, свойства.

Материалы и методы

Культуральные, биохимические и морфологические свойства бактерий определяли по тестам, указанным в *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2014* (Brenner, 2014). Окраску мазков, приготовление и стерилизацию питательных сред проводили согласно ГОСТ ISO 1113–1–2011. Приготовление суспензий и разведений — ГОСТ Р 51426–99. Посев на питательные среды согласно ГОСТ Р 26670–91. Подготовку и отбор лабораторных проб проводили по ГОСТ Р 26669–85, ГОСТ 31861–2012, ГОСТ 31942–2012. Контроль питательных сред проводили согласно МУК 4.2.2316–08. В работе использовали штамм из музея кафедры МВЭ и ВСЭ ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГАУ» *P. multocida* 656.

Результаты исследования

Изучив литературные данные, сделали вывод, что оптимальная температура роста бактерий штамма *Pasteurella multocida* 656 составила 37 °С и в дальнейшей работе использовали этот температурный режим. В самом начале исследования проводили изучение морфологии роста референс-штаммов *P. multocida*. Посев бактерий был произведен на питательную среду МПА, а также МПБ, культивирование проводили при 37° С в течении 24 и 48 часов.

На МПА выделенные культуры образуют гладкие, выпуклые, сероватые, непрозрачные, круглые колонии, диаметром 0,5–2 мм (рис. 1). В течении 24 ч инкубации на бульоне заметно помутнение, при встряхивании об-

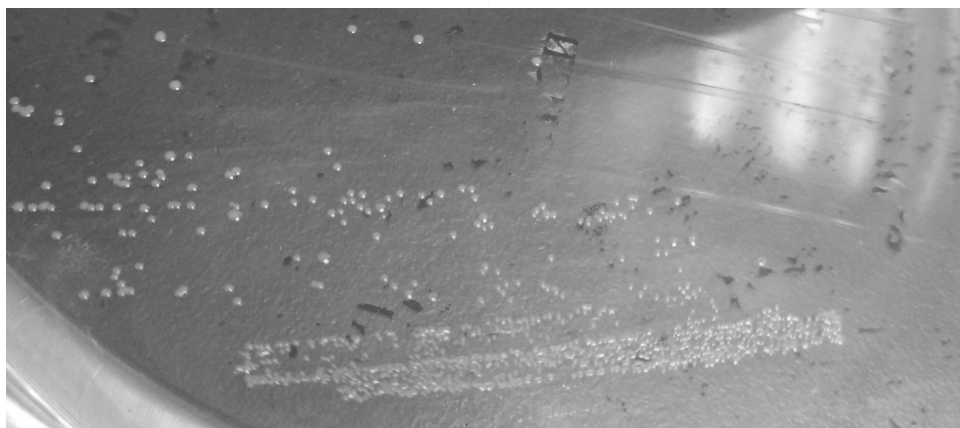


Рис. 1. Рост бактерий *P. multocida* штамм № 656 на МПА через 24 часа культивирования при 37°C.

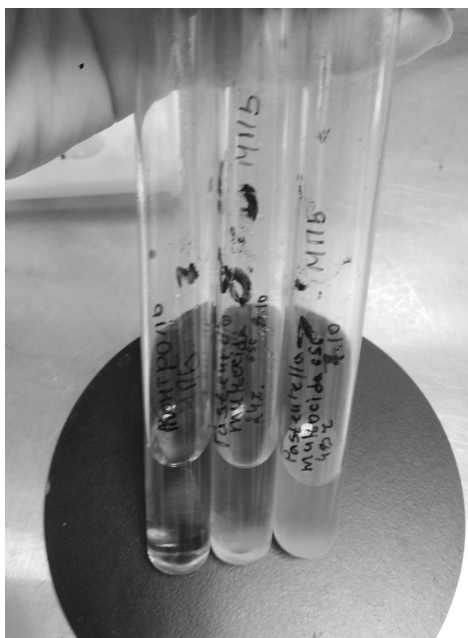


Рис. 2. Рост бактерий *P. multocida* штамм № 656 на МПБ через 24 ч и 48ч культивирования при 37°C. Слева пробирка контроль.



Рис. 3. Окраска по Грамму референс-штамма *P. multocida* увеличение $\times 100 \times 15$



Рис. 4. Реакция на каталазу штамма *P. multocida* 656 на МПА.

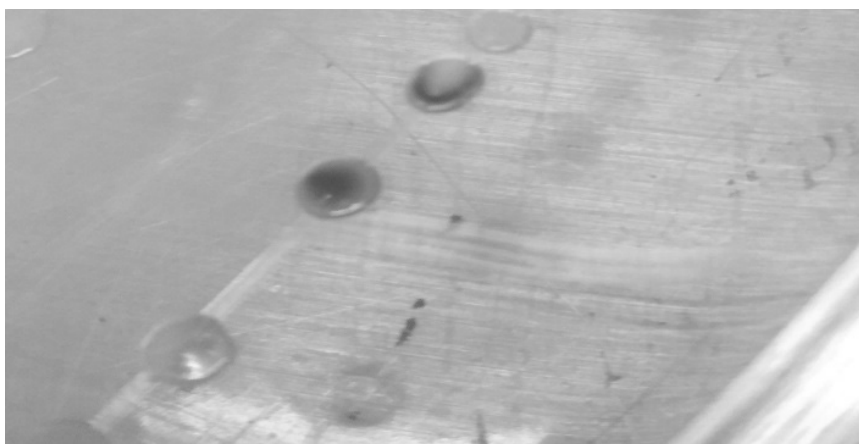


Рис. 5. Реакция на оксидазу штамма *P. multocida* 656 на МПА.

разуются «муаровые» волны. Спустя 48 ч со дна поднимается косичка при циклонном встряхивании.

На следующем этапе исследований проводили окраску изучаемых культур по Граму (рис. 3) и определяли их подвижность (рис. 4).

С помощью методики окраски по Граму было подтверждено, что изученные культуры *P. multocida* являются грамотрицательными бактериями в виде коротких палочек с закругленными концами и заметной биполярностью. Располагаются одиночно, парами или цепочками (рис. 3). Культура являлась неподвижной, о чем свидетельствует рост по уколу, без помутнения всей среды. На выросших колониях, инкубированных 48 ч при температуре 37°C, проводили тесты на оксидазу и каталазу.

Для определения оксидазной активности на чашку Петри с суточной культурой *P. multocida* наносили каплю свежеприготовленного 1% раствора N-N-диметил-пара-фенилендиамина, через 10 сек колонии исследуемого микроорганизма приобретали розовый оттенок, что говорило о положительной оксидазной реакции. Бактерии *P. multocida* оксидаза и каталаза-положительные

На следующем этапе проводили изучение биохимических свойств культур. Перечень изучаемых показателей подбирали в соответствии с литературными данными Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2014 (Brenner, 2014).

Проводили постановку тестов на образование индола (рис. 6), восстановление нитрата (рис. 7). Резуль-

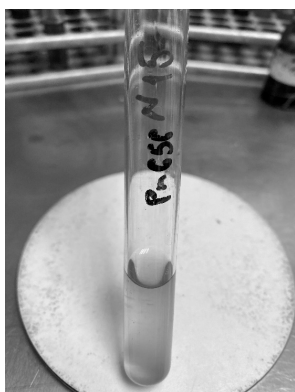


Рис. 6. Тест на образование индола- появление розового слоя (инкубирование бактерий *Pasteurella multocida* 656 в течении 48ч при 37°C)

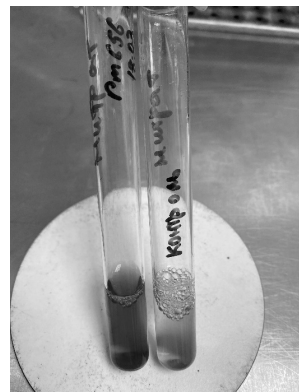


Рис. 7.-Определение способности восстановления нитратов (инкубация бактерий *P. multocida* 656 в течении 48 ч при 37°C) Справа контрольная пробирка.

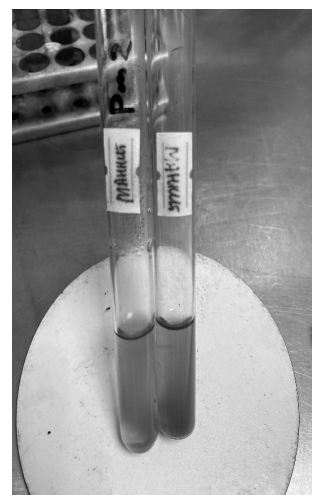
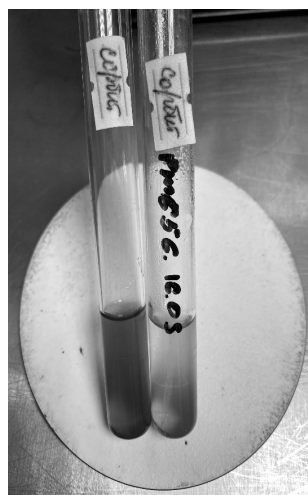


Рис. 8. Определение сахаролитических свойств. (инкубация бактерий *P. multocida* 656 в течении 72 ч при 37°C). Слева контрольные пробирки без посевов.

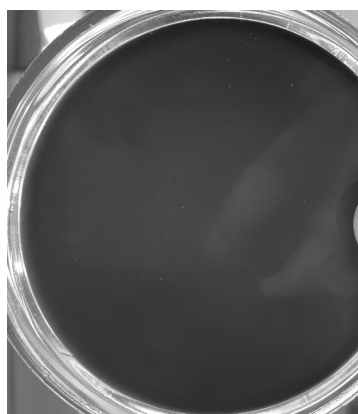


Рис. 9.-Определение способности к β -гемолизу (инкубация бактерий *P. multocida* 656 в течении 48 ч при 37°C)

таты по данным тестам получали спустя 48 часов культивирования культур при 37 °С. Параллельно с этим производили постановку тестов на образование H₂S, определение сахаролитических свойств. Для полной характеристики ферментативных свойств исследуемого штамма были проведены тесты на ферментацию следующих углеводов — мальтоза, манноза, рамноза, раффиноза, дульцитол, ксилоза, маннит (рис. 8) и β-гемолиз (рис. 9). Результаты по данным тестам снимались ежедневно в течении 5–7 дней. Для изучения процесса редукции нитратов, использовали нитратный бульон. В пробирки со средой петлей вносили колонию исследуемого микроорганизма (с МПА). Пробирки культивировали в течение 24-х часов при 37 °С. В пробирки с суточной культурой вносили 1–2 капли 5%-го спиртового раствора α-нафтола. Пробирки тщательно встряхивали. Через 10–15 минут проводили учет результатов. Штамм *Pasteurella multocida* 656 способен редуцировать нитриты в нитраты, продуцируя фермент нитратредуктазу, вплоть до образования азота

в качестве конечного продукта реакции. В данном случае, в процессе культивирования среда окрашивалась в розовый цвет.

ВЫВОД

В результате изучения биохимических свойств, сделали вывод, что штаммы бактерий вида *Pasteurella multocida* 656 не образуют сероводород, дают отрицательную реакцию Фогес-Проскауэра, лизиндекарбоксылазу, не разжижают желатин, не показывают β-гемолиз на кровяном агаре. Обладают способностью ферментировать такие сахара, как глюкозу, сахарозу, маннит, галактозу, фруктозу. Показывают положительные результаты на тесты: орнитиндекарбоксылаза, индол, нитраты. Полученные результаты исследования позволяют предположить, что указанные бактериологические тесты возможно использовать для создания схемы и дифференциации бактерий вида *P. multocida* от сопутствующей микрофлоры.

ЛИТЕРАТУРА

1. Васильев Д.А. Учебно-методическое пособие по методам общей бактериологии / Д.А. Васильев, И.Г. Швиденко, С.Н. Золотухин. // Ульяновск. — 2016. — 152 с.
2. Викторов Д.А. Усовершенствование методов выделения, идентификации и индикации бактерий *Pseudomonas putida*: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.02.03; 03.01.06 / Д.А. Викторов. — Саратов, 2011. — 22 с.
3. Abdelmalek W.Z. phenotypic and genotypic characterization of *pasteurella multocida* isolated from chickens //Benha Veterinary Medical Journal. — 2020. — Т. 39. — №. 1. — С. 63–67.
4. Adil M. et al. Phenotypic Characterization, Molecular Identification and In Vitro Susceptibility of Bubaline *Pasteurella multocida* to Ceftiofur Hydrochloride // International Journal of Agriculture and Biology. — 2019. — Т. 22. — №. 5. — С. 849–854.
5. Bergey's manual of systematic bacteriology: Volume 3: The Firmicutes. — Springer Science & Business Media, 2014. — Т. 3.
6. Boulianne M. et al. Pasteurellosis and other respiratory bacterial infections //Diseases of Poultry. — 2020. — С. 831–889.
7. Holschbach C.L. et al. Prevalence and temporal trends in antimicrobial resistance of bovine respiratory disease pathogen isolates submitted to the Wisconsin Veterinary Diagnostic Laboratory: 2008–2017 //Journal of Dairy Science. — 2020. — Т. 103. — №. 10. — С. 9464–9472.
8. Hurtado R. et al. Pathogenomics insights for understanding *Pasteurella multocida* adaptation //International Journal of Medical Microbiology. — 2020. — Т. 310. — №. 4. — С. 151417.
9. Kim J. et al. Characterisation of *Pasteurella multocida* isolates from pigs with pneumonia in Korea //BMC veterinary research. — 2019. — Т. 15. — №. 1. — С. 1–8.
10. Nawara M.B., Khaled M.A., SW E.M. Isolation, identification and antibiogram of *Pasteurella multocida* isolated from apparently healthy rabbits in Al-Bayda, Libya.
11. Peng Z. et al. Genetic and phylogenetic characteristics of *Pasteurella multocida* isolates from different host species //Frontiers in microbiology. — 2018. — Т. 9. — С. 1408.
12. Yilma M.A. et al. Phenotypic and Molecular Characterization of the Capsular Serotypes of *Pasteurella Multocida* Isolates From Bovine Respiratory Disease Cases in Ethiopia. — 2020.