

ZAPOTRZEBOWANIA WZROSTOWE GATUNKU *PASTEURELLA MULTOCIDA*

KAZIMIERZ BUKOWSKI

Katedra Mikrobiologii Wydziału Weterynaryjnego SGGW

Kierownik Prof. dr Juliusz Brill

W związku z podjęciem przez katedrę prac nad budową antygenową *P. multocida*, wysunęło się zagadnienie odpowiedniej pożywki dla tych drobnoustrojów, przynajmniej takiej, która dawałaby dużą ilość masy komórkowej o odpowiednich wartościach antygenowych. W oparciu o dostępną literaturę chciałbym w pierwszym rzędzie przedstawić aktualny stan wiadomości o zapotrzebowaniach wzrostowych *P. multocida*.

Wzrost tych drobnoustrojów jest zależny od różnych czynników, m. in. od koncentracji jonów wodorowych w pożywkach, temperatury inkubacji, od jakościowego i ilościowego składu chemicznego podłoża. *P. multocida* na podłożach sztucznych rośnie w granicach pH od 6—8,5. Optimum pH leży jednak w zakresie 7,2—7,4. Optimum temperatury inkubacji dla tych drobnoustrojów wynosi 37°C Merchant (1956). Podobnie jak i innym drobnoustrojom również dla *P. multocida* niezbędne są do wzrostu sole nieorganiczne. Niektóre jony związków mineralnych odgrywają rolę aktywatorów w reakcjach enzymatycznych, jak np.: Mg⁺⁺, który ma duże znaczenie w procesach fosforylacji, i jest aktywatorem koenzymu A. Poza tym sole są czynnikiem utrzymującym stały poziom ciśnienia osmotycznego i stabilizują równowagę jonową między komórką a środowiskiem. Rolę czynnika regulującego ciśnienie osmotyczne spełnia chlorek sodowy, w praktyce zazwyczaj do pożywek dodaje się sole zawierające kationy Na, K, Mg, oraz aniony SO₄PO₄ i Cl.

W skład krwinek, które najczęściej dodaje się do podłoży wchodzi hematyna nazywana czynnikiem X dla pałeczek *Haemophilus*. Czynnik ten zawarty w krwinkach sprzyja wzrostowi wszystkich drobno-

ustrojów już w dawkach rzędu tysięcznych mikrograma na mililitr pożywki. Czynniki wzrostowy X działa jako katalizator oddechowy wzrostu odbywającego się w warunkach tlenowych.

Webster już w 1925 r. zauważył, że dodatek krwi do podłoża umożliwia lepszy wzrost *P. multocida* w warunkach tlenowych. Jordan (1952) zaobserwowała podobne zjawisko i stwierdza, że krew może być zastąpiona przez hematynę, katalazę, siarczyn sodowy i inne ciała zdolne do katalizowania rozkładu perhydrołu. W dalszych badaniach wspomniana autorka udowodniła, że wymienione przez nią substancje mają znaczenie dla wzrostu *P. multocida* jedynie w warunkach tlenowych. Działania ich nie można tłumaczyć bezpośrednim wpływem na wzrost *P. multocida* gdyż np. hematyna nie oddziaływała na produkcję enzymów ale jedynie regulowała dopływ tlenu. Badania przeprowadzono posiłkując się podłożami stałymi.

Według Baina (1959) czysty tlen użyty do przewietrzenia hodowli *P. multocida* na podłożu płynnym jest inhibitorem wzrostu gdyż likwiduje słabe działanie katalazy. Dodatek CO₂ do powietrza używanego do przewietrzania hodowli płynnej na podłożu Baina i Jonesa (1958) nie wywierał ani ujemnego ani dodatniego wpływu na wzrost. Podobnie zachowały się hodowle, jeżeli przewietrzano je tylko zwykłym powietrzem filtrowanym. Działanie czystego tlenu na wzrost *P. multocida* można było zahamować dodając duże ilości krwi.

Wynika z tego wniosek, że w hodowli występowało podobne zjawisko jakie opisała Jordan. Przewietrzanie hodowli powietrzem w zwykły sposób zwiększa powierzchnię odżywiania dla drobnoustrojów. Podobne rezultaty można osiągnąć stosując zamiast przewietrzania wstrząsanie co praktykuje się przy hodowli w małych objętościach.

Ryu (1959) donosi, że świeża surowica krwi kóz, koni, bydła hamuje wzrost *P. multocida*. Czynniki hamujące zawarty w surowicy ginie po ogrzaniu jej do 60°C w ciągu 30 min. Autor pracy przypuszcza, że czynnikiem tym jest aleksyna. Surowica krwi kury nie wykazywała jednak tego działania. Dodanie krwinek odmytych z surowicy ma wyraźne działanie pobudzające wzrost *P. multocida*.

W jednej ze swej publikacji Jordan (1952) omawia znaczenie maltozy i galaktozy jako jedynych źródeł węgla w tlenowych warunkach hodowli. Węglowodany te na podłożu syntetycznym hamują wzrost pastereli w różnym stopniu, natomiast kwas mlekowy i sacharoza stanowią wystarczające źródło węgla zapewniające normalny wzrost tych drobnoustrojów. Berkman (1940) wykazał, że pantotenian wapnia, amid nikotynowy, biotyna, dwufosfopirydy, nonukleotyd są czynnikami podstawowymi wzrostu *P. multocida*. Tenże Berkman pisze jednak, że ani czysta biotyna ani czysty kwas nikotynowy nie mogą zastąpić

wymienionych poprzednio nieoczyszczonych preparatów biotyny, czy też amidu kwasu nikotynowego. Czynniki, którego nie dało się zidentyfikować nazwano „Butylfaktor”.

Z publikacji Jordan (1952) wynika, że czynnikami wzrostowymi dla *P. multocida* są: kwas olejowy, amid nikotynowy, tiamina, pantotenian wapnia i l-cystyna.

Bain i Jones (1958) mając na uwadze obecność dużej ilości witamin w wyciągach wodnych z komórek drożdżowych, opracowali podłoże, na którym uzyskali wielokrotnie bogatszy wzrost *P. multocida* aniżeli na podłożach stosowanych dotychczas.

Większość witamin znajdujących się w wyciągach wodnych z drożdży stanowi czynniki wzrostowe dla *P. multocida*.

W doświadczeniach przeprowadzonych w Zakładzie Mikrobiologii Wydziału Weterynaryjnego w Warszawie wykorzystano podłoże opracowane przez Baina i Jonesa (1958) o składzie: 170 ml hydrolizatu kazeiny, 100 ml wyciągu wodnego drożdży, 5 g tryptonu, 2 g sacharozy, 1 g krystalicznego siarczanu magnezowego ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), 2,72 g kwaśnego fosforanu potasowego dwuzasadowego (KH_2PO_4), 10,745 g krystalicznego kwaśnego fosforanu sodowego ($Na_2HPO_4, 12 H_2O$), i dopełniono wodą destylowaną do 1000 ml. Po ustaleniu pH na 7,6 sterylizowano w autoklawie przy $120^\circ C$ przez 12 min. Dobrze przygotowane podłoże zawiera około 270 mg $\%$ całkowitego azotu określonego metodą Kjeldahla w 100 ml pożywki.

Poniżej podaję sposoby przygotowania poszczególnych składników pożywki:

a) Hydrolizat kazeiny: do 200 g kazeiny dodać 170 ml 10 n HCl i 10 ml wody mieszać do chwili rozpuszczenia kazeiny: sterylizować w autoklawie przy $120^\circ C$ przez 45 minut, oziębiać i zobojętniać 5-procentowym NaOCH do pH 7,0. Ług sodowy należy dodawać stopniowo, ażeby nie dopuścić do podwyższenia temperatury hydrolizatu powyżej $30^\circ C$. Następnie dodać 3% węgla aktywnego, sączyć przez bibułę. Płyn użyty do pożywki powinien mieć barwę słomkową.

b) Przygotowanie wyciągu wodnego drożdży: do 450 g sprasowanych komórek dodać 500 ml wody destylowanej, doprowadzić do wrzenia i gotować niezbyt gwałtownie przez 5 min. stale mieszając, następnie odwirować. Do sporządzenia pożywek użyć płyn z nad osadu. Na płynnej pożywce Baina-Jonesa nawet przy małym inokulum wyjściowym drobnoustrojów można otrzymać obfity wzrost. Jest on około 5-krotnie większy niż na zwykłym bulionie z mięsa końskiego. Bain zaleca przewietrzanie hodowli filtrowanym powietrzem, gdyż pozwala to otrzymać

obfitszy wzrost i większą masę komórkową. Z 1000 ml hodowli na podłożu według sprawozdania, Baina i Jonesa otrzymuje się 0,5 g komórek bez przewietrzania, a 1,9 g przy intensywnym przewietrzaniu.

Zachęteni dobrymi wynikami hodowli podanymi przez Baina postanowiliśmy poddać próbom opisane podłoże, tym bardziej, że stosowane było ono dla produkcji masy komórkowej do szczepionek.

Przedmiot naszych badań stanowiło 20 szczepów *P. multocida* zarówno świeżo wyizolowanych jak i muzealnych przechowywanych w pracowni około 1 roku. Szczepy różniły się między sobą zarówno właściwościami biochemicznymi jak i serologicznymi. Mimo tego wzrost każdego z 20 szczepów był w zasadzie jednakowo obfity.

Przed wysianiem na podłoże Baina wszystkie szczepy posiewano na skosy krwawe na 24 godziny. Następnie splukiwano roztworem fizjologicznym soli kuchennej i doprowadzano stan zmętnienia do 100 000 000 porównując z standardem przygotowanym metodą Wrighta. W ten sposób w dużym przybliżeniu zdołano określić inokulum wyjściowe do posiewu na podłoże. Z kolei zawiesinę rozcieńczano do 1000 komórek w 1 mililitrze i 0,1 ml posiewano na 3 ml pożywki. Po 24 godz. inkubacji w cieplarni w temperaturze 37°C hodowlę starannie mieszano, a następnie rozcieńczano roztworem fizjologicznym NaCl do 10^{-5} z tego rozcieńczenia wysiewano 0,1 ml na agar krwawy na płytce o ϕ 10 cm. Materiał na powierzchni rozprowadzano równomiernie bagietką szklaną. Po 24 godz. inkubacji w cieplarni odczytywano wyniki licząc wyrosłe kolonie na powierzchni pożywki. Analogicznie postępowano z hodowlą kontrolną na zwykłym bulionie, użytą zamiast pożywki Baina-Jonesa (wyniki zawiera tabela I).

Uzyskane wyniki wskazują, że średnia wzrostu dla 20 szczepów na podłożu Baina-Jonesa jest około 6-krotnie większa bez wstrząsania i około 9-krotnie większa z wstrząsaniem hodowli niż hodowli w bulionie zwykłym w tych samych warunkach. Z tego zestawienia wyższa wartość Baina-Jonesa w porównaniu z bulionem odżywczym jest niezaprzeczalna. Uzyskane wyniki są zasadniczo zgodne z danymi podanymi przez Baina jakkolwiek użyte metody różniły się między sobą.

W dalszym ciągu badań podłoże próbowano zestalić 3-procentowym agarem. Wzrost *P. multocida* na podłożu zestalonym był jednak skąpy i wymagał dużego inokulum do posiewu. Należy dodać, że warunki hodowli na podłożu stałym zapewniają większy dopływ tlenu niż w płynnym. Czynnikiem hamującym wzrost na podłożu stałym może być tlen, a nie brak składników odżywczych. Na podłożu tym rosną również dobrze wszystkie inne rodzaje drobnoustrojów.

Tabela 1

Porównanie wzrostu *P. multocida* na odżywczym bulionie i na podłożu Baina-Jonesa

| Szczepy | 24-godzinna hodowla rozcieńczona 10 ⁻⁵ | | | | |
|---|---|-----------------------|---|--------------------|----------------------|
| | Liczba szczepów | hodowla niewstrząsana | | hodowla wstrząsana | |
| | | bulion | podłoże Baina Jonesa | bulion | podłoże Baina Jonesa |
| | | | średnia ilość wyrosłych kolonii (na podłożu stałym) | | |
| zlepiające się pod wpływem monowalentnej surowicy <i>anti P. bubaliseptica</i> (8369) | 4 | 18 | 107 | 22 | 175 |
| zlepiające się pod wpływem monowalentnej surowicy <i>anti P. ovoseptica</i> (8747) | 1 | 23 | 98 | 16 | 171 |
| nie zlepiające się pod wpływem powyżej podanych surowic | 15 | 16 | 86 | 22 | 156 |

Wszystkie cytowane tu prace nie wiążą zagadnienia odżywiania z podziałem serologicznym ani z budową antygenową. Wyjątek stanowi praca Baina i Jonesa, który pracował w szczególności z typem I Robertsa. Powiązanie zagadnienia budowy antygenowej z zagadnieniem odżywiania mogłoby mieć poważne znaczenie dla produkcji szczepionek i ich skuteczności dla zwierząt.

Odpowiednia gęstość hodowli na podłożu Baina-Jonesa umożliwia użycie jej bezpośrednio bez zagęszczania jako antygenu do uodparniania zwierząt. Ma to tę zaletę, że do podłoża podczas wzrostu wypłukują się też rozpuszczalne antygeny co jak wiadomo nie jest obojętne przy produkcji szczepionek względnie surowic. Pożywka Baina-Jonesa powinna znaleźć w kraju zastosowanie dla przygotowania:

- zawiesin bakteryjnych do produkcji szczepionki i surowic odpornościowych,
- zawiesin bakteryjnych dla celów diagnostycznych,
- masy bakteryjnej dla badań składu antygenowego *P. multocida*,
- może być też podstawą opracowania podłoży wybiórczych do izolacji *P. multocida* bezpośrednio z materiału. (Brak podłoży wybiórczych wskazuje na potrzebę podjęcia badań w tym kierunku). Podłoże to jest o wiele tańsze od podłoży mięsnych i tym samym może zmniejszyć koszt produkcji.

LITERATURA

1. Bain R. V. S., Jones R. F. (1958) *Brit. Vet. J.* 114, 215.
2. Bain R. V. S. (1959) *Brit. Vet. J.* 115, 10, 365.
3. Berkman S., Saunders F., Koser S. A. (1940) *Proc. Soc. Exp. Biol.* 44, 68.
4. Berkman S. (1942) *J. Infect. Dis.* 71, 201.
5. Jordan R. M. M. (1952) *Brit. J. Exp. Path.* 33, 27.
6. Jordan R. M. M. (1952) *Brit. J. Exp. Path.* 33, 27.
7. Merchant I. A., Packer R. A. (1956) *Vet. Bact. Virology* fifth ed 402.
8. Ryu. E. (1959) XVI Inter. Vet. Cong. Madrid 21—27 mayo. str. 571.
9. Webster L. T. (1925) *J. Exp. Med.* 41, 571.

РОСТОВЫЕ ТРЕБОВАНИЯ ВИДА *PASTEURELLA MULTOCIDA*

Р е з ю м е

На основании доступной литературы в докладе рассмотрена роль крови, гематина, витаминов, сахаров для *P. multocida* в аэробных и анаэробных условиях роста. Затем проведено анализ пригодности и питательной ценности жидкой среды Бейна и Джонса (1958). Для опытов использовано 20 штаммов *P. multocida* различных серологических типов. Рост *P. multocida* на этой среде определялся с помощью метода разбавления жидкой культуры. Культуры посеивались в разбавлении ± 10 в количестве 0,1 мл на питательный агар с кровью. Средняя роста (количества колоний) для 20 штаммов *P. multocida* на жидкой среде по Бейну и Джонсу без встряхивания во время инкубации была в 6 раз выше, а со встряхиванием в 9 раз выше, чем на обыкновенном питательном бульоне. Средняя роста *P. multocida* на среде Бейна и Джонса сгущенной 3% агаром не отличалась от средней роста на обыкновенном питательном агаре.

K a z i m i e r z B u k o w s k i (Warszawa)

THE GROWTH REQUIREMENTS OF THE SPECIES
PASTEURELLA MULTOCIDA

S u m m a r y

In the presented paper, on the basis of the accessible literature, the author discusses the role of blood, haematin, vitamins, and sugars for *P. multocida* under aerobic and anaerobic growth conditions. After-

wards an analysis was conducted to state the usefulness and nourishing value of the fluid medium after Bain and Jones (1958). Twenty *P. multocida* strains of various serological types were used in the experiment. The growth of *P. multocida* on the medium was determined by means of the fluid culture dilutions method. 0.1 ml of the culture diluted $10 \pm$ was disseminated on the nutrient agar with blood. The mean of growth of the colonies number for twenty *P. multocida* strains in the fluid medium after Bain and Jones, without shocking them during the incubation was by six time greater than in the ordinary nutrient broth. The mean of growth of *P. multocida* in the Bain and Jones' medium, as coagulated with the three percentageous agar, did not differ from the mean of growth in the ordinary nutrient agar.