

ВИЗНАЧЕННЯ МІКРОЧАСТИНОК У РІДКИХ ПОЖИВНИХ СЕРЕДОВИЩАХ ЗА ДОПОМОГОЮ ОПТИЧНОГО МЕТОДУ

І. М. Кушнір

Державний науково-дослідний контрольний інститут ветеринарних препаратів та кормових добавок

У статті висвітлено питання визначення концентрації мікрочастинок за допомогою методу розсіювання світла та їх розмірне розподілення у пептонній воді, що піддавалась автоклавуванню, а також досліджено вплив інкубування на кількісний стан мікрочастинок у розчині. Встановлено збільшення кількості мікрочастинок в автоклавованій пептонній воді, у порівнянні з неавтоклавованою. При інкубуванні поживного середовища впродовж 24–48 год відмічено збільшення кількості мікрочастинок немікробної природи, а також збільшення кількості мікрочастинок великих розмірів.

Дослідження швидкості росту мікроорганізмів проводять різними методами, проте, одними із розповсюджених є різноманітні оптичні методи [1–4]. Традиційний турбодиметричний метод дає змогу проводити дослідження за умови великої концентраціями клітин на рівні 10^6 – 10^8 в 1см^3 . Спосіб ґрунтується на змінах мутності рідкого поживного середовища у процесі культивування в ньому мікроорганізмів [5]. Зміна мутності рідкого поживного середовища включає дві складові: мутність розчину, зумовлену зміною кількості мікроорганізмів у процесі їх культивування, та мутність розчину, зумовлену зміною фізико-хімічних параметрів рідкого поживного середовища.

Перед використанням поживні середовища піддаються стерилізації, проте, високі температурні режими приводять до деструкції поживних середовищ, а значить до зміни їх фізико-хімічних властивостей.

Метою нашої роботи була кількісна оцінка концентрації мікрочастинок та їх розмірне розподілення у пептонній воді, що піддавалась дії високої температури.

Матеріали і методи. Пептонну воду, приготовану згідно з ДФУ [6], фільтрували через мембранний фільтр з порами 0,2 мкм та розділяли на дві частини, одну з яких автоклавували при температурі 121 °С впродовж 15 хв. Після автоклавування розчин охолоджували до кімнатної температури та проводили вимірювання розмірного розподілу мікрочастинок в обох частинах пептонної води. У подальшому автоклавований та неавтоклавований розчин пептонної води поміщали в термостат та інкубували впродовж 48 год за температури 37 °С. Вимірювання розмірного розподілу мікрочастинок проводили в обох частинах пептонної води перед інкубуванням та через 24 і 48 год.

Розмірний розподіл мікрочастинок проводили на пристрої ПРМ-6, згідно з алгоритмом, описаним в [7, 8]. Графічне представлення результатів вимірів проводили шляхом визначення кількості мікрочастинок у вибраному інтервалі розмірів до загальної кількості мікрочастинок у досліджуваному розмірному інтервалі. Загальну концентрацію мікрочастинок у розчині визначали шляхом перерахунку з урахуванням ефективності реєстрації мікрочастинок у різних розмірних інтервалах.

Результати та обговорення. Визначення концентрації мікрочастинок у неавтоклавованій та автоклавованій пептонній воді, що піддавалась інкубуванню за температури 37 °С впродовж 24 та 48 год подано у таблиці.

Концентрація мікрочастинок у пептонній воді

Час інкубування (год)	Неавтоклаована	Автоклаована
	Концентрація мікрочастинок, $10^4/\text{см}^3$	
Перед інкубуванням	9,6±0,2	25,3±0,9
24	11,2±0,3	36,2±1,1
48	11,4±0,3	40,1±1,2

Як видно з даних, наведених у таблиці, у розчині пептонної води, що піддавалась автоклауванню перед інкубуванням, відзначали збільшення концентрації мікрочастинок на 163 % у порівнянні з неавтоклаованою пептонною водою. У подальшому на 24 та 48 год інкубування концентрація мікрочастинок в автоклаованій пептонній воді збільшувалась на 43 та 58,4 %, у порівнянні до початку інкубування.

Кількість мікрочастинок у не автоклаованій пептонній воді на 24 та 48 год інкубування збільшувалась лише на 16,6 та 18,7 %, у порівнянні до початку інкубування.

Результати визначення розмірного розподілу мікрочастинок у пептонній воді, яку автоклаували та неавтоклаованої наведені на рисунку 1.

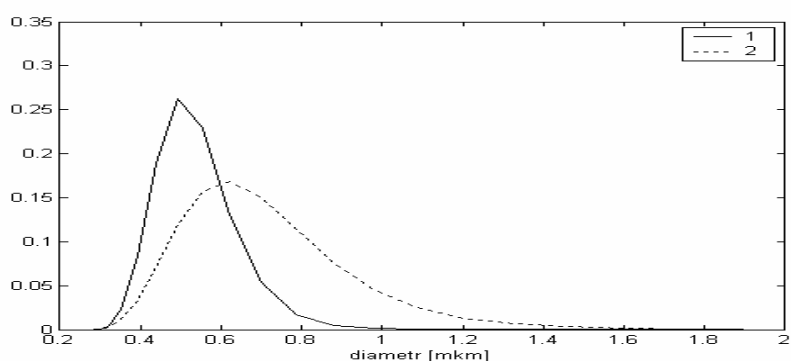


Рис. 1. Розподіл мікрочастинок за розмірами

Примітка: крива 1 — неавтоклаована пептонна вода, крива 2 — автоклаована пептонна вода

Як видно з рисунку 1, у автоклаованій та неавтоклаованій пептонній воді спостерігали суттєві зміни у розмірному розподілі мікрочастинок. Значні зони розсіювання припадали на ділянку 0,42–0,58 мкм для неавтоклаованої пептонної води, при цьому максимум розсіювання світла припадав на ділянку з розмірами 0,48 мкм. При дослідженні автоклаованої пептонної води відмічали збільшення мікрочастинок великих розмірів. Так, значні зони розсіювання припадали на ділянку 0,5–0,8 мкм з максимумом розсіювання 0,62 мкм. При цьому концентрація мікрочастинок у автоклаованому середовищі зростала приблизно у 2,6 раза. Результати вимірювання розподілу мікрочастинок за розмірами у неавтоклаованій пептонній воді після приготування та через 24 і 48 год інкубування в термостаті за температури 37 °С, наведені на рисунку 2.

Як видно з рисунку 2, у неавтоклаованій пептонній воді відмічалися значні зони розсіювання в інтервалі розмірів 0,42–0,53 мкм. Максимум розсіювання припадає на ділянку 0,48 мкм. Після інкубування максимум розподілу зміщувався із 0,48 мкм у вихідному розчині до 0,5 після 24 год та до 0,6 мкм після 48 год. При цьому суттєвих змін збільшення концентрації мікрочастинок у процесі інкубування не відмічали.

Результати вимірювання розподілу мікрочастинок за розмірами в автоклаованій пептонній воді після інкубування за температури 37 °С впродовж 24 та 48 год наведені на рисунку 3.

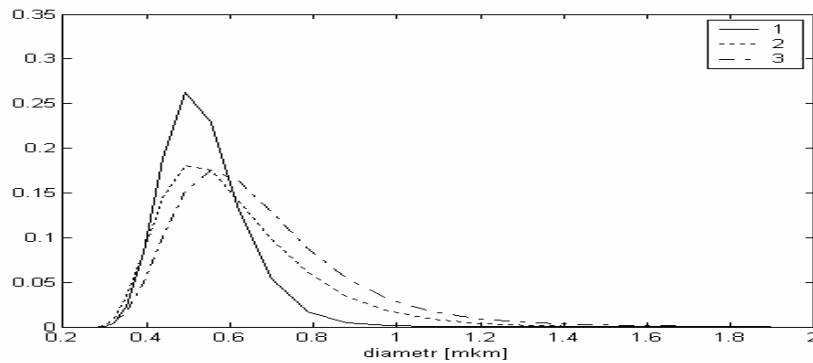


Рис. 2. Розподіл мікрочастинок за розмірами у пептонній воді

Примітка: крива 1 — неавтоклавована пептонна вода, крива 2 — неавтоклавована пептонна вода, інкубована 24 год, крива 3 — неавтоклавована пептонна вода, інкубована 48 год

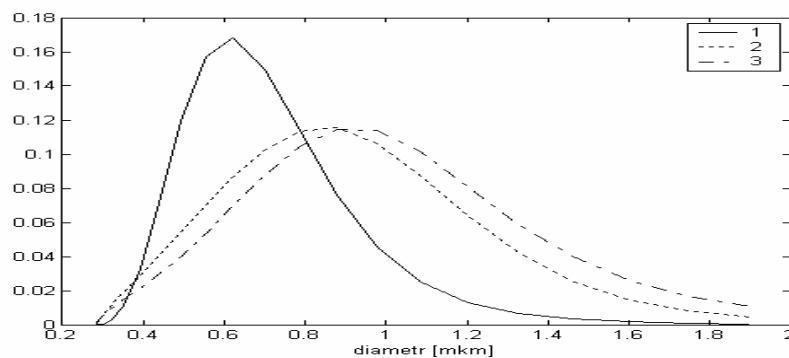


Рис. 3. Розподіл мікрочастинок за розмірами у автоклавованій пептонній воді

Примітка: крива 1 — автоклавована пептонна вода, крива 2 — пептонна вода, інкубована 24 год, крива 3 — пептонна вода, інкубована 48 год

Як видно з рисунку 3, у автоклавованій пептонній воді (крива 1) відмічали значні зони розсіювання світла в інтервалі розмірів 0,5–0,7 мкм. Максимум розсіювання світла припадав на ділянку розмірами 0,6 мкм. Через 48 год після інкубування зростало число мікрочастинок великих розмірів, а максимум розподілу зміщувався з 0,6 мкм у вихідному розчині до 0,92 мкм.

Результати свідчать, що в процесі культивування у поживних середовищах збільшується концентрація та розмір мікрочастинок немікробної природи, а також кількість мікробних клітин. Тому для вірогідних результатів вимірювань, необхідно проводити паралельні вимірювання концентрації мікрочастинок у середовищі без внесених мікроорганізмів та враховувати результати цих вимірювань при обробці результатів.

ВИСНОВКИ

1. Концентрація мікрочастинок великих розмірів 0,5–0,8 мкм у пептонній воді зростає при підвищенні температури термічної обробки середовища.
2. У процесі культивування пептонної води збільшується кількість мікрочастинок великих розмірів.

Перспективи подальших досліджень. Планується розробка оптичного методу контролю механічних включень у ветеринарних лікарських засобах.

DEFINITION OF MICROPARTICLES IN LIQUID NUTRIENT ENVIRONMENT

USING OPTICAL METHODS

I. M. Kushnir

S U M M A R Y

The article highlighted the issue of determining the concentration of micro-particles and their dimensional distribution in pepton water, by method of light scattering, that was subjected to autoclaving, and the influence of incubation on quantitative status of micro-particles in solution. The increase in the number of micro-particles in autoclaved pepton water comparing with non-autoclaved was established. At incubation of nutrient environment for 24–48 hours, the increase of number of micro-particles of non-microbial nature, as well as increasing the number of large micro-particles was marked.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МИКРОЧАСТИЦ В ЖИДКИХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ ПРИ ПОМОЩИ ОПТИЧЕСКОГО МЕТОДА

И. М. Кушнир

А Н Н О Т А Ц И Я

В статье освещен вопрос определения при помощи метода рассеивания света концентрации микрочастиц и их размерное распределение в пептонной воде, которая подвергалась автоклавированию, а также исследовано влияние инкубации на количественное состояние микрочастиц в растворе. Установлено увеличение количества микрочастиц в автоклавированной пептонной воде, по сравнению с неавтоклавированной. При инкубации питательной среды на протяжении 24–48 часов отмечено увеличение количества микрочастиц немикробной природы, а также микрочастиц больших размеров.

Л І Т Е Р А Т У Р А

1. *Alupoaei C. E. Rubio* Quantitative spectroscopy analysis of prokaryotic cells: vegetative cells and spores / C. E. Alupoaei, J. A. Olivares, L. H. Garc // Biosensors and Bioelectronics. — 2004. — Vol. 19. — P. 893–903.
2. *Bhunja A. K.* Light Scattering, Fiber Optic- and Cell-Based Sensors for Sensitive Detection of Foodborne Pathogens / A. K. Bhunia, P. Banada, P. Banerjee et al. // Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology. — 2007. — Vol. 15. — P. 121–145.
3. *Wos M.* Sensitive and meaningful measures of bacterial metabolic activity using NADH fluorescence / M. Wos, P. Pollard // Water Research. — 2006. — Vol. 40. — P. 2084–2092.
4. *Wang L.* Fluorescent Nanoparticles for Multiplexed Bacteria Monitoring / L. Wang, W. Zhao, Meghan B. // Bioconjugate Chem. — 2007. — Vol. 18. — P. 297–301.
5. *Van Benthem R. C.* Compact Optical Sensor for Real-Time Monitoring of Bacterial Growth for Space Applications / R. C. van Benthem, D. van Den Assem, Krooneman J. // Ann. N. Y. Acad. Sci. — 2002. — Vol. 974. — P. 541–555.
6. Державна Фармакопея України 1-видання // Харків : РІГЕР, 2001. — 531 с.
7. *Bilyy O. I.* Rapid detection of bacterial cells by light-scattering method / O. I. [Bilyy](#), V. B. [Getman](#), R. O. [Bilyy](#) // Proc. SPIE. — 2008. — Vol. 6864. — P. 686411–10.
8. *Kotsyumbas I. Ya.* Light scattering application for bacterial cell monitoring during cultivation process / I. Ya. [Kotsyumbas](#), [I. M. Kushnir](#), R. O. [Bilyy](#) // Proc. SPIE 2007. — Vol. 6631. — P. 66311I–8I-8.

Рецензент: кандидат біологічних наук В. І. Ткаченко, ДНДКІ ветпрепаратів та кормових добавок.

УДК: 636.2:619:612.015.3

ЗМІНИ ДЕЯКИХ ПОКАЗНИКІВ ВУГЛЕВОДНОГО ОБМІНУ У КРОВІ ХВОРИХ НА КЕТОЗ ТА ЗДОРОВИХ КОРІВ

М. Р. Сімонов

Інститут біології тварин НААНУ

У роботі представлений аналіз вмісту глюкози, пірвіноградної кислоти, інсуліну та кортизолу у крові здорових та хворих високопродуктивних корів до та після отелення. Проведені дослідження показали, що у хворих корів реєструється порушення вуглеводного обміну. У крові хворих корів вірогідно знижується вміст глюкози та інсуліну, а також зростає вміст кортизолу та пірвіноградної кислоти.

Одним із найбільш поширених захворювань високопродуктивних корів є кетоз. У стадах корів із високим рівнем продуктивності (5000 л і більше молока за лактацію), кетоз реєструється у близько 30 % тварин [1].

Найчастіше кетоз діагностується в перші два місяці лактації [2]. Під час переходу від тільності до лактації в організмі корови за декілька днів відбуваються кардинальні зміни в обміні речовин. Три тижні перед отеленням є коротким, але дуже важливим відрізком часу в житті корови, від якого залежить здоров'я і продуктивність в наступну лактацію та збереженість поголів'я, в цілому. У цей ж час (останні три тижні тільності) витрати поживних речовин на ріст плода, збільшення плаценти і молочної залози максимальні. Крім цього, в перший місяць лактації відбувається втрата живої маси тіла в зв'язку з дефіцитом енергії. Однак, неможна стимулювати накопичення запасів енергії в організмі, оскільки це прямий шлях до кетозу. Якщо корова споживає недостатню кількість корму, організм звертається до своїх внутрішніх запасів і, в першу чергу, використовує жири тіла, які розщеплюються до вільних жирних кислот. З кров'ю вільні жирні кислоти потрапляють в печінку і м'язи, де використовуються в якості джерела енергії, посилюється кетогенна функція печінки. У випадку, якщо недостатньо пропіонатів, які синтезуються в рубці з легкоперетравних вуглеводів, печінка починає перетворювати жирні кислоти в кетонів тіла (ацетон і β -оксимасляна кислота) і виникає кетоз [3].

Не дивлячись на те, що в останні десятиріччя вдалось встановити ряд закономірностей цього критичного періоду, даних, які стосуються змін в гормональному обміні корів, є недостатньо.

Матеріали і методи. Матеріалом для досліджень була голштинізована чорно-ряба велика рогата худоба, у віці від 2 до 3 років, продуктивністю понад 5500 л молока за лактацію. Проби крові брали за три тижні до отелення та два тижні після родів. Проводили клінічний огляд корів та за допомогою індикаторних смужок (Ketophan, Pliva) визначали вміст кетонових тіл у сечі. Тварин з позитивним результатом на вміст кетонових тіл у сечі виділяли у окрему групу. Кров відбирали із яремної вени. У сироватці крові визначали вміст глюкози глюкозооксидазним методом, інсуліну та кортизолу методом імуно-ферментного аналізу із використанням тест-наборів фірми «Human». Вміст пірвіноградної кислоти визначали у цільній крові модифікованим методом Умбрайта.

Одержані дані опрацьовували на комп'ютері в програмі Excel, визначаючи середню арифметичну величину (M), статистичну похибку середньої арифметичної величини (m), вірогідність різниці між середніми арифметичними двох варіаційних рядів ($p <$).

Результати та обговорення. Проведені лабораторні дослідження показали, що після отелення у сироватці крові здорових корів вірогідно знижується (на 22,2 %; $p < 0,01$) вміст глюкози та інсуліну (21,6 %; $p < 0,01$; рис. 1). При цьому, зростає вміст кортизолу (на 19,3 %; рис. 2) та пірвіноградної кислоти (5,8 %; табл. 1). Такі зміни показників вуглеводного обміну, очевидно, можна розглядати, як результат невідповідності рівня

поступлення енергії з кормом і витрати глюкози на метаболічні процеси і синтез молока. Із наближенням до отелу концентрація прогестерону в крові знижується, тоді як вміст естрогенів залишається високим або, навіть, зростає [4]. Високий рівень естрогенів у крові корів є провідним регулятором, понижуючим апетит [5].

Таблиця 1

Вміст глюкози та пірвіноградної кислоти у крові здорових та хворих на кетоз корів; (M±m, n=5)

Група тварин	Глюкоза, ммоль/л	Пірвіноградна кислота, мкмоль/л
Здорові до отелення	4,09±0,14	105,2±8,71
Здорові після отелення	3,18±0,21**	111,7±10,84
Хворі після отелення	1,98±0,06***##	192,1±3,84***###

Примітка: 1. ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$, порівняно зі здоровими тваринами до отелення; 2. ## — $p < 0,01$; ### — $p < 0,001$, порівняно зі здоровими тваринами після отелення.

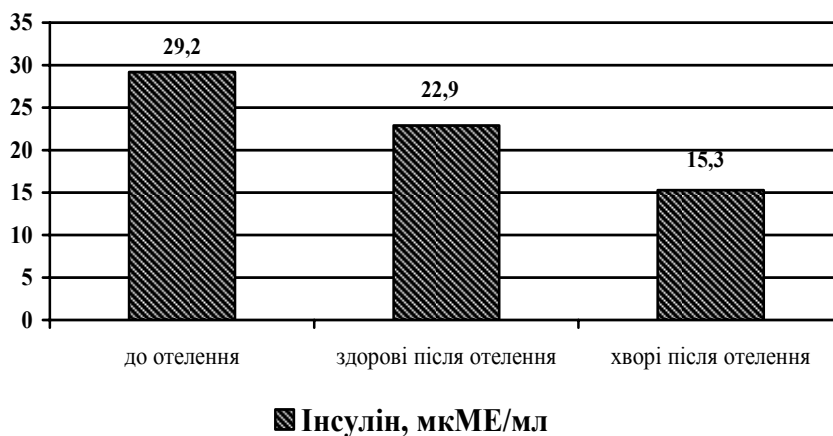


Рис. 1. Вміст інсуліну у сироватці крові здорових та хворих на кетоз корів; (M±m, n=5)

При проведенні клінічного дослідження корів, хворих на кетоз, було встановлено, що тварини більше лежать, у них швидко знижувалася жива маса та надій, вони були пригніченими, рухи ставали повільні та обережні, у деяких реєструвалося м'язове тремтіння. При контакті індикаторних смужок із сечею забарвлення змінилось на фіолетове, що свідчить про наявність у сечі кетонових тіл.

Отримані результати лабораторних досліджень свідчать, що у корів, хворих на кетоз, вміст глюкози після отелення знизився на 51,6 % ($p < 0,001$) і склав 1,98 ± 0,06 ммоль/л (норма 2,5–3,5 ммоль/л). При цьому, порівняно зі здоровими тваринами після отелення, у хворих концентрація інсуліну була нижча на 33,4 % ($p < 0,001$; рис. 1), а кортизолу вища на 41 % ($p < 0,01$; рис. 2). У хворих тварин зріс (на 41,9 %; $p < 0,001$) вміст пірвіноградної кислоти (табл. 1), що може бути пов'язано з інтенсивним розпадом глікогену і глюкози в тканинах при окисненні молочної кислоти.



Рис. 2. Вміст кортизолу у сироватці крові здорових та хворих на кетоз корів; ($M \pm m$, $n=5$)

Інсулін підвищує проникність клітинних мембран для глюкози, чим забезпечує зниження рівня глюкози у крові. Головний метаболічний ефект кортизолу виникає при зменшенні секреції інсуліну. Внаслідок зменшення синтезу білка у м'язах посилено вивільняються амінокислоти, з яких під впливом кортизолу в печінці прискорюється синтез глюкози (глюконеогенез) [6]. З отриманих даних можна зробити висновок про залучення організмом захисних пристосувань за низького вмісту глюкози у крові.

В И С Н О В К И

1. Накопичення у крові корів кетонових тіл спричиняє напруженню компенсаторних механізмів, що виражається у вірогідному зниженні вмісту інсуліну та зростанні кортизолу.

2. У корів, хворих на кетоз, реєструється вірогідне зниження рівня глюкози на 51,6 % ($p < 0,001$), інсуліну на 21,5 % ($p < 0,01$) та зростання кортизолу на 19,2 % та піровиноградної кислоти на 5,8 %.

Перспективи подальших досліджень. Подальші дослідження вуглеводного, білкового, мінерального обмінів та змін у гормональному статусі у хворих на кетоз корів дадуть змогу розробити інформативні діагностичні тести і ефективні методи профілактики та лікування.

CHANGES OF SOME CARBONIC METABOLISM INDICES IN BLOOD OF HEALTHY AND SICK WITH KETOSIS COWS

M. R. Simonov

S U M M A R Y

Analysis of glucose, pyruvic acid, insulin and cortisol levels in blood of healthy high-yielder cows and with ketoacidosis before and after calving is discussed in the article. Conducted researches showed disturbances in carbonic metabolism in sick cows. In their blood probable decrease of glucose and insulin level was observed, also increasing of cortisol and pyruvic acid levels was revealed.

ИЗМЕНЕНИЯ НЕКОТОРЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА

В КРОВИ ЗДОРОВЫХ И БОЛЬНЫХ НА КЕТОЗ КОРОВ

М. Р. Симонов

А Н Н О Т А Ц И Я

В работе представлен анализ содержания глюкозы, пировиноградной кислоты, инсулина и кортизола в крови здоровых и больных высокопродуктивных коров до и после отела. Проведенные исследования показали, что у больных коров регистрируется нарушение углеводного обмена. В крови больных коров достоверно снижается содержание глюкозы и инсулина, а также растет содержание кортизола и пировиноградной кислоты.

Л І Т Е Р А Т У Р А

1. *Dirksen G.* Innere Medizin und Chirurgie des Rinders / G. Dirksen, H.-D. Jürker, M. Stöber (Hrsg.). — Berlin : Parey, 2002. — 1283 s.
2. *Левченко В. І.* Внутрішні хвороби тварин / В. І. Левченко, В. В. Влізло, І. П. Кондрахін та ін. ; За ред. В. І. Левченка. — Біла Церква, 2001. — Ч. 2. — 544 с.
3. Кетоз крупного рогатого скота [Електронний ресурс] / С. Стребков // Российский Центр сельскохозяйственного консультирования. — 2008. — Режим доступа до журн.: http://mcx-consult.ru/page_0510082009.
4. *Grummer R. R.* Impact of changes in organic nutrient metabolism on feeding the transition dairy cow / R. R. Grummer // J. Anim. Sci. — 1995. — № 73. — P. 2820–2833.
5. *Grummer R. R.* Feed to avoid fatty liver and ketosis / R. R. Grummer // Hoard's Dairyman. — 1993. — № 23. — P. 754.
6. *Левченко В. І.* Ветеринарна клінічна біохімія / В. І. Левченко, В. В. Влізло, І. П. Кондрахіні та ін. ; За ред. В. І. Левченка і В. Л. Галяса. — Біла Церква : ВАТ «Білоцерківська книжкова фабрика», 2002. — 400 с.

Рецензент: старший науковий співробітник лабораторії обміну речовин, кандидат біологічних наук Стефанишин О. М.