

УДК 619:579.843.94:57.082.26

DOI 10.29326/2304-196X-2019-2-29-12-16

ПОДБОР ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ И ОПТИМИЗАЦИЯ РЕЖИМА ГЛУБИННОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *AVIBACTERIUM PARAGALLINARUM*

М. С. Фирсова¹, В. А. Евграфова², А. В. Потехин³¹ Аспирант, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: firsova@arriah.ru; ORCID ID 0000-0002-1531-004X² Ведущий ветеринарный врач, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: evgrafova@arriah.ru; ORCID ID 0000-0003-3053-6976³ Заведующий сектором, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: potehin@arriah.ru; ORCID ID 0000-0002-3529-4809

РЕЗЮМЕ

Проведена сравнительная оценка различных жидких питательных сред с добавлением ростовых факторов для культивирования штамма № 5111 *Avibacterium paragallinarum*. Самый высокий показатель удельной скорости роста ($\mu = 0,787 \pm 0,041 \text{ ч}^{-1}$) и наибольшее накопление биомассы возбудителя ($X = 9,52 \pm 0,04 \text{ Ig КОЕ/см}^3$) наблюдали при культивировании на соево-казеиновом бульоне. При этом среднее время удвоения концентрации живых микробных клеток было минимальным ($t_d = 0,88 \text{ ч}$), а экспоненциальная фаза роста продолжалась в течение 6 ч. На соево-казеиновом бульоне в лабораторном биореакторе Biotron LiFlus GX определен оптимальный режим культивирования *Avibacterium paragallinarum*, основанный на измерении и регуляции основных физико-химических параметров. Время выхода культуры на начало стационарной фазы роста было максимальным при аэрации 1,0 л/мин, при этом парциальное давление кислорода в питательной среде составляло не более 25%. Периоду интенсивного снижения величины рН питательной среды соответствовала экспоненциальная фаза роста бактерий. Значение рН питательной среды в диапазоне от $7,30 \pm 0,02$ до $7,90 \pm 0,06$ существенно не влияло на показатель удельной скорости штамма, продолжительность лаг-фазы при этом была минимальна – 0,36–0,45 ч. При культивировании штамма в питательной среде с рН $7,90 \pm 0,06$ наблюдали максимальное накопление бактерий ($9,76 \pm 0,04 \text{ Ig КОЕ/см}^3$). Добавление в процессе культивирования 0,6–0,8 г/л 40%-го раствора глюкозы способствовало снижению показателя рН суспензии. Минимальное значение окислительно-восстановительного потенциала (–75 мВ) соответствовало завершению экспоненциальной фазы роста штамма.

Ключевые слова: инфекционный ринит (гемофилез) кур, *Avibacterium paragallinarum*, штамм № 5111, культивирование.

UDC 619:579.843.94:57.082.26

NUTRIENT MEDIUM SELECTION AND OPTIMIZATION OF *AVIBACTERIUM PARAGALLINARUM* DEEP CULTURE METHOD

M. S. Firsova¹, V. A. Yevgrafova², A. V. Potekhin³¹ Post-Graduate Student, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: firsova@arriah.ru; ORCID ID 0000-0002-1531-004X² Leading Veterinarian, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: evgrafova@arriah.ru; ORCID ID 0000-0003-3053-6976³ Head of Sector, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: potehin@arriah.ru; ORCID ID 0000-0002-3529-4809

SUMMARY

Different liquid nutrient media supplemented with growth factors intended for *Avibacterium paragallinarum* strain No. 5111 cultivation were compared. The highest specific growth rate ($\mu = 0.787 \pm 0.041 \text{ h}^{-1}$) and the maximal accumulation of the agent's biomass ($X = 9.52 \pm 0.04 \text{ Ig CFU/cm}^3$) were reported when cultured in casein soybean broth. Herewith, the mean time of the live microbial cell concentration doubling was minimal ($t_d = 0.88 \text{ h}$), and the exponential growth phase lasted for 6 hours. The optimal method for *Avibacterium paragallinarum* cultivation in casein soybean broth in laboratory bioreactor Biotron LiFlus GX was determined through the measurements and adjustment of basic physical and chemical parameters. The time period until the culture reached the stationary growth phase was maximal with aeration at 1.0 l/min; herewith, the O₂ partial pressure in the nutrient medium did not exceed 25%. The period of the intense decrease of medium's pH was accompanied with the exponential phase of the bacterial growth. The nutrient medium's pH ranging from 7.30 ± 0.02 to 7.90 ± 0.06 had no significant impact on the specific growth rate of the strain and the lag phase duration was minimal – 0.36–0.45 h. The strain cultivation in the nutrient medium with pH 7.90 ± 0.06 demonstrated maximal aggregation of the bacteria ($9.76 \pm 0.04 \text{ Ig CFU/cm}^3$). 40% glucose solution added at 0.6–0.8 g/l during cultivation facilitated the decrease of the suspension's pH. Minimal redox value (–75 mV) was indicative of the completion of the exponential phase of the strain growth.

Key words: avian infectious coryza (Glasser's disease), *Avibacterium paragallinarum*, strain No. 5111, cultivation.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время инфекционные болезни птиц, сопровождающиеся поражением респираторного тракта, остаются одной из наиболее актуальных и экономически значимых проблем ветеринарии. Из комплекса респираторных болезней птиц особый интерес для ветеринарных специалистов представляет инфекционный ринит (гемофилез) кур. Обусловлено это, с одной стороны, скудностью информации о заболевании, а с другой – отсутствием отечественных средств его специфической профилактики [2, 5, 6, 11].

Технология получения микробной биомассы в последние 30–40 лет претерпела коренные изменения. Выращивание микроорганизмов на плотных питательных средах часто заменяют глубинным культивированием в жидких белково-гидролизатных или синтетических средах [3, 4].

Суспензионное культивирование по сравнению с выращиванием бактерий на агаре имеет ряд преимуществ, одним из которых является возможность создания стандартных условий при использовании средств автоматизации, особенно при переходе от лабораторных и полупроизводственных условий к автоматизированным поточным линиям производства [3, 8].

Важное значение для качества получаемой микробной суспензии имеет выбор питательной (ростовой) среды. Возбудитель инфекционного ринита кур (*Avibacterium paragallinarum*) является очень прихотливым микроорганизмом, требует для роста сложных питательных сред, обогащенных сывороткой крови и никотинамидадениндинуклеотидфосфатом. Кроме того, бактерии *A. paragallinarum* обладают узким спектром адаптации к условиям культивирования, очень чувствительны к закислению питательных сред, а при многократных пересевах их вирулентность и иммуногенность снижаются [9, 10, 12].

Для создания вакцины против инфекционного ринита кур одной из важнейших задач является разработка технологии культивирования его возбудителя. Без изучения процессов жизнедеятельности бактерий для получения достаточного количества бактериальной массы со стабильными иммунобиологическими свойствами подобрать режимы культивирования за короткое время невозможно [1, 7, 9].

При выборе условий выращивания для каждого микроорганизма большое внимание уделяют подбору режимов культивирования, таких как температура, интенсивность перемешивания и аэрации, концентрация водородных ионов (рН), окислительно-восстановительный потенциал (еН), парциальное давление (рO₂) и концентрация глюкозы (Sr) [4, 9].

Наиболее подходящим методом получения бактериальной биомассы *A. paragallinarum*, достаточной для производства вакцины, является глубинное культивирование [3, 8]. Однако сведений относительно выращивания данным способом бактерий *A. paragallinarum* с целью получения антигенов в зарубежной и отечественной литературе недостаточно и многие аспекты до конца не выяснены, что существенно осложняет разработку отечественных средств специфической профилактики заболевания.

Поэтому целью данной работы были подбор питательной среды и оптимизация режима глубинного культивирования штамма *A. paragallinarum*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали штамм № 5111 бактерии *Avibacterium paragallinarum* серогруппы В, депонированный в коллекции штаммов микроорганизмов ФГБУ «ВНИИЗЖ» в 2017 г.

Для культивирования *A. paragallinarum* использовали: бульон на основе триптического гидролизата мяса по Хоттингеру (ТГХ), бульон на основе панкреатического гидролизата казеина (ПГК) «Bacto Tryptone» (Difco), соево-казеиновый бульон (СКБ) на основе энзиматического гидролизата казеина и сои (Sigma), бульон на основе триптического гидролизата казеина (ТГК) «Tryptone-D» (HiMedia), бульон и агар для культивирования pleuror pneumonia-подобных микроорганизмов «PPLO broth» и «PPLO agar» (Difco). В качестве V-фактора роста добавляли никотинамидадениндинуклеотид (1% приготовленного раствора) фирмы Roth. В качестве ростостимулирующих компонентов в питательные среды вносили сыворотку крови лошади (НПП «Микроген») и гемин (1% приготовленного раствора) фирмы Serva.

Культивирование бактерий проводили в жидкой питательной среде в конических колбах в орбитальном шейкере-инкубаторе при 150 об/мин в течение 12 ч при температуре 37 °С в условиях повышенного содержания углекислого газа.

Глубинное культивирование *A. paragallinarum* проводили в лабораторном биореакторе Biotron LiFlus GX с измерением рН, еН, рO₂ и Sr.

Концентрацию живых микробных клеток определяли методом титрования на плотных питательных средах. Высев культуры проводили после внесения расплодного материала и каждые 2 ч в процессе культивирования [4].

Удельную скорость роста штамма определяли по формуле:

$$\mu = 2,3 (\lg X / \lg X_0) / t,$$

где μ – удельная скорость роста микроорганизмов (ч⁻¹);
X₀ и X – начальная и конечная концентрация микробных клеток (КОЕ/см³);

t – время культивирования микроорганизмов (ч).

Время удвоения концентрации микробных клеток (td, ч) рассчитывали по формуле:

$$td = \ln 2 / \mu.$$

Рис. 1. Динамика роста бактерий *A. paragallinarum* штамма № 5111 на различных питательных средах

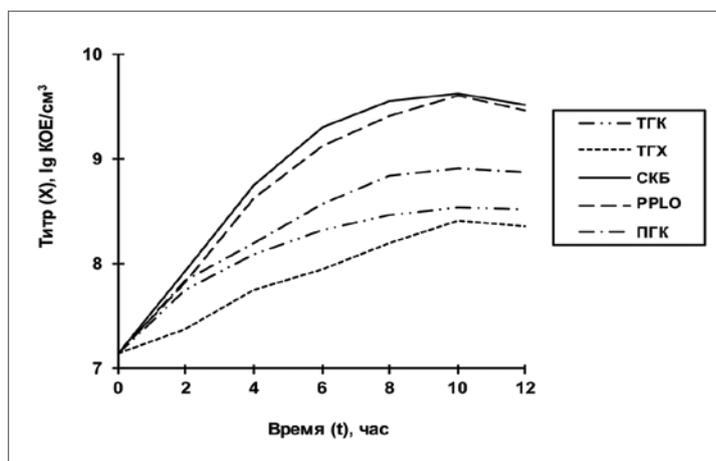


Таблица 1
Основные параметры роста бактерий *A. paragallinarum* при различной степени аэрации питательной среды
n = 3

Параметры роста ($M \pm m$)	Принудительная подача воздуха (А), л/мин			
	0	1,0	2,0	4,0
Лаг-фаза, ч	0,45 ± 0,09	0,48 ± 0,05	1,34 ± 0,05	1,54 ± 0,07
m , ч ⁻¹	0,94 ± 0,03	0,97 ± 0,04	0,81 ± 0,03	0,72 ± 0,05
$t_{\text{стац}}$, ч	8,65 ± 0,35	8,78 ± 0,25	7,15 ± 0,5	6,26 ± 0,4
X , lg КОЕ/см ³	9,64 ± 0,07	9,76 ± 0,04	8,20 ± 0,04	8,02 ± 0,09

m – удельная скорость роста в период экспоненциальной фазы;

$t_{\text{стац}}$ – время выхода культур на стационарную фазу;

X – максимальная концентрация живых микробных клеток.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Основным критерием при подборе оптимальных условий культивирования возбудителя инфекционного ринита кур является получение максимального количества биомассы.

Выбор питательной среды основывался на изучении динамики роста бактерий *A. paragallinarum* в различных средах. Результаты этих исследований представлены на рисунке 1.

Как видно из рисунка 1, наиболее высокие показатели удельной скорости роста в период экспоненциальной фазы были при использовании СКБ и среды на основе PPLO ($\mu = 0,787 \pm 0,041$ ч⁻¹ и $\mu = 0,824 \pm 0,034$ ч⁻¹ соответственно). Среднее время удвоения концентрации живых микробных клеток у таких культур составило менее часа ($td = 0,88$ ч и $td = 0,84$ ч соответственно). При культивировании бактерий *A. paragallinarum* на СКБ и PPLO отмечали наиболее продолжительную экспоненциальную фазу роста (6 ч) и наибольшее накопление возбудителя в данных питательных средах ($9,52 \pm 0,04$ lg КОЕ/см³ и $9,48 \pm 0,03$ lg КОЕ/см³ соответственно).

Минимальную удельную скорость роста ($m = 0,360 \pm 0,030$ ч⁻¹) и накопление микробных клеток ($X = 8,36 \pm 0,05$ lg КОЕ/см³) наблюдали на среде ТГХ. Среднее время удвоения концентрации живых микробных клеток в этом случае составило $td = 1,43$ ч.

Таким образом, полученные данные указывают на то, что наиболее перспективными питательными средами для наработки бактериальной массы *A. paragallinarum* являются среды на основе СКБ и PPLO-бульона. С учетом того, что СКБ по стоимости в 1,5–2,0 раза дешевле стоимости PPLO-бульона, его использование в дальнейших экспериментах экономически было более оправданно.

Оптимизацию режима глубинного культивирования штамма проводили в лабораторном биореакторе с измерением основных физико-химических параметров.

Для изучения влияния степени аэрации питательной среды на рост бактерий *A. paragallinarum* проводили периодическое глубинное культивирование при скорости вращения мешалки от 200 до 1000 об/мин в установленных режимах аэрации 1,0; 2,0 и 4,0 л/мин, а также без принудительной подачи воздуха.

Результаты исследований, представленные в таблице 1, показывают, что такие параметры, как удельная скорость роста и накопление возбудителя в питательной среде в зависимости от выбранного режима аэрации, имеют существенные различия. Начальная посевная концентрация бактерий составляла $7,14$ lg КОЕ/см³. Через 12 ч выращивания максимальное накопление живых микробных клеток составило $9,76 \pm 0,04$ lg КОЕ/см³, что значительно превышает таковые параметры, полученные при культивировании в колбе. Время, в течение которого культуры выходили на начало стационарной фазы роста (время наибольшего накопления возбудителя в питательной среде), было максимальным при культивировании бактерий без принудительной подачи воздуха и при аэрации не более 1,0 л/мин.

В ходе проведенных исследований было установлено, что результатом малого накопления бактериальной массы *A. paragallinarum* в условиях интенсивной подачи воздуха (4,0 л/мин) являлись продолжительная лаг-фаза, низкая удельная скорость роста и короткое время выхода культуры на стационарную фазу. При этом значение парциального давления кислорода в питательной среде в процессе культивирования составляло от 50 до 75%. Более высокие показатели роста бактерий наблюдали в процессе культивирования без принудительной подачи воздуха или минимальной аэрации (1,0 л/мин). При этом в первом случае парциальное давление кислорода в питательной среде составляло 5%, во втором – не более 25%. В последующих экспериментах значение pO_2 поддерживали не выше критического уровня 25%.

Резкое снижение выживаемости бактерий при интенсивной аэрации, возможно, было связано с ингибирующим действием перекисных соединений, снижающих эффективность гликолитических процессов в клетках.

Оптимальным значением pH для многих видов бактерий, в том числе и *A. paragallinarum*, является 7,2–7,4. И хотя процессы катаболизма и анаболизма бактерий могут протекать в довольно широком диапазоне pH (от 6,0 до 8,0), активность их при различных значениях pH может быть различна, что может влиять на характер роста бактерий при наработке биомассы. Поэтому следующим этапом работы было изучение влияния pH среды на рост бактерий *A. paragallinarum*.

Исходная питательная среда на основе СКБ имела pH $7,45 \pm 0,05$. Значение показателя концентрации водородных ионов регистрировали каждый час на протяжении всего периода культивирования.

Полученные результаты исследований свидетельствуют о том, что после внесения расплодочного материала и выхода биореактора на установленный режим наблюдали снижение значения pH на $0,10 \pm 0,02$ ед. уже в течение первого часа культивирования, что было связано с короткой лаг-фазой культуры.

На протяжении второго часа культивирования падение значения pH оставалось на прежнем уровне. С третьего часа культивирования интенсивность снижения pH постепенно нарастала, достигая максимальных значений к 7–8 ч (на $0,20 \pm 0,05$ ед./ч).

В результате проведенных исследований установлено, что периоду интенсивного снижения величины pH питательной среды соответствовала экспоненциальная фаза роста бактерий, которая продолжалась до 9 ч культивирования. К этому времени значение

pH снижалось до $6,50 \pm 0,05$, а концентрация живых микробных клеток достигала максимального значения $X = 9,72 \pm 0,04$ lg КОЕ/см³.

Полученные результаты исследований показали, что в процессе периодического глубинного культивирования *A. paragallinarum* происходит постоянное снижение показателя pH питательной среды, который при довольно низких значениях ($6,50 \pm 0,05$) может быть причиной раннего выхода культуры на стационарную фазу роста и, следовательно, препятствовать дальнейшему накоплению возбудителя. Чтобы это выяснить, провели исследования по изучению влияния различных значений pH питательной среды на рост и накопление бактерий *A. paragallinarum* в процессе периодического глубинного культивирования.

С этой целью были приготовлены питательные среды с pH 7,00; 7,30; 7,60; 7,90 и 8,20, которые использовали для глубинного культивирования штамма *A. paragallinarum*. При этом учитывали удельную скорость роста, время выхода культуры на стационарную фазу роста и накопление возбудителя в питательной среде. Результаты этих исследований представлены в таблице 2.

В ходе проведенных исследований было отмечено, что значение pH питательной среды в диапазоне от 7,30 \pm 0,02 до 7,90 \pm 0,06 существенно не влияло на показатель удельной скорости штамма, продолжительность лаг-фазы при этом была минимальна – 0,36–0,45 ч.

Анализ данных относительно накопления бактерий *A. paragallinarum* показал, что при культивировании штамма в питательных средах с радикальными значениями pH $7,00 \pm 0,04$ и $8,20 \pm 0,05$ рост возбудителя характеризовался наименьшим значением X ($9,50 \pm 0,03$ lg КОЕ/см³ и $9,72 \pm 0,04$ lg КОЕ/см³ соответственно) по сравнению с диапазоном значений pH $7,60 \pm 0,04$ – $7,90 \pm 0,06$ ($9,74 \pm 0,03$ – $9,76 \pm 0,04$ lg КОЕ/см³ соответственно).

Большому накоплению биомассы способствовало время выхода культуры на стационарную фазу роста, которое было выше при культивировании в питательной среде с pH $7,90 \pm 0,06$ ($t_{\text{стац}} = 9,45 \pm 0,5$ ч) и $7,60 \pm 0,04$ ($t_{\text{стац}} = 9,45 \pm 0,3$ ч).

На основании полученных экспериментальных данных провели дополнительное культивирование штамма № 5111 *A. paragallinarum*, установив «плавающий» диапазон автоматического регулирования pH от 7,6 до 7,9. По окончании процесса закисления бактериальной суспензии и повышения значения pH на 0,2 ед. осуществлялась импульсная подача 40%-го раствора глюкозы с помощью перистальтического насоса.

По мере роста микроорганизмов срабатывание регулятора pH происходило с увеличивающейся частотой до того момента, когда прекращалось закисление среды. При добавлении раствора глюкозы снова началось закисление, что свидетельствует о лимитировании роста культуры данным субстратом (0,6–0,8 г/л). Необходимо отметить, что даже при лимитировании роста *A. paragallinarum* глюкозой в процессе культивирования наблюдалась плавная тенденция к снижению показателя pH. По всей видимости, образующиеся при ферментации глюкозы органические кислоты не подвергаются дальнейшему расщеплению и, как следствие, накапливаются в питательной среде.

Известно, что в процессе аэробного культивирования микроорганизмов показатель окислительно-вос-

Таблица 2
Влияние pH среды на основные параметры роста бактерий *A. paragallinarum*
 $n = 3$

Значение pH	Параметры роста при глубинном культивировании ($M \pm m$)		
	m , ч ⁻¹	$t_{\text{стац}}$, ч	X , lg КОЕ/см ³
$7,00 \pm 0,04$	$0,80 \pm 0,05$	$8,00 \pm 0,5$	$9,50 \pm 0,03$
$7,30 \pm 0,02$	$0,91 \pm 0,03$	$9,40 \pm 0,4$	$9,67 \pm 0,02$
$7,60 \pm 0,04$	$0,96 \pm 0,04$	$9,45 \pm 0,3$	$9,74 \pm 0,03$
$7,90 \pm 0,06$	$0,97 \pm 0,03$	$9,45 \pm 0,5$	$9,76 \pm 0,04$
$8,20 \pm 0,05$	$0,95 \pm 0,03$	$9,30 \pm 0,4$	$9,72 \pm 0,04$

m – удельная скорость роста в период экспоненциальной фазы;

$t_{\text{стац}}$ – время выхода культуры на стационарную фазу роста;

X – максимальная концентрация живых микробных клеток.

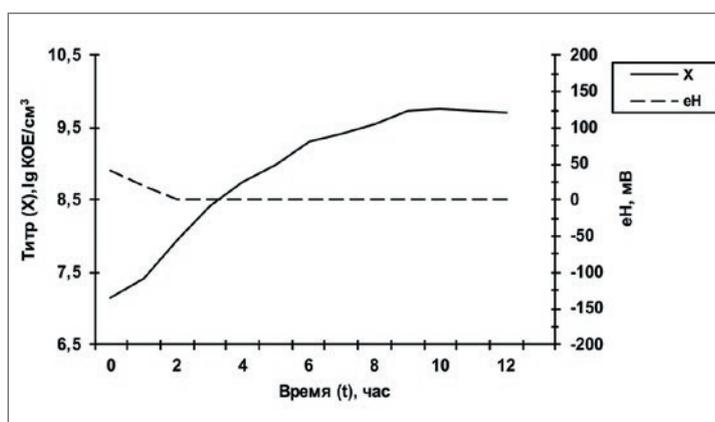
становительного потенциала нестабилен, так как eH является сложной функцией, которая зависит от таких показателей, как pH, рO₂, температура, а также свойств среды и особенностей роста микроорганизма.

Оптимальное значение eH для большинства аэробных и факультативно-анаэробных бактерий находится в диапазоне от –200 до +200 мВ. И хотя процессы метаболизма бактерий могут протекать в более широком диапазоне eH (от –350 до +350 мВ), активность их при различных значениях eH может быть различна, что может отражаться на величине конечной концентрации микроорганизмов. Поэтому следующим этапом работы было определение динамики изменения eH в процессе глубинного культивирования *A. paragallinarum* (рис. 2).

Исходное значение eH питательной среды до внесения посевного материала составляло +40 мВ. В процессе культивирования наблюдали постепенное снижение eH до –105 мВ, стабилизацию параметра и незначительное повышение до –75 мВ. Минимальное значение eH соответствовало завершению экспоненциальной фазы роста микроорганизмов.

Таким образом, процесс периодического глубинного культивирования *A. paragallinarum* штамма № 5111 при регулировании основных физико-химических

Рис. 2. Кривая роста *A. paragallinarum* и динамика изменения eH питательной среды в процессе периодического глубинного культивирования



параметров характеризовался следующими показателями: продолжительность фазы приспособления (лаг-фазы) – $0,46 \pm 0,05$ ч (1/26 часть от общего времени культивирования); длительность фазы логарифмического роста (экспонента) – $9,08 \pm 0,10$ ч; максимальная удельная скорость роста $0,97 \pm 0,03$ ч⁻¹; время удвоения биомассы – $0,72 \pm 0,02$ ч; максимальное накопление живых микробных клеток – $9,76 \pm 0,04$ Ig КОЕ/см³.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведенных исследований была подобрана оптимальная питательная среда для культивирования *A. paragallinarum*. Максимальные показатели удельной скорости роста, времени удвоения и накопление микробных клеток наблюдали на СКБ. Учитывая изменения физико-химических показателей питательной среды в процессе периодического глубинного культивирования *A. paragallinarum*, можно получать бактериальную массу, которая бы содержала популяции бактерий, взятые в конце экспоненциальной – начале стационарной фазы роста (8–9 ч), что дает возможность приготовить антиген с выраженными антигенными и иммуногенными свойствами.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Баснакьян И. А. Культивирование микроорганизмов с заданными свойствами. – М.: Медицина, 1992. – 188 с.
- Данилова В. А., Потехин А. В., Степанова И. А. Особенности выделения и идентификации возбудителя инфекционного ринита (гемофилеза) кур // Ветеринария сегодня. – 2016. – № 3 (18). – С. 65–70.
- Динамика накопления биомассы сальмонелл при их глубинном культивировании / А. П. Медведев, А. А. Вербицкий, Ю. О. Асташинок, К. А. Огурцова // Ветеринарный журнал Беларуси. – 2018. – № 1 (8). – С. 9–11.
- Перт С. Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток: пер. с англ. – М.: Мир, 1978. – 330 с.
- An update on avian infectious coryza: Its reemerging trends on epidemiology, etiologic characterization, diagnostics, therapeutic and prophylactic advancements / S. M. Deshmukh, H. S. Banga, S. Sodhi, R. S. Brar // J. Dairy Vet. Anim. Res. – 2015. – Vol. 2 (3). – P. 86–92; DOI: 10.15406/jdvar.2015.02.00037.
- Blackall P. J., Soriano V. E. Infectious coryza and related bacterial infections // Diseases of Poultry / ed. Y. M. Saif [et al.]. – 12th ed. – Ames, Iowa, 2008. – P. 789–803.
- Development of a recombinant vaccine against infectious coryza in chickens / R. Sakamoto, S. Baba, T. Ushijima [et al.] // Res. Vet. Sci. – 2013. – Vol. 94 (3). – P. 504–509; DOI: 10.1016/j.rvsc.2012.10.027.
- Fairbrother R. W. The cultivation of bacteria // A Text-Book of Medical Bacteriology. – 2014. – Chap. IV. – P. 33–48; DOI: 10.1016/b978-1-4832-0032-3.50008-4.
- Maizirwan M., Mohamad R. S., Ramlan A. A. The Growth rate of *Haemophilus paragallinarum* profile in shake flask fermentation; determination [Substrate]_{critical} // J. Teknologi. – 2002. – Vol. 36 (F). – P. 55–60; DOI: 10.11113/jt.v.36.583.
- Patil V. V., Mishra D., Mane D. V. 16S ribosomal RNA sequencing and molecular serotyping of *Avibacterium paragallinarum* isolated from Indian field conditions // Veterinary World. – 2017. – Vol. 10 (8). – P. 1004–1007; DOI: 10.14202/vetworld.2017.1004-1007.
- Reclassification of *Pasteurella gallinarum*, [*Haemophilus*] *paragallinarum*, *Pasteurella avium* and *Pasteurella volantium* as *Avibacterium gallinarum* gen. nov., comb. nov., *Avibacterium paragallinarum* comb. nov., *Avibacterium avium* comb. nov. and *Avibacterium volantium* comb. nov. / P. J. Blackall, H. Christensen, T. Beckenham [et al.] // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2005. – Vol. 55 (Pt 1). – P. 353–362; DOI: 10.1099/ijs.0.63357-0.
- Selection of *Avibacterium paragallinarum* Page serovar B strains for an infectious coryza vaccine // H. Sun, S. Xia, X. Li [et al.] // Vet. Immunol. Immunopathol. – 2018. – Vol. 199. – P. 77–80; DOI: 10.1016/j.vetimm.2018.04.001.

Поступила 15.04.19

Принята в печать 24.05.19