

ВЛИЯНИЕ УЛЬТРАЗВУКА НА EIMERIA TENELLA
(COCCIDIIDA, EIMERIIDAE)

Л. И. Козаченко

Всесоюзный научно-исследовательский институт по болезням птиц, Ленинград

Ультразвук с частотой 20 кГц, интенсивностью 11.9 Вт/см² и наружной боковой поверхностью 1.88 см² может за 8 мин уничтожить 90—100% неспорулированных ооцист, за 16 мин 99.5—100% спорулированных ооцист *E. tenella*, находящихся в 10 мл суспензии. Скорость разрушения ооцист зависит от длительности озвучивания и увеличения интенсивности ультразвука, причем увеличение интенсивности оказывается в этом отношении более эффективным, чем удлинение времени озвучивания.

Большой экономический ущерб, наносимый кокцидиозами современным животноводческим хозяйствам, заставляет обратить особое внимание на изучение и разработку эффективных методов борьбы с кокцидиями. Мероприятия, направленные на уменьшение потерь от кокцидиозов, предусматривают борьбу со стадиями, развивающимися в организме хозяина, и применение химических и физических способов для дезинвазии внешней среды от ооцист. Эффективность результатов, полученных при воздействии физических факторов на жизнедеятельность экзогенных стадий возбудителей кокцидиоза, побуждает продолжать поиски в этом направлении. За последние годы все большее значение приобретают исследования, связанные с влиянием ультразвука на биологические объекты. Использование ультразвуковых волн высокой интенсивности основано на их способности в результате процесса кавитации вызывать разрыв бактериальных клеток и клеточных структур. Этим объясняется стерилизующее действие ультразвука (Эльшинер, 1955).

О резистентности ооцист кокцидий кур к ультразвуку впервые сообщил Уричио (Uricchio, 1953), который использовал этот метод для иммунизации цыплят ооцистами *E. tenella*, обработанными ультразвуком. Хейсин и Хенох (1956) обнаружили неодинаковую резистентность к ультразвуку у разных видов ооцист кокцидий кролика. Имеются сообщения о разрушении стенок и содержимого ооцист *E. stiedae* под действием ультразвука с частотой 20 кГц, интенсивностью 23.9 Вт/см², боковой поверхностью 1.74 см² (Coudert, Döll, Dürr, 1972). В силу недостаточной изученности вопроса целью дальнейших исследований должно быть выяснение влияния ультразвука с различной частотой, интенсивностью, минимальной и максимальной эффективной мощностью на различные виды кокцидий. Это и послужило основанием для проведения настоящих исследований с наиболее вирулентным видом кокцидий кур *E. tenella*.

Приношу благодарность моему руководителю проф. М. В. Крылову и ст. н. сотр. лаборатории протозоологии Н. П. Крыловой за оказанную практическую помощь и ценную научную консультацию при выполнении данной работы, а также директору Ленинградского научно-исследовательского института антибиотиков проф. И. М. Терешину, любезно предоставившему необходимую аппаратуру.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Исследования проводили со спорулированными ооцистами *E. tenella*, сохранявшимися в холодильнике при температуре $4 \pm 2^\circ$ в течение 3 мес., и с неспорулированными, полученными непосредственно перед постановкой опытов из слепых отростков кишечника цыплят. Исходная концентрация суспензии в 1.5—2.0%-м растворе двуххромовокислого калия составляла $5 \cdot 10^4$ и $10 \cdot 10^4$ ооцист в 1 мл. Объем озвучиваемой жидкости был равен 10 мл в каждом сосуде. Обработку ультразвуком суспензии ооцист проводили в стаканчиках из толстого стекла с резиновыми крышечками: диаметр стаканчиков — 19 мм, высота — 110 мм, высота столба жидкости — 30 мм. В качестве источника ультразвука служил английский ультразвуковой дезинтегратор MsE 150 с частотой 20 кГц и акустической номинальной мощностью 150 Вт. Работа ультразвукового прибора регулировалась тремя уровнями мощности звука — низким (12.6 Вт), средним (22.5 Вт), высоким (35.3 Вт) — и 6-ступенчатым включателем амплитуды. Во всех опытах пользовались первой ступенью включателя, при которой показания на амплитудной шкале были максимальными и равнялись 4 мкм при низкой мощности, 7 мкм при средней и 12 мкм при высокой мощности. Источник ультразвука погружали на такую глубину, чтобы возникшая на поверхности турбулентность не нарушала контакта между суспензией и звукопередающей конической головкой. Концентрацию ооцист в суспензии до и после озвучивания определяли в камере Горяева. О влиянии ультразвука на жизнеспособность ооцист кокцидий судили по способности неспорулированных ооцист к споруляции, а спорулированных ооцист — к заражению восприимчивых цыплят в возрасте 18 дней. Споруюляцию проводили в стандартных условиях при температуре $\pm 24^\circ$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В предварительных опытах испытывали отдачу мощности прибора в воде. Максимальная отдача мощности ультразвуковой головки в воде при высоком уровне включения мощности составляла 35.3 Вт, минимальная — при низком уровне была 12.6 Вт, мощность среднего уровня соответствовала 22.5 Вт.

В первых опытах, проводимых без охлаждения суспензии, проверяли влияние ультразвука с частотой 20 кГц и средним уровнем мощности на спорулированные ооцисты в течение различного времени (табл. 1). С увеличением времени воздействия ультразвука на суспензию ооцист процент механически разрушенных паразитов возрастает и соответственно уменьшается количество морфологически неизмененных ооцист. При экспозиции 0.5 мин разрушено 15% ооцист, при увеличении экспозиции до 16 мин все ооцисты были разрушены.

После непрерывного озвучивания в течение 4 мин температура суспензии поднималась до 53° , в течение 16 мин — до 72° . Для того чтобы исключить воздействие температурного фактора на ооцисты, в дальнейших опытах сосуд с суспензией на время озвучивания погружали в ванночку со льдом. Температура суспензии при этом не подымалась выше 25° даже при 16-минутном озвучивании. Поэтому результаты воздействия ультразвука средней мощности на неохлажденную и охлажденную суспензии ооцист при одинаковых экспозициях будут несколько отличаться.

С возрастанием мощности от 12.6 до 22.5 Вт увеличивалось количество разрушенных ооцист (табл. 2).

При экспозиции 2 мин и низкой мощности звука процент морфологически неизмененных ооцист равен 71, при этой мощности, но 16-минутном озвучивании — 17. При среднем уровне мощности и экспозиции 2 мин процент морфологически неизмененных ооцист был 56, а при той же мощности звука и 16-минутной экспозиции равнялся 0.5. Полученные результаты мы не можем сравнить с данными других авторов, так как, несмотря на одинаковую частоту ультразвуковых волн — 20 кГц, акустическая

Таблица 1

Влияние ультразвука средней мощности на спорулирование ооцист в зависимости от экспозиции

Экспозиция озвучивания (в мин)	Процент морфологически неизмененных спорулированных ооцист после озвучивания
0.5	85
1	68
2	49
4	27
8	1—2
16	0

Таблица 2

Влияние низкой и средней мощностей ультразвука в зависимости от экспозиции на спорулированные ооцисты

Экспозиция озвучивания	Процент морфологически неизмененных спорулированных ооцист		P
	низкая мощность звука	высокая мощность звука	
2	71.0	56.0	> 0.05
4	63.0	19.0	< 0.05
8	28.0	11.0	< 0.05
16	17.0	0.5	< 0.05

номинальная мощность приборов была различной — 150 Вт вместо 250, соответственно неодинаковой была и интенсивность звука.

Характер повреждения спорулированных ооцист в результате воздействия ультразвука разнообразен. При увеличении длительности озвучивания и мощности звука, наряду с повышением числа ооцист с деформированными стенками установлен выход сначала единичных, а затем значительного количества спороцист. У некоторой части ооцист, при кажущейся целости стенок, в спороцистах наблюдались деформированные спорозиты.

После озвучивания суспензии спорулированных ооцист ими проводили заражение цыплят с учетом симптомов болезни, привесов и летальности. Для заражения брали такой объем суспензии, в котором по первоначальным расчетам содержалось $2 \cdot 10^4$ ооцист (табл. 3).

Таблица 3

Влияние ультразвука на жизнеспособность спорулированных ооцист

Мощность звука	Экспозиция озвучивания (в мин)	Процент привеса цыплят за 10 дней опыта	Пало цыплят	P по отношению к контролю
Низкая	2	65.1	6	< 0.05
	4	39.1	2	< 0.05
	8	45.8	0	< 0.05
	16	76.9	0	< 0.05
Средняя	2	13.5	4	< 0.05
	4	33.3	3	< 0.05
	8	63.1	0	< 0.05
	16	85.7	0	< 0.05
	0	17.6	13	—

Примечание. В каждой группе было по 15 цыплят, которых заражали дозой в $2 \cdot 10^4$ ооцист.

Таблица 4

Влияние ультразвука на неспорулированные ооцисты

Экспозиция озвучивания (в мин)	Мощность звука	Количество недеформированных ооцист после озвучивания (в % при концентрации суспензии в 1 мл)		P
		$5 \cdot 10^4$ ооцист	$10 \cdot 10^4$ ооцист	
4	Низкая	53	91	< 0.05
	Средняя	34	58	< 0.05
	Высокая	11	17	> 0.05
8	Низкая	32	61	< 0.05
	Средняя	10	24	< 0.05
16	Низкая	10	22	> 0.05
	Средняя	0	0	—

Т а б л и ц а 5
Влияние ультразвука на споруляцию

Время наблюдений	Мощность ультразвука	Экспозиция озвучивания (в мин)	Процент морфологически неизменных неспорулированных ооцист после озвучивания	Процент спорулированных ооцист из оставшихся морфологически неизменных	Процент спорулированных ооцист при расчете по отношению к концентрации ооцист в суспензии до озвучивания
Через 24 ч	Низкая	4	91	21	19
		8	61	14	9
		16	21	0	0
	Средняя	0	100	64	64
		4	58	7	4
		8	24	0	0
	Высокая	16	—	—	—
		0	100	64	64
		4	17	0	0
		8	—	—	—
		16	—	—	—
		0	100	64	64
Через 48 ч	Низкая	4	91	23	25
		8	61	10	7
		16	21	0	0
	Средняя	0	100	73	73
		4	58	10	6
		8	24	0	0
	Высокая	16	—	—	—
		0	100	73	73
		4	17	0	0
		8	—	—	—
		16	—	—	—
		0	100	73	73
Через 72 ч	Низкая	4	91	24	22
		8	61	8	5
		16	21	0	0
	Средняя	0	100	81	81
		4	58	8	5
		8	24	0	0
	Высокая	16	—	—	—
		0	100	81	81
		4	17	0	0
		8	—	—	—
		16	—	—	—
		0	100	81	81
Через 96 ч	Низкая	4	91	24	22
		8	61	8	5
		16	21	0	0
	Средняя	0	100	81	81
		4	58	8	5
		8	24	0	0
	Высокая	16	—	—	—
		0	100	81	81
		4	17	0	0
		8	—	—	—
		16	—	—	—
		0	100	81	81

Биопроба наглядно демонстрирует сохранение способности озвученных ооцист к инфицированию. Экзогенные стадии кокцидий были обнаружены во всех восьми группах цыплят, зараженных озвученными ооцистами. С увеличением экспозиции озвучивания уменьшалась гибель цыплят, а при экспозициях 8 и 16 мин летальность отсутствовала. Процент привеса цыплят увеличивался по мере удлинения времени воздействия ультразвука на ооцисты. Исключение составляет привес, полученный в 1-й группе.

Наблюдения за деформацией стенок неспорулированных ооцист, подвергнутых обработке ультразвуком низкой, средней и высокой мощности

в течение 4 мин, а также низкой и средней мощности в течение 4, 8 и 16 мин в зависимости от концентрации исходной суспензии ооцист, показали, что в более концентрированной взвеси ооцист озвучивание менее эффективно (табл. 4). Эльпинер (1963), изучая эффективность ультразвука, обнаружил такую же зависимость бактерицидного действия ультразвуковых волн от концентрации озвучиваемых микроорганизмов.

При воздействии ультразвука процент недеформированных ооцист был различным и зависел от экспозиции и мощности прибора (табл. 4).

Способность к споруляции неспорулированных ооцист после воздействия на них ультразвука в течение 4, 8 и 16 мин при разных мощностях проверяли, подсчитывая количество проспорулировавшихся ооцист через 24, 48, 72, 96 ч (табл. 5). Подмечена четкая обратная зависимость между длительностью воздействия и увеличением интенсивности ультразвука с частотой 20 кГц и способностью незрелых ооцист кокцидий спорулировать. При воздействии низкой мощности ультразвука на неспорулированные ооцисты последние погибают в течение 16 мин, при средней — через 8 мин, при высокой мощности — через 4 мин. Данные контроля споруляции через 96 ч совпадают с данными, полученными через 72 ч.

Характер повреждения неспорулированных ооцист, подвергнутых воздействию ультразвука, разнообразен. Имелась либо деформация стенки, либо частично или полностью разрушенные ооцисты, либо цитоплазма заполняла всю ооцисту и в последующем у таких ооцист не наблюдали споруляцию.

В тех случаях, когда источник ультразвука не был погружен в жидкость, ооцисты не разрушались. Это объясняется тем, что ультразвуковые волны почти полностью отражаются от поверхности суспензии.

ВЫВОДЫ

1. Ингибирующее действие ультразвуковых волн с частотой 20 кГц на ооцисты *E. tenella* зависит от интенсивности звука и продолжительности его воздействия.

2. Незрелые ооцисты полностью погибают при озвучивании их ультразвуком интенсивностью 18.7 Вт/см² в течение 4 мин, интенсивностью 11.9 Вт/см² в течение 8 мин и интенсивностью 6.7 Вт/см² в течение 16 мин.

3. Вирулентность кокцидий значительно снижается при воздействии на них ультразвука низкой мощности уже в течение 8 мин; ультразвук средней мощности (интенсивность 11.9 Вт/см²) в течение 16 мин разрушает 99.5—100% спорулированных ооцист.

Л и т е р а т у р а

- Хейсин Е. М., Хенох М. А. 1956. Действие ультразвуковых колебаний на ооцисты кокцидий кролика. Биофизика, 1 (8): 724—728.
- Эльпинер И. Е. 1955. Перспективы применения ультразвуковых волн в сельском хозяйстве. В кн.: Труды научной сессии, посвященной достижениям и задачам советской биофизики в сельском хозяйстве. Изд. АН СССР, М.: 49—53.
- Эльпинер И. Е. 1963. Ультразвук. Физико-химическое и биологическое действие. Изд. физ.-мат. лит., М.: 1—420.
- Coudert P., Döll G., Dürer U. 1972. Zur Ultraschallresistenz der Oocysten von *E. stiedai* (Sporozoa, Coccidia). Ann. Rech. Vetar., 3 (4): 551—570.
- Uricchio W. A. 1953. The feeding of artificially altered oocyst of *E. tenella* as a means of establishing immunity to cecal coccidiosis in chickens. Proc. Helminthol. Soc. Washington, 20 (2): 77—83.

THE EFFECT OF ULTRASONICS ON EIMERIA TENELLA (COCCIDIIDA, EIMERIIDAE)

L. I. Kozachenko

S U M M A R Y

Ultrasonics (frequency — 20 kHz, intensity — 11.9 w/cm² and external lateral surface — 1.88 cm²) can annihilate for 8 minutes from 90 to 100% of non-sporulated and for 16 minutes 99.5 to 100% of sporulated oocysts of *E. tenella* maintained in 10ml suspension plunged into a bath with ice. The destruction rate of oocysts depends on the duration of the ultrasonics effect and the increase of its intensity. It should be noted that the increase in intensity is more effective in this respect than the extension of ultrasonics effect.