

БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ МЕТАБОЛИЗМА УГЛЕВОДОВ БАКТЕРИЯМИ РОДА *BORDETELLA*

А.В. Мастиленко, кандидат биологических наук, ст. преподаватель
ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина»
тел. 8(8422)55-95-47, mav0608@yandex.ru

Д.А. Васильев, доктор биологических наук, профессор
ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина»
тел. 8(8422)55-95-47, dav_ul@mail.ru

О.Ю. Борисова, д.м.н., профессор
ФБУ «Московский научно-исследовательский институт микробиологии и биотехнологии
им Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора
тел. 8 (495) 452-18-16, mav0608@yandex.ru

Ю.Б. Васильева, кандидат биологических наук, доцент
ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина»

Т.Н. Полетаева, мл. научный сотрудник
Научно-исследовательский инновационный центр микробиологии и биотехнологии ФГБОУ
ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина»
тел. 8(8422)55-95-47, grant-ugsha@yandex.ru

Н.В. Макшанова, мл. научный сотрудник
Научно-исследовательский инновационный центр микробиологии и биотехнологии ФГБОУ
ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина»
тел. 8(8422)55-95-47, grant-ugsha@yandex.ru

А.А. Ломакин, студент 2 курса факультета ветеринарной медицины
ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина»
тел. 8(8422)55-95-47, mav0608@yandex.ru

Ключевые слова: *Bordetella*, метаболизм углеводов, особенности, *B. bronchiseptica*

В статье представлен обзор литературных источников по проблеме биохимических особенностей метаболизма углеводов бактерий рода *Bordetella*. Авторами проведены собственные исследования особенностей метаболизма простых и сложных углеводов на примере бактериальных культур *B. bronchiseptica*. Полученные результаты свидетельствуют о слабо выраженном метаболизме глюкозы и ксилозы данными бактериальными культурами, при этом время инкубации и учета результатов были значительно увеличены в сравнении с общепринятой методикой до 48 часов.

Актуальность. Бактерии рода *Bordetella* в настоящее время ассоциируются с респираторными заболеваниями человека и животных. К данному роду относятся давно охарактеризованные микроорганизмы *B.pertussis*, *B.parapertussis*, *B.bronchiseptica* («классические» *Bordetella*), сравнительно недавно описанные *B.avium* и выделенные в последние годы *B.petrii*, *B.holmesii*, *B.hinzii*, *B.trematum*, *B.ansorpii* («новые» *Bordetella*). [1, 2, 3, 10].

Большинство патогенных штаммов бактериальных видов рода *Bordetella* имеет полный набор факторов патогенности, присущих данному роду: фимбрии (Fim), филаментозный гемагглютинин (FHA), секреция факторов адгезии и колонизации (III тип секреции), некоторые виды включают также

в свой арсенал патогенности дермонекротический токсин (DNT), остеотоксин, аденилатциклазный токсин (ACT), трахеальный цитотоксин (ТСТ), липополисахарид (LPS), и только *B.pertussis* и *B.parapertussis* секретируют также коклюшный токсин (PTX).

Бактериальные клетки представляют собой коккобациллы, имеющие средние размеры 0,2-0,5×0,5-2,0 мкм. Однако в старых культурах их размеры значительно увеличиваются, что свидетельствует о дезорганизации процессов пластического обмена и накоплении продуктов обмена в условиях снижения количества необходимых компонентов и их качества для полноценной жизнедеятельности бактериальных клеток. Капсула была обнаружена лишь у трех видов – *B. pertussis*, *B. bronchiseptica*, и *B. trematum* [10].

Все виды рода *Bordetella* являются облигатными аэробами. Основой их метаболизма является окисление аминокислот [2, 10]. По данным Weiss (1992) углеводы не используются данными бактериями. В то же время, они являются ауксотрофами по некоторым неорганическим и органическим веществам (неорганической сере, никотинамиду, метионину, цистину, цистеину или глутатиону) [4]. За исключением *B.pertussis* бактериальные виды данного рода прекрасно растут на широко используемых синтетических и полусинтетических средах (агаре МакКонки, пептоном агаре, триптикозо-соевом агаре с добавлением 5 % крови, средах на основе сердечного экстракта) [5].

Несмотря на филогенетическое родство, многими авторами отмечается фенотипический плеоморфизм бактериального роста при культивировании различных видов рода *Bordetella* [4, 10]. Так только *B. holmesii* и *B. parapertussis* на средах с тирозином образуют характерный коричневый пигмент, активно диффундирующий в окружающую среду [7]. Высокая активность уреазы характерна для *B. holmesii* и *B. parapertussis*. Однако стоит отметить, что *B. bronchiseptica* также экспрессирует данный фермент, однако его активность не сопоставима с вышеуказанными видами. Оксидазная активность характерна для большинства видов *Bordetella*, исключением являются *B. holmesii*, *B. parapertussis*, *B. trematum*. Редукция нитратов является весьма вариабельным признаком лишь для вида *B. bronchiseptica*, в остальных случаях отмечается отрицательная реакция.

По данным Rowatt (1955) при культивировании *B.pertussis*, *B.parapertussis*, *B.bronchiseptica* на среде с глутаматом скорость роста бактериальных культур резко снижается при уменьшении на 10 % исходного его количества. Однако, как отмечает автор, наблюдается неоднородность этой закономерности для данных бактериальных видов. Так в процессе метаболизма глутамата образуется аммиак, вследствие чего отмечается повышение pH среды с 7,0 до 7,3. Это обстоятельство служит ингибитором нормально роста для *B.pertussis* и *B.bronchiseptica*. Однако начало снижения скорости роста бактериальной культуры *B.parapertussis* было несколько отдалено во временном интервале от вышеуказанных видов. Причем, как отмечает Rowatt, количество использованного бактериальными клетками глутамата было эквивалентно образованному аммиаку для *B.pertussis* и *B.parapertussis*; при анализе метаболизма *B.bronchiseptica* оказалось, что количество образованного аммиака было значительно больше количества деградированного глутамата [6].

В исследованиях Ensminger (1953) отмечается, что при исследовании метаболизма аминокислот бактериями рода *Bordetella* с помощью хроматографии на бумаге в процессе их культивирования на питательных средах наблюдается дезаминирование аминокислот по убывающей по следующей закономерности: аспарагиновая кислота, серин, глицин,

глутамат, аланин и пролин. При культивировании *B.bronchiseptica*, кроме указанных аминокислот наблюдалась также деградация лейцина. Другие аминокислоты были обнаружены автором на хроматограмме в исходном количестве, т.е. не были дезаминированы бактериальными клетками. Единственным новым азотсодержащим соединением оказался пигмент у *B.parapertussis*, который располагался на хроматограмме выше валина и метионина, и представлял собой продукт дезаминирования тирозина на поздних стадиях бактериального роста [7].

В исследованиях Lautrop et al. (1960) отмечается, что бактерии рода *Bordetella* окисляют глюкозу, однако значительно слабее других микроорганизмов. Так авторами была использована среда следующего состава: пептон - 0,2 % ; NaCl - 0,5 % ; K₂HPO₄ - 0,03 % ; агар - 0,3 % ; бромтимоловый синий - 0,003 % ; глюкоза - 1,0 % ; pH - 7,1. При посеве в полужидкой среде происходило медленное окисление глюкозы на поверхности агара с постепенным уменьшением визуализации изменения окраски среды по ходу посева сверху вниз. Исследователи обращают внимание, что данная реакция не должна рассматриваться как отрицательная, учитывая окислительный характер ферментации, и может наблюдаться на протяжении нескольких дней инкубации [8].

На основании полногеномного секвенирования ДНК различных штаммов рода *Bordetella* в исследованиях Parkhill et al. (2003) было показано отсутствие полного генетического кластера гликолитического цикла. По данным авторов у всех бактериальных видов рода *Bordetella* отсутствуют гены основных ферментов АТФ-зависимых реакций фосфорилирования глюкозы: глюкокиназы, фосфорилирующей глюкозу до глюкозо-6-фосфата, и 6-фосфофруктокиназы, превращающей глюкозо-6-фосфат в фруктозо-1,6-бисфосфат. Более того, у бордетелл авторами не обнаружено функционирующих систем фосфотрансфераз углеводов, несмотря на то, что у некоторых видов, например *B.bronchiseptica*, *B.pertussis* и *B.parapertussis*, имеются гены, детерминирующие данные ферменты [2, 9].

Гликонеогенез бактериальных видов *Bordetella* начинается с дефосфорилирования пирувата или фосфоенолпирувата, образующихся в результате переаминирования аминокислот, используемых бактериальными клетками в пластическом обмене, синтезе полисахарида и ароматических аминокислот. По данным Varabote et al. (2005) гликонеогенез не имеет родовых и, тем более, каких-либо видовых особенностей [9].

По данным Thalen et al. (1999) некоторые патогенные бордетеллы (например, *B. pertussis*) также обладают частично дисфункциональным циклом трикарбоновых кислот. Авторы отмечают, что данные виды не способны синтезировать цитрат из оксалацетата и ацетила-Со-А, и использовать пируват в качестве единственного источника энергии, т. е. данные метаболические пути оказались неактивными [11].

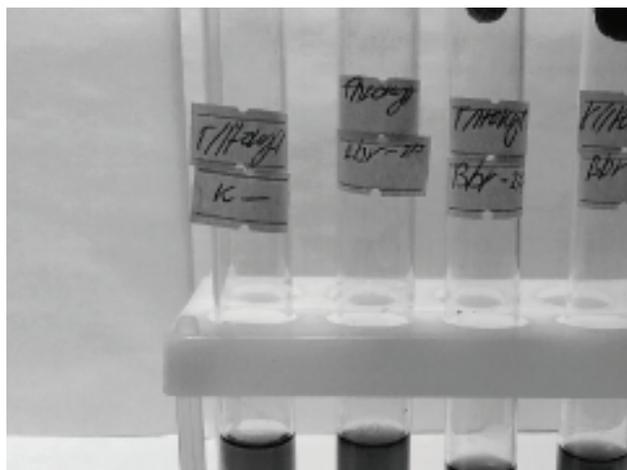


Рис. 1. Утилизация глюкозы бактериальными культурами *B. bronchiseptica* (индикатор – бромтимоловый синий)

Таблица 1 – Утилизация углеводов бактериальными культурами *B. bronchiseptica*

Углевод	V.br1	V.br.7	V.br.200	V.br.210	V.br.214	V.br.22067
Дульцит	-	-	-	-	-	-
Сорбид	-	-	-	-	-	-
Ксилоза	+	+	+	+	+	+
Рамноза	-	-	-	-	-	-
Раффиноза	-	-	-	-	-	-
Глюкоза	+	+	+	+	+	+
Манноза	-	-	-	-	-	-
Маннит	-	-	-	-	-	-
Сахароза	-	-	-	-	-	-
Лактоза	-	-	-	-	-	-
Мальтоза	-	-	-	-	-	-
Инозит	-	-	-	-	-	-
Инозин	-	-	-	-	-	-

По данным большинства современных исследователей следует, что бактериальные виды *Bordetella* не способны ферментировать простые и сложные углеводы вследствие неактивности соответствующих ферментативных систем. В то же время, большинство исследований, касающихся генома бактерий данного рода, содержат данные, однозначно указывающие на наличие соответствующих генов в их геноме [12, 13, 14].

Данных, в которых представлены доказательства того, что бордетеллы являются микроорганизмами, обладающими слабым метаболизмом углеводов, в настоящее время представлено достаточно мало, однако, на наш взгляд, для более глубокого понимания данного вопроса требуются более детальные исследования, включающие в себя, в том числе, анализ условий протекания процессов окисления в слабо выраженной форме.

Таким образом, мы поставили перед собой целью исследование биохимических особенностей

метаболизма углеводов бактериями рода *Bordetella*. Первоочередной задачей являлось исследование метаболизма углеводов бактериальными культурами *B. bronchiseptica*. Выбор объекта исследований основан на том, что данный вид не требует особых условий культивирования и обладает оптимальной скоростью роста.

Материалы и методы. В работе были использованы культуры *B. bronchiseptica* из коллекции кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия им. П.А. Столыпина, которые в соответствии с паспортными данными, обладали типичными для бактерий этих видов морфологическими, культуральными и биохимическими свойствами.

В работе были использованы среды Гисса с углеводами (НПО «Питательный среды», г. Махачкала), термостат ТС-80М-2, автоклав ГК-100-3, шкаф сушильно-стерилизационный ШСС-80п УХЛ 424, холодильная камера, установка бактерицидная УГД-2, предметные стекла ГОСТ 9284-75, предметные стекла с лункой и покровные стекла ГОСТ 9284-75, горелка спиртовая ГОСТ 25336, пробирки ГОСТ 25336, пробки резиновые и ватно-марлиевые, колбы ГОСТ 25336, пинцет ГОСТ 21241, штативы алюминиевые, дозаторы автоматические, чашки Петри ГОСТ 25336 82, наконечники до 1000 мкл. с аэрозольным фильтром.

Биохимические свойства бордетелл исследовали согласно общепринятым в микробиологии методикам: инструкция по бактериологическому и серологическому исследованиям при коклюше и паракклюше (для бактериологических лабораторий санитарно-эпидемиологических станций и больниц) Минздрава СССР Москва 1984 г.; инструкции по применению набора для определения биохимических свойств НИИЭМ им Пастера; Методы общей бактериологии в трех томах под редакцией Ф. Герхарда и др. Москва "Мир" 1984; - А.С. Лабинская. Микробиология с техникой микробиологических исследований. Изд 4-е, перераб. и доп. М., "Медицина", 1978 г.

Результаты исследований. В процессе исследования были приготовлены среды Гисса с соответствующими углеводами. В качестве индикатора был использован бромкрезоловый пурпурный и бромтимоловый синий.

Среды содержали агар в концентрации 0,5%. Посевы были произведены методом укола в столбик. Таким образом, мы могли наблюдать изменение цвета среды по ходу посева. Условия культивирования были следующими: 37°C 18-24-48 часов.

Через 18 часов изменение цвета и характера среды мы не наблюдали ни в одной из пробирок с углеводами. Через 24 часа в пробирках с глюкозой цвет среды в верхней части среды изменился незначительно, но визуально отличимо от основной среды и отрицательного контроля. Через 48 часов в пробирках с глюкозой мы наблюдали четкое изменение цвета в верхней части среды, с уменьшением визуализации изменения в толще среды (рис. 1). Также через 48 часов наблюдалась положительная реакция утилизации ксилозы у всех исследуемых штаммов. Результаты представлены в таблице 1.

Выводы. В результате проведенных экспериментов были исследованы биохимические особенности метаболизма углеводов бактериями рода *Bordetella* на примере культур *B. bronchiseptica*. Полученные результаты свидетельствуют о слабо выраженном метаболизме глюкозы и ксилозы данными бактериальными культурами, при этом время инкубации и учета результатов были значительно увеличены в сравнении с общепринятой методикой до 48 часов. Возможность контаминации нами исключена на основании отрицательных контролей. Исходя из полученных данных, считаем необходимым проведение дальнейших исследований связанных с метаболизмом углеводов у бактерий рода *Bordetella* с увеличенными сроками культивирования и различными температурными режимами.

Библиографический список:

1. Goodnow R.A. Biology of *B. bronchiseptica* / Microbiol. Rev. - 1980. - V.44. - P.722-738.
2. Comparative analysis of the genome sequences of *B. pertussis*, *B. parapertussis* and *B. bronchiseptica* / J. Parkhill [et al.] // Nature genetics Advance online publication. - 2003. - V.10. - P.1038-1227.
3. New species of *Bordetella*, *Bordetella ansorpii* sp. nov., isolated from the purulent exudate of an epidermal cyst / Kwan Soo Ko [et al.] // Journal of clinical microbiology. - 2005. - N.6. - P. 2516-2519.
4. Weiss, A.A. The genus *Bordetella*. In Balows, Tru`per, Dworkin, Harder and Schleifer (Editors), The Prokaryotes: a Handbook on the Biology of Bacteria: Exophysiology, Isolation, Identification, Applications., 2nd Ed., Vol. 3, Springer-Verlag, Berlin, Germany. - 1992. - P. 2530-2543.
5. Hoppe, J.E. *Bordetella*. In Murray, Baron, Phaller, Tenover and Tenover (Editors), Manual of Clinical Microbiology, American Society for Microbiology, Washington DC. - 1999. - P. 614-624.
6. Rowatt, E. Amino Acid Metabolism in the Genus *Bordetella* / J. gen. Microbiol. - 1955. - V.13. - P.552-560
7. Ensmingerp, W. Pigment production by *Haemophilus parapertussis* / J. Bact. - 1953. - V.65. - P.509.
8. Lautrop, H. Laboratory Diagnosis of Whooping-cough or *Bordetella* Infections / H. Lautrop, B. W. Lacey and B. Sc. / Bull. Wld Hlth Org. - 1960. - V.23. - P. 15-35.
9. Barabote R. D., Saier M. H. Comparative genomic analyses of the bacterial phosphotransferase system //Microbiology and Molecular Biology Reviews. - 2005. - T. 69. - №. 4. - С. 608-634.
10. Васильев Д.А., Васильева Ю.Б., Мاستиленко А.В., Сверкалова Д.Г., Семанина Е.Н., Борисова О.Ю., Золотухин С.Н., Швиденко И.Г. Бордетеллез животных: характеристика заболевания и возбудителя, разработка методов диагностики: моногр. Ульяновск: Изд. Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии им. П.А. Столыпина, 2014. 206 с.
11. Thalen M. et al. Rational medium design for *Bordetella pertussis*: basic metabolism //Journal of biotechnology. - 1999. - T. 75. - №. 2. - С. 147-159.
12. Moran N. A., Plague G. R. Genomic changes following host restriction in bacteria // Current opinion in genetics and development. - 2004. - T. 14. - №. 6. - С. 627-633.
13. Mattoo S., Cherry J. D. Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections

due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies //Clinical microbiology reviews. – 2005. – Т. 18. – №. 2. – С. 326-382.

14. Sebahia M. et al. Comparison of the genome sequence of the poultry pathogen *Bordetella avium* with those of *B. bronchiseptica*, *B. pertussis*, and *B. parapertussis* reveals extensive diversity in surface structures associated with host interaction //Journal of bacteriology. – 2006. – Т. 188. – №. 16. – С. 6002-6015.

BIOCHEMICAL FEATURES OF THE METABOLISM OF CARBOHYDRATES SORT BORDETELLA BACTERIA

Mastilenko A.B., Vasilyev D.A., Borisov O.Yu., Vasilyeva Yu.B., Poletayeva T.H., Makshanova H.B., Lomakin A.A.

Key words: *Bordetella*, metabolism of carbohydrates, features, *B. bronchiseptica* Biochemical features of a metabolism of carbohydrates sort *Bordetella* bacteria

The review of references on a problem of biochemical features of a metabolism of carbohydrates of bacteria of the sort *Bordetella* is presented in article. Authors conducted own researches of features of a metabolism of simple and difficult carbohydrates on the example of bacterial cultures of *B. bronchiseptica*. The received results testify to poorly expressed metabolism of glucose and a ksiloza these bacterial cultures, thus time of an incubation and the accounting of results were considerably increased in comparison with the standard technique till 48 o'clock.

УДК 619:579.62:601

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ СЕРИИ ПОЛИВАЛЕНТНОГО ФАГОВОГО БИОПРЕПАРАТА ПРИ СМЕШАННОЙ КИШЕЧНОЙ ИНФЕКЦИИ ПОРОСЯТ-СОСУНОВ

С.Н. Золотухин, доктор биологических наук, профессор,

А.С. Мелехин, аспирант,

ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина»

тел 8(8422)559535; E-mail: fvm.zol@yandex.ru

Н.В. Пименов, доктор биологических наук, профессор

ФГБОУ ВПО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехно-

логии имени К.И. Скрябина»,

тел.: 8(495)377-91-17; E-mail: pimenov-nikolai@yandex.ru

Ключевые слова: Бактериофаги, антибиотики, энтеробактерии, диарея, лечение, сохранность.

В работе авторы изучали терапевтическую эффективность сконструированного ими поливалентного фагового препарата. Было установлено, что при применении традиционной схемы антибиотикотерапии сохранность заболевших поросят составила 78%, применение бактериофага позволило сохранить 86% животных от числа заболевших. Наибольший эффект получили при сочетанном применении антибиотиков и бактериофага, выжило 45 голов из 50, что составило 90%.