

УДК 616:619

БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ МЕТАБОЛИЗМА УГЛЕВОДОВ БАКТЕРИЯМИ РОДА *BORDETELLA*

Ломакин А.А., студент 2 курса факультета ветеринарной медицины
Научные руководители – Мاستиленко А.В., кандидат биологических наук, старший преподаватель, Васильев Д.А., доктор биологических наук, профессор

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

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

Аннотация. 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.

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.ansorpjii* («новые» *Bordetella*). [1, 2, 3, 10, 15-19].

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 нормального 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 Ensmingerp (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-бифосфат. 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 син-

тезировать цитрат из оксалацетата и ацетила-Со-А, и использовать пируват в качестве единственного источника энергии, т. е. данные метаболические пути оказались неактивными [11].

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, неоднозначно 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 Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии 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, лабораторная бактериологическая посуда, 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 паракоклюше (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.

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

Дульцит	-	-	-	-	-	-
Сорбид	-	-	-	-	-	-
Ксилоза	+	+	+	+	+	+
Рамноза	-	-	-	-	-	-
Раффиноза	-	-	-	-	-	-
Глюкоза	+	+	+	+	+	+
Манноза	-	-	-	-	-	-
Маннит	-	-	-	-	-	-
Сахароза	-	-	-	-	-	-
Лактоза	-	-	-	-	-	-
Мальтоза	-	-	-	-	-	-
Инозит	-	-	-	-	-	-
Инозин	-	-	-	-	-	-

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 отличается 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. 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 бакте-

риальными 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. На основании полученных данных считаем необходимым проведение дальнейших исследований связанных с метаболизмом углеводов у бактерий рода *Bordetella* с увеличенными сроками культивирования и различными температурными режимами; а также исследований, связанных с идентификацией наличия соответствующих генов, кодирующих основные ферментные комплексы метаболизма, и их экспрессии при воздействии различных внешних факторов при культивировании.

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: Exo-physiology, 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. – Т. 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. Бордетеллэз 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. – Т. 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. – Т. 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.
 15. Сверкалова Д.Г. Создание транспортной и накопительной сред для *Bordetella bronchiseptica* / Д.Г. Сверкалова, А.В. Мاستиленко, Д.Н. Хлынов, Ю.Б. Никульшина, Д.А. Васильев // *Актуальные вопросы аграрной науки и образования Материалы Международной научно-практической конференции, посвященной 65-летию Ульяновской ГСХА*. Ульяновск. - 2008. - С. 134-136.
 16. Никульшина Ю.Б. Культивирование *Bordetella bronchiseptica* на различных селективных средах / Ю.Б. Никульшина, Д.Г. Сверкалова, А.В. Мاستиленко, Д.Н. Хлынов, Д.А. Васильев // *Актуальные вопросы аграрной науки и образования Материалы Международной научно-практической конференции, посвященной 65-летию Ульяновской ГСХА*. Ульяновск - 2008. - С. 57-59.
 17. Васильев Д.А. Индикация *Bordetella bronchiseptica* из объектов внешней среды и клинических образцов / Д.А. Васильев, Ю.Б. Васильева, Е.Н. Семанина, Е.Г. Семанин // *Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения Материалы V Международной научно-практической конференции*. Ульяновск: ГСХА им. П.А. Столыпина. -2013. - С. 18-22.
 18. Никульшина Ю.Б. Разработка методов индикации и идентификации *Bordetella bronchiseptica*, выделенных у домашних животных / Ю.Б. Никульшина, Д.Г. Сверкалова, Е.Н. Никулина // *Ветеринарная патология*. 2007. - № 4. - С. 103-106.
 19. Васильева Ю.Б. Изучение чувствительности и диагностической эффективности тест-системы индикации и идентификации бактерий *B. bronchiseptica* / Ю.Б. Васильева, А.В. Мастыленко, Д.А. Васильев, Р.Р. Бадаев, С.В. Мерчина, И.Г. Швиденко, А.С. Скорик // *Современные проблемы науки и образования*. - 2014. - № 5. - С. 596.

BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF THE METABOLISM OF CARBOHYDRATES BY BACTERIA OF THE GENUS BORDETELLA

Lomakin, A. A., Mastilenco A.V., Vasiliev D.A.

Key words: *Bordetella*, metabolism of carbohydrates, features, and *B. bronchiseptica*.

Summary. The article presents a literature review on the problem of biochemical characteristics of carbohydrate metabolism in bacteria of the genus *Bordetella*. The authors have conducted their own studies of the metabolism of simple and complex carbohydrates for example bacterial cultures of *B. bronchiseptica*. The results indicate a poorly-defined the metabolism of glucose and xylose data bacterial cultures, incubation time and results were significantly increased in comparison with the conventional technique to 48 hours.

УДК 616:619

РАЗРАБОТКА СИСТЕМЫ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ *CORYNEBACTERIUM ULCERANS* НА ОСНОВЕ ПЦР В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

Ломакин А.А., студент 2 курса факультета ветеринарной медицины
Научные руководители - Полетаева Т.Н., Макшанова Н.В., младшие научные сотрудники

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

Ключевые слова: ПЦР, молекулярно-генетическая идентификация, *C. ulcerans*, *C. diphtheria*

Аннотация. Статья посвящена разработке молекулярно-генетической идентификации *C. ulcerans* на основе метода ПЦР в режиме "реального времени". В результате проведенных экспериментов нами было обнаружено, что олигонуклеотиды и флуоресцентный зонд с красителем R6G, фланкирующие фрагмент гена *uvrB* системы *UvrABC protein B* являются видоспецифичными для *C. ulcerans*.