

УДК 619:579.841.94

Великий С.В., научный сотрудник
Дадашко С.В., научный сотрудник
Зубовская И.В., кандидат ветеринарных наук
Новикова О.Н., кандидат ветеринарных наук, доцент

РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеслеского», г. Минск, Республика Беларусь

ВЛИЯНИЕ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА РОСТ БАКТЕРИЙ *BORDETELLA BRONCHISEPTICA* ПРИ СТАЦИОНАРНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ

Резюме

В результате проведенных исследований установлено, что максимальное накопление *Bordetella bronchiseptica* наблюдается в ГРМ-бульоне и бульоне Хоттингера с добавлением 1%-го глутамина и 10%-ной сыворотки КРС.

Ключевые слова: *Bordetella bronchiseptica*, культивирование, питательные среды.

Summary

As a result of the studies, it was found that the accumulation of *Bordetella bronchiseptica* is maximum in GRM broth and Hottinger broth with the addition of 1% glutamine and 10% cattle serum.

Keywords: *Bordetella bronchiseptica*, cultivation, nutrient media.

Поступила в редакцию 13.11.2024 г.

ВВЕДЕНИЕ

Род *Bordetella* относится к грамотрицательным β -протеобактериям из семейства *Alcaligenaceae*. Большинство представителей приспособились жить в тесном контакте с высшими организмами, либо в качестве явных первичных патогенов, либо в сообществах, которые иногда приводят к возникновению сопутствующих заболеваний. *Bordetella pertussis* вместе с *Bordetella bronchiseptica* и *Bordetella parapertussis* составляют классическую группу бордетелл, вызывающих респираторные заболевания у млекопитающих, в то время как к неклассическим видам бордетелл относятся свободноживущие (*Bordetella petrii*), патогены птиц (*Bordetella avium* и *Bordetella hinzii*) и условно-патогенные микроорганизмы человека (*Bordetella holmseii*, *Bordetella trematum* и *Bordetella ansorpii*). Предполагается, что патогенная группа классических бордетелл произошла от свободно обитающих в окружающей среде неклассических видов *Bordetella*. *B. bronchiseptica* может выживать в окружающей среде и заражать широкий спектр млекопитающих, включая собак, свиней, кошек, кроликов и людей. *B. pertussis* и *B. parapertussis* являются патогенами с ограниченным количеством хозяев.

B. pertussis вызывает коклюш, тяжелое респираторное заболевание человека [1, 2].

B. parapertussis вызывает заболевание у человека, но был найден и у овец. Однако *B. parapertussis*, вызывающая респираторное заболевание овец, не способна вызывать соответствующее заболевание у человека.

Все микроорганизмы рода *Bordetella* являются грамотрицательными коккобациллами, некоторые виды являются подвижными, строгие аэробы с оптимальной температурой роста 35–37 °С. Несмотря на то, что все виды имеют относительно простую потребность в питательных веществах, различия в предпочтениях зависят от степени чувствительности к токсическим субстанциям и метаболитам, найденным в общепринятых лабораторных средах. *B. pertussis* является наиболее прихотливым видом и ингибируется компонентами, присутствующими во многих средах, включая жирные кислоты, ионы металлов, сульфиды и пероксиды. Другие виды рода *Bordetella* менее прихотливы и хорошо растут на агарах, содержащих кровь. Скорость роста представителей рода *Bordetella* обратно пропорциональна прихотливости;

B. pertussis растёт медленно, тогда как *B. avium* и *B. bronchiseptica* – быстро. *B. bronchiseptica*, *B. avium* способны расти в фосфатно-буферном растворе и пресной воде, которые теоретически могут являться источниками инфекции [3].

B. bronchiseptica является асахаролитическим микроорганизмом: ни один из протестированных углеводов или сахарных спиртов, включая декстрозу, маннозу, галактозу, мальтозу, маннит, рамнозу, сорбит, инозит, фруктозу, салицин, ксилозу, лактозу, рафинозу и сахарозу, не способствовал росту. Кроме того, потребность в углероде и энергии может быть удовлетворена исключительно любой из четырех аминокислот (глутамат, глутамин, пролин или тирозин) или любой другой из нескольких органических кислот, таких как сукцинат, цитрат, α -кетоглутарат, ацетат, фумарат, пируват, малат, лактат или оксалоацетат. Эти результаты противоречат требованиям, предъявляемым к росту *B. pertussis*, по крайней мере в отношении двух аминокислот – глутамата или пролина в дополнение к цистину или цистеину. Геномный анализ подтверждает экспериментальные наблюдения, что *Bordetella* не использует сахара в качестве источника углерода. В частности, в геноме отсутствуют гены, кодирующие гликолитические функции, такие как глюкокиназа, фосфофруктокиназа и фруктозо-1,6-бисфосфатаза.

Кроме того, у всех видов рода *Bordetella* отсутствуют гены, отвечающие за несколько ферментов окислительной ветви пентозофосфатного пути, при котором глюкозо-6-фосфат окисляется до рибулозо-5-фосфата. Этот участок пути является местом образования никотинамидадениндинуклеотидфосфата (NADPH). Таким образом, бордетеллы должны генерировать восстановительную энергию за счет других реакций, поскольку NADPH является основным донором электронов и водорода в реакциях клеточного биосинтеза. Анализ последовательностей генома показывает, что бордетеллы способны синтезировать большинство аминокислот, а также использовать аминокислоты в качестве источника азота. Катаболизм аминокислот включает в себя удаление аминокислотной группы, в результате чего образуется α -кетоглутарат, который вступает в цикл Кребса или используется

для клеточных реакций. При дезаминировании образуется аммиак. Усвоение неорганического азота клеточными компонентами осуществляется только за счет включения аммиака в качестве аминокислотной группы в глутамат и глутамин. Когда глутамат используется в качестве основного источника углерода, образуется избыток аммиака, что приводит к дисбалансу углерода и азота и увеличению кислотности питательной среды.

Известна базовая химически определенная среда (CDM), используемая для суспензионного культивирования *B. bronchiseptica*, на основе двух распространенных сред – среды SS (Stainer and Scholte, 1971) и среды CL (Imaizumi et al., 1983.), содержащая 1 % глутамата натрия [4].

В своей научно-практической работе мы столкнулись с проблемой увеличения биомассы *B. bronchiseptica* при масштабировании производства бактериальных биопрепаратов на основе данного микроорганизма.

В связи с этим целью наших исследований являлось изыскание и подбор оптимальных параметров и условий для накопления *B. bronchiseptica*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводились на базе отдела бактериальных инфекций РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского». Объектом исследований являлся коллекционный штамм *Bordetella bronchiseptica* КМИЭВ-В212, выделенный от кроликов.

Тестировались следующие питательные среды с добавлением 0,5%-го дрожжевого экстракта (Angel Yeast CO., LTD, Китай): ГРМ-бульон (ФБУН «ГНЦ ПМБ», Россия), бульон Хоттингера (ОАО «БелВитунифарм», Беларусь). Были изготовлены следующие образцы каждой из питательных сред в жидком виде: среды без добавок (готовая среда, приготовленная по рецептуре), среды с добавлением 10%-ной сыворотки крови крупного рогатого скота (КРС), среды с 1%-ным глутамином, среды с 1%-ным глутамином и 10%-ной сывороткой крови КРС. Все пробирки с жидкими питательными средами объемом по 5 мл заражали суточной культурой в концентрации 1 миллиард

микробных тел в миллилитре (млрд м.т. в мл) посредством инокуляции бактериологической петли объемом 10 мкл. Инкубирование осуществлялось в термостате POLEKO при температуре +37 °С. Динамику роста бактериальной культуры *Bordetella bronchiseptica* определяли ежедневно по оптической плотности при помощи денситометра DEN-1 (Biosan Ltd., EU) в течение 15 дней. Фиксируемые показатели оптической плотности культуральной жидкости могут не отражать реальных значений количества микробных тел, поэтому конечная концентрация микробных клеток, по которой делали выводы о продуктивности среды, определялась в конце опыта после центрифугирования всего объема исследуемой пробы, ресуспензирования полученного осадка в физиологи-

ческом растворе и установления действительного значения количества микробных тел на денситометре последовательными разведениями аликвоты ресуспензированного осадка до 3,3 единиц по МакФарланду, что соответствует концентрации 1 млрд м.т. в мл.

Чистоту культуры в каждой пробе определяли с помощью окраски мазков по Граму с последующим микроскопированием.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

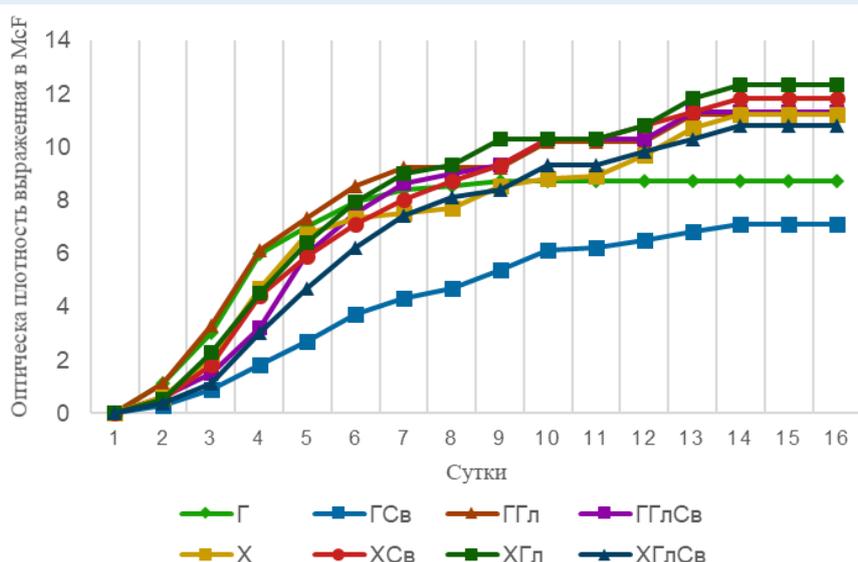
Микроскопирование мазков всех проб показало наличие мелких грамотрицательных коккобацилл.

Данные, полученные при измерении динамики оптической плотности по МакФарланду, отражены в таблице 1 и на рисунке.

Таблица 1 – Оптическая плотность баккультуры, выраженная в McF

Сутки	Виды питательных сред							
	Г	ГСв	ГГл	ГГлСв	Х	ХСв	ХГл	ХГлСв
0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	1,1	0,3	1,1	0,6	0,6	0,5	0,5	0,4
2	3,0	0,9	3,3	1,5	2,1	1,8	2,3	1,1
3	6,0	1,8	6,1	3,2	4,7	4,4	4,5	3,0
4	7,0	2,7	7,3	6,0	6,7	5,9	6,4	4,7
5	7,9	3,7	8,5	7,5	7,3	7,1	7,9	6,2
6	8,4	4,3	9,2	8,6	7,5	8,0	9,0	7,4
7	8,5	4,7	9,2	9,0	7,7	8,7	9,3	8,1
8	8,7	5,4	9,2	9,3	8,5	9,3	10,3	8,4
9	8,7	6,1	10,2	10,3	8,8	10,3	10,3	9,3
10	8,7	6,2	10,2	10,3	8,9	10,3	10,3	9,3
11	8,7	6,5	10,2	10,3	9,7	10,8	10,8	9,8
12	8,7	6,8	11,2	11,3	10,7	11,3	11,8	10,3
13	8,7	7,1	11,2	11,3	11,2	11,8	12,3	10,8
14	8,7	7,1	11,2	11,3	11,2	11,8	12,3	10,8
15	8,7	7,1	11,2	11,3	11,2	11,8	12,3	10,8

Примечание – Г – ГРМ-бульон; ГСв – ГРМ-бульон с 10%-ной сывороткой КРС; ГГл – ГРМ-бульон с 1%-ным глутамином; ГГлСв – ГРМ-бульон с 10%-ной сывороткой КРС и 1%-ным глутамином; Х – бульон Хоттингера; ХСв – бульон Хоттингера с 10%-ной сывороткой КРС; ХГл – бульон Хоттингера с 1%-ным глутамином; ХГлСв – бульон Хоттингера с 10%-ной сывороткой КРС и 1%-ным глутамином



Г – ГРМ-бульон; ГСв – ГРМ-бульон с 10%-ной сывороткой КРС; ГГл – ГРМ-бульон с 1%-ным глутамином; ГГлСв – ГРМ-бульон с 10%-ной сывороткой КРС и 1%-ным глутамином; Х – бульон Хоттингера; ХСв – бульон Хоттингера с 10%-ной сывороткой КРС; ХГл – бульон Хоттингера с 1%-ным глутамином; ХГлСв – бульон Хоттингера с 10%-ной сывороткой КРС и 1%-ным глутамином

Рисунок – Динамика изменения оптической плотности культуры

Из данных таблицы 1 и рисунка видно, что рост культуры останавливается на 12-й день у сред на основе ГРМ-бульона и 13-й день – у сред на основе бульона Хоттингера. Эти процессы касаются всех сред, за исключением ГРМ-бульон без добавок, где выход на плато произошел на 8-й день,

и ГРМ-бульона с добавлением сыворотки КРС, рост на котором происходил без ярко выраженного изменения скорости роста с выходом на плато на 13-й день.

В таблице 2 представлена действительная конечная концентрация *B. bronchiseptica* в различных питательных средах.

Таблица 2 – Конечная концентрация *Bordetella bronchiseptica* при культивировании в различных средах

Питательные среды	Г	ГСв	ГГл	ГГлСв	Х	ХСв	ХГл	ХГлСв
Концентрация, млрд м.т. на мл	4,25	5,75	11	16	6	9	9	16

Примечание – Г – ГРМ-бульон; ГСв – ГРМ-бульон с 10%-ной сывороткой КРС; ГГл – ГРМ-бульон с 1%-ным глутамином; ГГлСв – ГРМ-бульон с 10%-ной сывороткой КРС и 1%-ным глутамином; Х – бульон Хоттингера; ХСв – бульон Хоттингера с 10%-ной сывороткой КРС; ХГл – бульон Хоттингера с 1%-ным глутамином; ХГлСв – бульон Хоттингера с 10%-ной сывороткой КРС и 1%-ным глутамином

Измерение действительного количества микробных тел при накоплении на средах на основе ГРМ-бульона без добавок показало конечную концентрацию *B. bronchiseptica* 4,25 млрд м.т. в мл для ГРМ-бульона, а с добавлением 10%-ной сыворотки КРС – 5,75 млрд м.т. в мл. В средах на основе бульона Хоттингера без добавок

показало конечную концентрацию *B. bronchiseptica* 6 млрд м.т. в мл, а с добавлением 10%-ной сыворотки КРС – 9 млрд м.т. в мл.

Действительное количество микробных тел при накоплении на средах на основе ГРМ-бульона с добавлением 1%-го глутамина показало конечную концентрацию *B. bronchiseptica* 11 млрд м.т. в мл без

добавления 10%-ной сыворотки КРС, а с добавлением – 16 млрд м.т. в мл, что на 45 % выше, чем без сыворотки. Накопление целевого микроорганизма в бульоне Хоттингера с добавлением 1%-го глутамин показал конечную концентрацию *B. bronchiseptica* 9 млрд м.т. в мл без добавления 10%-ной сыворотки КРС, а с добавлением – 16 млрд м.т. в мл, что на 78 % выше, чем без сыворотки.

Без добавления 1%-го глутамин конечная концентрация *B. bronchiseptica* больше у сред на основе бульона Хоттингера: с добавлением сыворотки – на 57 %, без сыворотки – на 41 %. В то же время концентрация *B. bronchiseptica* с добавлением 1%-го глутамин больше у сред на основе ГРМ-бульона на 11 %.

Однако учитывая, что стоимость ГРМ-бульона в четыре раза ниже по сравнению с бульоном Хоттингера при одном и том же выходе бактериальной массы, использование первого будет предпочтительнее.

ВЫВОДЫ

Исходя из проведенных исследований при выборе питательной среды и дополнительных питательных веществ для накопления *Bordetella bronchiseptica* при стационарном культивировании, наиболее оптимальной является среда с добавлением 1%-го глутамин и 10%-ной сыворотки КРС. Внесение этих добавок привело к накоплению 16 млрд м.т. в мл как в бульоне Хоттингера, так и ГРМ-бульоне.

Несмотря на более ранний выход на плато при использовании ГРМ-бульона без добавок при стационарном культивировании *B. bronchiseptica*, использование ГРМ-бульона с добавлением глутамин и сыворотки крови КРС более предпочтительно, т.к. продукция бактериальной массы увеличивается в 4,25 раза.

Кроме того, в сравнении с бульоном Хоттингера с теми же показателями роста использование ГРМ-бульона экономически более выгодно.

СПИСОК ЦИТИРОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Armstrong, S. K. *Bacterial Metabolism in the Host Environment: Pathogen Growth and Nutrient Assimilation in the Mammalian Upper Respiratory Tract* / S. K. Armstrong // *Microbiol Spectr.* – 2015. – Jun. – Vol. 3(3). doi: 10.1128/microbiolspec.MBP-0007-2014.

2. Weiss, A. *The Genus Bordetella in: The Prokaryotes, A Handbook on the Biology of Bacteria, Volume 5: Proteobacteria: Alpha and Beta Subclasses* / A. Weiss // Springer; 3rd ed. edition. – 2006. – Oct. Chapter 3.2.3. – P. 648–674.

3. Колодкина, В. Л. *Лабораторные исследования при коклюше и паракоклюше* / В. Л. Колодкина, Т. Н. Денисевич ; ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии» Министерства здравоохранения Республики Беларусь. – Минск, 2010. – С. 3–4.

4. Guetter, S. D. *Production of biomass and filamentous hemagglutinin by Bordetella bronchiseptica* / S. D. Guetter, M. A. Eiteman // *Bioprocess Biosyst Eng.* – 2014. – Feb. – Vol. 37(2). – P. 115–123. doi: 10.1007/s00449-013-0977-4.

препарат ветеринарный

МАСТИН

ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ СУБКЛИНИЧЕСКОГО И КЛИНИЧЕСКОГО
МАСТИТОВ КОРОВ В ПЕРИОД ЛАКТАЦИИ

- ▶ антибактериальный препарат группы цефалоспоринов;
- ▶ действующее вещество – цефкином;
- ▶ обладает широким спектром бактерицидного действия;
- ▶ механизм действия заключается в нарушении формирования клеточной стенки бактерий, что приводит к их гибели



WWW.BIEVM.BY

