

ОСОБЕННОСТИ БИОЛОГИИ БАКТЕРИЙ ВИДА *BORDETELLA BRONCHISEPTICA*

Васильева Ю.Б.

ФГБОУ ВПО «Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия имени П.А. Столыпина», Ульяновск, Россия (432017, г. Ульяновск, бульвар Новый Венец-1), grant-ugsha@yandex.ru

В статье приводятся результаты исследования фенотипических особенностей штаммов *B. bronchiseptica*. Бордетеллы не требовательны к условиям роста, хорошо культивируются на обычных агаровых средах, обильнее - на средах, обогащенных питательными веществами, витаминами, ферментами и микроэлементами, также растут на селективных средах, содержащих ингибиторы роста. Биологической особенностью штаммов *B. bronchiseptica* является их фенотипическая вариабельность, обусловленная течением инфекционного цикла. При культивировании вирулентных штаммов бордетелл на плотных средах образуются мелкие, выпуклые, круглые, с ровными краями, полупрозрачные колонии с блестящей поверхностью и четкой зоной гемолиза. Бордетеллы, находящиеся в авирулентной фазе, формируют большие, с ровными и шероховатыми краями, преимущественно плоские с приподнятым центром, матовой поверхностью колонии с отсутствующей зоной гемолиза. Имеются промежуточные варианты. Переход из вирулентной в авирулентную фазу происходит при длительном культивировании, многократных пассажах, снижении температуры выращивания до 25 °С.

Ключевые слова: *B. bronchiseptica*, фенотипическая гетерогенность, биологические свойства.

CHARACTERISTICS OF BIOLOGY OF BACTERIA SPECIES *BORDETELLA BRONCHISEPTICA*

Vasileva Yu.B.

FSBEI HPE «Ulyanovsk SAA named after P.A. Stolypin», Ulyanovsk, Russia (432017, Ulyanovsk, Novyj Venec boulevard, 1), grant-ugsha@yandex.ru

The article presents the results of a study of phenotypic characteristics of strains *B. bronchiseptica*. *Bordetella* is not demanding in terms of growth, well-cultivated on conventional agar media, abundant - in media enriched with nutrients, vitamins, enzymes and trace elements, are also growing on selective media containing growth inhibitors. Biological feature of strains *B. bronchiseptica* is their phenotypic variability due to the passage of the infectious cycle. During the cultivation of virulent strains of *Bordetella* to form small dense environments, convex, round, with smooth edges, translucent colonies with a shiny surface and a clear zone of hemolysis. *Bordetella* found in avirulent phase, form large, with smooth and rough edges, mostly flat with a raised center, a matte surface of the colony with a missing zone of hemolysis. There are intermediate options. Transition from a virulent phase occurs during prolonged cultivation, multiple passages, reducing the growth temperature to 25 °С.

Keywords: *B. bronchiseptica*, phenotypic heterogeneity, biological properties.

Характерной особенностью бактерий вида *Bordetella bronchiseptica* (*B. bronchiseptica*) является фенотипическая гетерогенность колоний. Типы колоний отличаются строением и вирулентностью. Различают вирулентную (I), авирулентную (II) и промежуточную (III) фазы. Переход бактерий из одной фазы в другую происходит не только при выращивании на питательных средах, но и в живом организме в результате спонтанных мутаций [2; 5].

В.В. Ласеу в своих исследованиях получил результаты, при которых колоний микроорганизма, находящихся в вирулентной фазе I, было больше при культивировании на средах Борде-Жангу и кровяном агаре, чем на простых агаровых средах [4]. Автором были сделаны выводы, что на тип фазы вирулентности, при искусственном культивировании, существенное влияние оказывает состав питательной среды. Различия в пределах II и III фаз

были связаны с определенными капсульными или наружными мембранными антигенами. Характерной особенностью III фазы стало присутствие флагеллярного антигена [2; 3; 5].

Целью нашей работы явилось исследование фенотипических особенностей лабораторных и полевых штаммов *B. bronchiseptica*.

Материалы и методы исследований. Научные исследования проводились при финансовой поддержке государства в лице Минобрнауки России в рамках реализации ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы (соглашение № 8267 от 10.08.2012). Исследования выполнялись в лаборатории кафедры МВЭиВСЭ ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина». В работе использовались 5 референс-штаммов бактерий вида *B. bronchiseptica*. Учитывали специфические особенности роста бордетелл на 18-ти плотных агаровых средах. Работу проводили согласно общепринятым в микробиологии методам, используя для этого соответствующие среды и реактивы [1].

Для приготовления разработанной нами селективно-диагностической среды VBR-57 УГСХА необходимы следующие компоненты: пептон ферментативный в количестве 20,0 г/дм³; метионин - 0,3 г/дм³; цистеин - 0,3 г/дм³; никотиновая кислота - 0,1 г/дм³; цефазолина натриевая соль - 0,004 г/дм³; хлорид бария - 0,4 г/дм³; глюкоза – 0,7 г/дм³; лактоза - 0,7 г/дм³; сахароза - 0,7 г/дм³; мальтоза - 0,7 г/дм³; маннит - 0,7 г/дм³; бромтимоловый синий - 0,2 г/дм³. В дистиллированную воду добавляют все компоненты по предложенной прописи, кроме цефазолина. Компоненты растворяют и нагревают на водяной бане до кипения. Доводят pH среды 0,1 N раствором NaOH до 7,2±0,2. Среду автоклавируют при t 110-112 °C 15 минут. Повторно измеряют pH среды и разливают по чашкам Петри.

Результаты и их обсуждение. Анализ результатов культивирования штаммов *B. bronchiseptica* на жидких и плотных питательных средах показал, что бордетеллы являются аэробами с оптимальной температурой культивирования 35-37 °C, при pH от 4 до 7,5.

В мясо-пептонном бульоне через 48 ч инкубации референс-штаммы бордетелл вызывали равномерное помутнение с последующим образованием осадка и пристеночного кольца.

При культивировании на плотных агаровых средах установили, что референс-штаммы *B. bronchiseptica* хорошо растут как на простых средах (мясо-пептонный агар), так и на обогащенных витаминами, ферментами, микроэлементами и другими питательными веществами (триптиказно-соевый, Васто PPLO агар). Бордетеллы также показали хороший рост на селективных средах, не предназначенных для их культивирования и содержащих ингибиторы роста и другие агрессивные вещества. Был отмечен обильный рост на дифтерийной среде, среде для коринобактерий – Пизу, на менингококкагаре, на среде для иерсиний и псевдотуберкулеза, на среде для идентификации энтеробактерий - ацетатном

агаре, среде Эндо. На мясо-пептонном агаре с 0,03% цетримидом и стафилококкагаре рост всех исследуемых референс-штаммов отсутствовал через 24, 48, 72 ч (таблица 1).

Таблица 1 - Оценка культивирования референс-штаммов *B. bronchiseptica* на агаровых средах

№	Агаровая среда	рН среды	Размер колоний в зависимости от срока инкубации, мм			Реакция среды
			24 ч	48 ч	72 ч	
1.	Агар Симмонса	7,0 ±0,2	0,9±0,7	1,3±0,4	2,4±0,4	с зеленого на синий
2.	Ацетатный агар	6,6±0,2	1,5±0,5	2,0±0,7	3,5±0,5	с оливково-зеленого на васильковый
3.	Vacto PPLO агар	7,0±0,1	1,8±0,3	2,5±0,5	4,0±0,5	отсутствует
4.	ББР-57 УГСХА	7,2±0,2	1,5±0,5	2,5±0,5	3,5±0,5	с зеленого на бирюзовый
5.	Бордетелагар	7,2±0,2	1,0±0,4	1,4±0,7	1,9±0,2	отсутствует
6.	ГРМ – агар	7,3±0,2	-	1,2±0,4	4,0±1,0	отсутствует
7.	Дифтерийная среда	7,2±0,1	1,3±0,5	3,0±0,5	4,5±0,5	отсутствует
8.	Кровяной агар 10%	7,2±0,1	-	2,5±0,5	3,5±0,5	слабый β-гемолиз через 48 ч
9.	Казеиново-угольный агар	7,2±0,1	-	2,0±0,5	4,5±0,5	отсутствует
10.	Менингококкагар	7,0±0,2	2,0±0,6	3,0±0,3	5,6±0,4	отсутствует
11.	Мясо-пептонный агар	7,2±0,2	1,3±0,7	2,5±1,2	5,6±7,7	отсутствует
12.	МПА с цетримидом	7,2 ±0,2	-	-	-	отсутствует
13.	Среда Пизу	7,7±0,2	1,7±0,3	2,3±0,7	2,5±0,8	среда вокруг колоний коричневая
14.	Среда Сабуро	5,7±0,2	0,8±0,8	1,2±0,5	2,0±0,2	отсутствует
15.	Среда для иерсиний и псевдотуберкулеза	7,7±0,2	1,2±0,4	2,0±0,7	2,8±0,5	с зеленого на синий, при открывании – запах аммиака
16.	Стафилококк агар	7,0±0,4	-	-	-	отсутствует
17.	Триптиказо-соевый агар	7,2±0,1	1,3±0,7	2,3±0,4	3,1±0,7	отсутствует
18.	Среда Эндо	7,4±0,2	1,3±0,7	2,0±0,5	3,5±0,5	отсутствует

Появление первых колоний на агаровых средах регистрировали в основном в первые сутки выращивания через 16-24 ч. На чашках Петри образовывались мелкие росинчатые жемчужные полупрозрачные колонии, не превышающие в диаметре 2 мм. При более длительном культивировании колонии значительно увеличивались в размере.

Мы также наблюдали наличие реакции на некоторых селективных средах. На ацетатном агаре - изменение цвета среды в зоне роста колоний с оливково-зеленого на

васильковый, что свидетельствовало о способности штаммов *B.bronchiseptica* утилизировать ацетат натрия. На питательной среде Пизу в зоне роста бактерий выделялся коричневый пигмент, показывающий наличие фермента цистиназы. Среда для иерсиний и псевдотуберкулеза при культивировании на ней бордетелл изменила цвет с зеленого на синий. При открытии чашки ощущался запах аммиака, свидетельствующий о наличии фермента уреазы. На среде Симмонса также отмечали цветовую реакцию. На разработанной нами среде VBR-57 УГСХА бордетеллы образовывали синего цвета колонии, среда изменяла цвет с зеленого на бирюзовый. При более длительном культивировании верхушка колоний приобретала темно-синюю окраску.

При культивировании на плотных средах *in vitro* мы регистрировали фенотипическую гетерогенность колоний. Бордетеллы в I вирулентной фазе образовывали мелкие, росинчатые, выпуклые, круглые, с ровным краем, полупрозрачные колонии с блестящей поверхностью, с четкой зоной гемолиза на средах с добавлением крови. Цвет колоний был различным в зависимости от среды выращивания. На простых средах наблюдали жемчужные, грязно-белые или сероватые колонии. Колонии были влажной консистенции, легко снимались с поверхности среды.

Бордетеллы в авирулентной III фазе образовывали большие, с ровными и шероховатыми краями, преимущественно плоские с приподнятым центром, матовой поверхностью колонии с отсутствующей зоной гемолиза. Цвет колоний на простых питательных средах был белый жемчужный или серый с голубоватым оттенком. Консистенция колоний была маслянистая, они легко снимались с поверхности среды.

Также наблюдали промежуточные варианты (фаза II): с ровными и шероховатыми краями, выпуклые и плоские, блестящие и матовые, белые и серые колонии. Типы колоний соответствовали разным фазам инфекционного цикла микроорганизма.

Морфологические признаки вирулентных референс-штаммов на различных агаровых средах представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Морфологическая характеристика колоний вирулентных референс-штаммов *B. bronchiseptica*

№	Питательная среда	Форма	Величина	Профиль	Цвет	Блеск	Край	Консистенция	Прозрачность
1.	Агар Симмонса	круглая	мелкие	выпуклые	ржавые или белые	есть	ровный	мягкая, маслянистая	непрозрачные
2.	Ацетатный агар	округлая	росинчатые	выпуклые	белые	есть	ровный	маслянистая	полупрозрачные
3.	Vasto PPLO агар	круглая	мелкие	слегка конические	серовато-белые	есть	ровный	мягкая	полупрозрачные
4.	BBR-57 УГСХА	круглая	мелкие	слегка конические	бирюзовые	есть	ровный	вязкая	непрозрачные
5.	Бордетелагар	округлая	росинчатые	куполообразные	серо-белые	есть	ровный	маслянистая	полупрозрачные
6.	ГРМ – агар	круглая	мелкие	слабо выпуклые	серовато-белые	есть	ровный	влажная	непрозрачные
7.	Дифтерийная среда	круглая	мелкие	слегка конические	серовато-белые	есть	ровный	маслянистая	полупрозрачные
8.	Кровяной агар 10%	круглая	росинчатые	слегка конические	белые	есть	ровный	маслянистая	непрозрачные
9.	Казеиново-угольный агар	круглая	росинчатые	куполообразные	серо-белые	есть	ровный	маслянистая	полупрозрачные
10.	Менингококкагар	круглая	мелкие	выпуклые	грязно-белые	есть	ровный	мягкая	полупрозрачные
11.	Мясо-пептонный агар	круглая	мелкие	слабо выпуклые	серовато-белые	есть	ровный	маслянистая	непрозрачные
12.	Среда Пизу	круглая	росинчатые	слегка выпуклые	с темным центром	есть	ровный	мягкая	полупрозрачные
13.	Среда Сабуро	округлая	росинчатые	выпуклые	грязно-белые	есть	ровный	маслянистая	полупрозрачные
14.	Среда для иерсиний и псевдотуберкулеза	круглая	мелкие	слегка выпуклые	беловатые	есть	ровный	мягкая	непрозрачные
15.	Триптиказо-соевый агар	округлая	росинчатые	слегка конические	серовато-белые	есть	ровный	мягкая	полупрозрачные
16.	Эндо	круглая	росинчатые	слегка конические	грязно-белые	есть	ровный	мягкая	непрозрачные

При длительном культивировании, многократных пассажах наблюдали формирование колоний разных морфологических типов и больших размеров (рис. 1-2).

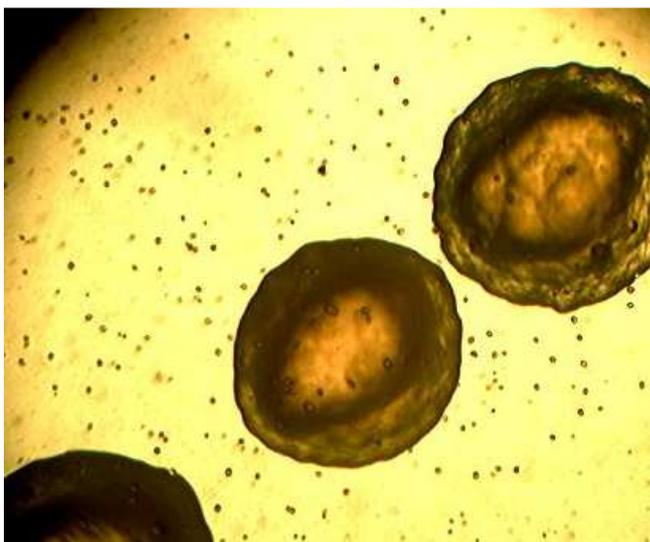


Рис. 1. Типичного размера колонии референс-штамма 22-067 *B. bronchiseptica* на основе кровяного агара через 72 ч (x4)

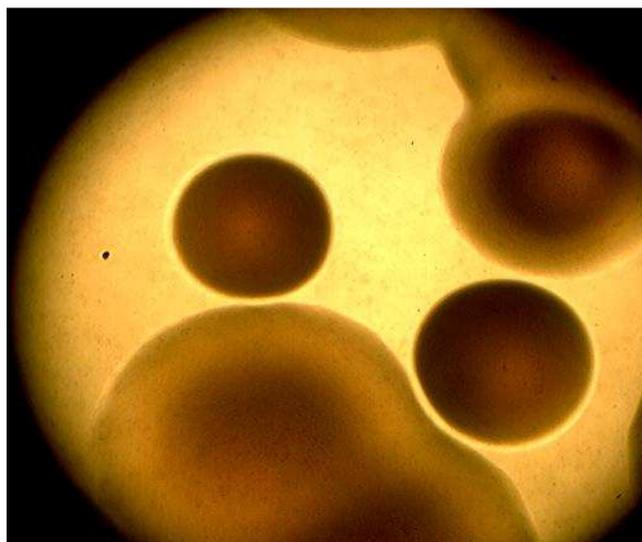


Рис. 2. Колонии референс-штамма *B. bronchiseptica* 22-067 на менингококкагаре через 72 ч (x4)

При длительном культивировании наблюдали переход бордетелл в слабовирулентную фазу II и авирулентную фазу III и значительное увеличение размера колоний (рис. 3, 4).

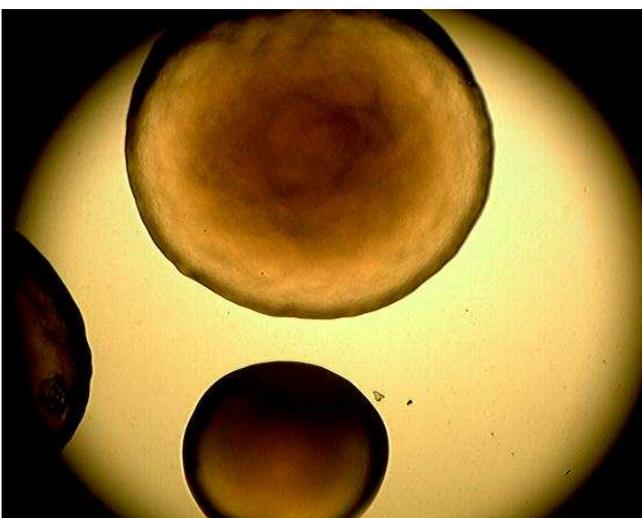


Рис. 3, 4. Крупные колонии референс-штамма *B. bronchiseptica* 22-067 на основе кровяного агара через 72 ч (x4)

При культивировании референс-штаммов *B. bronchiseptica* на 10%-ном кровяном агаре при температуре 37 °С в течение 48 ч наблюдали зону β -гемолиза. Данный агар можно использовать для культивирования бордетелл в вирулентной фазе I. При снижении температуры культивирования до 25 °С регистрировали мутационный переход из вирулентной в авирулентную фазу.

Выводы. Результаты проведенных исследований показали, что фенотипические особенности штаммов *B. bronchiseptica* эффективно изучать при выращивании их на плотных агаровых средах. Бордетеллы не требовательны к условиям роста, хорошо культивируются на обычных агаровых средах (МПА), обильнее - на средах, обогащенных питательными веществами, витаминами, ферментами и микроэлементами (КУА, бордетелагар), также растут на селективных средах, содержащих ингибиторы роста и другие агрессивные вещества (среда Пизу, менингококкагар и др.).

Биологической особенностью штаммов *B. bronchiseptica* является их фенотипическая изменчивость, обусловленная течением инфекционного цикла. При культивировании вирулентных штаммов бордетелл на плотных средах образуются мелкие, росинчатые, выпуклые, круглые, с ровным краем, полупрозрачные колонии с блестящей поверхностью, с четкой зоной гемолиза. Бордетеллы в авирулентной фазе формируют большие, с ровными и шероховатыми краями, преимущественно плоские с приподнятым центром, матовой поверхностью колонии с отсутствующей зоной гемолиза. Имеются промежуточные варианты. Переход из вирулентной в авирулентную фазу происходит при длительном культивировании, многократных пассажах, снижении температуры выращивания до 25 °С.

Список литературы

1. Лабинская А.С. Микробиология с техникой микробиологических исследований. - М. : Медицина, 1978. – 394 с.
2. Bemis D.A. Bacteriological variation among *B. bronchiseptica* isolates from dogs and other species / D.A. Bemis, H.A. Greisen, M.J.G. Appel // J. Clin. Microbiol. – 1977. – V. 5. – P. 471-480.
3. Chhatwal G.S. Temperature dependent expression of an acid phosphatase by *B. bronchiseptica*: role in intracellular survival / G.S. Chhatwal, M.J. Walker, H. Yan [et al.] // Microb. Pathog. – 1997. – V. 22. – P. 257-264.
4. Lacey B.W. The influence of growth conditions on the antigenic structure of *H. pertussis*, *parapertussis*, *bronchisepticus* // In Sixth International Congress of Microbiology, Rome, Italy. – 1953. – V. 1. – P. 357.
5. Nakase Y. Studies on *Hemophilus bronchisepticus*. Phase variation of *H. bronchisepticus* // Kitasato Arch. Exp. Med. – 1957. – V. 30. – P. 73-77.

Рецензенты:

Васильев Дмитрий Аркадьевич, доктор биологических наук, профессор, директор ООО «Научно-исследовательский инновационный центр микробиологии и биотехнологии», Ульяновская область, Чердаклинский р-н, пос. Октябрьский.

Золотухин Сергей Николаевич, доктор биологических наук, профессор кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ ФГБОУ ВПО «Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия имени П.А. Столыпина», г. Ульяновск.