

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТАБОЛИЗМА *BORDETELLA PETRII* ПРИ РОСТЕ НА РАЗЛИЧНЫХ ИСТОЧНИКАХ УГЛЕРОДА И АЗОТА

Мастиленко Андрей Владимирович, кандидат биологических наук, доцент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

Ломакин Артём Андреевич, аспирант кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

Шестаков Андрей Геннадьевич, кандидат биологических наук, доцент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ

432017, г. Ульяновск, бульвар Новый Венец, дом 1: тел.: 89603621517

e-mail: artemy.lomakin@yandex.ru

Ключевые слова: *Bordetella*, *B. petrii*, биохимические свойства, углеводы, аминокислоты.

В статье представлены результаты исследований способности бактерии вида *Bordetella petrii* штамма von Wintzingerode ATCC BAA-461 метаболизировать органические и неорганические вещества как единственные источники углерода и азота в солевой основе питательных сред. По результату работы было установлено, что бактерии вида *B. petrii* при культивировании в течение 48 часов при температуре 37°С окисляют глюкозу, но не ферментируют. Так же бактерии этого вида способны использовать нитрат калия в качестве источника азота. Было установлено, что бактерии продуцируют свободный азот. При росте в среде с источником нитрата наблюдали газообразование. Бактерии вида *B. petrii* используют цитрат натрия и сукцинат натрия как единственные источники углерода в питательной среде. Было установлено, что бактерии вида *B. petrii* способны использовать L-аргинин, L-цистин, L-пролин, L-аланин как единственный источник углерода и азота в питательной среде, но не способны использовать L-глицин как источник питательных веществ. Полученные нами данные будут использованы в дальнейшем при конструировании среды накопления и селективной среды для выделения и идентификации бактерии вида *B. petrii*.

Введение

Бактерии вида *B. petrii* – единственный представитель рода, выделенный из окружающей среды, а также из биореактора, обогащенного речными осадками [1, 2]. *B. petrii* были выделены от пациентов с диагнозом остеомиелит нижней челюсти, кистозным фиброзом и хроническим гнойным мастоидитом [3]. Кроме того, штаммы *B. petrii* были выделены из морских губок и корневой системы трав [4, 5]. Отмечена биотехнологическая значимость *B. petrii* и их способность разлагать ароматические соединения, что приводит к элиминации тяжелых металлов [6, 7, 8, 9].

К роду *Bordetella* в настоящее время относят 16 видов: *B. pertussis*, *B. parapertussis*, *B. bronchiseptica*, *B. holmesii*, *B. avium*, *B. hinzii*, *B. ansorpii*, *B. petrii*, *B. trematum*, *B. bronchialis*, *B. flabilis*, *B. sputigena*, *B. pseudohinzi*, *B. muralis*, *B. tumbae*, *B. tumulicola*. В ветеринарной практике не достаточно данных о роли бактерий рода *Bordetella* в этиологии инфекционных процессов. В последнее время в публикациях появилась информация, что представители рода были выделены из объектов окружающей среды, от животных и человека [10].

Центральные метаболические пути у *B. petrii* схожи с таковыми у других представителей

рода *Bordetellae*. *B. petrii* осуществляют трансформацию веществ с использованием таких метаболических путей, как: дегградация бензоата, фталата, 3-гидроксibenзоата, 3-гидроксифенилацетата и 4-гидроксифенилацетата, нитратредукция и основными циклами Кребса, Энтнера-Дудорова [2, 11].

Бактерии вида *B. petrii* имеют необходимые ферменты для цитратного цикла и синтеза нуклеотидов, кофакторов, аминокислот и жирных кислот [1,2]. По литературным данным при анализе *in silico* последовательности генома *B. petrii* предполагается наличие набора вспомогательных путей для использования альтернативных питательных веществ, таких как глюконат, компоненты цитоплазмы растительных клеток, цианаты (как источник азота) и различные ароматические соединения [11]. Данные особенности метаболизма позволяют разрабатывать различные варианты сред для *B. petrii*.

Разные источники углерода предполагают изменение пути Энтнера-Дудорова по средству регулятора транскрипции семейства IclR [12, 13, 14]. *B. petrii* окисляет, но не ферментирует глюкозу, используя для этого периплазматическую глюкозодегидрогеназу [7].

Важный отличительный признак штаммов *B. petrii* от других бактерий рода *Bordetellae* в том,

что они имеют факультативный анаэробный энергетический обмен и могут использовать нитрат в качестве конечных акцепторов электронов при анаэробном дыхании. Соответственно, в своем основном геноме *B. petrii* кодирует ферменты, необходимые для проведения полной денитрификации от нитрата до свободного азота. Бактерии *B. petrii* продуцируют пектиназы. Данная способность характерна для ряда фитопатогенных бактерий [15, 16, 17, 18].

В связи с изученными литературными данными нам представляется интересным исследовать способность *B. petrii* метаболизировать различные органические источники углерода и азота при добавлении их в качестве единственного компонента в солевую основу питательных сред.

Цель работы - исследование способности *Bordetella petrii* штамма vonWintzingerode ATCC BAA-461 метаболизировать различные органические и неорганические вещества как единственный источник углерода и азота в солевой основе питательных сред.

Задачами исследования является изучение способности *B. petrii* к:

- окислению или ферментации глюкозы;
- использованию нитрата калия в качестве источника азота бактериями *B. petrii*;
- использованию сукцинат и цитрат в качестве единственных источников углерода в питательной среде;
- использованию L-аргинина, L-глицина, L-цистина, L-пролина, L-аланина в качестве единственных источников углерода и азота в питательной среде.

Объекты и методы исследований

ГРМ-агар (Микроген, Махачкала), агар бактериологический (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск), L-цистин, глюкоза, сукцинат натрия (НеваРеактив, Санкт-Петербург), цитрат натрия, L-пролин, L-аргинин, L-глицин, калий азотокислый, магний сернокислый, калий фосфорнокислый двухзамещенный, натрий хлорид, бромтимоловый синий.

Для изучения биохимических особенностей бактерий нами были разработаны методики.

Для изучения способности бактерии *B. petrii* метаболизировать глюкозу был произведен посев в среду с глюкозой (состав: глюкоза- 8 г, ГРМ-агар- 35.3 г, бромтимоловый синий-0.2 г). Посев культуры штамма был произведен методом укола. Культивировали данный штамм на среде в течение 48 часов при температуре 37°C.

Нитратредукцию определяли двумя методами. В первом случае была применена среда со следующим составом: глюкоза- 8,0 г, KNO_3 -3,0

г, бромтимоловый синий-0,2 г. Во втором случае была использована среда : сукцинат натрия-4г, KNO_3 -3 г, KH_2PO_4 -2г, MgSO_4 -2 г, NaCl-9 г, бромтимоловый синий-0.2 г.

Для определения способности бактерии *B. petrii* использовать цитрат натрия как источник углерода использована среда (состав среды на 1л): цитрата натрия-4г, KH_2PO_4 -2г, MgSO_4 -2 г, NaCl-9 г, агар бактериологический-20 г, бромтимоловый синий – 0,2 г.

Определение способности метаболизировать сукцианат натрия бактериями *B. petrii* было исследовано при использовании среды, состав среды указан на 1 литр: сукцинат натрия - 4 г, KH_2PO_4 - 2 г, MgSO_4 - 2 г, NaCl- 9г, агар бактериологический-20г, бромтимоловый синий – 0,2 г.

Для изучения способности бактерий *B. petrii* использовать в качестве единственного источника углерода и азота L-аргинин была скомпонована среда: L-аргинин-5,0г, KH_2PO_4 -2,0г, MgSO_4 -2,0 г, NaCl-9,0г, агар бактериологический-20 г, бромтимоловый синий-0,2 г.

Для определения способности метаболизировать L-глицин бактериями *B. petrii* была использована среда (состав указан на 1 литр): L-глицин -5,0г, KH_2PO_4 -2,0г, MgSO_4 -2,0 г, NaCl-9,0г, агар бактериологический-20,0 гр, бромтимоловый синий - 0,2 г.

Для исследования способности бактерии вида *B. petrii* метаболизировать L-цистин как единственного источника углерода и азота использована среда (состав указан на 1 литр): L-цистин -5,0г, KH_2PO_4 -2,0г, MgSO_4 -2,0 г, NaCl-9,0г, агар бактериологический-20,0 гр, бромтимоловый синий-0,2 г.

Для исследования способности бактерии вида *B. petrii* метаболизировать L-пролин, как единственный источник углерода и азота, использована среда (состав указан на 1 литр): L-пролин -5,0г, KH_2PO_4 -2,0г, MgSO_4 -2,0 г, NaCl-9,0г, агар бактериологический-20,0 г, бромтимоловый синий-0,2 г.

Для исследования способности бактерии вида *B. petrii* метаболизировать L-аланин как единственный источник углерода и азота использована среда (состав указан на 1 литр): L-аланин-5,0г, KH_2PO_4 -2,0г, MgSO_4 -2,0 г, NaCl-9,0г, агар бактериологический-20,0 г, бромтимоловый синий-0,2 г.

Результаты исследований

Для изучения окислительно-ферментативных свойств бактерии штамма *B. petrii* vonWintzingerode ATCC BAA-461 при использовании глюкозы посев суточной культуры штамма был произведен методом укола в толщу среды в пробирке. При культивировании штамма *B. petrii*

на среде в течение 48 часов при температуре 37°C был видимый рост бактериальной культуры. В течение периода культивирования произошло изменение цвета среды с зеленого на желтый в верхней части питательной среды. Это свидетельствует о том, что проходит гликолиз, конечные продукты которого закислили среду, в свою очередь изменения цвета в нижней части среды не наблюдалось.

При культивировании бактерии на среде с L-цистином и D-глюкозой при температуре 37°C через 24 часа наблюдался рост. Изменения цвета среды при культивировании в течение 72 часов не произошло, рост бактерий *B.petrii* отмечался в верхней части через 24 часа культивирования и в нижней части столбика питательной среды через 72 часа.

При культивировании на этой же среде с глюкозой бактерий вида *B.petrii* в чашках Петри при идентичных условиях (в течение 48 часов при температуре 37°C) было обнаружено изменение цвета среды на синий ввиду защелачивания ее продуктами метаболизма бактерии.

При исследовании способности бактерий к нитратредукции в присутствии глюкозы, через 24 часа культивирования происходило частичное изменение цвета в верхней части среды, изменение цвета указывало на ее защелачивание. Через 48 часов было полное изменение цвета всего столбика среды.

Также была изучена способность на использование сукцината натрия как единственного источника углерода в среде. В качестве одного из источников азота был использован калий азотокислый. После культивирования бактерий в термостате при 37°C в течение 48 часов наблюдался рост по всей толще среды. Было изменение цвета в верхней и нижней частях пробирки с зеленого на синий. Было установлено, что *B.petrii* продуцирует свободный азот. По уколу в среде были пузырьки газа свободного азота (рис. 1).

На среде с L-аргинином рост бактерии вида *B.petrii* был через 24 часа культивирования при температуре 37°C в верхней части питательной среды, через 48 часов - в нижней части. Изменения цвета среды не произошло на протяжении всего срока культивирования.

Было проведено исследование на способность бактерии *B.petrii* использовать сукцинат натрия в качестве источника углерода. В среду не добавлены дополнительные источники азота. Через 24 часа культивирования при температуре 37°C рост бактерий штамма *B.petrii* был в верхней части среды, изменения цвета не было. Через 48 часов



Рис 1 - Пробирка слева - рост бактерий *Bordetella petrii* штамма vonWintzingerode ATCC BAA-461 на среде с калием азотокислым и сукцинатом при температуре культивирования 370C через 48 часов видно газообразование. Пробирка справа – контроль.

культивирования рост наблюдался во всей толще среды. Изменений цвета среды не произошло в течение всего времени эксперимента.

Также было проведено исследование, в котором единственным источником углерода был цитрат натрия. В данную среду не вносили дополнительных источников азота. Изменение цвета с зеленого на синий было уже через 24 часа культивирования штамма *B.petrii*. По результату культивирования при 37°C через 24 часа рост располагался в верхнем слое среды, через 48 часов - во всей толще агарового столбика.

На среде с L-аргинином рост наблюдался через 24 часа при температуре 37°C, как и в случае с цитратом натрия, в верхней части питательной среды, через 48 часов рост был по длине всего укола. Изменений цвета за весь период культивирования штамма *B.petrii* не было.

На среде с L-цистином был рост через 16 часов при тех же условиях культивирования в аэробных условиях без изменения цвета среды. Через 24 часа рост культуры бактерий *B.petrii* был и анаэробно без изменения цвета.

На питательной среде, в которой источником углерода и азота служит L-аланин, через 48 часов при температуре 37°C рост наблюдался по всей длине укола без изменения цвета.

Была проверена способность микроорганизма к метаболизму L-глицина. После культивирования на среде с глицином в качестве единственного источника углерода и азота. По резуль-

тату культивирования бактерий *B. petrii* при температуре 37°C в течение 72 часов рост отсутствовал как в аэробных, так и в анаэробных условиях.

На среде с L-пролином после культивирования штамма *B. petrii* был рост через 16 часов при температуре 37°C по всей длине укола. Через 48 часов культивирования в верхней части среды произошло окисление субстрата, цвет среды сменился с зеленого на желтый.

Выводы

По полученным нами результатам установлено, что бактерии вида *Bordetella petrii* штамма von Wintzingerode ATCC BAA-461 способны метаболизировать ряд указанных выше органических и неорганических веществ как единственных источников углерода и азота в солевой основе питательных сред. Выявлено, что бактерии вида *B. petrii* при культивировании на среде с глюкозой в течение 48 часов при температуре 37°C метаболизируют глюкозу по окислительному типу в присутствии кислорода и не способны ферментировать глюкозу в отсутствие кислорода. Нами обнаружено, что *B. petrii* способны использовать нитрат калия в качестве источника азота, при этом бактерии продуцируют свободный азот, осуществляя полную денитрификацию. По уколу в среде наблюдали газообразование. Установлено, что бактерии *B. petrii* способны использовать цитрат натрия и сукцинат натрия как единственные источники углерода в питательной среде. Также установлено, что бактерии вида *B. petrii* способны использовать L-аргинин, L-цистин, L-пролин, L-аланин как единственный источник углерода и азота в питательной среде. Однако, использовать L-глицин как единственный источник питательных веществ бактерии *B. petrii* не способны и не показывают роста в процессе культивирования.

Полученные нами данные будут использованы в дальнейшем для конструирования среды накопления и селективной среды для выделения и идентификации бактерии вида *B. petrii*.

Библиографический список

1. *Bordetella petrii* sp. nov., isolated from an anaerobic bioreactor, and emended description of the genus *Bordetella* / von F. Wintzingerode [et al.] // International journal of systematic and evolutionary microbiology. – 2001. – Т. 51, № 4. – С. 1257-1265.
2. The missing link: *Bordetella petrii* is endowed with both the metabolic versatility of environmental bacteria and virulence traits of pathogenic *Bordetellae* / R. Gross [et al.] // BMC genomics. – 2008. – Т. 9, № 1. – С. 449.
3. *Bordetella petrii* recovered from chronic pansinusitis in an adult with cystic fibrosis / L. Biederman [et al.] // IDCases. – 2015. – Т. 2, № 4. – С. 97-98.
4. A molecular systematic survey of cultured microbial associates of deep-water marine invertebrates / K. Sfanos [et al.] // Systematic and Applied Microbiology. – 2005. – Т. 28, № 3. – С. 242-264.
5. Identification of diazotrophs in the culturable bacterial community associated with roots of *Lasiurus indicus*, a perennial grass of Thar Desert, India / S. P. Chowdhury [et al.] // Microbial ecology. – 2007. – Т. 54, № 1. – С. 82-90.
6. Hibi, M. Characteristics and biotechnology applications of aliphatic amino acid hydroxylases belonging to the Fe (II)/ α -ketoglutarate-dependent dioxygenase superfamily / M. Hibi, J. Ogawa // Applied microbiology and biotechnology. – 2014. – Т. 98, № 9. – С. 3869-3876.
7. Odukkathil, G. Residues of endosulfan in surface and subsurface agricultural soil and its bioremediation / G. Odukkathil, N. Vasudevan // Journal of environmental management. – 2016. – Т. 165. – С. 72-80.
8. Olive-pomace harbors bacteria with the potential for hydrocarbon-biodegradation, nitrogen fixation and mercury-resistance: promising material for waste-oil-bioremediation / N. Dashti [et al.] // Journal of environmental management. – 2015. – Т. 155. – С. 49-57.
9. Evaluation of microbial fuel cells for electricity generation from oil-contaminated wastewater / K. Hamamoto [et al.] // Journal of bioscience and bioengineering. – 2016. – Т. 122, № 5. – С. 589-593.
10. Hamidou, Soumana I. Environmental origin of the genus *Bordetella* / Soumana I. Hamidou, B. Linz, E. T. Harvill // Frontiers in microbiology. – 2017. – Т. 8. – С. 28.
11. Cho, S. J. Identification and characterization of 3, 6-anhydro-L-galactonate cycloisomerase belonging to the enolase superfamily / S. J. Cho, J. A. Kim, S. B. Lee // Biotechnology and bioengineering. – 2015. – Т. 20, № 3. – С. 462-472.
12. Comparative genomics of the classical *Bordetella* subspecies: the evolution and exchange of virulence-associated diversity amongst closely related pathogens / J. Park [et al.] // BMC genomics. – 2012. – Т. 13, № 1. – С. 545.
13. *Pusillimonas ginsengisoli* sp. nov., isolated from soil of a ginseng field / S. Srinivasan [et al.] // International journal of systematic and evolutionary microbiology. – 2010. – Т. 60, № 8. – С. 1783-1787.
14. Sung, Y. C. Identification and characterization of a cyanate permease in *Escherichia coli* K-12 / Y. C. Sung, J. A. Fuchs // Journal of bacteriology. – 1989.

– Т. 171, № 9. – С. 4674-4678.

15. Bartling, S. Synergism between *Erwinia pectate lyase* isoenzymes that depolymerize both pectate and pectin / S. Bartling, C. Wegener, O. Olsen // *Microbiology*. – 1995. – Т. 141, № 4. – С. 873-881.

16. Основы подбора компонентов питательных сред для первичного выделения *Bordetella bronchiseptica* / Ю. Б. Васильева, Д. А. Васильев, А. В. Мастиленко, Д. Г. Сверкалова, А. Г. Семанин // *Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии*. – 2014. – №. 1 (25). – С. 85 - 93

17. Создание транспортной и накопительной сред для *Bordetella bronchiseptica* / Д. Г. Сверкалова, А. В. Мастиленко, Д. Н. Хлынов, Ю. Б. Никольшина, Д. А. Васильев // *Актуальные вопросы аграрной науки и образования*. – 2008. – С. 134-136.

18. Подбор селективных компонентов к питательной среде для выделения *B. Bronchiseptica* / Ю. Б. Васильева, А. В. Мастиленко, Д. Г. Сверкалова, Д. А. Васильев, С. Н. Золотухин // *Актуальные вопросы ветеринарной науки*. – 2015. – С. 12-15.

RESEARCH OF BORDETELLA PETRII METABOLISM IN CASE OF GROWTH ON VARIOUS SOURCES OF CARBON AND NITROGEN

Mastilenko A.V., Lomakin A.A., Shestakov A.G.
FSBEI HE Ulyanovsk State Agrarian University
432017, Ulyanovsk, Novyi Venets Boulevard, 1: tel.: 89603621517
e-mail: artemy.lomakin@yandex.ru

Key words: Bordetella, B. petrii, biochemical properties, carbohydrates, amino acids.

The article presents results of studies on the ability of *Bordetella petrii* bacterium of von Wintzingerode ATCC BAA-461 strain to metabolize organic and inorganic substances as the only sources of carbon and nitrogen in a salt-based nutrient medium. According to the research results, it was found that *B. petrii* bacteria oxidize glucose, but do not ferment, when cultured for 48 hours at a temperature of 37^o C. Also, bacteria of this type are able to use potassium nitrate as a source of nitrogen. It was found that bacteria produce free nitrogen. In case of growth in a medium with nitrate source, gas formation was observed. Bacteria of *B. petrii* genus use sodium citrate and sodium succinate as the only carbon sources in the nutrient medium. It was found that *B. petrii* bacteria are able to use L-arginine, L-cystine, L-proline, L-alanine as the only source of carbon and nitrogen in the nutrient medium. But they are not able to use L-glycine as a source of nutrients. The data obtained by us will be used later in construction of accumulation medium and selective medium for isolation and identification of *B. petrii* bacteria.

Bibliography

1. *Bordetella petrii* sp. nov., isolated from an anaerobic bioreactor, and emended description of the genus *Bordetella* / von F. Wintzingerode [et al.] // *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. – 2001. – V. 51, № 4. – P. 1257-1265.
2. The missing link: *Bordetella petrii* is endowed with both the metabolic versatility of environmental bacteria and virulence traits of pathogenic *Bordetellae* / R. Gross [et al.] // *BMC genomics*. – 2008. – V. 9, № 1. – P. 449.
3. *Bordetella petrii* recovered from chronic pansinusitis in an adult with cystic fibrosis / L. Biederman [et al.] // *IDCases*. – 2015. – V. 2, № 4. – P. 97-98.
4. A molecular systematic survey of cultured microbial associates of deep-water marine invertebrates / K. Sfanos [et al.] // *Systematic and Applied Microbiology*. – 2005. – V. 28, № 3. – P. 242-264.
5. Identification of diazotrophs in the culturable bacterial community associated with roots of *Lasiurus indicus*, a perennial grass of Thar Desert, India / S. P. Chowdhury [et al.] // *Microbial ecology*. – 2007. – V. 54, № 1. – P. 82-90.
6. Hibi, M. Characteristics and biotechnology applications of aliphatic amino acid hydroxylases belonging to the Fe (II)/ α -ketoglutarate-dependent dioxygenase superfamily / M. Hibi, J. Ogawa // *Applied microbiology and biotechnology*. – 2014. – V. 98, № 9. – P. 3869-3876.
7. Odukkathil, G. Residues of endosulfan in surface and subsurface agricultural soil and its bioremediation / G. Odukkathil, N. Vasudevan // *Journal of environmental management*. – 2016. – V. 165. – P. 72-80.
8. Olive-pomace harbors bacteria with the potential for hydrocarbon-biodegradation, nitrogen fixation and mercury-resistance: promising material for waste-oil-bioremediation / N. Dashti [et al.] // *Journal of environmental management*. – 2015. – V. 155. – P. 49-57.
9. Evaluation of microbial fuel cells for electricity generation from oil-contaminated wastewater / K. Hamamoto [et al.] // *Journal of bioscience and bioengineering*. – 2016. – V. 122, № 5. – P. 589-593.
10. Hamidou, Soumana I. Environmental origin of the genus *Bordetella* / Soumana I. Hamidou, B. Linz, E. T. Harvill // *Frontiers in microbiology*. – 2017. – V. 8. – P. 28.
11. Cho, S. J. Identification and characterization of 3, 6-anhydro-L-galactonate cycloisomerase belonging to the enolase superfamily / S. J. Cho, J. A. Kim, S. B. Lee // *Biotechnology and bioengineering*. – 2015. – V. 20, № 3. – P. 462-472.
12. Comparative genomics of the classical *Bordetella* subspecies: the evolution and exchange of virulence-associated diversity amongst closely related pathogens / J. Park [et al.] // *BMC genomics*. – 2012. – V. 13, № 1. – P. 545.
13. *Pusillimonas ginsengisoli* sp. nov., isolated from soil of a ginseng field / S. Srinivasan [et al.] // *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. – 2010. – V. 60, № 8. – P. 1783-1787.
14. Sung, Y. C. Identification and characterization of a cyanate permease in *Escherichia coli* K-12 / Y. C. Sung, J. A. Fuchs // *Journal of bacteriology*. – 1989. – V. 171, № 9. – P. 4674-4678.
15. Bartling, S. Synergism between *Erwinia pectate lyase* isoenzymes that depolymerize both pectate and pectin / S. Bartling, C. Wegener, O. Olsen // *Microbiology*. – 1995. – V. 141, № 4. – P. 873-881.
16. The basics of selection of nutrient medium components for primary isolation of *Bordetella bronchiseptica* / Yu. B. Vasilieva, D. A. Vasiliev, A. V. Mastilenko, D. G. Sverkalova, A. G. Semanin // *Vestnik of Ulyanovsk State Agricultural Academy*. – 2014. – No. 1 (25). – P. 85 - 93
17. Development of transport and storage media for *Bordetella bronchiseptica* / D. G. Sverkalova, A. V. Mastilenko, D. N. Khlynov, Yu. B. Nikulshina, D. A. Vasiliev // *Current problems of agricultural science and education*. – 2008. – P. 134-136.
18. Selection of selective components for a nutrient medium for isolation of *B. Bronchiseptica* / Yu. B. Vasilieva, A. V. Mastilenko, D. G. Sverkalova, D. A. Vasiliev, S. N. Zolotukhin // *Current problems of veterinary science*. – 2015. – P. 12-15.