

УДК 619:616-07

РАЗРАБОТКА БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОГО МЕТОДА ИДЕНТИФИКАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ *A. HYDROPHILA*

Д.А. Васильев, доктор биологических наук, профессор
8(8422) 55-95-47, *dav_ul@mail.ru*

С.В. Мерчина, кандидат биологических наук, доцент
8(8422) 55-95-47, *dav_ul@mail.ru*

Н.И. Молофеева, кандидат биологических наук, доцент
8(8422) 55-95-47, *tolo-na@mail.ru*

Т.И. Канаева, кандидат биологических наук, старший преподаватель

8(8422) 55-95-47, *tanya-kanaeva@yandex.ru*

Н.Г. Барт, кандидат биологических наук, старший преподаватель
тел. 8(8422) 55-95-47, *bart1967@mail.ru*

ФГБОУ ВО Ульяновская ГСХА

Ключевые слова: *A. hydrophila* 7966 ATCC, питательный агар для культивирования микроорганизмов сухой (ГРМ-агар) (ФБУН «ГНЦПМиБ», г.Оболенск), триптико-соевый агар «Difco», селективные среды, ассоцианта *A. hydrophila*

Разработан бактериологический метод идентификации ***A. hydrophila***, обладающего высокой специфичностью.

Введение. Длительное время аэромонады относили к семейству *Vibrionaceae*, в которое также входят вибрионы, фотобактерии, плесени-омонады. С помощью метода молекулярной гибридизации было показано, что *Aeromonas* даже с энтеробактериями имеют значительно больше сходства, чем с вибрионами. Поэтому выделили аэромонады в самостоятельное семейство *Aeromonadaceae*. Типовой род семейства - *Aeromonas*, который включает виды: *hydrophila*, *sevia*, *salmonicida*, *sobria*, *media* и др. Род *Aeromonas* разделяется на две основные группы: подвижные аэромонады (*A. hydrophila*, *A. sobria*, *A. cavia*) и неподвижные (*A. salmonicida*). Инфекцию у человека вызывают подвижные аэромонады, наибольшее значение среди которых имеют *A. hydrophila*. Это обосновано тем, что подвижные бактерии приспособлены к поиску компонентов, необходимых для конструктивных и энергетических целей, и как следствие, обладают патогенными свойствами. [1].

Бактерии различных видов рода *Aeromonas* недостаточно изучены. Обладают схожими свойствами по культуральным, морфологическим, биохимическим и другим показателям, они затрудняют видовую дифференциацию, а от полученных результатов зависит санитарная оценка пищевого продукта контаминированного изучаемым микроорганизмом [2].

В первую очередь, для идентификации, целесообразно применять следующие тесты, дифференцирующие бактерии *A. hydrophila*: морфология с окраской по Граму, OF-тест, т. е. тип расщепления глюкозы – окисление (O) или ферментация (F), определение ферментов в тестах на цитохромоксидазу и нитратредуктазу (редукция нитратов в нитриты).

Имеются данные о том, что аэромонады, обладая психрофильными свойствами, способны сохраняться в контаминированных ими продуктах, таких как говядина, ростбиф, свинина и др., находящихся в бытовых холодильниках при 2 - 10°C. Более того, температура +5 °C благоприятствует их размножению и продуцированию вирулентных факторов. Порча продуктов питания обусловлена наличием у микроорганизмов рода *Aeromonas* экзоэнзимов. ин. В винной продукции в первые 5 минут инактивируется до 50 % бактерий, и через 24 ч в данном субстрате сохраняется до 33% аэромонад [3].

Цель наших исследований – разработка бактериологического метода выделения и идентификации микроорганизмов *A. hydrophila*

Задачи:

- изучение биологических свойств референс-штамма *A. hydrophila* 7966 ATCC;

- на основе полученных показателей конструирование оптимальной среды накопления и селекции;

- разработка оптимальных параметров культивирования микроорганизмов данного вида для бактериологической идентификации.

Объекты и методы исследований. Референс-штамм *A. hydrophila* 7966 ATCC, полевые штаммы *A. hydrophila*.

Единственным нормативным документом в России по методам идентификации аэромонад в различных видах исследуемого материала являются Методические рекомендации «Методы исследований объектов окружающей среды и патологического материала на аэромонады», разработанные в Московском научно-исследовательском институте гигиены им. Ф.Ф. Эрисмана в 1980 году.

В настоящей статье приведены и разработаны параметры идентификации *A. hydrophila*, опирающиеся на предлагаемые нами накопительные и селективные среды.

Результаты исследований. Изучение морфологических и тинкториальных свойств бактерий вида *A. hydrophila*.

Выяснение морфологии клеток и отношения к окраске по Грамму следует считать первоочередным при проведении идентификации. При этом исследования могут быть выявлены характерные морфологические особенности (например, кокковая форма и др.), которые сразу же без других тестов дадут представление о микроорганизме. Все выделенные штаммы бактерий *A. hydrophila* по Грамму окрашивались отрицательно и имели вид коротких палочек с закругленными концами. Для выявления капсулообразования применяли окраску свежих культур по методу Ольта, при которой капсула окрашивалась в желто-оранжевый цвет, а вегетативная клетка в красно-коричневый. Для электронной микроскопии препараты наносили из бульонной культуры на сеточки с углеродной подложкой. Фиксировали 2% O_5O_4 в течение 1,5-2 мин. Остаток культуры смывали какодилатным буфером (pH – 7,2). Окрашивали объект 2% фосфорно-вольфрамовой кислотой в течение 2 мин. Просматривали в электронном микроскопе JEM – 7A (Япония). Благодаря данным световой и электронной микроскопии установили, что выделенные бактерии *A. hydrophila* прямые палочки с закругленными концами, располагаются поодиночке, парами, цепочками, подвижные, имеют тонкие нитевидные образования – жгутики (монотрихи). Данные бактерии имеют капсулу, микрокапсулу (утолщение верхних слоев клеточной стенки), что характерно для вирулентных штаммов, кроме жгутиков в некоторых штаммах просматриваются пили. Важнейшим биологическим свойством бактерий *A. hydrophila* являются температурные показатели. В опыте были использованы референс-штамм бактерии *A. hydrophila* 7966 ATCC и 10 штаммов выделенных нами из различных объектов окружающей среды, патологического материала и пищевых продуктов. Рост бактерий проверяли на жидкой среде (МПБ) и плотной среде (триптико-соевый агар, TSA, Difco), при -4, +5, +30, +41, +45°C., в течение от 1 до 4 суток. Наблюдали следующие результаты: рост бактерий *A. hydrophila* 7966 ATCC при - 4°C не обнаруживался, но при высевании из пробирок с замороженными бульонными культурами на агар и инкубации чашек в термостате при оптимальной температуре (30°C), отмечался характерный рост бактерий *A. hydrophila* 7966 ATCC. При температуре +5°C в пробирках было помутнение спустя 48 часов, в то время как на чашках, выросли мелкие колонии уже через 24 часа. Температура +30°C является оптимальной для роста бактерий *A. hydrophila* 7966, спустя

24 часа в пробирках имелось характерное помутнение, а на чашках с TSA рост округлых, с ровными краями, светло-бежевых колоний, до 3 мм в диаметре. Температура +41 °С считается уже не приемлемой для роста аэромонад, однако, референс-штамм также имел характерный рост на данных средах, спустя 24 часа. А вот при температуре +45 °С роста не наблюдалось. Все 10 выделенных нами штаммов росли при данных температурных показателях, как в пробирках с бульоном, так и на чашках с агаром. Эти данные необходимо учитывать при дифференциальной диагностике бактерий *A. hydrophila*. [3]

Бактериологическая идентификация бактерий *A. hydrophila*.

Аэромонады хорошо растут на мясо-пептонном бульоне (МПБ) при 37С. По прошествии 24 ч мы наблюдали равномерное помутнение бульона с образованием серовато-серебристой поверхностной пленки и хлопьевидного белого осадка. На мясо-пептонном агаре (МПА) данные бактерии образуют выпуклые, округлые, блестящие, полупрозрачные с беловато-желтым оттенком колонии. Однако при исследовании материала содержащего обильную смешанную микрофлору идентификация *A. hydrophila* на этих средах затруднена.

По результатам проведенных исследований мы предлагаем среду для накопления *A. hydrophila* следующего состава: вода дистиллированная – 1000 мл, дрожжевой экстракт – 4,0 г, мальтоза – 3,5 г, $MgSO_4$ – 5,0 г, K_2HPO_4 – 2,0 г, желатин – 50,0 г, конго-рот – 3,0 г, кристаллический фиолетовый – 0,1 г. Способ приготовления. Дрожжевой экстракт вносили в холодную воду 1000 мл, после чего ее нагревали. Затем последовательно добавили калий фосфорнокислый двузамещенный и магния сульфат, мальтозу, Конго-рот (в виде 0,3% водного раствора) и кристаллический фиолетовый (в виде 0,01% водного раствора). Кипятили 2-3 минуты, при постоянном помешивании. В бульон внести желатин и оставить для набухания на 1 час, затем подогреть в водяной бане при 40 – 50 °С до полного расплавления желатина. После этого горячую среду фильтровали через ватно-марлевый фильтр и разлили в стерильные пробирки по 5 мл. Стерилизовать при 110 °С 30 минут. [5]

Питательной основой этой среды является дрожжевой экстракт и мальтоза (по 4,0 г и 3,5 г соответственно). Минеральной базой для *A. hydrophila* является набор солей фосфата калия двузамещенного (2,0г) и семиводного сульфата магния (5,0г). Соли калия, магния и фосфора стимулируют синтез микробной клетки *A. hydrophila*, а для образования бактериальных белков необходимы анионы, содержащие серу. Для уплотнения среды, а также во избежание выпадения

элективного агента в осадок и равномерного распространения его во всей среде добавляется желатин (5%), кроме того желатин является растворимым белком. Бактерии *A. hydrophila* обладают протеолитической активностью и способны разжижать желатин, что можно использовать как показателем дифференциации. Красители выступают в качестве элективного агента.

После процедуры накопления и обогащения пересевали бактерии с жидких сред на плотные питательные среды, для изучения морфологических, культуральных, биохимических свойств, по совокупности которых определяется видовая принадлежность исследуемого микроорганизма.

В рамках наших исследований мы изучали специфичность действия трёх селективных сред, А2, ТВА с ампициллином, среда Шмита-Шантелье. Специфичность определяли по спектру подавления роста ассоциантов (*Ps. aeruginosa*, *Ps. putida*; *P. mirabilis*; *Citrobacter*; *E. coli*; *M. morgani*; *P. vulgaris*; *Kl. pneumoinae*; *Enterobacter*; *P. multocida*; *Pr. rettgeri*; *Y. enterocolitica*). Посев производили из суточных культур бактерий, культивировали при 37°C в течение 24 часов. Контроль производили на МПА. Результаты приведены в таблице 1.

Испытанные среды обладают специфичностью, но имеется возможность роста ассоциантов. Отсутствие надежных ингибиторов в среде А2 позволяет выживать и расти на ней большинству бактерий из сопутствующей микрофлоры (*Ps. aeruginosa*, *Ps. putida*; *Citrobacter*; *E. coli*; *Kl. pneumoinae*; *Enterobacter*; *Pr. rettgeri*; *Y. enterocolitica*). ТВА, хотя и содержит элективный агент, все же не обладает высокой специфичностью. Кроме того, ТВА с ампициллином пропускает антибиотикочувствительные и негемолитические штаммы. Отсюда следует, что селективные свойства испытанных сред недостаточны.

В лаборатории кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ Ульяновской ГСХА им. П.А.Столыпина была разработана плотная селективная среда для бактериологической идентификации *A. hydrophila*. В универсальном варианте селективная среда должна удовлетворять следующим требованиям: обеспечивать рост максимального количества штаммов конкретного вида микроорганизма, даже при наличии единичных клеток в пробе; полностью подавлять рост любых видов сопутствующей микрофлоры; не изменять видовые свойства исследуемого микроорганизма; быть простой в изготовлении и не содержать дефицитных или дорогостоящих компонентов. Состав плотной селективной среды (прототипом которой послужила выше

Таблица 1 - Специфичность существующих селективных сред для *A. hydrophila*

№№	Вид бактерий, используемых в опыте	Среда А2	ТВА с ампициллином	Среда Шмита-Шантелье	Контроль МПА
	<i>A. hydrophila</i> 7966 ATCC	+	+	+	+
	<i>Ps. aeruginosa</i>	+	-	+	+
	<i>Ps. putida</i>	+	-	+	+
	<i>P. mirabilis</i>	-	-	-	+
	<i>Citrobacter</i>	+	-	-	+
	<i>E. coli</i>	+	-	+	+
	<i>M.morganii</i>	-	-	-	+
	<i>P. vulgaris</i>	-	-	-	+
	<i>Kl.pneumoinae</i>	+	+	-	+
10	<i>Enterobacter</i>	+	+	-	+
11	<i>Pasteurella multocida</i>	-	-	-	+
12	<i>Pr. rettgeri</i>	+	-	-	+
13	<i>Y.enterocolitica</i>	+	-	-	+

приведенная среда накопления), следующий: вода дистиллированная – 1000 мл, агар-агар – 15 г, дрожжевой экстракт – 4,0 г, мальтоза – 3,5 г, K_2HPO_4 – 2,0 г, $MgSO_4$ – 5,0 г, желатин – 50,0 г, конго-рот – 3,0 г, кристаллический фиолетовый – 0,1 г. Цвет среды красно-коричневый.

Определение специфичности действия селективной среды является важнейшим из критериев для подобного рода сред [6]. Была проведена серия экспериментов по определению специфичности. Специфичность определялась следующим образом. Брали суточные культуры *A. hydrophila*; *P. aeruginosa*, *Ps. putida*; *P. mirabilis*; *Citrobacter*; *E. coli*; *M.morganii*; *P.vulgaris*; *K. pneumoinae*; *Enterobacter*; *Pas. multocida*; *Pr. rettgeri*; *Yer.enterocolitica*. Производили посев вышеуказанных бактерий на предлагаемую селективную среду. Культивировали посеvy при 37 °С 24 часа [7]. Полученные результаты демонстрируют, что на вторые сутки на изучаемой селективной среде бактерии *A. Hydrophila* дают характерный рост: округлые, выпуклые, блестящие до 3 мм в диаметре, светло-бежевые, без изменения цвета среды под ними, изучаемые штаммы асоциантов через 24 часа не дают роста.

Выводы. Результаты исследований свидетельствуют, что с использованием на предложенных накопительной и селективной сред, бактерии *A. hydrophila* растут. Возможные ассоцианты на изученной среде не растут или имеют отличительный рост колоний. Таким образом, предлагаемая нами плотная селективная среда обладает необходимой искомой специфичностью, что необходимо для проведения бактериологической идентификации *A. hydrophila*.

Библиографический список

1. Garcia, F. Challenge of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) fed diets supplemented with vitamins C and E by *Aeromonas hydrophila* under different temperature / F. Garcia, F.R. Moraes, M.L. Martins // Arq.brasil. Med.veter.Zootecn. – 2009. – Т. 61. – V. 2. – P. 378-385.
2. Васильев, Д.А. Детекция *Aeromonas hydrophila* в пищевой продукции из гидробионтов с применением биосенсоровна основе гомологичных бактериофагов / Д.А. Васильев, Д.А. Викторов, И.Р. Насибуллин [и др.] //Фундаментальные исследования. – 2014. – № 5-1. – с.50-54.
3. Gibbs, A. Evaluation of the inhibition of culturable *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, or *Aeromonas hydrophilia* by an existing drinking water biofilm / A. Gibbs, G. Shawn, C. Mark // Journal of Environmental Engineering and Science. – 2008. – V. 7, N 6. – P. 559-568.
4. In vitro activity of micafungin combined with itraconazole against *Candida* spp. / M. Marcal [et al.] // International journal of antimicrobial agents. – 2007. – V. 30, N 5. – P. 463-465.
5. Канаева, Т.И. Разработка методов выделения и идентификации бактерий *Aeromonas hydrophila*/ автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук/ Саратовский Н.И. ГАУ им. Н.И. Вавилова. – Саратов, 2009. – с.5-7.
6. Khushiramani, R. Evaluation of a digoxigenin-labelled probe for detection of *Aeromonas* spp. / R. Khushiramani, S.K. Girisha, I. Karunasagar // Letters in Applied Microbiology. – 2009. – V. 48, N 3. – P. 383-385.
7. Orozova, P. Identification and pathogenicity to rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), of some aeromonads / P. Orozova, M. Barker, D.A. Austin // Journal of Fish Diseases. – 2009. – V. 32, N 10. – P. 865-871.

DEVELOPMENT OF A BACTERIOLOGICAL METHOD OF IDENTIFICATION OF MICROORGANISMS OF *A. HYDROPHILA*

Vasilyev D. A., Merchina S. V., Molofeeva N. I., Kanayeva T. I., Bart N. G.

Keywords: *A. hydrophila* 7966 ATCC, a nutritious agar for cultivation of microorganisms dry (GRM-agar) (FBUN "GNTSPMIB", Obolensk), a triptiko-soy agar of "Difco", selective environments, an assotsiant of *A. hydrophila*

The bacteriological method of identification of *A. hydrophila* possessing high specificity is developed.