

УДК 619:616-07

## ВЫДЕЛЕНИЕ И ТИПИРОВАНИЕ *FLAVOBACTERIUM PSYCHROPHILUM* ИЗ ОБЪЕКТОВ АКВАКУЛЬТУРЫ

Д.Г. Сверкалова, кандидат биологических наук, старший преподаватель, тел. 8(8422)55-5-47, da2307@ya.ru

А. Г. Семанин, аспирант, тел. 8(8422)55-5-47, anton\_sem\_777@mail.ru

А.И. Калдыркаев, кандидат биологических наук, старший преподаватель, тел. 8(8422)55-5-47

А.Г. Шестаков, кандидат биологических наук, старший преподаватель, тел. 8(8422)55-5-47

С.Н. Золотухин, доктор биологических наук, профессор тел. 8(8422)55-5-47, fvm.zol@yandex.ru

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

ФГБОУ ВО Ульяновская ГСХА

**Ключевые слова:** *Flavobacterium psychrophilum*, холодноводная болезнь рыб, схема выделения

Работа посвящена разработке бактериалогической схемы выделения и типирования *Flavobacterium psychrophilum* из объектов аквакультуры

**Введение.** *Flavobacterium psychrophilum* – возбудитель инфекций рыб, семейства лососевых, известных как «бактериальная холодная болезнь». Поражение рыб *F. psychrophilum* приводит к значительным экономическим потерям в аквакультуре во всем мире [1]. Болезнь «холодной воды» может вызвать потери до 50% популяции рыб (Rucker и др. 1953).

В связи с развитием в России рыбоводческих хозяйств, занимающихся разведением пресноводной рыбы семейства лососевых, создаются условия для возникновения и распространения бактериальной холодной болезни. Данный возбудитель еще не достаточно изучен в нашей стране. Отсутствуют бактериалогические схемы выделения и идентификации *Flavobacterium psychrophilum*, не разработаны селективно-диагностические среды, среды накопления.

Целью работы стало разработать упрощенную схему выделения и первичной идентификации *F. psychrophilum*, основываясь на данных литературных источников и свойствах штаммов кафедры Микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы ФГБОУ ВО Ульяновская ГСХА

**Материалы и методы.** Штаммы *F.psychrophilum* 512, *F. psychrophilum* 537, *F. psychrophilum* 571, *F. psychrophilum* 570, мясо-пептонный агар и бульон, конго-красный, набор окраски по Граму, 2% - раствор перекиси водорода; 10% - раствор КОН; трехсахарный агар (среда № 13); Среды Гисса, среда с желатином, 0.7% мясопептонный агар, среда Хью-Левсона, скошенный мясопептонный агар, реактив Ковача, бульон с триптофаном, диметилпаранитрофенолдиамин дигидрохлорид

**Результаты исследований и их обсуждение.** Предлагаем упрощенную схему выделения и идентификации *F. psychrophilum*.

Первый этап. Посев материала в мясопептонный бульон. Инкубация при 15-20 °С в течении 4-5 суток.

Второй этап. Пересев с мясопептонного бульона на мясопептонный агар. Инкубация при 15-20 °С в течении 4-5 суток с ежедневным просмотром. Рост колоний *F.psychrophilum* на мясопептонном агаре задерживается, может появиться только на 4-5-е сутки. Отбор характерных колоний, а именно: колонии *F.psychrophilum* могут быть двух типов – гладкие, гидрофобные, клейкие и грубые гидрофильные с приподнятым центром и тонким неровным ореолом роста вокруг (Högfors-Rönholm и Wiklund 2010). Кроме того, *F.psychrophilum* образует желтый пигмент, но встречаются и безпигментные штаммы.

При обнаружение характерных колоний – постановка начальных тестов идентификации: тест на каталазную активность, при наличие пигмента – тест с 10% КОН, тест на оксидазу. Приготовление мазков и окраска по Граму.

Выделение чистой культуры - посев в мясопептонный бульон материала с характерной отдельно стоящей колонии, которая прошла первичные тесты идентификации. Если размер колоний позволяет, а в мазке – однородная культура, то можно провести отсев материала с колонии для определения биохимических свойств, это значительно сократит время исследования, учитывая, что растет культура долго (4-5-ть суток). Но есть опасность инфицирования материала и как следствие получение неточных результатов. Для идентификации выбраны тесты на отношение к кислороду и подвижность (посев уколом в столбик 0,7% агара), посев в конденсационную воду скошенного мясопептонного бульона для определения скользящей подвижности, определение наличия фермента желатиназы (посев уколом в столбик желатиновой среды), определение продукции сероводорода (посев в столбик среды № 13) и ферментации сахаров (посев на малый ряд Гиса за вычетом сахаров, которые присутствуют в среде №13), тест на возможность роста на

среде с Конго-красным. Посев в мясопептонный бульон с триптофаном для дальнейшего определения индола. Посев на плотную среду с мочевиной (проба Закса), для определения фермента нитритредуктазы.

Третий этап. Постановка теста на индол. Учет и интерпретация результатов. Время идентификации 8-10 суток, если посев на биохимические тесты проводится непосредственно с колонии. Если же процесс выделения чистой культуры идет через рост на мясопептонном бульоне, то время идентификации увеличивается еще на 4-5 суток.

*F. psychrophilum* – грамотрицательные тонкие палочки прямые или с изогнутыми концами, размером приблизительно 0,4-0,5×1,0-5,0 мкм. Некоторые клетки могут быть длиннее других – 8-12 мкм. *F. psychrophilum* каталазоположительная, оксидазоположительна [2]. Образует желтый флексирубиновый пигмент. Строгий аэроб. Неподвижна или обладает медленной скользящей подвижностью [2]. Не ферментирует сахара, сероводород, индол, уреазу не продуцирует, тест ОФ – отрицательный (цвет среды Хью-Лефсона под вазелиновым маслом не изменяет), разжижает желатин. Рост на среде с Конго-красным отсутствует на четвертый день инкубации при 15°C, в отличие от другого вида *Flavobacterium* (*Crumpa* и *Kay* 2008).

Отрицательное окрашивание по Граму *F. psychrophilum* отличает данный вид бактерий от *Coryneforms*, отсутствие скользящего роста дифференцировать *F. psychrophilum* от родов *Cytophaga* и *Flexibacter*. Отсутствие функциональных жгутиков позволяет отличить *F. psychrophilum* от родов *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Alteromonas*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, вида *Bordetella bronchiseptica*. Отрицательный тест на среде Хью-Лефсона отличает *F. psychrophilum* от семейств *Enterobacteriaceae*, *Pasteurellaceae*, *Vibrionaceae*. Продукция фермента каталазы отличает *F. psychrophilum* от рода *Kingella*.

Мижвидовая дифференциация осуществляется за счет тестов на ферментацию сахаров, теста на индол, отсутствие фермента уреазы. *F. psychrophilum* не ферментирует глюкозу, в отличие от видов *F. aguatile*, *F. bolustinum*, *F. meningosepticum*, *F. multivorum*, *F. spiritivorum*, также отсутствие ферментации лактозы от видов *F. aguatile*, *F. meningosepticum*, *F. multivorum*, *F. spiritivorum*, отсутствие продукции индола от видов *F. breve*, *F. bolustinum*, отсутствие фермента уреазы – от *F. oboratum*.

Мясопептонный бульон вполне можно использовать как среду накопления, а мясопептонный агар как плотную среду для получения изолированных колоний, так как они имеют все основные вещества, необходимые для жизнедеятельности *F. psychrophilum*.

Исходя из сообщений зарубежных авторов, изучающих *F. psychrophilum*, можно рекомендовать для получения ускоренного роста бактерий данного

вида добавлять в среду первичного выделения галактозу, глюкозу, рамнозу и обезжиренное молоко. Указанные компоненты были добавлены Daskalov и др (1999) в цитофага-агар и бульон, в результате чего получили ускоренный и обильный рост *F.psychrophilum*. Для тех же целей можно использовать дрожжевой экстракт совместно с глюкозой и солью – Cepeda и др (2004). Облегчить выделение *F.psychrophilum* из внешней среды можно внесением в среду 5 мг/л антибиотика группы аминогликозидов – тобрамицина, который был предложен для этих целей Kumagai и др (2004)

Хорошие результаты по сообщениям Alvarez и Guijarro (2007) показали использование для восстановления жизнеспособных клеток *F.psychrophilum* питательного агара с активированным углем. *F.psychrophilum* чувствительна к содержанию хлорида натрия, бактериостатическим действием на данный вид бактерий обладает концентрация указанной соли свыше 0,8 % [2].

**Выводы.** Для выделения *F.psychrophilum* из объектов аквакультуры можно использовать готовые среды отечественного производства, в состав которых входят перечисленные выше компоненты, но содержание хлорида натрия в них не должно превышать 0,8 %.

Предложенная схема выделения позволяет дифференцировать *F.psychrophilum* за 288 - 360 часов. Время идентификации составляет 192-240 часов, если посев на биохимические тесты проводится непосредственно с колонии.

#### Библиографический список

1. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Second Edition Vol. 4 Springer New York Dordrecht Heidelberg London, 2010
2. Brian Austin, Dawn A. Austin Bacterial Fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish. Springer Dordrecht Heidelberg New York London 2012

## ISOLATION AND TYPING OF FLAVOBACTERIUM PSYCHROPHILUM FROM AQUACULTURE

Sverkalova D.G., Semanin A.G., Kaldy`rkaev A.I., Shestakov A.G.,  
Zolotukhin S.N., Vasiliev D.A

**Key words:** *Flavobacterium psychrophilum*, cold-water disease in fish, the scheme of allocation.

The paper deals with the development bakteriologicheskaya scheme of isolation and typing of *Flavobacterium psychrophilum* from aquaculture.