

## КОНСТРУИРОВАНИЕ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНО-ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ СРЕДЫ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ И ПЕРВИЧНОЙ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ БАКТЕРИЙ РОДА *FLAVOBACTERIUM*

**Семанин Антон Геннадьевич**, аспирант кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

**Васильев Дмитрий Аркадьевич**, доктор биологических наук, профессор кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

**Золотухин Сергей Николаевич**, доктор биологических наук, профессор кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ

432017, г. Ульяновск, бульвар Новый Венец, 1; тел.: 6 8(8422)55-95-47;

e-mail: anton-vet@mail.ru

**Ключевые слова:** индикатор, референс-штамм, дрожжевой экстракт, сафранин, среда.

В статье представлены результаты исследований, связанные с подбором оптимального состава питательной среды для выделения и идентификации бактерий рода *Flavobacterium*. В ходе проведенных исследований были выявлены отличительные особенности роста на разрабатываемой среде у штаммов бактерий вида: *Flavobacterium aquatile*, *Flavobacterium pectinovorum*, *Flavobacterium johnsoniae*, а также бактерий ассоциантов. Подобраны все составляющие питательной среды, а также определены оптимальные условия культивирования на данной среде изучаемых видов флавобактерий.

### Введение

В условиях активного развития аквакультуры, и в частности осетроводства, широкое распространение приобрели бактериальные заболевания осетровых рыб, вызываемые оксидазоположительными аэромонадами, псевдомонадами, а также флавобактериями [1]. Бактериальные болезни, вызванные бактериями рода *Flavobacterium*, встречаются во всем мире [2] преимущественно у лососевых при искусственном выращивании. Способность бактерий приобретать устойчивость к антибиотикам приводит к быстрому развитию резистентности к лечебным препаратам, а также к рецидивирующим инфекциям [3]. Для того чтобы понять факторы и механизм патогенеза флавобактериозов, необходимо более детальное изучение бактерий данного рода [4].

Сложность бактериологической идентификации бактерий рода *Flavobacterium* состоит в том, что в научной практике нет селективной питательной среды, которая наилучшим образом позволила бы провести первичную дифференциацию данного микроорганизма от бактерий-ассоциантов. В практике сегодня используются среды: Enriched Anacker and Ordal medium, Hsu-Shotts, МПА, Van Niel's Yeast Agar, ВКПМ № 70. Основным недостатком перечисленных сред является наличие сходного культурального роста у бактерий рода *Flavobacterium* и *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas hydrophila* и отсутствие

компонентов в составе сред, подавляющих рост бактерий-ассоциантов.

Цель и задачи исследований

Цель работы – конструирование дифференциально-диагностической среды выделения и идентификации бактерий рода *Flavobacterium*.

Для выполнения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- выбрать питательную основу для конструируемой среды;
- провести исследования по изучению устойчивости изучаемых бактерий к различным красителям-ингибиторам;
- используя свои исследования по изучению биохимических свойств, провести работу по введению в подобранный состав питательной среды дополнительных составляющих компонентов, которые позволили бы дифференцировать флавобактерии от бактерий - ассоциантов;
- подобрать оптимальные условия режимов культивирования бактерий рода *Flavobacterium* на данной среде.

Объекты и методы исследований

В качестве объектов исследований были использованы референс-штаммы бактерий рода *Flavobacterium* из музейной коллекции кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ Ульяновской ГСХА: *Flavobacterium pectinovorum* VKMB-1171, *Favobacterium aquatile* VKPMB-8534, *Flavobacterium johnsoniae* VKMB-

Таблица 1

Составы питательных сред для культивирования флавобактерий, рекомендованные различными литературными источниками

Компонент среды	Среда				
	Enriched Anacker and Ordal medium	МПА	ВКПМ №70	Hsu-Shotts	Van Niel's Yeast Agar
триптон, г	5,0	-	-	2,0	-
пептон, г	-	1,0	15,0		-
Желатин, г	-	-	-	3,0	-
дрожжевой экстракт, г	0,5	-	5,0	0,5	10,0
Na-acetate, г	0,2	-	-	-	-
агар-агар, г	10,0	10,0	15,0	10,0	15,0
NaCl, г	-	5,0	5,0	-	-
CaCl <sub>2</sub> (2H <sub>2</sub> O)	-	-	-	0,3	-
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	-	-	-	-	1,0
MgSO <sub>4</sub>	-	-	-	-	0,5
дистиллированная вода	1000ml	1000ml	1000ml	1000ml	1000ml

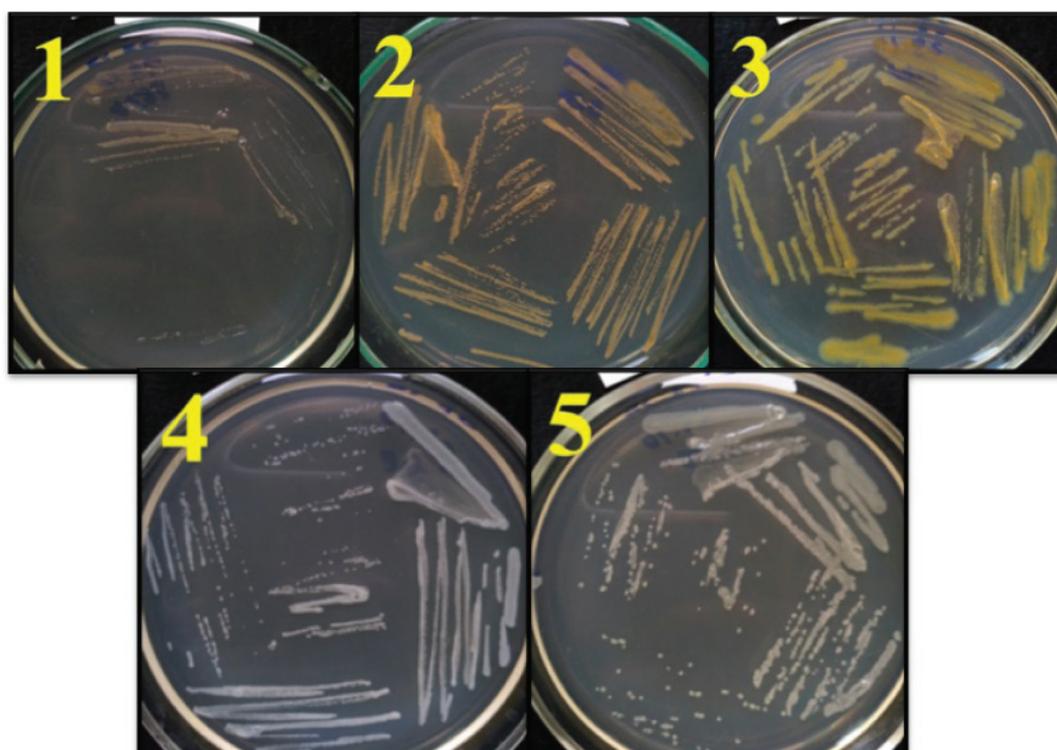


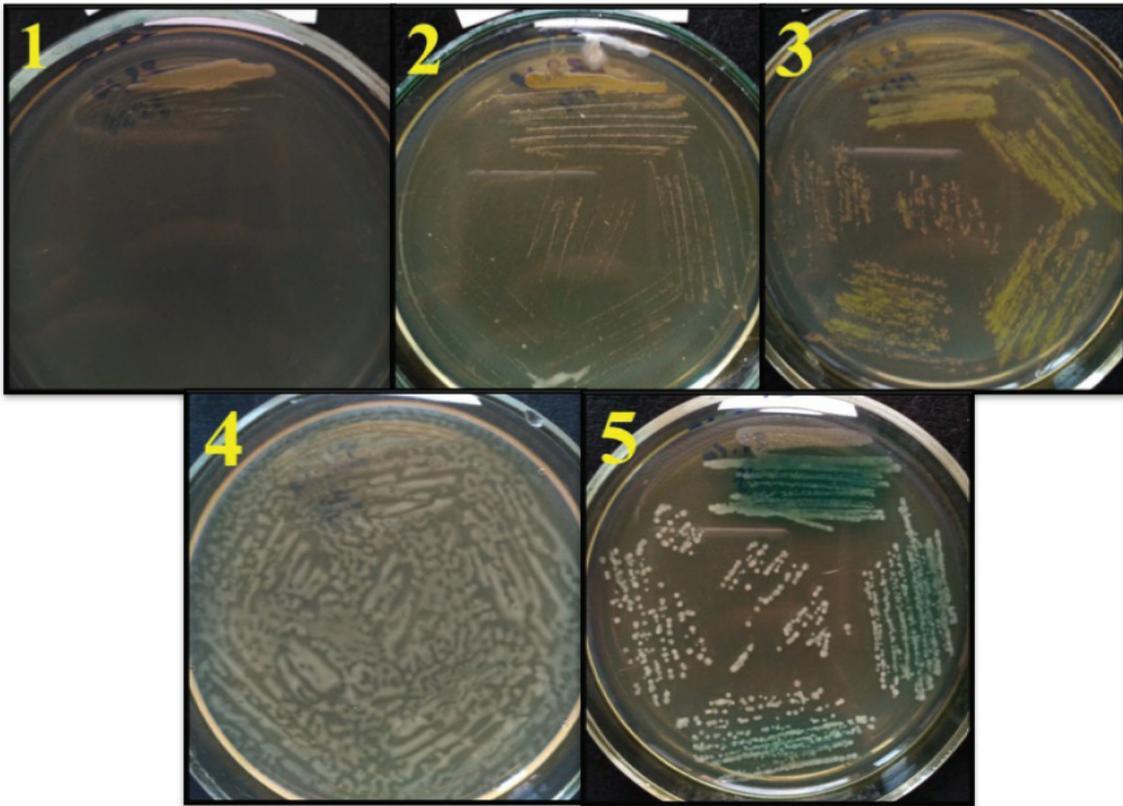
Рис. 1 - Рост на среде Enriched Anacker and Ordal medium (время культивирования 24 часа при 25 °С): 1 - *F. aquatile* VKPMB-8534; 2 - *F. pectinovorum* VKMB-1171; 3 - *F. johnsoniae* VKMB-1426; 4 - *A. hydrophila* 216; 5 - *Ps. aeruginosa* 13

1426. В качестве микроорганизмов-ассоциантов были использованы бактериальные культуры *Pseudomonas aeruginosa* 13 и *Aeromonas hydrophila* 216.

#### Результаты исследований

Первый этап исследований заключался в

подборе компонентов для питательной основы конструируемой среды. С этой целью были осуществлены посеы изучаемых штаммов на набор сред, широко используемых в лабораторной практике: Enriched Anacker and Ordal medium, МПА, ВКПМ № 70, Hsu-Shotts (компо-



**Рис. 2 - Рост на МПА (время культивирования 24 часа при 25 °С): 1 - *F. aquatile* VKPMB-8534; 2 - *F. pectinovorum* VKMB-1171; 3 - *F. johnsoniae* VKMB-1426; 4 - *A. hydrophila* 216; 5 - *Ps.aeruginosa* 13**

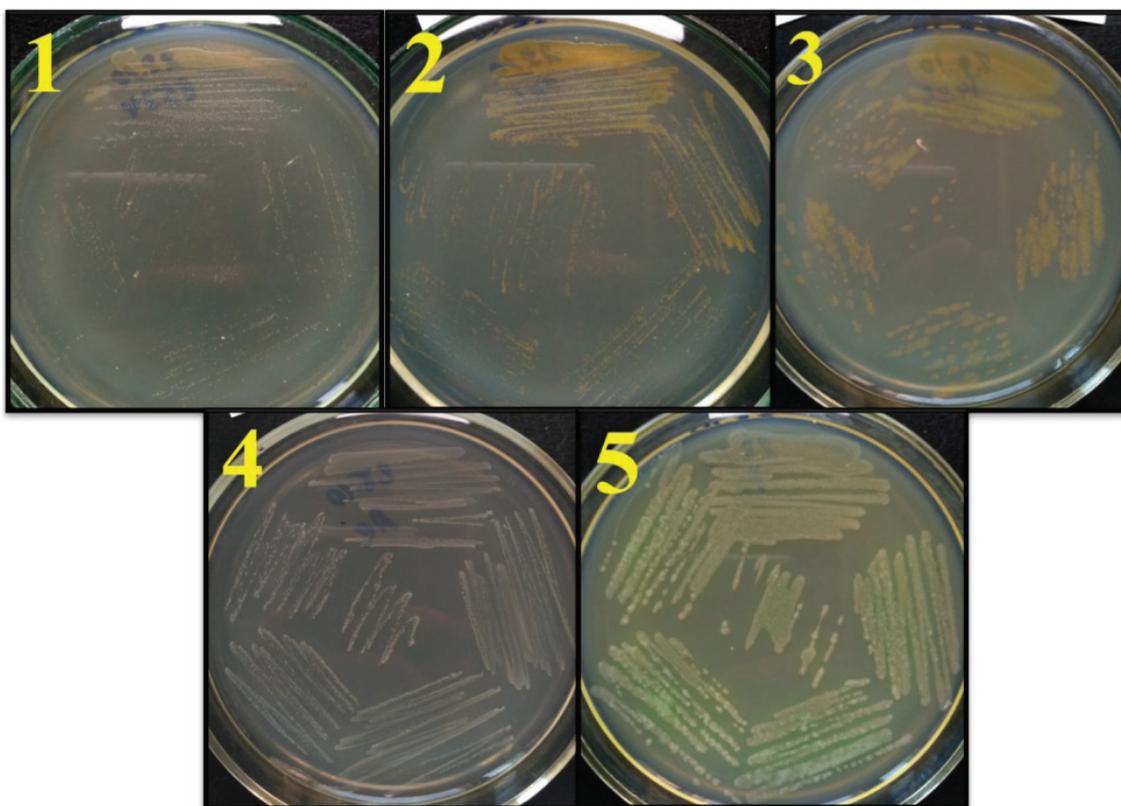
нентный состав данных сред представлен в таблице 1).

Суточные культуры каждого из штаммов засеивали на чашки Петри с представленными средами. Посевы культивировали при 25 °С в течение 24-72 часов с фиксацией результатов каждые 24 часа. В ходе предыдущих исследований было установлено, что данный температурный параметр является оптимальным для роста изучаемых видов бактерий рода *Flavobacterium*. Результаты проведенных исследований представлены на рисунках 1-4.

Характеристика роста штаммов на среде Enriched Anacker and Ordal medium: 1) *F. aquatile* VKPMB-8534: колонии мелких размеров, форма округлая, поверхность гладкая, выпуклая, блестящая, светло-желтого цвета, с ровными краями, консистенция пастообразная; 2) *F. pectinovorum* VKMB-1171: колонии мелких размеров, форма округлая, поверхность гладкая, выпуклая, блестящая, темно-желтого цвета, с ровными краями, консистенция пастообразная; 3) *F. johnsoniae* VKMB-1426: колонии средних размеров, форма округлая, поверхность гладкая, выпуклая, блестящая, темно-желтого цвета, с волнистыми краями, консистенция пастообразная; 4) *Aeromonas hydrophila* 216: колонии средних размеров, форма округлая, поверхность гладкая, выпуклая, блестящая, белого цвета, с ровными краями, консистенция пастообразная; 5) *Pseudomonas aeruginosa* 13: коло-

бразная; 4) *Aeromonas hydrophila* 216: колонии мелких размеров, форма округлая, поверхность гладкая, выпуклая, блестящая, белого цвета, с ровными краями, консистенция пастообразная; 5) *Pseudomonas aeruginosa* 13: колонии мелких размеров, форма округлая, поверхность гладкая, выпуклая, блестящая, серого цвета, с ровными краями, консистенция пастообразная.

Характеристика роста штаммов на среде МПА: 1) *F. aquatile* VKPMB-8534: колонии мелких размеров, форма округлая, поверхность гладкая, выпуклая, блестящая, светло-желтого цвета, с ровными краями, консистенция пастообразная; 2) *F. pectinovorum* VKMB-1171: колонии мелких размеров, форма округлая, поверхность гладкая, выпуклая, блестящая, темно-желтого цвета, с ровными краями, консистенция пастообразная; 3) *F. johnsoniae* VKMB-1426: колонии мелких размеров, форма округлая, поверхность гладкая, выпуклая, блестящая, ярко-желтого цвета, с волнистыми краями, консистенция пастообразная; 4) *Aeromonas hydrophila* 216: колонии средних размеров, форма округлая, поверхность гладкая, выпуклая, блестящая, белого цвета, с ровными краями, консистенция пастообразная; 5) *Pseudomonas aeruginosa* 13: коло-



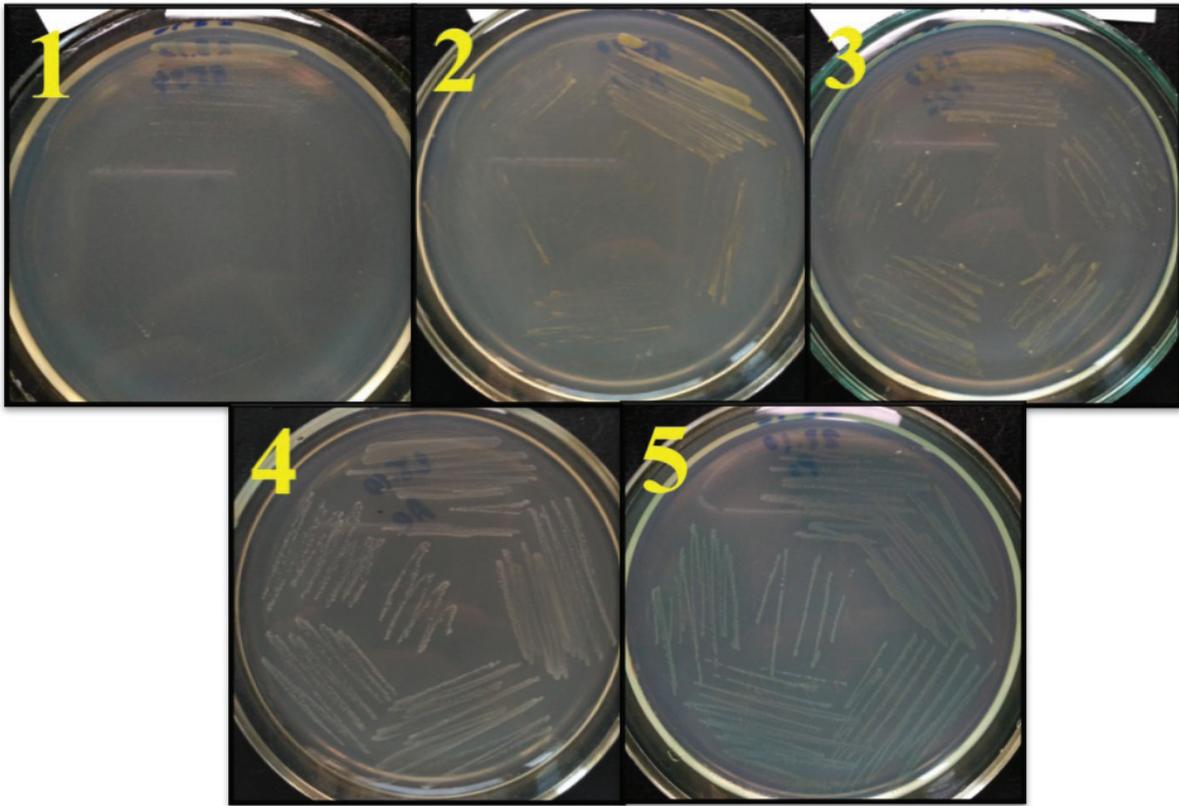
**Рис. 3 - Рост на ВКПМ № 70 (время культивирования 24 часа при 25 °С): 1 - *F. aquatile* VKPMB-8534; 2 - *F. pectinovorum* VKMB-1171; 3 - *F. johnsoniae* VKMB-1426; 4 - *A. hydrophila* 216; 5 - *Ps. aeruginosa* 13**

нии средних размеров, форма округлая, поверхность гладкая, выпуклая, блестящая, серо-зеленого цвета, с ровными краями, консистенция пастообразная.

Характеристика роста штаммов на среде ВКПМ № 70: 1) *F. aquatile* VKPMB-8534: колонии мелких размеров, форма округлая, поверхность гладкая, выпуклая, блестящая, светло-желтого цвета, с ровными краями, консистенция пастообразная; 2) *F. pectinovorum* VKMB-1171: колонии мелких размеров, форма округлая, поверхность гладкая, выпуклая, блестящая, тёмно-желтого цвета, с ровными краями, консистенция пастообразная; 3) *F. johnsoniae* VKMB-1426: колонии средних размеров, форма округлая, поверхность гладкая, выпуклая, блестящая, ярко-желтого цвета, с волнистыми краями, консистенция пастообразная; 4) *Aeromonas hydrophila* 216: колонии мелких размеров, форма округлая, поверхность гладкая, выпуклая, блестящая, белого цвета, с ровными краями, консистенция пастообразная; 5) *Pseudomonas aeruginosa* 13: колонии средних размеров, форма округлая, поверхность гладкая, выпуклая, блестящая, серо-зеленого цвета, с ровными краями, консистенция пастообразная.

Характеристика роста штаммов на среде Hsu-Shotts: 1) *F. aquatile* VKPMB-8534: колонии мелких размеров, форма округлая, поверхность гладкая, выпуклая, блестящая, светло-желтого цвета, с ровными краями, консистенция пастообразная; 2) *F. pectinovorum* VKMB-1171: колонии мелких размеров, форма округлая, поверхность гладкая, выпуклая, блестящая, тёмно-желтого цвета, с ровными краями, консистенция пастообразная; 3) *F. johnsoniae* VKMB-1426: колонии мелких размеров, форма округлая, поверхность гладкая, выпуклая, блестящая, ярко-желтого цвета, с волнистыми краями, консистенция пастообразная; 4) *Aeromonas hydrophila* 216: колонии мелких размеров, форма округлая, поверхность гладкая, выпуклая, блестящая, белого цвета, с ровными краями, консистенция пастообразная; 5) *Pseudomonas aeruginosa* 13: колонии средних размеров, форма округлая, поверхность гладкая, выпуклая, блестящая, серо-зеленого цвета, с ровными краями, консистенция пастообразная.

По результатам исследований за основу среды был выбран состав Enriched Anacker and Ordal medium, т. к. спустя 24 часа на данной среде количество и размер колоний флавобактерий



**Рис. 4 - Рост на Hsu-Shotts (время культивирования 24 часа при 25 °С): 1 - *F. aquatile* VKPMB-8534; 2 - *F. pectinovorum* VKMB-1171; 3 - *F. johnsoniae* VKMB-1426; 4 - *A. hydrophila* 216; 5 - *Ps. aeruginosa* 13**

значительно превосходили по сравнению с другими средами, а также рост бактерий - ассоциантов был не такой обильный по сравнению с другими составами питательных сред (при одинаковых условиях культивирования).

Второй этап - изучение устойчивости *F. johnsoniae*, *F. pectinovorum*, *F. aquatile* и возможных бактерий-ассоциантов к красителям: конго-красный, сафранин, бромкрезоловый пурпурный, Нильсона синий, Кристенсена фиолетовый, метиленовый оранжевый, метиленовый красный, метиленовый синий, метиленовый зеленый. Исследования проводили путем добавления данных красителей к установленной питательной основе. Каждый из отобранных красителей добавляли в основу среды и разливали на чашки Петри. Чашки подсушивали в термостате при 37 °С в течение 24 часов. После этого на каждую чашку со средой делали посеы штаммов: *F. johnsoniae*, *F. pectinovorum*, *F. aquatile*, *Ps. aeruginosa* и *A. hydrophila*. Инкубировали посеы в термостате при 25 °С, результат учитывали каждые 24 часа (до 72 часов). Результаты исследований представлены на рисунках 5-12.

Оценка полученных результатов позволила выявить отличия роста исследуемых видов микроорганизмов на питательной среде Enriched Anacker and Ordal medium с добавлением в неё различных красителей. Так как добавлением в основу среды этих красителей мы выявили существенные морфологические различия колоний изучаемых микроорганизмов, то для дальнейшей работы был выбран индикатор бромкрезоловый пурпурный. При внесении данного индикатора в состав среды наблюдалось подавление роста бактерий *Ps. aeruginosa* 13, а у изучаемых видов флавобактерий наблюдался обильный рост колоний спустя 24 часа при температуре 25 °С, в то время как остальные индикаторы либо были неэффективны в отношении возможных бактерий-ассоциантов, либо подавляли рост флавобактерий.

Следующим этапом было внесение по отдельности (из расчета 1 г на 1000 мл) в получившиеся составы питательных сред сахаров: дультита, арабинозы, галактозы, глюкозы, сахарозы и рамнозы. Выбор данных сахаров был связан с результатами проведенных исследований по изучению биохимических свойств флавобактерий.

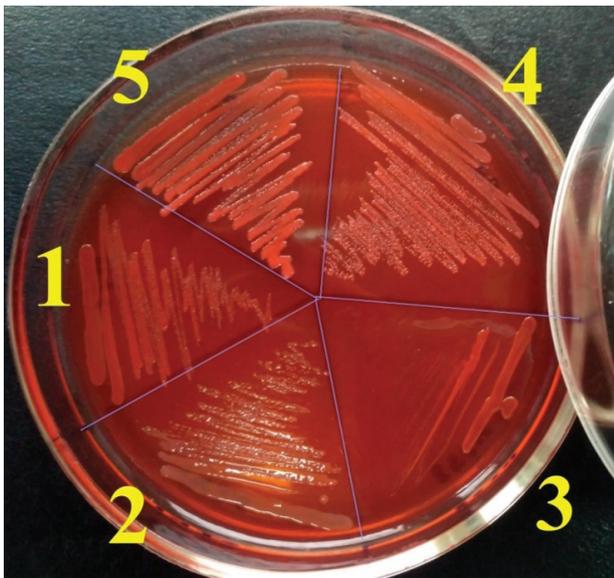


Рис. 5 - Рост изучаемых бактерий на среде Enriched Anacker and Ordal medium с добавлением красителя - конго красный (24 часа при 25 °C): 1 - *F. pectinovorum* VKMB-1171; 2 - *F. johnsoniae* VKMB-1426; 3 - *F. aquatile* VKPMB-8534; 4 - *A. hydrophila* 216; 5 - *Ps.aeruginosa* 13

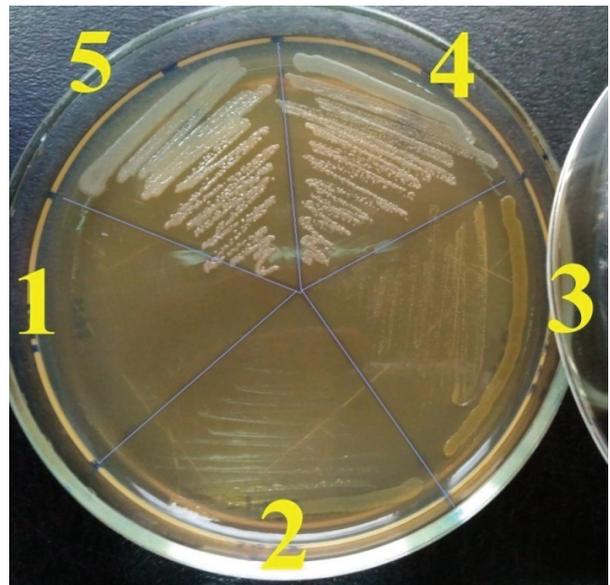


Рис. 6 - Рост изучаемых бактерий на среде Enriched Anacker and Ordal medium с добавлением красителя - метиленовый красный (24 часа при 25 °C): 1 - *F. pectinovorum* VKMB-1171; 2 - *F. johnsoniae* VKMB-1426; 3 - *F. aquatile* VKPMB-8534; 4 - *A. hydrophila* 216; 5 - *Ps.aeruginosa* 13

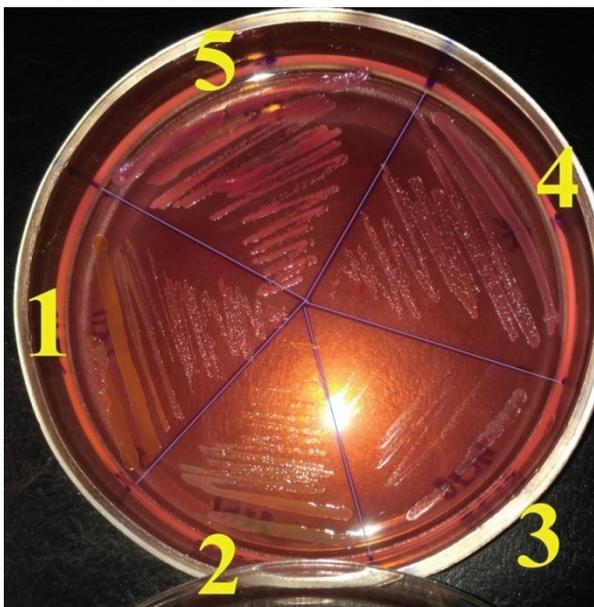


Рис. 7 - Рост изучаемых бактерий на среде Enriched Anacker and Ordal medium с добавлением красителя - сафранин (24 часа при 25 °C): 1 - *F. pectinovorum* VKMB-1171; 2 - *F. johnsoniae* VKMB-1426; 3 - *F. aquatile* VKPMB-8534; 4 - *A. hydrophila* 216; 5 - *Ps.aeruginosa* 13

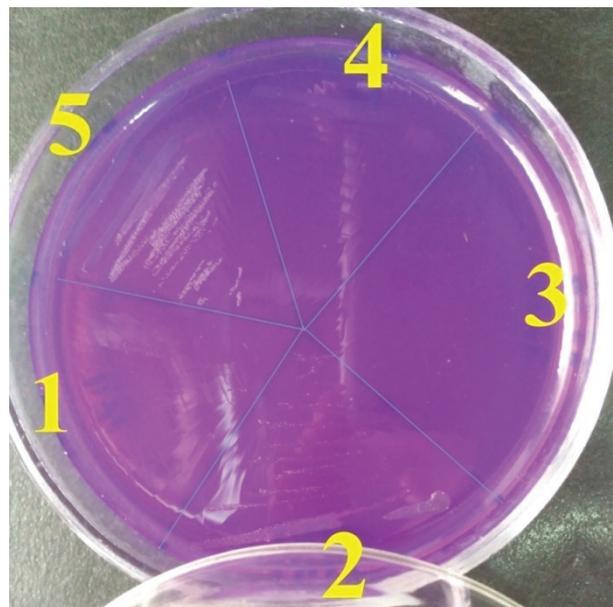


Рис. 8 - Рост изучаемых бактерий на среде Enriched Anacker and Ordal medium с добавлением красителя - Кристенсена фиолетовый (24 часа при 25 °C): 1 - *F. pectinovorum* VKMB-1171; 2 - *F. johnsoniae* VKMB-1426; 3 - *F. aquatile* VKPMB-8534; 4 - *A. hydrophila* 216; 5 - *Ps.aeruginosa* 13

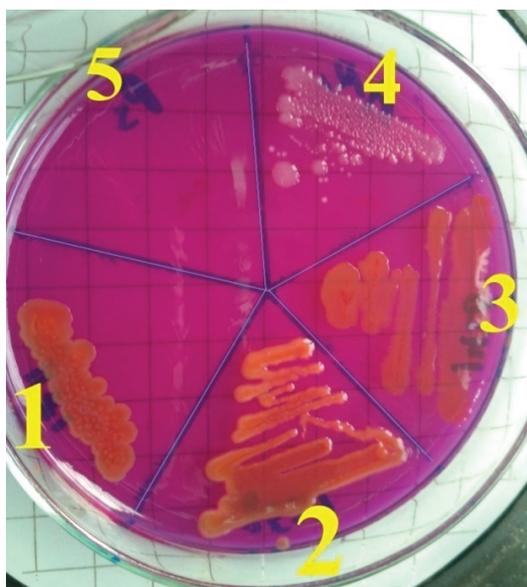


Рис. 9 - Рост изучаемых бактерий на среде Enriched Anacker and Ordal medium с добавлением красителя – бромкрезоловый пурпурный (24 часа при 25 °С): 1 - *F. pectinovorum* VKMB-1171; 2 - *F. johnsoniae* VKMB-1426; 3 - *F. aquatile* VKPMB-8534; 4 - *A. hydrophila* 216; 5 - *Ps.aeruginosa* 13

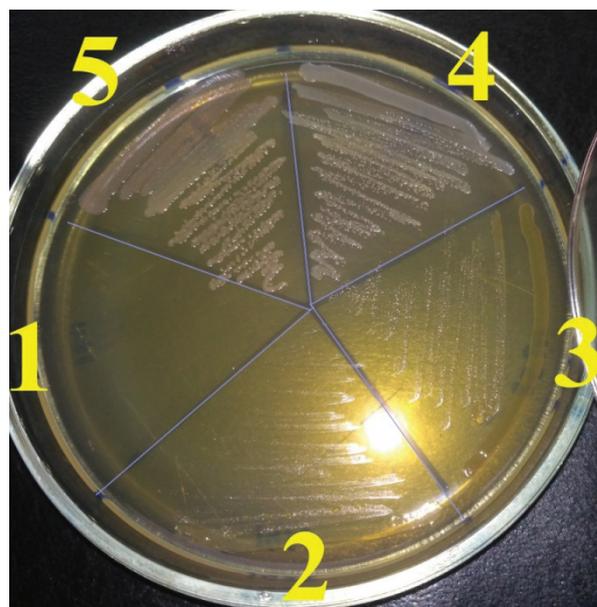


Рис. 11 - Рост изучаемых бактерий на среде Enriched Anacker and Ordal medium с добавлением красителя – метиленовый оранжевый (24 часа при 25 °С): 1 - *F. pectinovorum* VKMB-1171; 2 - *F. johnsoniae* VKMB-1426; 3 - *F. aquatile* VKPMB-8534; 4 - *A. hydrophila* 216; 5 - *Ps.aeruginosa* 13

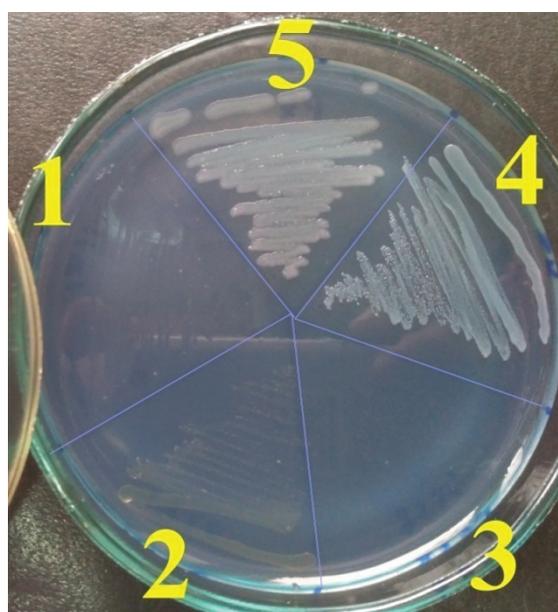


Рис. 10 - Рост изучаемых бактерий на среде Enriched Anacker and Ordal medium с добавлением красителя – Нильсона синий (24 часа при 25 °С): 1 - *F. pectinovorum* VKMB-1171; 2 - *F. johnsoniae* VKMB-1426; 3 - *F. aquatile* VKPMB-8534; 4 - *A. hydrophila* 216; 5 - *Ps.aeruginosa* 13

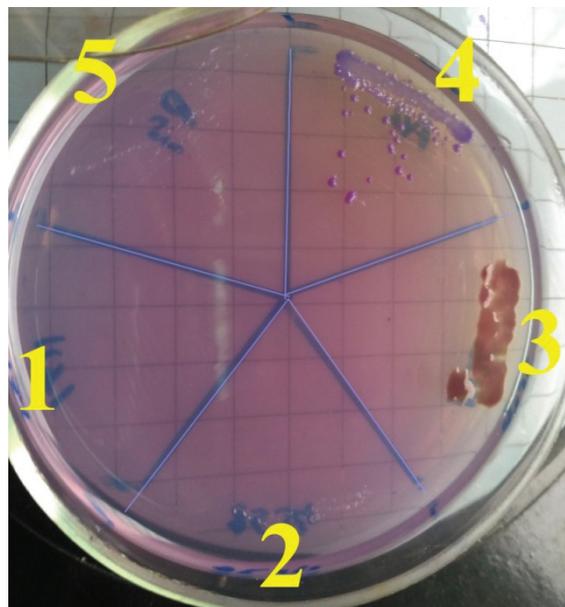
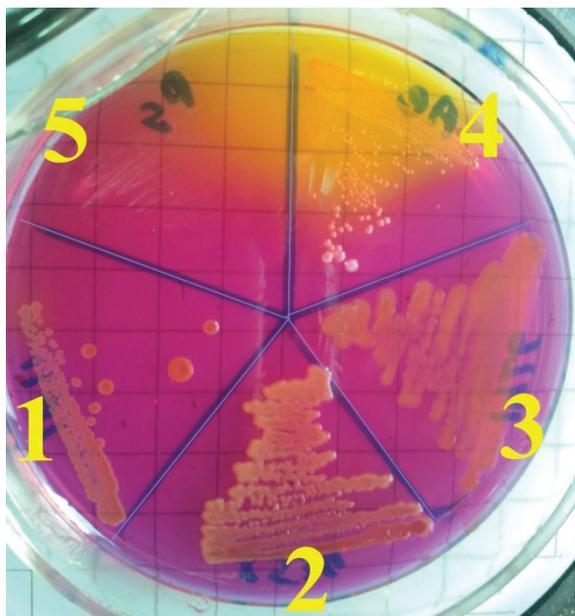


Рис. 12 - Рост изучаемых бактерий на среде Enriched Anacker and Ordal medium с добавлением красителя – метиленовый зеленый (24 часа при 25 °С): 1 - *F. pectinovorum* VKMB-1171; 2 - *F. johnsoniae* VKMB-1426; 3 - *F. aquatile* VKPMB-8534; 4 - *A. hydrophila* 216; 5 - *Ps.aeruginosa* 13



**Рис. 13 - Рост изучаемых бактерий на сконструированной среде (24 часа при 25 °С):**  
 1 - *F. pectinovorum* VKMB-1171; 2 - *F. aquatile* VKPMB-8534; 3 - *F. johnsoniae* VKMB-1426; 4 - *A. hydrophila* 216; 5 - *Ps.aeruginosa* 13

В ходе исследований в качестве дополнительной составляющей разрабатываемой среды и составляющей индикаторной pH-системы (вместе с красителем) нами была отобрана глюкоза. При использовании данного сахара и индикатора бромкрезоловый пурпурный установили, что возможные ассоцианты на среде, такие как *Ps.aeruginosa* 13, не имеют роста, *A. hydrophila* 216 изменяет цвет среды с фиолетового на ярко-желтый, колонии мелкие по сравнению с изучаемыми видами флавобактерий, у которых наблюдался обильный рост колоний на сконструированной среде, и цвет среды они не изменяли (рисунок 13).

#### Выводы

Принцип действия дифференциально-диагностической среды определяется взаимодействием изучаемых видов флавобактерий с введенным в выбранный нами состав среды индикатора бромкрезоловый пурпурный и моносахарида глюкозы. В результате этого взаимодействия происходит обильный рост колоний бактерий *F. johnsoniae*, *F. Pectinovorum*, *F. Aquatile*. Одновременно данная среда ингибирует рост возможных ассоциантов *Ps.aeruginosa*, а также *A. hydrophila* изменяет цвет среды с фиолетового на ярко-желтый. Полученные данные свидетельствуют о том, что сконструированная нами дифференциально-диагностическая питатель-

ная среда обладает специфичностью в отношении *F. johnsoniae*, *F. Pectinovorum*, *F. Aquatile* и значительно облегчает их идентификацию. В России до настоящего времени подобные диагностические питательные среды в отношении *Flavobacterium* не производили, и поэтому разработка их является актуальной и значимой для практической микробиологии.

#### Библиографический список

1. Семанин, А.Г. Изучение возбудителя флавобактериоза / А.Г. Семанин, Н.П. Пекарская // Инновационная деятельность в модернизации АПК. Материалы международной научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых. – Курск: Курская государственная сельскохозяйственная академия им. И.И. Иванова, 2017. – С. 229 - 231.
2. Loch, T.P. *Flavobacterium spartansii* sp. nov., a pathogen of fishes, and emended descriptions of *Flavobacterium aquidurens* and *Flavobacterium araucanum*/ T.P. Loch, M. Faisal // Int J Syst Evol Microbiol. - 2014. - № 64(2). - P. 406 - 412.
3. Выделение и типирования *Flavobacterium psychrophilum* из объектов аквакультуры / А.Г. Семанин, Д.Г. Сверкалова, А.И. Калдыркаев, А.Г. Шестаков, С.Н. Золотухин, Д.А. Васильев // Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения. Материалы VII международной научно-практической конференции. – Ульяновск: ГСХА им. П.А. Столыпина, 2016. - С. 280 - 283.
4. Результаты изучения биохимических свойств *Flavobacterium psychrophilum* / Д.А. Викторов, А.П. Воротников, Н.А. Парамонова, Д.А. Васильев // Международный научно-исследовательский журнал. – 2014. - № 2. - С. 53-54.
5. Садртдинова, Г.Р. Изучение культуральных свойств бактерий вида *Klebsiella oxytoca* / Г.Р. Садртдинова, Е.А. Ляшенко, Д.А. Васильев // Биотехнология: реальность и перспективы. Материалы международной научно-практической конференции. - Саратов: Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова, 2014. - С. 193 - 196.
6. Садртдинова, Г.Р. Биохимическая активность бактерий вида *Klebsiella oxytoca* / Г.Р. Садртдинова, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин // Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения. Материалы VII международной научно-практической конференции. - Ульяновск: УГСХА

им. П.А. Столыпина, 2016. - Том III. - С. 261 - 265.

7. Семанин, А.Г. Разработка параметров идентификации / А.Г. Семанин, Д.Г. Сверкалова, А.Г. Шестаков // Достижения молодых учёных в ветеринарную практику. Материалы IV международной научно-практической конференции. - Владимир: Федеральное государственное учреждение «Федеральный центр охраны здоровья животных», 2016. - С. 149 - 154.

8. Роль бактерий *Flavobacterium psychrophilum* в патогенезе рыб / Н.А. Парамонова, Д.А. Викторов, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин // Биотехнология: реальность и перспективы в сельском хозяйстве. – Саратов: Издательство «КУБиК», 2013. – С. 93 - 95.

9. Пекарская, Н.П. Разработка питательной среды для *Favobacterium* / Н.П. Пекарская, А.Г. Семанин // Знания молодых для развития ветеринарной медицины и АПК страны. Материалы международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых. – СПб.: ФГБОУ ВО СПбГАВМ, 2017. – С. 166.

10. Семанин, А.Г. Выделение и изучение свойств бактерий из открытых водоёмов РФ / А.Г. Семанин, С.Н. Золотухин, Н.П. Пекарская // Современные проблемы и перспективы агро-

промышленного комплекса Сибири. Материалы XVI региональной научно-студенческой конференции аграрных вузов СФО. – Кемерово: Кемеровский государственный сельскохозяйственный институт, 2017. – С. 170 - 173.

11. Barnes, M.E. A Review of *Flavobacterium psychrophilum* Biology, Clinical Signs, and Bacterial Cold Water Disease Prevention and Treatment / M.E. Barnes, M.L. Brown // The Open Fish Science Journal. – 2011. - № 4. – P. 1–9.

12. An introduction to the family Flavobacteriaceae. / J-F. Bernardet, Y Nakagawa, M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.H. Schleifer, E. Stackebrandt. - Springer-Verlag, 2006. - Vol. 7/ - P. 455 - 480.

13. *Flavobacterium chilensesp. nov.* and *Flavobacterium araucanumsp. nov.*, isolated from farmed salmonid fish. Int J Syst Evol Microbiol / P. Kämpfer, N. Lodders, K. Martin, R. Avendaño // Herrera. - 2012. - № 62(6). – P. 1402 – 1408.

14. Flemming, L. Phenotypic and molecular characterisation of fish-borne *Flavobacterium johnsoniae*-like isolates from aquaculture systems in South Africa. / L. Flemming, D. Rawlings, H. Chenia // Res Microbiol - 2007. - № 158 (1).- P.18–30.

## CONSTRUCTION OF DIFFERENTIAL AND DIAGNOSTIC MEDIUM FOR IDENTIFICATION AND PRIMARY DIFFERENTIATION OF FLAVOBACTERIUM BACTERIA

**Semanin A.G., Vasilyev D.A., Zolotukhin S.N.**  
**FSBEI HE Ulyanovsk SAU**  
**432017, Ulyanovsk, Noviy Venets, Bld., 1;**  
**8 (8422) 55-95-47; e-mail: anton-vet@mail.ru**

*Key words: indicator, reference strain, yeast extract, safranin, medium.*

The article describes results of studies related to the selection of the appropriate composition of differential and diagnostic nutrient medium for isolation and identification of *Flavobacterium* genus bacteria. Reference strains of the museum of the Department of Microbiology, Virology, Epizootology and VSE of USAU were used during the experiment: *Flavobacterium pectinovorum* VKMB-1171, *Favobacterium aquatile* VKPMB-8534, *Flavobacterium johnsoniae* VKMB-1426, *Pseudomonas aeruginosa* № 13 and *Aeromonas hydrophila* № 216. Studies were carried out on the selection of components for the nutrient base of the medium to be constructed. For this purpose, the cultures of the studied strains were inoculated to a set of media widely used in laboratory practice: Enriched Anacker and Ordal medium, MPA, VKPM № 70, Hsu-Shotts. Studies on the stability of *F. johnsoniae*, *F. pectinovorum*, *F. aquatile* and possible bacteria-associates to various indicators: Congo-red, safranin, bromocresol purple, Nilsson blue, Christensen violet, methylene orange, methylene red, methylene blue, methylene green were carried out. The obtained data indicate that the differential and diagnostic nutrient medium we have developed has specificity for *F. johnsoniae*, *F. Pectinovorum*, *F. Aquatile* and greatly simplifies their identification. Such diagnostic nutrient media have not been produced for *Flavobacterium*, and therefore their development is relevant for practical microbiology in Russia.

### *Bibliography*

1. Semanin, A.G. Study of the causative agent of flavobacteriosis / A.G. Semanin, N.P. Pekarskaya // Innovative activity in the modernization of the agro-industrial complex. Materials of the international scientific-practical conference of students, post graduate students and young scientists. - Kursk: Kursk State Agricultural Academy named after I.I. Ivanova, 2017. - P. 229 - 231.

2. Loch, T.P. *Flavobacterium spartansii* sp. nov., a pathogen of fishes, and emended descriptions of *Flavobacterium aquidurensis* and *Flavobacterium araucanum* / T.P. Loch, M. Faisal // Int J Syst Evol Microbiol. - 2014. - № 64(2). - P. 406 - 412.

3. Isolation and typing of *Flavobacterium psychrophilum* from aquaculture objects / A.G. Semanin, D.G. Sverkalova, A.I. Kaldyrkaev, A.G. Shestakov, S.N. Zolotukhin, D.A. Vasilyev // Agrarian science and education at the present stage of development: experience, problems and solutions. Materials of the VII International Scientific and Practical Conference. - Ulyanovsk: State Agricultural Academy named after P.A. Stolypin, 2016. - P. 280 - 283.

4. Results of studying the biochemical properties of *Flavobacterium psychrophilum* / D.A. Viktorov, A.P. Vorotnikov, N.A. Paramonova, D.A. Vasilyev // International Scientific and Research Journal. - 2014. - P. 53-54.

5. Sadrtidinova, G.R. Study of cultural properties of *Klebsiella oxytoca* bacteria / G.R. Sadrtidinova, E.A. Lyashenko, D.A. Vasilyev // Biotechnology: reality and prospects. Materials of the international scientific-practical conference. - Saratov: Saratov State Agrarian University named after N.I. Vavilov, 2014. - P. 193 - 196.

6. Sadrtidinova, G.R. Biochemical activity of *Klebsiella oxytoca* bacteria / G.R. Sadrtidinova, D.A. Vasilyev, S.N. Zolotukhin // Agrarian science and education at the present stage of development: experience, problems and solutions. Materials of the VII International Scientific and Practical Conference. - Ulyanovsk: USAA named after P.A. Stolypin, 2016. - Volume III. - P. 261 - 265.

7. Semanin, A.G. Development of identification parameters / A.G. Semanin, D.G. Sverkalova, A.G. Shestakov // Achievements of young scientists in

veterinary practice. Materials of the IV International scientific and practical conference. - Vladimir: Federal State Institution 'Federal Center of Animal Health Protection', 2016. - P. 149-154.

8. The role of *Flavobacterium psychrophilum* bacteria in fish pathogenesis / N.A. Paramonova, D.A. Viktorov, D.A. Vasilyev, S.N. Zolotukhin // *Biotechnology: reality and prospects in agriculture*. - Saratov: Publishing house «KUBIK», 2013. - P. 93 - 95.

9. Pekarskaya, N.P. Development of nutrient medium for *Favobacterium* / N.P. Pekarskaya, A.G. Semanin // *Knowledge of young people for development of veterinary medicine and the country agro-industrial complex. Materials of the international scientific conference of students, post graduate students and young scientists*. - SPb.: FSBEI HE SPSAVM. - P. 166.

10. Semanin, A.G. Isolation and study of properties of bacteria from open reservoirs of the RF / A.G. Semanin, S.N. Zolotukhin, N.P. Pekarskaya // *Modern problems and prospects of the agro-industrial complex of Siberia. Materials of the XVI regional scientific-student conference of agrarian high schools of Siberian Federal District*. - Kemerovo: Kemerovo State Agricultural Institute, 2017. - P. 170 - 173.

11. Barnes, M.E. A Review of *Flavobacterium psychrophilum* Biology, Clinical Signs, and Bacterial Cold Water Disease Prevention and Treatment / M.E. Barnes, M.L. Brown // *The Open Fish Science Journal*. - 2011. - № 4. - P. 1-9.

12. An introduction to the family Flavobacteriaceae. / J-F. Bernadet, Y Nakagawa, M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.H. Schleifer, E. Stackebrandt. - Springer-Verlag, 2006. - Vol. 7/ - P. 455 - 480.

13. *Flavobacterium chilense* sp. nov. and *Flavobacterium araucanum* sp. nov., isolated from farmed salmonid fish. *Int J Syst Evol Microbiol* / P. Kämpfer, N. Ladders, K. Martin, R. Avendaño-Herrera. - 2012. - № 62(6). - P. 1402 - 1408.

14. Flemming, L. Phenotypic and molecular characterisation of fish-borne *Flavobacterium johnsoniae*-like isolates from aquaculture systems in South Africa. *Res Microbiol* / L. Flemming, D. Rawlings, H. Chenia. - 2007. - № 158(1). - P. 18-30.