

В результате исследований доказали, что предлагаемый нами диагностиком для идентификации бактерий *Aeromonas hydrophila*, состоящий из антигенного ультразвукового дезинтеграта данных бактерий и гипериммунной сыворотки (D), полученной на УЗ антиген можно использовать для идентификации выделенных бактерий методами РА и РДП.

УДК 619:579

РЕЗУЛЬТАТЫ АПРОБАЦИИ ПРЕДЛАГАЕМОЙ СХЕМЫ ВЫДЕЛЕНИЯ И ТИПИЗАЦИИ БАКТЕРИЙ *AEROMONAS HYDROPHILA*

Т.И. Канаева, Д.А. Васильев А.А. Нафеев
Научно-исследовательский инновационный центр
микробиологии и биотехнологии
ФГОУ ВПО «Ульяновская государственная
сельскохозяйственная академия»

*Results of approbation of the offered scheme of allocation and typification of bacteria of kind *Aeromonas hydrophila* are described.*

*Описаны результаты апробации предлагаемой схемы выделения и типизации бактерий вида *Aeromonas hydrophila*.*

Целью ниже описанных исследований являлась: разработка среды накопления, селективной и транспортной среды для *Aeromonas hydrophila*, а так же разработка схемы выделения и бактериологической идентификации бактерий вида *Aeromonas hydrophila*.

Результаты

Конструирование селективной среды:

Для подбора селективного агента было проведено исследование референс-штаммов *Aeromonas hydrophila* (**A.h.01реф.** и **A.h.02реф.**) на устойчивость к химиотерапевтическим средствам методом диффузии в агар с применением 28 антимикробных препаратов. В результате проведенных исследований выяснили, что антибиотики непригодны для использования в качестве селективного агента. Наиболее приемлемым, был бы ампициллин, или доксициклин. Но некоторые виды из возможных ассоциантов (*Pseudomonas aeruginosa*, *Citrobacter*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Yersinia enterocolitica*) так же устойчивы к данным антибиотикам. Кроме того, некоторые штаммы *Aeromonas hydrophila* являются ампициллин-чувствительными, другие неустойчивы по отношению к доксициклину.

Чувствительность к красителям - один из критериев в систематике микроорганизмов. Имеются сообщения о применении красок и для выявления факторов патогенности различных бактерий. В условиях лаборатории нами были проведены исследования устойчивости *Aeromonas hydrophila* и возможных ассоциантов к следующим красителям: Конго-рот, кристаллический фиолетовый,

бриллиантовый зеленый и феноловый красный. Выяснили, что *Aeromonas hydrophila* обладает абсолютной устойчивостью к Конго-рот в концентрации 0,3 %. К кристаллическому фиолетовому в концентрации 0,01 %. Отсюда следует, что селективный агент должен состоять из 3 г/л конго-рота, так как 94,4% штаммов возможных ассоциантов неустойчивы к данной концентрации красителя, и 0,1 г/л кристаллического фиолетового (33,3% неустойчивых штаммов из возможных ассоциантов).

Изучив литературные данные, пришли к выводу, что в качестве азотно-витаминной основы нужно использовать дрожжевой экстракт, а в качестве источника углерода – мальтозу. Опытным путем установили, оптимальное содержание в среде накопления должно быть дрожжевого экстракта 4,0 г и мальтозы 3,5 г. Хорошей минеральной базой для *Aeromonas hydrophila* является набор солей фосфата калия двузамещенного (2,0 г) и семиводного сульфата магния (5,0 г). Соли калия, магния и фосфора стимулируют синтез микробной клетки *Aeromonas hydrophila*, а для образования бактериальных белков необходимы анионы, содержащие серу. Таким образом, данный набор солей целесообразно включить в среду в применяемых дозах.

Во избежание выпадения селективного агента в осадок и для равномерного распространения его во всей среде решено было добавить желатин (5 %), учитывая также, что желатин является растворимым белком, а бактерии *Aeromonas hydrophila* обладают протеолитической активностью и способны разжижать желатин.

В результате вышеизложенных исследований, предложенный нами рецепт накопительной среды для бактерий *Aeromonas hydrophila* УГСХА – 1А.н. имеет следующий состав: вода дистиллированная – 1000 мл; 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 краснокоричневый.

Были проведены испытания прототипа селективной среды по времени культивирования и специфичности действия. Резкое увеличение количества КОЕ наблюдалось при 30 °С от 18 до 24 часов. Следовательно, оптимальное время культивирования составляет 24 часа. Специфичность селективной среды определяли с помощью бактерий, ассоциантов *Aeromonas hydrophila*: *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*; *Proteus mirabilis*; *Staphylococcus*; *Citrobacter*; *Escherichia coli*; *Listeria monocytogenes*; *Morganella morganii*; *Proteus vulgaris*; *Klebsiella pneumoniae*; *Enterobacter*; *Pasteurella multocida*; *Providencia rettgeri*; *Yersinia pseudotuberculosis*; *Yersinia enterocolitica*. Полученные данные свидетельствовали, что на прототипе селективной среды происходит рост бактерий *Aeromonas hydrophila*. Одновременно данная среда ингибирует рост возможных ассоциантов *Aeromonas hydrophila*. Следовательно, она обладает специфичностью.

Среду данного состава можно использовать для перевозки проб исследуемого материала до лаборатории. Благодаря тому, что она содержит желатин, уплотняющий среду, и необходимые питательные вещества, бактерии *Aeromonas hydrophila* способны накапливаться в ней и сохраняться в течение 2 месяцев. Рост *Aeromonas hydrophila* на среде УГСХА – 1А.н. при -4 °С не наблюдался, но при высевании из пробирок с замороженными бульонными культурами на питательный агар и инкубации чашек в термостате в течение 24 ч. при оптимальной

температуре (30 °С), наблюдался характерный рост бактерий *Aeromonas hydrophila*. При температуре +5 °С наблюдалось помутнение среды спустя 48 часов, при хранении аэромонадных штаммов в течение 2 месяцев при данной температуре, они не теряют своих свойств и сохраняют жизнедеятельность. Температура +30 °С является оптимальной для роста бактерий *Aeromonas hydrophila*, спустя 18 часов среда мутнеет.

Среда УГСХА – 1А.н. применима и в качестве плотной селективной среды, в этом случае вместо желатина в состав включают агар-агар (15 г). Цвет среды красно-коричневый. Спустя 24 ч, при 30 °С на среде наблюдается рост округлых, с ровным краем, выпуклых, светло-бежевых, блестящих колоний, до 3 мм в диаметре.

Разработка бактериологического метода выделения и идентификации *Aeromonas hydrophila*

Исследуемый материал помещали в среду накопления УГСХА – 1А.н.. Спустя 24 часа культивирования при температуре 30 °С наблюдали помутнение среды и разжижение желатина.

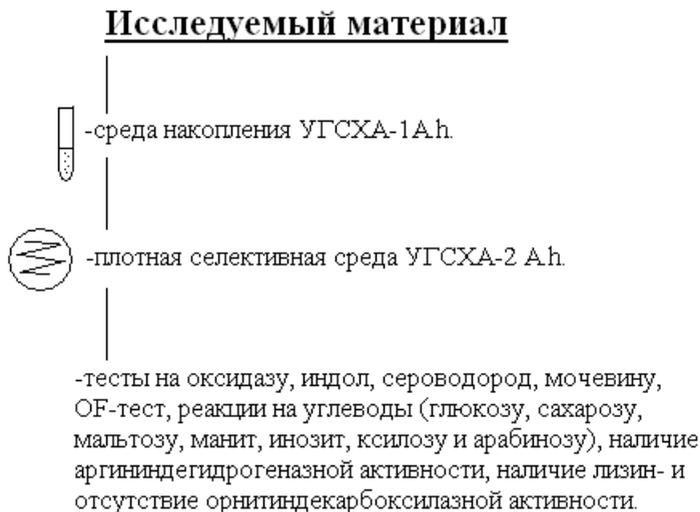


Рис.1. Схема выделения и бактериологической идентификации *Aeromonas hydrophila*

Второй этап: со среды накопления пересевали культуру на плотную селективную среду УГСХА – 2А.н.. Культивировали еще 24 часа при 30 °С. Выделенные бактерии окончательно идентифицировали по тинкториальным и культуральным свойствам, а также тестов на оксидазу, индол, сероводород, мочевины, OF-теста, реакции на углеводы (глюкозу, сахарозу, мальтозу, манит, инозит, ксилозу и арабинозу), наличию аргининдегидрогеназной активности,

наличию лизин- и отсутствию орнитиндекарбоксилазной активности. Для фенотипического определения вирулентных факторов определяли наличие гемолитической активности у выделенных штаммов на триптозо-кровяном агаре (Difco) с добавлением 5 % дифибринированной крови. ДНКазную активность на среде DNA BA (Difco). **На данных средах вокруг колоний *Aeromonas hydrophila* спустя 48 ч культивирования наблюдалась широкая зона лизиса.**

С помощью предложенной схемы (рис.1.) нами было выделено 52 штамма бактерий вида *Aeromonas hydrophila* из проб от объектов окружающей среды. На наличие изучаемых бактерий были исследованы пробы от морской рыбы, поступающей на рынки города Ульяновска в замороженном состоянии, а так же от речной рыбы из местных водоемов. Кроме того, проводились исследования по обнаружению аэромонад в пробах воды из открытых водоемов Ульяновской области, сточных водах и водопроводной воде Ульяновска.

Таблица 1. Результаты исследования объектов окружающей среды

| № п/п | Название и количество проб | Контаминация бактериями <i>Aeromonas hydrophila</i> (кол-во выделенных штаммов) |
|-------|--------------------------------------|---|
| 1 | Замороженная морская рыба (36 проб) | + (2 штамма) |
| 2 | Свежая речная рыба (62 пробы) | + (7 штаммов) |
| 3 | Вода из открытых водоемов (189 проб) | + (24 штаммов) |
| 4 | Сточные воды (158 проб) | + (16 штаммов) |

«+» случаи контаминации *Aeromonas hydrophila*

Из таблицы 1 видно, что наибольший процент выделенных бактерий *Aeromonas hydrophila* приходится на открытые водоемы, сточные воды и речную рыбу.

Таким образом, предложенная схема позволяет за 48 часов выделить и идентифицировать *Aeromonas hydrophila*.