

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ДЕПАРТАМЕНТ НАУЧНО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ ПОЛИТИКИ И ОБРАЗОВАНИЯ
УЛЬЯНОВСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ
АКАДЕМИЯ ИМ. П.А.СТОЛЫПИНА

Материалы IV Международной
научно-практической конференции

**АГРАРНАЯ НАУКА И ОБРАЗОВАНИЕ
НА СОВРЕМЕННОМ ЭТАПЕ РАЗВИТИЯ:**
опыт, проблемы и пути их решения

Том I

22-24 ноября 2012 года

Материалы IV Международной научно-практической конференции «Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения» / - Ульяновск:, ГСХА им. П.А. Столыпина, 2012, т. I - 392 с.

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:
А.В. ДОЗОРОВ, РЕКТОР (ГЛ. РЕДАКТОР)
В.А. ИСАЙЧЕВ, С.Н. ЗОЛОТУХИН, И.А. ВАНДЫШЕВ,
М.А. КАРПЕНКО, О.М. ЯГФАРОВ, А.В. БУШОВ

Авторы опубликованных статей несут ответственность за достоверность и точность приведенных фактов, цитат, экономико-статистических данных, собственных имен, географических названий и прочих сведений, а также за разглашение данных, не подлежащих открытой публикации.

Keywords. δ - endotoxins *B. thuringiensis*, antilysozymic activity of *E. coli* bacteria persistence factors.

The high activity of strains E. coli antilysozymic isolated from the large intestine of white mice in experimental dysbiosis caused by long-term administration of high doses of δ - endotoxins B. thuringiensis, demonstrates the need to be of the characteristics of the culture of bacteria for their persistence in the biotope.

УДК 619:616-07

РАЗРАБОТКА СХЕМЫ ВЫДЕЛЕНИЯ БАКТЕРИИ AEROMONAS SALMONICIDA

Н.Г. Куклина, аспирант, ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А.Столыпина», Тел 8-917-619-24-88, ul_nk@mail.ru,
И.Г. Горшков, аспирант, ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А.Столыпина», Тел. 8-917-057-20-24, i.o.gun@mail.ru,
Д.А. Викторов, к.б.н., старший научный сотрудник, ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А.Столыпина», Тел 8-908-477-55-73, viktorov_da@mail.ru,
Д.А. Васильев, д.б.н., профессор, ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А.Столыпина», 8-8422-55-95-47, dav_ul@mail.ru

Ключевые слова: *Aeromonas salmonicida*, питательные среды, бактериологические тесты, биохимия, микробиология, биотехнология.

Сконструированы специфичные питательные среды для бактерий рода Aeromonas: среда накопления и селективная среда, подобраны бактериологические тесты для дифференциации Aeromonas salmonicida от других аэромонад, разработан авторский тест для идентификации Aeromonas salmonicida.

Введение. *Aeromonas salmonicida* является возбудителем фурункулеза (аэромоноза) лососевых, который был впервые описан Эммерихом и Вайбелем еще в 1894 году в Германии (Emmerich, Wiebel 1894). *Aeromonas salmonicida* представляют собой короткие грамотрицательные палочки, которые могут быть соединены между собой в пары или цепи. Редко подвижные. Обычно имеет S-слой (Noonan and Trust, 1997). Оптимальная температура роста 22–25°C. Максимальная температура роста в питательном бульоне 34,5°C (Griffin et al., 1953). Колонии на мясо-пептонном агаре после 24 часов культивирования заостренные.

После 48–72 часов – колонии округлые, выпуклые, полупрозрачные, цельные и хрупкие.

Обычно положительны по аргининдигидролазе и отрицательны по орнитиндекарбоксилазе. По ДНКазе и желатиназе положительны. Восстанавливают нитрат. Почти все штаммы сбраживают углеводы, включая мальтозу, D – галактозу и трегалозу. Устойчивы к вибриостатическому агенту 2,4 – диамино – 6,7 – диизопропилптеридину (O/129). (Griffin et al., 1953; Smith, 1963; Schubert, 1974; Попов, 1984 ; Austin et al., 1989, 1998; Dalsgaard et al., 1994, 1998; Hanninen et al., 1995, 1997)

Целью исследования является разработка схемы выделения для бактерий вида *Aeromonas salmonicida*, а так же выделение штаммов данного микроорганизма из объектов окружающей среды с использованием разработанной схемы.

На наличие бактерий *A. salmonicida* нами были исследованы образцы воды из водоемов Ульяновской области – с. Дубровка, с. Михайловка, карьеры поселка УКСМ.

Материалы и методы исследований. При конструировании питательных сред в качестве прототипа были рассмотрены среды А-1 и А-2, применение которых описано в Методических рекомендациях «Методы исследований объектов окружающей среды и патологического материала на аэромонады», разработанные в Московском научно-исследовательском институте гигиены им. Ф.Ф. Эрисмана в 1980 году.

Результаты исследований и их обсуждение. В результате серии исследований нами были разработаны следующие авторские питательные среды:

Среда АН1-УГСХА (среда накопления) следующего состава:

1. Вода дистиллированная – 100 мл,
2. Сульфат магния – 0,02 г,
3. Фосфат калия 2-замещенный – 0,1 г,
4. Хлористый натрий – 0,5 г,
5. Глюкоза – 0,5 г,
6. Бромтимоловый синий – 0,003 г,
7. Стерилизация при 0,5 атм 15 мин,
8. После стерилизации асептически добавляли 0,5 мг ампициллина.

Глюкоза в данной среде служит источником углерода и доступна в качестве питательного субстрата для бактерий *A. salmonicida*. Фосфат калия двузамещенный, сульфат магния и хлорид кальция необходимы для обеспечения биохимических процессов в клетках *A. salmonicida*. Ампициллин используется в качестве селективной добавки [2]. Бромти-

моловый синий является индикатором снижения рН среды вследствие окисления глюкозы.

Среда АН2-УГСХА (плотная селективная среда) следующего состава:

1. Вода дистиллированная – 100 мл,

2. Агар-агар – 1,5 г,

3. Пептон – 0,5 г,

4. Дрожжевой экстракт – 0,3 г,

5. Сульфат магния – 0,02 г,

6. Калий 2-замещенный – 0,1 г,

7. Глюкоза – 0,5 г,

8. Стерилизация при 0,5 атм 15 мин,

9. Хлорид бария – 0,5 г,

После стерилизации асептически добавляли:

10. Трифенилтетразолий хлорид – 2 мл 10%-ного раствора,

11. Ампициллин – 0,5 мг.

Пептон является источником аминокислот, калий фосфорнокислый двузамещенный и магний сернокислый обеспечивают электролитный состав среды, необходимый для биохимических процессов. В качестве ингибитора посторонней микрофлоры был выбран ампициллин. Хлорид бария в указанной концентрации также эффективно ингибирует рост бактерий-ассоциантов рода *Pseudomonas*.

Первоначальным этапом исследования являлся посев 1 мл исследуемого субстрата на 5 мл накопительной питательной среды АН1-УГСХА:

После 24-48 часов культивирования при оптимальной для *A. salmonicida* температуре (20-22°C) наблюдалось помутнение прозрачного бульона, образование поверхностной плёнки, осадка, рост бактерий сопровождался изменением окраски среды с голубой на желто-зеленую.

С накопительной среды АН1-УГСХА производили посев по методу Дригальского на чашки Петри с плотной селективной средой АН2-УГСХА. После культивирования на данной среде в течение 24 часов при 20-22 °С, на ее поверхности были обнаружены однородные блестящие колонии округлой формы с ровными краями бордового цвета, плотной консистенции размером от 1 до 5 мм.

На этом этапе, при использовании разработанной нами схемы выделения и питательных сред, было выделено 30 штаммов бактерий.

После получения чистых культур, проводилось исследование их биохимических свойств по предлагаемым нами тестам:

- тест на оксидазу,

- тест на каталазу,
- тест на подвижность,
- окраска по Граму и микроскопия,
- тест на выделение газа из глюкозы,
- тест на выделение кислоты из глюкозы,
- тест на восстановление нитрата,
- тест на выделение кислоты из лактозы (среда Эндо),
- тест на гидролиз желатиназы,
- тест на использование цитрата (среда Симмонса).

Для оптимизации проведения теста на подвижность, окисления глюкозы и выделения газа из глюкозы, нами была разработана среда АНЗ-УГСХА, позволяющая объединить указанные тесты.

Состав среды АНЗ-УГСХА

1. Вода дистиллированная – 100 мл,
2. Агар-агар – 0,3 г,
3. Пептон – 0,5 г,
4. Сульфат магния – 0,02 г,
5. Калий 2-замещенный – 0,1 г,
6. Глюкоза – 0,5 г,
7. Хлористый натрий – 0,5 г
8. Стерилизация при 0,5 атм 15 мин,

Поскольку глюкоза в данной среде служит единственным источником углерода, способность бактерий к росту на ней указывает на наличие ферментативной либо окислительной активности по глюкозе. Фосфат калия двузамещенный, сульфат магния и хлорид кальция необходимы для обеспечения биохимических процессов в клетках *A. salmonicida*. После 24 часов культивирования в пробирках наблюдался рост неподвижных бактерий по линии укола петли, а так же наличие или отсутствие образования газа из глюкозы в виде пузырьков в столбике агара.

Результаты биохимических исследования представлены в таблице 1 и позволяют сделать вывод о том, что выделенные нами штаммы относятся к бактериям рода *Aeromonas*.

Таблица 1 – Биологические свойства выделенных штаммов

Признак	Количество штаммов с положительными для <i>Aeromonas salmonicida</i> результатам и	Процент штаммов с положительными для <i>Aeromonas salmonicida</i> результатами
1. оксидаза	30	100
2. каталаза	30	100

3. подвижность	30	100
4. окраска по грамму	30	100
5. восстановление нитрата	28	93.3
6. выделение газа из глюкозы	30	100
7. выделение кислоты из глюкозы	30	100
8. выделение кислоты из лактозы	30	100
9. тест на желатиназу	20	67
10. использование цитрата	25	83.3

По данным определителя Берджи (2005) и практическому руководству по идентификации бактериальных болезней рыб (Buller N.B. 2004) для вида *Aeromonas salmonicida* характерны следующие результаты по указанным тестам (таб. 2):

Таблица 2 – Биологические свойства, характерные для *Aeromonas salmonicida* (по данным определителя Берджи и Практическому руководству бактериальных болезней рыб)

Признаки	Определитель Берджи	Практическое руководство бактериальных болезней рыб
1. оксидаза	+	+
2. каталаза	+	+
3. подвижность	+	+
4. окраска по грамму	-	+
5. восстановление нитрата	+	+ / -
6. выделение газа из глюкозы	+ / -	+ / -
7. выделение кислоты из глюкозы	+	+
8. выделение кислоты из лактозы	+/-	-
9. тест на желатиназу	+	+
10. использование цитрата	+/-	-

Заключение

Исходя из этих данных, нами был сделан вывод, что из 30 выделенных культур, 28 штаммов (93,3 %) проявляют аналогичные свойства,

что позволяет отнести их к виду *Aeromonas salmonicida*.

Таким образом, разработанная нами схема позволяет дифференцировать *Aeromonas salmonicida* от других видов бактерий и выделять данный микроорганизм из объектов окружающей среды.

Библиографический список

1. Блинов А.И., Глушанова Н.А. // Аэромонады: выделение, идентификация и дифференциация, учебно-методические рекомендации, Новокузнецк, 1997

2. Канаева Т.И. Разработка методов выделения и идентификации бактерии *Aeromonas hydrophila*. // автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Саратов, 2009.

3. Методические указания по санитарно-бактериологической оценке рыбохозяйственных водоемов. Указание министерство Здравоохранения РФ. 27 сентября 1999г. № 13-4-2/1742.

4. Определитель Берджи в 2-х томах. : Под ред. Дж.Хоулта, Н.Крига, П.Снита, Дж.Стейли, С.Уильямса. – 2005

5. Nicky B. Buller *Bacteria from Fish and Other Aquatic Animals A Practical Identification Manual*. 2004

6. Hirvela-koski Varpu. *Fish pathogens aeromonas salmonicida and renibacterium salmoninarum: diagnostic and epidemiological aspects.*// academic dissertation, Helsinki, on September 23th 2005 (перевод).

DEVELOPMENT SCHEMES ISOLATED BACTERIA AEROMONAS SALMONICIDA

Kooklina N.G., Gorshkov I.G., Viktorov.D.A., Vasilyev D.A.

Keywords: Aeromonas salmonicida, culture media, bacteriological tests, biochemistry, microbiology, biotechnology.

We designed specific culture media for bacteria of the genus Aeromonas: Wednesday accumulation and selective media picked bacteriological tests for the differentiation of Aeromonas salmonicida from other aeromonads, the author developed a test to identify Aeromonas salmonicida.