

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«УЛЬЯНОВСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ  
АКАДЕМИЯ ИМЕНИ П.А.СТОЛЫПИНА»

На правах рукописи

**Куклина Наталья Григорьевна**

**БАКТЕРИОФАГОВЫЙ ПРЕПАРАТ ДЛЯ ИНДИКАЦИИ И  
ИДЕНТИФИКАЦИИ *AEROMONAS SALMONICIDA***

06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология,  
микология с микотоксикологией и иммунология

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание учёной степени кандидата биологических наук

**Научный руководитель:**

доктор медицинских наук,  
профессор

**Нафеев Александр Анатольевич**

Ульяновск – 2017

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	9
1.1. Систематика бактерий рода <i>Aeromonas</i> .....	9
1.2. Биологические, морфологические, культуральные признаки бактерий вида <i>A. salmonicida</i> .....	11
1.3. Антибиотикоустойчивость бактерии <i>A. salmonicida</i> .....	16
1.4. Патогенность бактерий <i>Aeromonas</i> .....	17
1.5. Аэромоназы рыб.....	19
1.6. Микробиологические методы идентификации бактерии вида <i>A. salmonicida</i> .....	23
1.7. Фагодиагностика бактерий.....	27
1.8. Биологические свойства и особенности бактериофагов рода <i>Aeromonas</i> .....	33
2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	35
2.1. Материалы и методы.....	35
2.2. Результаты собственных исследований.....	39
2.2.1. Изучение культуральных и тинкториальных свойств бактерии <i>A. salmonicida</i> .....	39
2.2.2. Изучение антибиотикочувствительности <i>A. salmonicida</i> .....	48
2.2.3. Конструирование жидкой накопительной среды и диагностическо-дифференциальной среды для выделения <i>A. salmonicida</i> .....	51
2.2.4. Определение специфичности сконструированных сред А. Sl.1-УГСХА и А. Sl.2-УГСХА.....	57
2.2.5. Разработка схемы выделения и идентификации <i>A. salmonicida</i> .....	62
2.2.6. Выделение бактериофагов <i>A. salmonicida</i> .....	70
2.2.7. Изучение основных биологических свойств выделенных бактериофагов.....	78

2.2.8. Определение технологических параметров изготовления и контроля бактериофагового биопрепарата для идентификации и индикации <i>A. salmonicida</i> .....	83
2.2.9. Разработка оптимальных условий постановки реакции нарастания титра фага.....	85
3. ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	95
ВЫВОДЫ.....	100
ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ.....	102
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ.....	103
СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....	104
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	106
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	126

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Бактерии рода *Aeromonas* были идентифицированы еще в конце XIX века, долгое время их считали сапрофитами, циркулирующими в воде открытых водоемов. Аэромонады широко распространены в окружающей среде: их выделяют из речной и морской воды, сточных вод, почвы, от гидробионтов (рыб, кальмаров, крабов, креветок и т.п.) (Khadori N., Fainstein V., 1988).

Бактерия *Aeromonas salmonicida* является возбудителем фурункулеза (аэромоноза) лососевых, который был впервые описан Эммерихом и Вайбелем еще в 1894 году в Германии (Kumar D., 1997). До недавнего времени считалось, что *A. salmonicida* поражает рыб только семейства лососевые, но современные исследования показывают, увеличение количество инфицированных рыб других семейств. (Janda J.M. et al., 2010, Fernandez-Alvarez C., et al, 2016). Фурункулез - это высококонтагиозная болезнь, протекающая остро, подостро и хронически. Зараженные рыбы с открытыми ранами являются источниками распространения *A. salmonicida*. В связи с высокой плотностью выращивания рыбы в хозяйствах, эта болезнь быстро распространяется с высоким процентом летальности (Головина Н.А., и др., 2003).

В настоящее время не существует достаточно четкой разработанной схемы выделения и идентификации данного микроорганизма, а значит и бактериологической диагностики данного заболевания.

**Цель исследования** – усовершенствование методов выделения, идентификации и индикации бактерии *A. salmonicida*.

Для достижения поставленной цели решались следующие **задачи**:

1. Изучить биологические свойства референс-штамма бактерии *A. salmonicida*, по результатам проведенных исследований разработать комплекс специальных бактериологических сред, состоящий из - жидкой накопительной и дифференциально-диагностических сред – для выделения и идентификации *A. salmonicida*, а также комплексную схему выделения и идентификации бактерии

*A. salmonicida*, с подобранными бактериологическими тестами по идентификации бактерий и фаговым биопрепаратом для постановки спот-теста;

2. Выделить из объектов окружающей среды бактериофаги, специфичные для *A. salmonicida* и изучить их основные биологические свойства - морфологию негативных колоний, литическую активность, спектр литической активности, специфичность действия, устойчивость к агрессивным факторам внешней среды (температуре и хлороформу);

3. Селекционировать бактериофаг для разработки фагового биопрепарат;

4. Отработать технологию получения и определить оптимальный срок и условия хранения сконструированного фагового биопрепарата;

5. Модернизировать схему реакции нарастания титра фага (РНФ) для индикации *A. salmonicida* в соответствии с биологическими свойствами бактерии данного вида и селекционированного бактериофага;

6. Изучить ареал распространения *A. salmonicida* в Ульяновской области.

**Научная новизна.** Впервые предложена комплексная схема выделения и идентификации *A. salmonicida*, включающая использование специализированных бактериологических сред - среды накопления А.С1.1-УГСХА, дифференциально-диагностической среды А.С1.2-УГСХА, ряд бактериологических тестов, направленных на идентификацию тинкториальных, биохимических и культуральных свойств бактерии искомого вида и сконструированный бактериофаговый биопрепарат для постановки спот-теста. Использование данной схемы позволяет выделять и типировать штаммы *A. salmonicida* из объектов санитарного надзора за 60-84 часа.

Выделены и селекционированы бактериофаги, специфичные к бактериям *A. salmonicida*, с изученными, по заданным параметрам, биологическими свойствами, на основе отобранного бактериофага разработан биопрепарат для индикации *A. salmonicida*.

Определены биотехнологические параметры для конструирования фагового биопрепарата и апробирована постановка схемы реакции нарастания

титра фага для выявления бактерии *A. salmonicida* из объектов санитарного надзора.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Предложена комплексная схема выделения и идентифицирования до вида бактерии *A. salmonicida* из объектов санитарного надзора, которая включает в себя разработанную среду накопления А.С1.1-УГСХА, дифференциально-диагностическую среду А.С1.2-УГСХА, систему бактериологических тестов и фаговый биопрепарат для спот-теста. Разработана технология получения фагового препарата, отработана и апробирована схема индикации и идентификации бактерий *A. salmonicida* методом реакции нарастания титра фага. Материалы диссертационной работы используются в учебном процессе при чтении лекций, для практических занятий студентов, работы аспирантов на кафедрах Ульяновской ГСХА им. П.А. Столыпина и УлГПУ им. И. Н. Ульянова. (Приложение 1).

**Методология и методы исследования.** При проведении исследований были использованы общенаучные и специальные методы: теоретико-методологический анализ литературных источников, микробиологические методы исследования, экспериментальные методы и методы статистического анализа.

**Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Комплексная схема выделения и идентификации бактерии *A. salmonicida*, включающая сконструированные бактериологические питательные среды (жидкая среда накопления А.С1.1-УГСХА, обеспечивающая преимущественный рост и размножение бактерий *A. salmonicida* и плотная дифференциально-диагностическая среда А.С1.2-УГСХА, позволяющая дифференцировать штаммы *A. salmonicida* от бактерий других видов и родов), бактериологические тесты и фаговый биопрепарат Аs125-УГСХА для постановки спот-теста.

2. Выделены бактериофаги *A. salmonicida* в количестве 17 штаммов из объектов водной среды.

3. Селекционирован бактериофаг As125-УГСХА как основа биопрепарата для идентификации и индикации *A. salmonicida* в объектах санитарного надзора, разработаны технологические параметры создания и определены оптимальные сроки и условия хранения фагового препарата;

4. Модифицирована схема индикации бактерии *A. salmonicida* методом РНФ с применением предлагаемого биопрепарата бактериофага As125-УГСХА, что позволяющая выявлять бактерии *A. salmonicida* за 28 часов.

Работа выполнена на кафедре микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы ФГБОУ ВО «Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия им. П.А. Столыпина».

**Степень достоверности и апробация работы.** Высокая степень достоверности результатов проведенных исследований подтверждается применением общепринятых и современных микробиологических и вирусологических методов и обработки информации. Использование перечисленных методов и статистический анализ экспериментальных данных обеспечили объективность и достоверность полученных результатов и выводов. Основное содержание и материалы диссертации представлены на: III-й Международной научно-практической конференции молодых ученых «Молодежь и наука XXI века» (Ульяновск, 2010), Международной научно-практической конференции «Ветеринарная медицина XXI века: инновации, опыт, проблемы и пути их решения» (Ульяновск, 2011), Международной научно-практической конференции «Задачи ветеринарной науки в реализации доктрины продовольственной безопасности Российской Федерации» (Покров, 2011), Международной научно – практической конференции молодых ученых и специалистов, (Троицк, 2012), IV-й, V-й, VI-й Международных научно-практических конференциях «Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения» (Ульяновск, 2012, 2013, 2014), Международной научно-практической конференции «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности» (Ульяновск, 2013), Международной научно-

практической конференции «Биотехнология: реальность и перспективы в сельском хозяйстве» (Саратов, 2013), Международной научно-практической конференции «Стратегия инновационного развития агропромышленного комплекса» (Курган, 2013), VIII-й Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика» (Москва, 2014), VIII-й Всероссийской научно-практической конференции «Аграрная наука в XXI веке: проблемы и перспективы» (Саратов, 2014), III-й Международной научной Интернет-конференции «Биотехнология. Взгляд в будущее» (Казань, 2014), Всероссийской научной конференции с международным участием, посвященная 10-летию создания кафедры ботаники и экологии растений и кафедры микробиологии СурГУ (Сургут, 2015), III-й научно-практической конференции с международным участием «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности» (Москва, 2016).

**Публикации.** По теме диссертации было опубликовано 23 работы, из них 4 статьи в изданиях, рекомендованных ВАК РФ.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из введения, трех глав: обзора литературы, собственных исследований, состоящих из объекта, материалов и методов, заключения, выводов, практических предложений, перспективы дальнейшей разработки темы, списка литературы, приложений. Материалы диссертации изложены на 128 страницах, включает в себя 22 таблицы и 18 рисунков. Список использованных литературных источников включает в себя 160 наименований - 76 отечественных и 84 иностранных.



## ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Классификация бактерий рода *Aeromonas*

Впервые род *Aeromonas* описал в своей работе Санарелли в 1891 году, хотя Циммерман уже в 1890 году в Хемнице смог выделить *Bacillus punctatus* из питьевой воды, а Эрнст в 1890 году выделил из тканей лягушки *Bacillus rancida*, но описания этих видов оказалось недостаточно для однозначного присвоения их к современному роду *Aeromonas* (Knut K., 2001).

Позднее, по признаку подвижности, бактерии рода *Aeromonas* были разделены на две основные группы – мезофильные (подвижные) штаммы (Schubert R. H. W., 1968), оптимальная температура роста которых 35°- 37°С, вызывающие с различные инфекции у человека и психрофильные (неподвижные) штаммы, для которых благоприятна температура роста - 22°-25°С и являющиеся причиной заболеваний рыб (Janda J. M., 1991).

В издании Bergey's Manual of Systematics Bacteriology (1997) род *Aeromonas* включен в семейство *Vibrionaceae*. Однако, после проведенного исследования рРНК-ДНК гибридизации представителей данного семейства, было выяснено, что род *Aeromonas* существенно отличается от других родов в семействе *Vibrionaceae* и должен быть выделен в отдельное семейство *Aeromodaceae* (Martinez-Murcia A. J. et al., 1992). Результаты исследований ДНК-гибридизации хорошо коррелируют с биохимическими исследованиями (Altwegg M. et al, 1990).

На основании метода ДНК-ДНК гибридизации род *Aeromonas* разделен на 14 видов (геномогрупп) (Carnahan A. M. et al., 2005). Позже число видов в роду увеличилось до 17 (Yanez M. A. et al., 2003). К настоящему времени признаны следующие виды *Aeromonas*: *A. hydrophila*, *A. bestiarum*, *A. salmonicida*, *A. caviae*, *A. media*, *A. eucrenophila*, *A. sobria*, *A. veronii*, *A. jandaei*, *A. schubertii*, *A. trota*, *A. allosaccharophila*, *A. encheleia*, *A. popoffii* и *A. culicicola* (Soler L. et al., 2004), *A.*

*molluscorum* (Minana-Galbis D. et al., 2002), *A. sharmana* (Saha P. et al., 2006), *A. bivalvium* (Minana-Galbis D. et al., 2007), *A. tecta* (Demarta A. et al., 2008).

В 1963 году было получено первое сообщение о нетипичном виде *A. salmonicida* (Smith J.W., 1963).

Возникновение "отклоняющихся" или "нетипичных" штаммов вызвало переосмысление систематики вида *A. salmonicida*. Сначала было разделение на две подвидности: *A. salmonicida subsp. salmonicida* и *subsp. achromogenes* (Schubert R.H.W., 1967). Затем на основе биохимических характеристик было предложено разделение на типичные и нетипичные штаммы без деления на подвиды (McCarthy D.H., 1977). Исследования McCarthy и Roberts (1980) указали на существование трех главных групп среди *A. salmonicida*: типичные штаммы, нетипичные штаммы, поражающие рыбу семейства лососевых и нетипичные штаммы, поражающую рыбу, относящуюся к другим семействам. Три группы соответственно назвали *A. salmonicida subsp. salmonicida*, *subsp. achromogenes* (также содержащий бывший *subsp. masoucida*) и *subsp. nova* (McCarthy D.H., Roberts R. J., 1980). Позже произошло разделение на следующие подвиды: *subsp. salmonicida*, *subsp. achromogenes* и *subsp. masoucida* (Popoff M., 1984), *subsp. smithia* (Austin D.A. et al., 1989) и *subsp. pectinolytica* (Pavan M. E. et al., 2000).

Скандинавская группа исследователей, совместно с представителями Норвегии, Швеции, Дании, Финляндии, Фарерских островов и Исландии выпустила руководство по надзору и диагностике заболеваний у культивируемых лососей. В первом выпуске 1992 года, вид *A. salmonicida* разделен на две группы на основе фенотипических свойств: *A. salmonicida subsp. salmonicida* и другие штаммы *A. salmonicida*, включая *subsp. achromogenes*, *subsp. masoucida* и т.д. (Midtlyng P. J. et al., 1992). В следующем выпуске руководства номенклатура *Aeromonas* была пересмотрена. Было выявлено, что фурункулез и язвенный дерматит может быть вызван как *A. salmonicida subsp. salmonicida*, так и *A. salmonicida subsp. achromogenes*, *subsp. masoucida*, *subsp. nova* и другими нетипичными штаммами (Midtlyng P.J. et al., 2000).

## 1.2 Биологические, морфологические и культуральные признаки бактерии вида *A. salmonicida*

Бактерии вида *A. salmonicida* представляют собой короткие грамотрицательные палочки, которые могут быть соединены между собой в пары или цепи (Gilardi G. L., 1970).

Редко подвижные. Поверхность покрыта S-слоем, играющим значительную физиологическую роль – усиливает клеточную филаментацию и чувствительность к некоторым антибиотикам (Garduno R. A. et al., 1994, Noonan B., Trust T. J., 1995). Оптимальная температура роста 22-25°C. Максимальная температура роста в питательном бульоне 34,5°C (Austin D.A., 2012). Колонии на мясо-пептонном агаре после 24 ч. заостренные. После 48-72 ч. колонии округлые, выпуклые, полупрозрачные, цельные и хрупкие. (Altwegg M., 1990).

На кровяном агаре морфология колоний сходная и некоторые подвиды могут производить гемолиз после 2-4 суток. (Millership S.E., 1996).

Пигментация колоний обычно желтоватая; отсутствие пигментации отражено серовато-белым цветом колонии. Коричневый, растворимый пигмент появляется после 24 ч и достигает максимального цвета через 48-72 ч (Griffin P. J. et al., 1953).

При посеве культур на среду Эндо с молоком, в отличие от бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, которые дают окраску от розового до малинового цвета колоний, аэромонады вырастают в виде бледно-розовых, с оранжевым оттенком. Круглые, иногда плоские колонии с протеолитической зоной и с характерным запахом (Дугажурпова Е. Д., 2012).

При неблагоприятных условиях штаммы *A. salmonicida* могут переходить в некультивируемое, но жизнеспособное состояние (Morgan J. A., 1993).

Атипичные штаммы *A. salmonicida* способны к секреции экзотоксинов PL, LCATA, AsaPL, P2-металложелатиназы и сериновой казеиназы (Gudmundsdottir S. et al, 2003).

*A. salmonicida* subsp. *salmonicida* способна образовывать коричневый водорастворимый пигмент на агаре, содержащем 0,1% эскулина или фенилаланина, также образует гемолиз на агаре из бычьей крови, способна к гидролизации эскулина, образование индола не происходит, способна к образованию газа из D-глюкозы, ферментирует салицин и L-арабинозу (Diamanka A., et al, 2014). В геноме данного подвида содержатся гены трех типов пили (Boyd J. M., et al, 2008).

*A. salmonicida* subsp. *achromogenes* не производит коричневый, водорастворимый пигмент, если не выращена на специфической среде, такой как триптико-соевый или триптико-кровяной агар. Образует индол, аргинин положителен, образует кислоту из маннитола, и ассимилирует N-ацетил глюкозамин. Не образует газ из D-глюкозы, эскулин не гидролизует; на кровяном агаре гемолиза не происходит (Gudmundsdottir B. K., et al, 1990).

*A. salmonicida* subsp. *masoucida* (Kimura T. A., 1969) не производит коричневый, водорастворимый пигмент на агаре; образует гемолиз на кровяном агаре; может гидролизировать эскулин; аргинин положительна; образует газ из D-глюкозы; ферментирует L-арабинозу; не ассимилирует N-ацетил глюкозамин.

*A. salmonicida* subsp. *pectinolytica* (Pavan M. E., et al, 2000) - колонии были изолированы из сильно загрязненных рек. Способен к производству меланина, растет при 37°C, также наблюдается рост в бульоне с KCN, образует газ из глюкозы, ферментирует маннитол и сахарозу.

*A. salmonicida* subsp. *smithia* (Austin D. A., et al., 1989) - неподвижная, примерно 1-2 мм в размере, с закругленными концами. Через несколько часов после начала культивирования начинает производить коричневый растворимый пигмент. Оптимальный рост при 4-25° С, при 30° С и в 0-2% растворе NaCl рост отсутствует. Штамм *A. salmonicida* subsp. *smithia* - каталаза- и оксидаза положителен, способен к образованию сероводорода, способен к ферментации фосфатазы и фосфоамидазы, не способен к образованию индола, аргинина, лизина, орнитина, фенилаланина, ДНКазы положителен, разжижает желатин, не

гидролизует эскулин, не производит гемолиз (Austin B., et al., 1998). Патогенен для рыбы, гибель наблюдается в течение 24-72 ч.

В 2004 году из каменной камбалы (*Kareius bicoloratus* L.) был выделен и исследован новый штамм *A. salmonicida*. На основании исследования его биологических характеристик (морфологических, культуральных, физиологических, биохимических и серологических), а также на основании результатов исследования молярных% Г-Ц пар, этот штамм отнесен к новому подвиду *flounderacida* (Zhang X., et al, 2004).

Сравнительная характеристика биохимических свойств подвидов бактерий *A. salmonicida* представлена в табл.1 (Bergeys Manual of Systematics Bacteriology, 1997)

Таблица 1. Сравнительная характеристика биохимических свойств бактерии *A. salmonicida*

Тест	<i>A. salmonicida</i>			
	<i>achromogenes</i>	<i>masoucida</i>	<i>salmonicida</i>	<i>smithia</i>
Индол	+	+	-	-
Проба с метиловым красным	+	+	+	-
Реакция Фогеса-Проскауэ	-	+	-	-
Использование цитрата (среда Симмонса)	-	-	-	-
Образование H <sub>2</sub> S	-	+	-	+
Гидролиз мочевины	-	-	-	-
Фенилаланиндезаминаза	-	-	-	-
Лизиндекарбоксилаза	В	В	В	-
Аргининдигидролаза	+	+	+	(-)
Орнитиндекарбоксилаза	-	-	-	-
Гидролиз желатина	+	+	+	+
Рост в присутствии KCN	-	-	-	
Использование малоната	-	-	-	
Образование кислоты из Д-глюкозы	+	+	+	(+)
Образование газа из Д-глюкозы	-	+	+	(+)
Образование кислоты из Целлобиозы	-	-	-	-
Дульцитола	-	-	-	
Эритритола	-	-	-	
Д-галактозы	+	+	+	-
Глицерола	В	В	В	(-)
Мио-инозитола	-	-	-	-

Лактозы	-	-	-	-
Мальтозы	+	+	+	-
Д-маннитола	-	+	+	-
Д-маннозы	+	+	+	
Мелибиозы				
<i>B</i> -метил-Д-глюкозида				
Рафинозы	-	-	-	-
L-рамнозы	-	-	-	
Салицина	<b>в</b>	<b>в</b>	<b>в</b>	
Д-сорбитола	-	-	-	(-)
Сахарозы	+	+	-	<b>в</b>
Трегалозы	+	+	+	-
Д-ксилозы	-	-	-	-
Гидролиз эскулина	-	+	+	-
Мукат, кислота	-	-	-	
Тартрат (среда Джорданса	-	-	-	
Использование ацетата				
Липаза (кукурузное масло)	+	+	+	-
ДНКазы	+	+	+	+
Восстановление нитрата	+	+	+	
Оксидаза	+	+	+	+
Цитрат (среда Кристенсена	-	-	-	
Просветление среды с тирозином				

Примечание: - 0-10% штаммов положительные, (-) 11-25% штаммов положительные, в- 26-75% штаммов положительные, (+) 76-89% штаммов положительные, +90-100% штаммов положительные.

В издании Bergeys Manual of Systematics Bacteriology (2007) приводится характеристика не только типичных штаммов *A. salmonicida*, но и атипичного штамма (табл. 2).

Таблица 2. Дифференциальная характеристика различных штаммов *A. salmonicida*

Признак	<i>A. salmonicida</i>					Атипичный <i>A. salmonicida</i>
	<i>achromogenes</i>	<i>masoucida</i>	<i>salmonicida</i>	<i>salmonicida</i>	<i>smithia</i>	
Штамм	ATCC 33659	ATCC 27013	ATCC 33658	47 strains	ATCC 49393	34 strains
Подвижность	- (100%)	-	-	-	-	- (100%)
β-гемолиз	-	+	+	+ (100%)	-	- (100%)
Оксидаза	+	+	+	+ (100%)	+	+ (100%)
Образование коричневого пигмента	+	-	+	+ (100%)	-	+ (68%)
Гидролиз эскулина	-	+	+	+ (100%)	-	- (97%)
Индол	+	+	-	- (100%)	-	+ (18%)
Гидролиз аргинина	+	+	-	- (100%)	-	
Реакция Фогес- Проскауэра	-	+	-		-	
Ферментация D-глюкозы	+	+	+	+ (100%)	+	+ (100%)
Выделение газа из D- глюкозы	-	+	+	+ (100%)	-	- (97%)
Ферментация						
Сахарозы	+	+	-	- (100%)	+	+ (100%)
Мальтозы	+	+	+	+ (100%)	+	+ (100%)
Салицина	-	-	+	+ (100%)	-	- (100%)
Арбутина	-	-	+	+ (91%)	-	- (100%)
D-галактозы	+	+	+	+ (100%)	-	+ (76%)
D-маннитола	-	+	+	+ (100%)	-	+ (94%)
L-арабинозы	-	+	+	+ (100%)	-	- (100%)
Инозитола	-	-	-	- (100%)	+	+ (37%)

Примечание: «-» - отрицательная реакция; «+» - положительная реакция.

### 1.3 Антибиотикоустойчивость

Исследования штаммов *A. salmonicida*, выделенных из радужной форели (*Oncorhynchus mykiss*) рыбоводческих хозяйств Австралии, показали устойчивость к амоксициклину, цефалотину, тетрациклину, в значительной степени флорфениколу и сульфаметоксазолу (Akinbowale O. L., et al., 2007).

Некоторые штаммы *A. salmonicida* устойчивы к окситетрациклину (Adams C. A., et al., 1998).

Французские исследователи показывают, что резистентность к хлорамфениколу встречается более часто и в большей степени, чем устойчивость к флорфениколу (Michel C., et al, 2003). Кроме того, был идентифицирован ген устойчивости к хлорамфениколу - *catA2* (Sorum H., 2003).

Три штамма *A. salmonicida* показали устойчивость к бета-лактамам, в т.ч. к карбапензам и амоксициллину (Hayes M.V., et al., 1994)

Штаммы, изолированные из лососевых рыб, выращиваемых в фермах Дании, Норвегии, Шотландии, Канады и США были проверены на восприимчивость к 22 противомикробным агентам (Dalsgaard I., et al., 1994). Антибиотикограммы выявили возрастающую резистентность к окситетрациклину и квинолону.

В нескольких странах были обнаружены мультирезистентные штаммы. Из *A. salmonicida* были выделены плазмиды, отвечающие за резистентность к стрептомицину, хлорамфениколу, тетрациклину и сульфатиазолу (Aoki T., et al., 1971).

Было выявлено, что существуют штаммы, содержащие плазмиды передающие и кодирующие резистентность к ампициллину, цефалексину, эритромицину и фуразолидону, либо в одиночку, либо в комбинации (Chaudhury et al., 1996).

Также отмечены случаи скоротечного формирования антибиотикорезистентных мутантов *in vitro*. Формирование мутантов,



резистентных к цефтазидиму, происходило в 5% случаев, к цефтриаксону в 5%, к гентамицину – 10% случаев (Гаврилин К. В., 2008).

Для более эффективного воздействия на аэромонады существенное значение придавалось профилактическому скормливанию карпам препаратов других фармакологических групп – фуразолидона, метиленовой сини, сульфаниламидных препаратов (Бабенко О.В., Оганесян, 1997).

#### **1.4 Патогенность бактерии *A. salmonicida***

Некоторые авторы считают, что в возникновении аэромоноза основную роль играет группа условно-патогенных аэромонад с приобретенной или индуцированной вирулентностью, возникшей в результате воздействия определенных факторов внешней среды или пассирования через организм рыб (Юхименко Л.Н. и др., 2000).

У вирулентных аэромонад отмечается высокая степень инвазивности (инфективности) вследствие наличия у них выраженных адгезивных свойств и способности проникать как через тканевые барьеры, так и внедряться в эпителиальные клетки (Leung K. Y., 1996; Соколова Н. А. и др., 2000; Иренков И.П. и др., 2001). Кроме того, в структуре бактериальной клетки присутствует липополисахарид, на который у рыб может возникать иммунная защитная реакция, при этом его количество не влияет на степень поражения тканей и органов (Voltaña S., et al., 2014).

Адгезины у аэромонад являются атрибутом приспособления к условиям окружающей среды и необходимы для запуска инфекционного процесса патогенными бактериями (Шимко В. В., 1991; Вовк Н.И., 2007).

Исследования, проведенные В.Ф. Борисенко (1991), свидетельствуют, что степень дезоксирибонуклеазной активности аэромонад, выделенных от больных рыб, находится в прямой зависимости от способности вызывать патологический процесс. Вирулентные аэромонады, обладающие ДНК-азной активностью, выделенные из патологического материала от рыб с признаками острого течения

болезни, постоянно дают положительный результат при постановке биопробы на карпах.

*A. salmonicida* – болезнетворный микроорганизм, вызывающий инфекционные заболевания рыб. Клинический фурункулез – септическая болезнь, которая проявляется как молниеносная, острая, подострая или хроническая форма. Острые формы вызывают высокую смертность, в то время как в подострых и хронических формах начало болезни более постепенное и смертность относительно низкая (Головина Н. А., 2003).

При изучении трех предполагаемых генов вирулентности – Aer, HLY, alt – наиболее распространенным геном является HLY (Zhou Q. L., et al., 2013).

*A. salmonicida*, как и другие виды *Aeromonas*, обладает следующими факторами патогенности – продукция адгезина, гемолизина, лецитиназы, амилазы, липазы, протеазы, дезоксирибонуклеазы, усваивают конго красный (Журавлева Л. А., 1998).

Установлено, что бактерии рода *Aeromonas* способны образовывать биопленки, способны инактивировать лизоцим, обладают гемолитической активностью и отсутствием плазмокоагулазы (Катаева Л.В., и др., 2015).

Основным летальным токсином *A. salmonicida* является глицерофосфолипид – холестеринацилтрансфераза (Hussain I., et al., 2000).

*A. salmonicida* subsp. *salmonicida* содержит токсин ADP-рибозилтрансфераза, обнаруживающий сходство с экзотоксинами синегнойной палочки и цитотоксином различных видов иерсиний (Braun M., et al., 2002). Данный токсин является белком, выделяемый при помощи секреторной системы III типа (Burr S.E., et al., 2005).

Подвид *A. salmonicida* subsp. *achromogenes* производит токсичные металлопептидазы, относящиеся к группе внеклеточных пептидаз являющиеся достаточно вирулентным при поражении рыб (Arnadottir H. et al., 2009).

*A. salmonicida* поражает в первую очередь желудочно-кишечный тракт рыб, что объясняется особенностью муцинового слоя кишечника (Padra J. T., et al., 2014).

Для более полного понимания факторов вирулентности был изучен геном *A. salmonicida*. Данное исследование показало наличие определенного количества генов, определяющих факторы вирулентности, в тоже время отсутствующих у других видов бактерий рода *Aeromonas* (Reith M. E., et al, 2008).

У карпа под воздействием патогенных аэромонад зафиксировано необратимое изменение структуры ядер эритроцитов – конденсация ядерного хроматина вблизи мембраны (Волынкин Ю. Л., 2007).

Хроническое течение аэромоноза вызывает сдвиг в системе антиоксидантной защиты. Отмечено уменьшение значений каталазы, пероксидазы, церулоплазмينا. Развивающийся патологический процесс в организме рыб при инфицировании ускоряет интенсивность свободно-радикальных реакций, в результате в органах и тканях накапливаются токсические перекиси липидов, концентрация малонового диальдегида увеличивается в среднем в два раза. Емкости системы антиоксидантной защиты при этом недостаточно для стабилизации процессов окисления в пределах нормального уровня, что выразалось в снижении концентрации фосфолипидов в крови рыб и активности ферментативного звена антиокислителей. Избыточная активация процессов свободнорадикального окисления и является одним из факторов патогенеза данной болезни. (Дрошнев А. Е., 2010, Борисова М. Н., 2003, 2004)

## 1.5 Аэромонозы рыб

Фурункулез (аэромоноз лососевых рыб) - инфекционная болезнь лососевых рыб, культивируемых в рыбоводных хозяйствах или обитающих в реках, озерах и открытых водоемах (морях) (Инструкция о мероприятиях по профилактике и мерам борьбы с фурункулезом лососевых рыб, 1997).

Бактерии рода *Aeromonas* являются одним из основных компонентов бактериальной флоры воды, особенно загрязненных органическими веществами.

В условиях интенсивного рыбоводства могут возникать вспышки, вызываемые высоковирулентными формами аэромонад, приводящие к массовой гибели рыб (Неретин М.В., 2005).

Возбудителем болезни является бактерия *Aeromonas salmonicida*, относящаяся к роду *Aeromonas*, семейству *Aeromonadaceae*.

*Эпизоотология.*

Фурункулезом болеют палия, ручьевая и радужная форель, проходные тихоокеанские и атлантические лососи, реже рыбы из других семейств (Суханова Е.В., и др., 2010).

Наиболее восприимчивы к фурункулезу рыбы старше двухлетнего возраста. Источником фурункулеза являются больные и переболевшие, а также дикие и сорные рыбы-бактерионосители (Buller N. B., 2004).

Перенос возбудителя происходит при пересадке и миграции рыб-бактерионосителей, через оплодотворенную икру, инфицированную в процессе получения половых продуктов от больных производителей, а также с водой, орудиями лова, рыбоводным инвентарем, тарой, спецодеждой и обувью обслуживающего персонала (Видишев Ю.А, 2011).

Заражение рыб происходит через поврежденные жабры и кожу, а также пищеварительный тракт (Подзорова А.А., 1997).

Заболевание рыб фурункулезом наиболее часто проявляется весной и летом, но при неблагоприятных условиях может возникнуть и в осенне-зимний период, а у проходных лососевых рыб - в период нерестовых миграций в пресноводные реки. Возникновению болезни способствуют повышение температуры воды, загрязнение водоема органическими веществами, слабая проточность, снижение уровня растворенного в воде кислорода, уплотненные посадки, кормление неполноценными кормами, другие болезни, снижающие резистентность организма рыб (Погорелова Н.П., 1995).

Инкубационный период у лососевых рыб продолжается в среднем 2-10 дней в зависимости от температурных условий и физиологического состояния

рыбы. У рыб, относящихся к другим семействам инкубационный период 3-30 дней (Hirvela-Koski V., 2005).

*Клинические признаки и патологоанатомические изменения.*

Аэромоноз у рыб протекает молниеносно, остро, подостро и хронически. Молниеносное течение болезни характеризуется внезапной и быстро нарастающей гибелью рыб без резко выраженных внешних признаков. Больные рыбы держатся у поверхности воды, корм не принимают. При патологоанатомическом вскрытии печень, почки, селезенка и кишечник без видимых изменений. Продолжительность болезни - несколько часов (Cipriano R. S., et al., 2001).

При остром течении начало болезни также внезапное, как и при молниеносном. Кожные покровы приобретают темную окраску, на брюшке и у основания грудных плавников появляются красные пятна, из ануса выделяются кровянисто-слизистые экскременты (Munro A. L. S., Hastings T. S., 1993).

Больные рыбы погибают или процесс переходит в подострую форму с образованием абсцессов на кожном покрове. При патологоанатомическом вскрытии обнаруживают в полости тела кровянистый экссудат, геморрагическое воспаление органов пищеварительного тракта, главным образом в пилорической части желудка и заднем отделе кишечника, некрозы в сердечной мышце и печени. Печень приобретает мраморную окраску, селезенка темно-вишневого цвета. Длительность болезни - от 1 до 3 дней (Гаврилин К.В., 2004).

При подостром течении в начале заболевания клинические признаки проявляются у отдельных рыб. Периодически выявляются малоподвижные особи, которые не принимают корма и находятся вблизи береговой зоны у поверхности воды. У рыб обнаруживают покрасневшие участки и кровоизлияния в области брюшка и у основания грудных плавников, бледную окраску жаберного аппарата и пучеглазие. В мышцах и под кожей образуются флюктуирующие абсцессы (фурункулы) с четко выраженными границами (форель) или припухлости без резко очерченных границ (лососи), содержащие экссудат красноватого цвета, некротизированную мышечную ткань, большое

количество бактерий. При патологоанатомическом вскрытии обнаруживают кровоизлияния и некроз в мышцах, паренхиматозных органах, кишечнике, гиперемии кровеносных сосудов. Болезнь длится от 3 до 7 дней, вызывая значительную гибель рыб (Paterson W. D., et al., 1980, Инструкция о мероприятиях по профилактике и мерам борьбы с фурункулезом лососевых рыб, 1997).

При хроническом течении болезни наблюдается гибель единичных особей. У больных рыб обнаруживают бледность и мраморность жабр, на поверхности тела язвы, рубцы, иногда абсцессы, после вскрытия, которых обнажается мускулатура и выделяется кровянистый экссудат, из ануса - слизисто-гнойные выделения. При патологоанатомическом вскрытии обнаруживают в мышцах, почках некротические участки и анемию печени. Длительность болезни - до нескольких недель (Бессарабов Б.Ф., 2007).

#### *Диагностика*

Диагноз на аэромоназ устанавливают на основании эпизоотических данных, клинических признаков, патологоанатомических изменений, результатов бактериологического исследования и положительной биопробы. Для бактериологического исследования берут не менее 5 экземпляров больных рыб. Определение вирулентности выделенных культур аэромонад проводят на двухлетках форели. Для заражения используют смыв физиологическим раствором 24-48 часовых культур, которые вводят рыбам внутримышечно или внутрибрюшинно в дозе 0,1 мл и наблюдают за ними в течение 10 дней. Каждой культурой заражают 5 рыб. Температура воды в аквариуме должна быть 14-15°C. Контрольным рыбам вводят стерильный физиологический раствор. Биопроба считается положительной при появлении у форели клинических признаков фурункулеза и развитии септического процесса через 2-3 суток после заражения с последующим выделением от них исходной культуры (Инструкция о мероприятиях по профилактике и мерам борьбы с фурункулезом лососевых рыб, 1997, Инструкция о мероприятиях по борьбе с аэромоназом карповых рыб, 1998).

Условно-патогенных бактерий рода *Aeromonas* выделяют из посевов кожи, печени, желчного пузыря, кишечника, почек (Авдеева Е. В., 2006).

#### *Профилактика и лечение аэромоноза.*

В настоящее время в качестве профилактики и для подавления вспышек аэромонозной инфекции используются антибиотики широкого спектра (Igbiosa I. H., et al, 2012).

В течение длительного времени для профилактики бактериальных инфекций как у нас в стране, так и за рубежом широко применялись антибиотики. Однако основной проблемой последних лет является широкое распространение резистентных форм патогенных микроорганизмов и снижение эффективности ряда антибиотиков (Бутко М.П., 2010). По данным американских ученых, заражение возбудителями, имеющими множественную устойчивость к антибиотикам, приводит к тому, что заболевание протекает в значительно более тяжелой форме, нередко со смертельным исходом, а борьба с подобными недугами обходится значительно дороже (Асадчая Р. Л., 2005).

### **1.6 Микробиологические методы идентификации бактерии вида *A. salmonicida***

Диагноз на аэромоноз ставят на основании клинических признаков, патологоанатомических изменений и результатов бактериологических исследований. При вспышке аэромоноза возбудитель болезни выделяется из паренхиматозных органов в монокультуре (Головина Н.А., 2003). Вирулентность выделенных аэромонад оценивают по степени ДНК-азной активности или путем постановки биологической пробы, согласно МУ № 133442/1116. Бактериологическая диагностика основана на выделении культуры чистой культуры *A. salmonicida*.

Первичные посевы из крови, асцитной жидкости, печени, почек, селезенки осуществляют на чашки Петри с агаром Эндо и инкубируют в термостате при температуре 26 - 28°C в течение 48 часов. Полученные изолированные колонии

отсевают на скошенный МПА для получения чистой культуры и инкубируют при той же температуре 18 – 20 часов (Блинов А. И., 1997).

Групповую дифференциацию выделенных бактерий проводят с использованием окраски по Граму классическим методом и синькой Леффлера. Для определения оксидазной активности применяют диметилпарафенилендиамина дигидрохлорид. С целью определения родовой принадлежности культуры пересевают в пробирки со средой Хью-Лейфсона бактерий по ферментации глюкозы в аэробных и анаэробных условиях. Биохимические свойства аэромонад и энтеробактерий изучают на пластинах биохимических дифференцирующих энтеробактерии (ПБДЭ) (Гончарова М.Н., 2012).

Галанина Е.В. и др. культурально-биохимические характеристики выделенных культур изучали с применением дифференциально-диагностических сред, систем индикаторных бумажных (СИБ) с набором из 16 основных тестов (НПО "Микроген", Москва), а также микротест-систем API 20E для идентификации энтеробактерий и API 20NE для идентификации грамотрицательных палочек не энтеробактерий (bioMérieux, Франция). Видовую идентификацию бактерий проводили, используя Определитель бактерий Берджи (1997).

Калина Г. П. предлагает высевать пробы воды в жидкую среду накопления, в состав которой входят: сульфат магния,  $K_2HPO_4$ , желатин, крахмал (среда А-1). Через 24 ч инкубирования посевов в термостате при температуре 30°C пересеять на плотную дифференциально-селективную среду, в состав которой кроме перечисленных компонентов (среда А-1) входят: водный раствор кристаллического фиолетового и трифенилтетрахлорид (среда А-2). Посевы на плотной селективной среде инкубируют в термостате при температуре 28-30°C в течение 42-48 ч. На плотной дифференциально-селективной среде колонии *Aeromonas* крупные с вишневым центром и узким бесцветным ободком.

Однако использование предлагаемых дифференциально-селективных питательных сред А-1 и А-2 не позволяет достаточно квалифицированно



проводить работу по выявлению аэромонад в пищевых продуктах (Канаева Т.И., 2009).

Добровольская Т. Г. и др. (2010) для выделения *Aeromonas* spp. рекомендует использовать среду в составе, которой содержится пептон, дрожжевой экстракт, триптон, L-орнитин солянокислый, маннит, инозит, Na-тиосульфат, цитрат желез, бромкрезол пурпурный, агар. Среда разливается в пробирки. Аэромонады образуют желтый осадок с пурпурным кольцом сверху.

Многие зарубежные исследователи для обнаружения бактерий рода *Aeromonas* предлагают использовать среды, содержащие ампициллин и различные селективные добавки. Так, Mishra S. et al. (1987) рекомендует использовать комбинацию 2-х сред – кровяного агара с бараньей кровью и ампициллином (30 мкг/л) и агара, содержащего ДНК-азу, толуидиновый синий и ампициллин (10 мкг/л).

Kelly M. et al (1988) считает, что наиболее оптимальным вариантом выделения аэромонад является комбинация двух сред – кровяного агара без ампициллина и CIN- агара (цефсулодин-иргазан-новобиоциновый агар).

Для количественной оценки содержания *Aeromonas* в пищевых продуктах и объектах внешней среды Jerpesen C. (1995) использует следующие среды: крахмал-ампициллиновый агар (SSA), ампициллин-желчные соли- инозитол-ксилозный агар (ampicillin bile salts inositol xylose-MIX agar), ампициллин-декстриновый агар (ADA), крахмал-глутамат-ампициллин-пенициллин С - глюкозный агар (starch glutamate ampicillin penicillin C-glucose agar - SGAP-10 C).

SGAP-10 C агар также рекомендует использовать Huguet J. M. (1991) для выделения *Aeromonas* spp. из объектов водной среды, а также их дифференцировки от бактерий рода *Pseudomonas*.

Midtlyng et al. (2000) для выделения бактерий рода *Aeromonas* предлагает использовать в качестве плотной питательной среды триптозо-кровяной агар. Культуру пересевают со среды накопления на триптозо-кровяной агар с добавлением 5% дефибринированной крови. Через 24 ч инкубации при

температуре 28°C наблюдается рост круглых, серых колоний *A. salmonicida* с зоной гемолиза вокруг.

Еще одна среда, которая часто упоминается в зарубежной литературе – триптико-соевый агар. В частности, L. Soler et.al. (2003) использовали триптико-соевый агар (Difco) для выделения *Aeromonas spp.*

В Японии ведется много исследований по обнаружению и генетическому анализу аэромонад, а для изучения чистой культуры так же применяется триптико-соевый агар (Zhang et.al., 2004). На этой среде рост *A. salmonicida* наблюдается в виде круглых, полупрозрачных, небольших колоний (2-3 мм), беловато-желтого цвета.

Вохме E.Rose and Anita J.G.Okaend (1998) считают, что можно использовать крахмально - ампициллиновый агар. Бактерии выращивают на чашках с МПА, содержащим 0,2% растворимого крахмала и ампициллин. Через двое суток заливают чашки раствором Люголя. Последний дает с крахмалом синее окрашивание, колонии *A. salmonicida* окружены прозрачными неокрашенными зонами.

В зарубежных странах одним из способов диагностики бактерии *A. salmonicida* является ИФА диагностика, которая используется наряду со стандартными бактериологическими методиками (Hiney, et al, 1994).

Выбор специфической среды для изоляции *Aeromonas spp.* будет всегда зависеть от типа рассматриваемого образца или нужды исследователя в качественном обнаружении или количественном выходе (Равилов А.З., и др., 1999).

Согласно Инструкции по борьбе с фурункулезом лососевых рыб (1997) при бактериологической диагностике посевы делают из крови, внутренних органов и не вскрывшихся абсцессов больных рыб на пластинчатые плотные питательные среды: мясо-пептонный агар или агар Хоттингера, агар Д и выдерживают при температуре 18-25°C в течение 48 часов. В посевах на жидких питательных средах образуется рыхлый осадок и тонкая сероватая пленка, в то время как весь столбик среды остается прозрачным. Через 7-10 дней поверхностный слой

бульона приобретает коричневый цвет, который в дальнейшем усиливается и распространяется на всю среду. Штаммы *A. salmonicida* дают гладкие, выпуклые колонии и помутнение бульона в первые сутки.

В данных нормативных документах описываются среды, не являющиеся селективными, и для более точной постановки диагноза требуется проведение дополнительных тестов.

### 1.7 Фагодиагностика бактерий

Бактериофаги – вирусы, которые характеризуются специфической способностью к избирательному инфицированию бактерий, относящихся к одному штамму (Adams, 1959).

Первые упоминания о бактериофагах относятся к концу 19 века. В 1896 Г. Ханкин, пытаясь объяснить сильное антибактериальное действие вод рек Ганги и Джумны в Индии, описал агент, который проходит через бактериальные фильтры и вызывает лизис микробов, разрушаясь при кипении. Спустя два года Н.Ф. Гамалея, публикует статью, в которой описывает разрушение *Bacillus anthracis* в дистиллированной воде, после чего жидкость приобретает свойства лизировать свежие культуры сибиреязвенной культуры (Алешкин В.А., 2016).

Бактериофаги построены из двух основных компонентов: белка и нуклеиновой кислоты. Белок формирует оболочку или капсид, внутри которого содержится геном из нуклеиновой кислоты (Браун Т.А., 2011)

Современная классификация бактериофагов включает 13 семейств, подразделенных более чем на 140 родов, которые содержат более 5300 видов фагов (Каттер Э., 2012).

Бактериофаги способны поражать большинство прокариот и легко могут быть выделены из почвы, сточных вод, воды. Экология фагов разнообразна, при этом они способны выживать при экстремальных температурах (до 95°C) и при экстремальных pH (pH = 1) (Sharp R., 2001).

Д'Эрель в начале 20 века выдвинул идею использования различных бактериофагов при инфекционных болезнях животных (Акимкин В.Г., 2010).

В 20-е годы бактериофаги были впервые применены для лечения дизентерии и заразных болезней кожи (Чушков В.Ю., 2011).

В Советском Союзе родоначальником фаготерапии был Г.Г. Элиава, под его руководством состоялись попытки по лечебному использованию бактериофагов для профилактики и лечению холеры (Алешкин А.В., 2016).

В 1940-е годы существовало семь лечебных бактериофаговых препаратов против стафилококков, стрептококков, кишечной палочки и других патогенных микроорганизмов. Несмотря на положительные результаты исследований, клинические данные по использованию бактериофаговых препаратов были противоречивые, что связано либо с полным отсутствием фаговых частиц в готовых препаратах, либо с узким спектром их литической активности (Sulakvelidze A., et al., 2001).

С появлением антибиотиков в странах Западной Европы и Америки производство лечебных бактериофаговых препаратов прекратилось. В Советском Союзе же применение бактериофагов в диагностических, лечебных и профилактических целях не прекращалось. По данному направлению работали такие исследователи, как Тимаков В.Д., Гольфарб Д.М., Тихоненко А.С., Бабалова Г.Г., Ревенко И.П., Крылов В.Н. и др. (Алешкин А.В., 2016).

Более сорока лет в Советском Союзе на базе Тбилисского научно-исследовательского института вакцин и сывороток им. Г. Элиавы и Уфимского научно-исследовательского института вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, а позднее и в Российской Федерации на филиалах предприятия «Микроген» производится свыше десятка наименований лекарственных средств как на основе отдельных видов бактериофагов, так и их комбинаций для лечения и профилактики острых кишечных инфекций и декомпенсированных форм дисбактериоза, а также против возбудителей ряда гнойно-воспалительных инфекций (Бойцов, и др., 2006).

Мировая практика применения фагов в комплексе санитарно-эпидемиологических процедур представлена в научной литературе достаточно широко. Мероприятия включают в себя четыре сферы деятельности – бактериофаг – опосредованный биоконтроль – использование фагов для борьбы с бактериями, поражающими сельскохозяйственные растения и животных на этапе предшествующем их попаданию на перерабатывающие заводы; фаговый биопроектинг – применение бактериофагов для деконтаминации овощей, фруктов, мяса, рыбы и т.д. в процессе их заводской переработки перед упаковкой готовой к употреблению продукции; профилактический прием бактериофагов людьми в качестве пробиотической добавки к пище для снижения риска развития спорадических случаев и эпидемических вспышек пищевых инфекций; фагоидентификация потенциально опасных микроорганизмов (Goodridge D. L., et al., 2003, Greer G. G., et al., 2005, Goodridge D. L., et al., 2011).

По характеру взаимодействия фага с клеткой все бактериофаги делятся на вирулентные (литические), вызывающие продуктивную инфекцию и лизис бактериальной клетки, и умеренные, вызывающие латентную инфекцию и ассоциацию генома вируса с бактериальной хромосомой. Умеренные фаги в отличие от вирулентных не вызывают гибели бактериальных клеток и при взаимодействии с ней переходят в неинфекционную форму фага – профаг (геном фага, ассоциированный с бактериальной хромосомой). Профаг, ставший частью хромосомы клетки, при ее размножении синхронно реплицируется с геномом бактерии, не вызывая ее лизиса, и передается по наследству от клетки к клетке в неограниченном числе поколений. Бактериальные клетки, содержащие в своей хромосоме профаг, называются лизогенными. Профаг в лизогенных бактериях самопроизвольно или под влиянием различных индуцированных агентов может переходить в вегетативный фаг. В результате такого превращения бактериальная клетка лизируется и продуцирует новые фаговые частицы. В ходе лизогенизации бактериальные клетки могут дополнительно приобретать новые признаки, детерминируемые геномом вируса. Такое явление – изменение свойств микроорганизмов под влиянием профага – называется фаговой, или лизогенной,

конверсией (проявление вирус-индуцированной трансформации) (Воробьев А.А., 2003).

Специфичность фагов послужила основанием для их наименования по видовым и родовым названиям чувствительных к ним бактерий. По признаку специфичности выделяют поливалентные бактериофаги, лизирующие культуры одного семейства или рода бактерий, моновалентные (монофаги), лизирующие культуры только одного вида бактерий, а также отличающиеся наиболее высокой специфичностью типовые бактериофаги, способные вызывать лизис только определенных типов (вариантов) бактериальной культуры внутри вида бактерий (Чушков В.Ю., 2011).

Наборы таких типоспецифических фагов используются для дифференцировки бактерий внутри вида – фаготипирования бактерий. С помощью этого метода можно установить источник и пути передачи инфекционного заболевания, т. е. провести его эпидемиологический анализ, поскольку он позволяет сравнивать фаготипы (фаговары) чистых культур бактерий, выделенных в ходе бактериологического исследования от больного и от окружающих его лиц – возможных бактерионосителей (Кочеткова В.А., 1989).

При селекции бактериофагов существенную роль играет критерий умеренности/вирулентности, т.к. воздействие умеренных бактериофагов на культуру фагочувствительных бактериальных клеток приводит к ее частичной лизогенизации, результатом которой является появление фагорезистентных вариантов (Викторов, Д.А., и др. 2013).

Спектр литической активности является одной из важных характеристик бактериофагов. Его изучают при помощи метода нанесения фага (spot-тест) на газон бактериальной культуры (Барт Н.Г., 2013, Ковалева Е.Н., 2013).

Также одной из характеристик бактериофагов является определение литической активности или титра. Титр бактериофага – это количество активных частиц бактериофага, содержащихся в 1 мл исследуемой жидкости, или величина наибольшего разведения исследуемой жидкости, при котором бактериофаг проявляет свои литическое действие. Полученную величину выражают

отрицательным логарифмом 10, где степень указывает кратность разведения фага. Наибольшее распространение для определения литической активности бактериофагов получили способ титрования в жидкой среде, предложенный Аппельманом, и метод агаровых слоев Грациа (Ганюшкин В.Я., 1988, Феоктистова Н.А., 2011, Юдина М.А., 2012, Барт Н.Г., 2013).

Метод Аппельмана основан на внесении различных количеств титруемого бактериофага в питательный бульон, засеянный одной и той же дозой бактериальной культуры, чувствительной к данному фагу. Титр фага определяли по наибольшему разведению препарата, в котором обнаруживалась литическая активность. Метод Грациа (метод агаровых слоев) основан на внесении различных разведений титруемого бактериофага в соответствующую культуру бактерий и посева на плотную питательную среду с целью получения негативных колоний бактериофага. (Ревенко И.П., 1978, Золотухин С.Н., 2007, Шестаков А.Г., 2010).

Бактериофаги по сравнению со всеми другими известными антибактериальными препаратами имеют следующие преимущества: не подавляют рост нормальной микрофлоры человека и животных, способны лизировать антибиотикоустойчивые патогенные микроорганизмы, не оказывают отрицательного воздействия на эукариотические клетки, могут быть использованы для профилактики бактериальных болезней (Зурабов А.Ю. и др., 2012).

Использование препаратов бактериофагов стимулирует активизацию факторов специфического и неспецифического иммунитета (Алсынбаев М.М. и др., 2008). Поэтому фаготерапия особенно эффективна при лечении хронических воспалительных заболеваний на фоне иммунодепрессивных состояний. Бактериофаги не препятствуют реализации лечебного воздействия других препаратов (антибиотики, пробиотики, синбиотики) и не чувствительны к их воздействию (Ворошилова Н.Н. и др., 2000).

Бактериофаги обладают и другими существенными преимуществами в качестве противомикробных средств: самостоятельно контролируют свое

воспроизведение, размножаясь только при наличии чувствительной культуры; могут снижать вирулентность даже резистентных к ним штаммов за счет использования в качестве мишени для адсорбции рецепторов, участвующих в патогенезе бактерии; не имеют побочных эффектов; могут применяться у пациентов с аллергией к антибиотикам, у беременных и детей грудного возраста; не препятствуют реализации лечебного действия других препаратов (антибиотики, пробиотики, синбиотики) и нечувствительны к их воздействию (Казьянин А.В., и др., 2010)

Имеется информация о способности бактериофагов инфицировать бактериальные клетки в составе биопленок за счет того, что фаговая инфекция вызывает нарушение структуры биопленки, делая оставшиеся там клетки доступными для воздействия факторов внешней среды, в том числе и для иммунной системы (Летаров А.В., 2010)

Производство препаратов фагов должно базироваться на ряде критериев (Зурабов А.Ю., и др., 2012): препараты должны включать строго вирулентные бактериофаги, фаги, входящие в препарат должны воспроизводиться в клетке-хозяине с высоким выходом активных частиц, фаги, входящие в препарат, должны сохранять литическую активность при длительном хранении, фаги, входящие в препарат, не должны взаимодействовать с представителями нормальной микрофлоры организма.

При создании биопрепарата на основе бактериофага, должны быть разработаны технологические параметры изготовления и контроля индикаторных бактериофагов, включающие в себя - температурные показатели культивирования бактериофага, количественное соотношение фага и культуры, оптимальное соотношение между временем пассажа и активности фага (Золотухин С.Н., 2007).

Ускоренное обнаружение возбудителя болезни в патологическом материале, кормах, пищевых продуктах и объектах внешней среды возможно проводить при помощи реакции нарастания титра фага (РНФ) с использованием тех же наборов бактериофагов (Золотухин С.Н., и др., 2006).



Сущность РНФ заключается в том, что если в исследуемом материале присутствует исследуемый возбудитель заболевания, то добавленный к такому материалу гомологичный фаг, вступая во взаимодействие с ним, интенсивно размножается, и последующее увеличение концентрации свободного внеклеточного фага указывает на присутствие в исследуемом субстрате гомологичного возбудителя (Викторов Д.А., 2011).

При разработке оптимальных условий постановки реакции нарастания титра фага (РНФ) необходимо определить – количественный показатель реакции, имеющий диагностическое значение, оптимальное время, обеспечивающее полноценное взаимодействие фага с бактериями (Васильев Д.А., Ковалева Е.Н., Золотухин С.Н., 2013).

## **1.8 Биологические свойства и особенности бактериофагов рода *Aeromonas***

Ishiguro E. E (1983) обнаружил, что в клеточной стенке *A. salmonicida* содержатся липополисахариды, которые являются рецепторами для фага 55R-1. Но при появлении мутации в клеточной стенке микроорганизм становится устойчивым к данному бактериофагу.

При изучении с помощью электронного микроскопа бактериофагов *Aeromonas* была выявлена филогенетическая связь между большинством фагов энтеробактерий и фагов *Aeromonas*, т.к. последние напоминали известные вирусы энтеробактерий (T2, P1, P2, T7) (Ackermann H.W., et al, 1985).

Исследование при помощи электронной микроскопии вирулентного фага phiAS4, выделенного из речной воды в Корее, показало, что он относится к семейству *Myoviridae*. Геном фага представляет собой линейную двухцепочную ДНК (Kim J.H., et al, 2012).

Фаг phiAS7 и фаг vB\_AsaM-56 имеют одинаковый набор кодонов, также как и бактерия *A. salmonicida* (Prabhakaram R., et al, 2014).

Исследования показали, что при использовании бактериофага HER 110 в аквариумах с американским гольцом (*Salvelinus fontinalis*) популяция *A. salmonicida* снизилась с  $10^8$  КОЕ до  $10^3$  КОЕ (Imbeault S., et al, 2006).

В настоящее время ученые изучают возможность использования фагов для лечения рыбы без воздействия на структуру природных бактериальных сообществ аквакультуры (Pereira, et al, 2011).

В 2013 году группой исследователей (Kim J. H., et al., 2015) получены результаты, о том, что бактериофаг PAS-1 можно рассматривать в качестве альтернативного средства борьбы против *A. salmonicida* subsp. *salmonicida*.

Y. J. Silva, C. Moreirinha и C. Pereira (2016) доказали в своих исследованиях эффективность лечения фагом AS-A мальков *Solea senegalis*. Также они показали, что фаг не влияет на природные бактериальные сообщества, но оказывает влияние на микроорганизмы, связанные с кишечным трактом рыб. При обработке фагом смертность мальков уменьшилась на 36% по сравнению с контрольной группой.

Исследования биологических свойств бактериофагов *A. sobria* Горшковым И.Г. (2015) показали, что литическая активность выделенных штаммов фагов варьирует от  $0,6(\pm 0,1) \times 10^6$  до  $2,0(\pm 0,2) \times 10^{10}$  БОЕ/мл по методу Грациа, устойчивы к воздействию температуры до  $48^\circ\text{C}$  в течение 20 минут и полностью инактивируются при  $54^\circ\text{C}$ , неустойчивы к обработке хлороформом в соотношении 1:10 продолжительностью свыше 5 минут.

Насибуллин И.Р. и соавторы (2013) определили литическую активность выделенных бактериофагов, активных в отношении *A. hydrophila* в пределах от  $5 \times 10^5$  до  $2 \times 10^8$  фаговых корпускул в 1 мл по методу Грациа и от  $10^{-5}$  до  $10^{-8}$  по методу Аппельмана.

Изучение термолабильности показало, что бактериофаги устойчивы в условиях выше  $60^\circ\text{C}$  и чувствительны при обработке хлороформом в соотношении 1:10 в течение 15 минут (Насибуллин И.Р., 2014).

## 2 СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1 Материалы и методы

#### **Штаммы:**

Для определения специфичности сконструированных нами сред, а также для изучения специфичности бактериофагов нами были использованы следующие референс-штаммы бактерий – *A. salmonicida* ATCC 33658, *A. hydrophila* ATCC 49140, *A. sobrea* ATCC 9071, *A. caviae* ATCC 12633, *Ps. putida* №12633, *Ps. aeruginosa* №128, *Ps. fluorescens* №13525, *Y. ruckeri* №6, *Y. enterocolitica*, *P. mirabilis* №523, *Kl. pneumoniae* №4463, *E.coli* №4, полученные из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ при ФГБОУ ВПО Ульяновской ГСХА им. П.А. Столыпина, а также 23 «полевых» штаммов, выделенных из объектов водной среды г. Ульяновска и Ульяновской области. Все штаммы обладают типичными биологическими свойствами для данного вида.

#### **Питательные среды и реактивы:**

Мясопептонный агар (МПА) (НПО «Питательные среды», г. Махачкала), мясопептонный бульон (МПБ) (НПО «Питательные среды», г. Махачкала), среда Эндо (ФГУП ГНЦПМ, г. Оболенск), среда Симмонса (ФГУП ГНЦПМ, г. Оболенск), агар бактериологический (НПО «Питательные среды», г. Махачкала), пептон сухой ферментативный (НПО «Питательные среды», г. Махачкала), экстракт дрожжевой (ФГУП ГНЦПМ, г. Оболенск), хлорид бария (ООО «Химмед», г. Санкт-Петербург), хлорид натрия (ООО «Химмед», г. Санкт-Петербург), сульфат магния (ООО «Химмед», г. Санкт-Петербург), гидрофосфат калия двузамещенный (ООО «Химмед», г. Санкт-Петербург), глюкоза (ООО «Химмед», г. Санкт-Петербург), бромтимоловый синий (ООО «Химмед», г. Санкт-Петербург), желатин (ООО «Химмед», г. Санкт-Петербург), 3% раствор перекиси водорода (ООО «Химмед», г. Санкт-Петербург), N-N-диметил-парафенилен-диамид (ООО «Диаэм», г. Казань), набор окраски по Граму (ЗАО «НИЦФ»), иммерсионное масло, конго рот (ООО «Химмед», г. Санкт-

Петербург), среды Гисса с углеводами: мальтозой, маннозой, рамнозой, раффинозой, дульцитолом, ксилозой, маннитом (ФГУП ГНЦПМ, г. Оболенск), диски с антибиотиками: канамицин, норфлоксацин, оксациклин, цефалотин, ампициллин, полимиксин, стрептомицин, бензилпенициллин, цефазолин, карбенициллин, левомецитин, эритромицин, энрофлоксацин, левофлоксацин, тетрациклин, цефамандол, кларитромицин, амоксициклин, ципрофлоксацин, цефаклор, мономицин, фуразолидон, ломефлоксацин, офлоксацин, гентамицин, доксициклин, цефоперазон, бацитрацин, оптохин, линкомицин (ЗАО «НИЦФ»).

### **Приборы и оборудование:**

Лупа бинокулярная МБС – 9, микроскоп «Биомед» с видеофотонасадкой, водяная баня, термометр ртутный, набор для фильтрации фагов (Millipore-Millivac), лабораторные центрифуги ОПи-8УХЛ 4.2, ЦЛС – 3, СМ – 6 М с угловыми и баккет-роторами, дистиллятор, шкаф сушильно-стерилизованный ШСС – 80, автоклав ГК-100-3, холодильники минусовые и бытовые, термостат ТС-80М-2, мерные цилиндры, флаконы, чашки Петри стеклянные (диаметр 120 мм), пробирки стеклянные, пробирки центрифужные пластиковые на 10 мл без юбки устойчивости, штативы пластиковые и металлические, спиртовки, наконечники на 100-200 мкл, 100-1000 мкл, 5-10 мл, дозаторы Sartorius с переменным объемом, стекла предметные, колбы стеклянные на 100, 500, 1000 мл, шпатель Дригальского стеклянный, пипетки Пастера на 1 мл стерильные, микробиологические петли.

### **Методы:**

Выделение, идентификация и индикация бактерий была проведена по общепринятым бактериологическим методам (Лабинская, 2008). Культуральные, биохимические и морфологические свойства бактерий *A. salmonicida* определяли по тестам, указанным в Bergey`s Manual of Determinative Bacteriology 2007. Тест на оксидазу был проведен с применением 1% раствора N-N- диметил-парафенилендиамин. Каталазную активность изучали с применением 3% раствора перекиси водорода. Приготовление и стерилизацию питательных сред, а также окраску мазков проводили согласно ГОСТ ISO 1113-1-2011. Приготовление

разведений и суспензий – ГОСТ Р 51426-99. Посев на питательные среды согласно ГОСТ Р 26670-91. Отбор и подготовку лабораторных проб проводили по ГОСТ 26669-85, ГОСТ 31942-2012, ГОСТ 31861-2012. Контроль разработанных питательных сред проводили согласно МУК 4.2.2316-08 «Методы контроля бактериологических питательных сред».

Выделение и изучение биологических свойств фагов проводили по методам И.П. Ревенко (1978), С.Н. Золотухина (2007), Э. Каттер (2012). Литическую активность определяли по методам Грациа и Аппельмана, в описании Васильева Д.А. (2011), Викторова Д.А. (2012). Реакцию нарастания титра фага для индикации *A. salmonicida* в объектах внешней среды проводили по методам В.Д. Тимакова и Д.М. Гольдфарба (в описании Викторова Д.А., 2011, Феоктистовой Н. А., 2006, Барт Н.Г., 2013, Юдиной М. А., 2013).

Статистическую обработку результатов исследований проводили с помощью пакета прикладных программ Statistica 6.0. (for Windows; «Stat Soft Ins.», США), Microsoft Excel 2003 (for Windows XP).

Работа выполнена на кафедре микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы ФГБОУ ВО «Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия им. П.А. Столыпина». Общая схема проведения исследования представлена на рис.1.

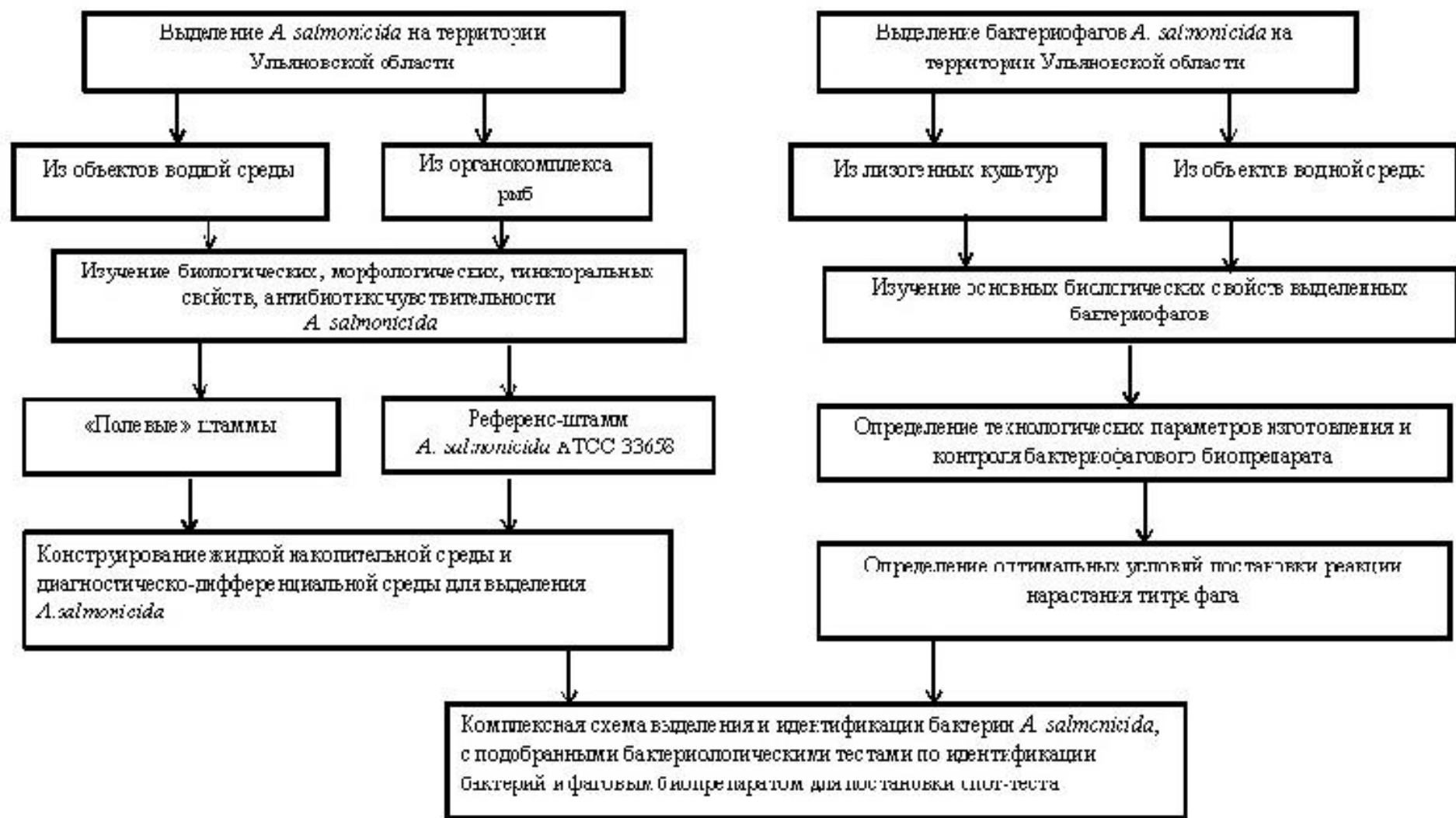


Рисунок 1. Общая схема проведения исследования

## 2.2 Результаты собственных исследований и их обсуждение

### 2.2.1 Изучение культуральных и тинкториальных свойств

#### *A. salmonicida* ATCC 33658

С целью определения стабильности свойств нами были определены культуральные и тинкторальные свойства референс-штамма *A. salmonicida* ATCC 33658.

Морфология клеток *A. salmonicida* ATCC 33658 нами была изучена методом окраски по Граму и с помощью светового микроскопа. В результате исследования окрашенных мазков, было выявлено, что референс-штамм *A. salmonicida* ATCC 33658 представляет собой мелкие, грамтрицательные палочки с закругленным концом (рис. 2). Подвижность референс-штамма *A. salmonicida* ATCC 33658 была определена на полужидком агаре, при помощи укола в столбик. В результате наблюдался рост бактерий только по линии укола, что свидетельствует о неподвижности бактерии (рис. 3).

На чашках Петри с МПА колонии мелкие, светлые, диаметр до 2 мм. На вторые сутки среда вокруг колоний приобретает коричневый цвет, за счет выделения пигмента (рис. 4).

Для изучения биологических свойств референс-штамма бактерии *A. salmonicida* ATCC 33658 были использованы следующие тесты: определение оксидазы, определение каталазы, определение желатиназы, определение нитратредуктазы, окисление и ферментация глюкозы (OF-тест), ферментация лактозы, способность к утилизации цитрата, тесты на ферментацию следующих углеводов – мальтоза, манноза, рамноза, раффиноза, дульцитол, ксилоза, маннит.

Для определения оксидазной активности на чашку Петри с суточной культурой *A. salmonicida* ATCC 33658 наносили каплю свежеприготовленного 1% раствора N-N- диметил-пара-фенилендиамин. Спустя 20 сек колонии

исследуемого микроорганизма приобретали розоватый оттенок, что свидетельствовало о положительной оксидазной реакции.

Каталазная активность была определена следующим образом - каплю перекиси водорода (3% раствор) наносили на предметное стекло и добавили туда же петлю с исследуемой культурой. Тест показал образование пузырьков воздуха, что говорит о положительной каталазной реакции.

Для исследования способности микроорганизмов к ферментации глюкозы в аэробных и анаэробных условиях приготовили среду Хью-Лейфсона. После инкубирования 24-48 ч при температуре 28°C провели учет результатов, *A. salmonicida* ATCC 33658 способна к ферментации глюкозы как в аэробных, так и в анаэробных условиях (изменение цвета в пробирках с зеленого на желтый как в аэробных условиях, так и в анаэробных условиях) (рис. 5).

С целью определения нитратредуктазной активности провели посев *A. salmonicida* ATCC 33658 при помощи бактериологической петли в пробирки с МПБ с добавлением нитрата калия. После инкубирования при 28°C 18 ч в пробирки добавили реактив – дистиллированная вода с крахмалом и йодистым калием и 10% водный раствор хлористоводородной кислоты. В результате произошло темно-синее окрашивание среды, что говорит о том, что *A. salmonicida* ATCC 33658 способна продуцировать фермент нитратредуктазу.

Для определения наличия желатиназной активности был проведен посев штамма в пробирки с МПБ с добавлением желатина. Спустя 18-24 часа результаты показали, разжижение желатина в пробирках, что говорит о положительной реакции.

Для определения ферментации лактозы был проведен посев на чашки Петри со средой Эндо при помощи бактериологической петли. Посевы культивировали при T - 28°C в течение 18-24 ч. В результате образовались светлые, слизистые колонии, что свидетельствует об отрицательной реакции (не образует кислоту из лактозы) (рис. 6).



Для определения утилизации цитрата был проведен посев *A. salmonicida* ATCC 33658 на чашки Петри со средой Симмонса, после чего чашки были оставлены в термостате при T-28°C на 18-24 ч. В результате цвет среды не изменился (зеленый), что говорит об отрицательном результате (рис. 7).

Для наиболее полной характеристики ферментативных свойств исследуемого штамма были проведены тесты на ферментацию следующих углеводов – мальтоза, манноза, рамноза, раффиноза, дульцитол, ксилоза, маннит. Культура *A. salmonicida* ATCC 33658 была посеяна при помощи бактериологической петли уколом в столбик в пробирки со средами Гисса, содержащие приведенные выше углеводы. Посевы культивировали при T-28°C в течение 18-24 ч., после чего были выявлены следующие свойства: *A. salmonicida* ATCC 33658 показала положительный результат при утилизации мальтозы, маннозы, маннита (изменение цвета среды в пробирках с фиолетового на желтый) и отрицательный результат при утилизации раффинозы, дульцитола, ксилозы и рамнозы (цвет среды не изменился).

В результате исследования были выявлены следующие биологические свойства, присущие референс-штамму *A. salmonicida* ATCC 33658 – оксидазаположительная, каталазаположительная, разжижает желатиназу, способна к окислению и ферментацию глюкозы, способна к восстановлению нитратов в нитриты, не способна к ферментации лактозы, раффинозы, ксилозы, рамнозы, не способна к утилизации цитрата, способна к утилизации мальтозы, маннозы, маннита и не может использовать в качестве источника углевода – раффинозу, дульцитол, ксилозу и рамнозу.

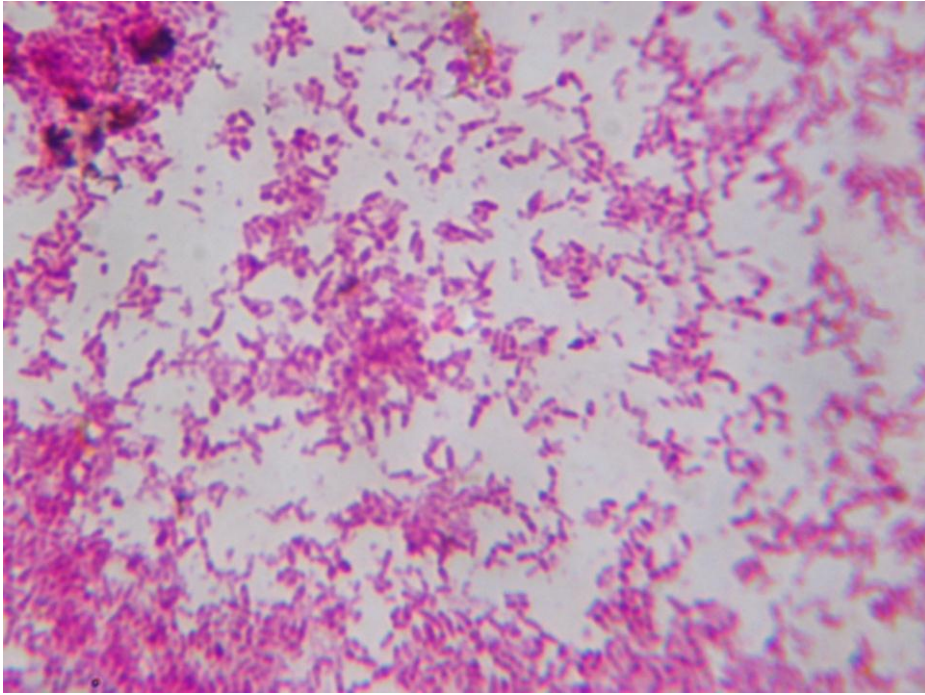


Рисунок 2. Грамотрицательные палочки *A. salmonicida* ATCC 33658, Ув. x100.



Рисунок 3. Рост *A. salmonicida* ATCC 33658 в пробирке с полужидким агаром (рост наблюдается только по линии укола, T-28°C, время культивирования – 18-24 ч)

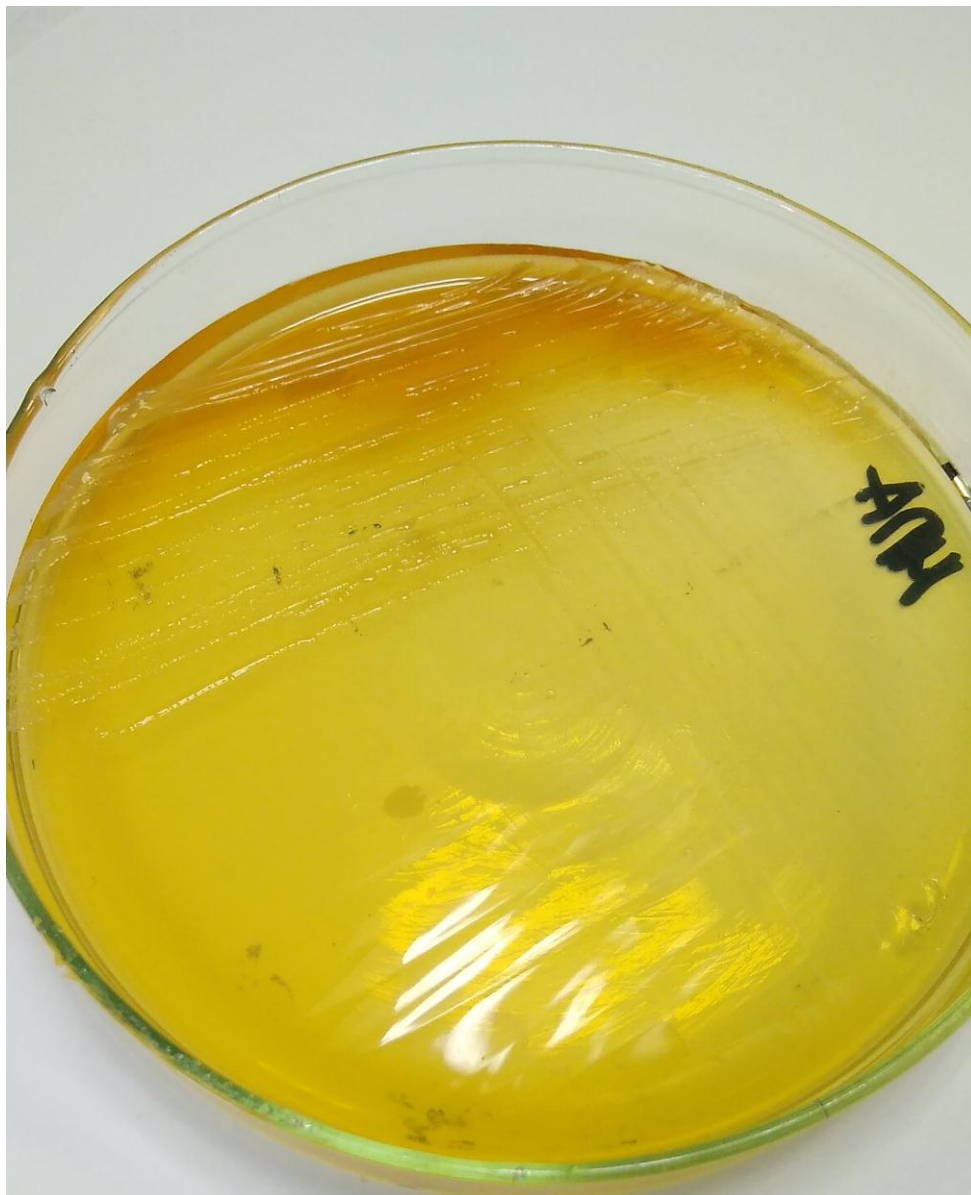


Рисунок 4. Рост *A. salmonicida* ATCC 33658 на чашке Петри с МПА (Т-28°C, время культивирования – 18-24 ч)



Рисунок 5. Рост *A. salmonicida* ATCC 33658 на среде Хью-Лейфсона (слева – контрольные пробирки, справа рост в пробирках в аэробных и анаэробных условиях, T-28°C, время культивирования – 18-24 ч)



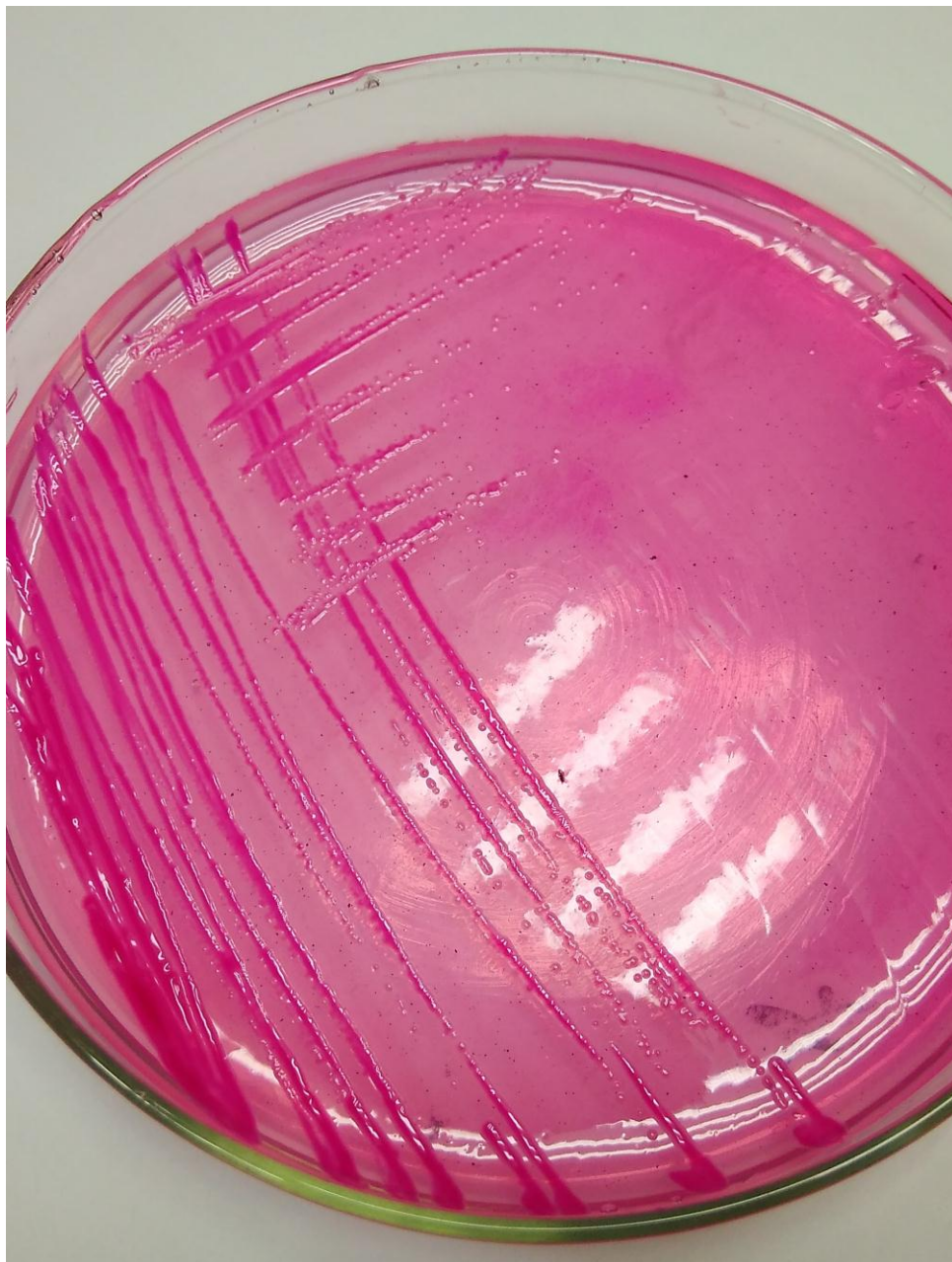


Рисунок 6. Рост *A. salmonicida* ATCC 33658 на среде Эндо (Т-28°С, время культивирования – 18-24 ч)

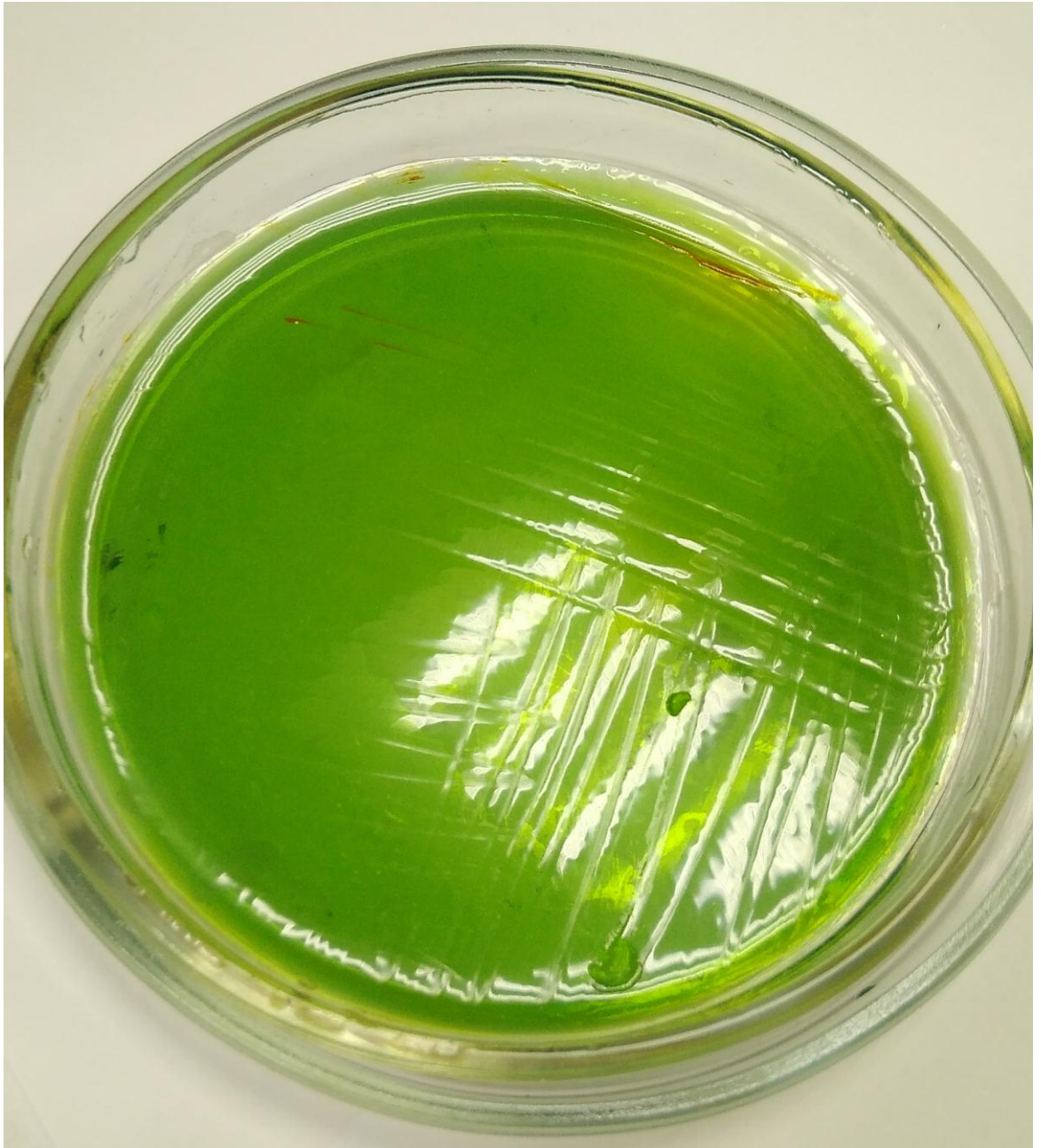


Рисунок 7. Рост *A. salmonicida* ATCC 33658 на среде Симмонса (Т-28°C, время культивирования – 18-24 ч)

## 2.2.2 Изучение антибиотикочувствительности референс-штамма

### *A. salmonicida* ATCC 33658

С целью подбора селективного компонента для конструирования плотной среды нами было проведено изучение антибиотикоустойчивости референс-штамма *A. salmonicida* ATCC 33658.

Исследование штамма *A. salmonicida* ATCC 33658 на устойчивость к ингибирующим химиотерапевтическим средствам было проведено с помощью метода диффузии в агар с применением дисков, которые содержали следующие антимикробные вещества: канамицин, норфлоксацин, оксациклин, цефалотин, ампициллин, полимиксин, стрептомицин, бензилпенициллин, цефазолин, карбенициллин, левомецитин, эритромицин, энрофлоксацин, левофлоксацин, тетрациклин, цефамандол, кларитромицин, амоксициклин, ципрофлоксацин, цефаклор, мономицин, фуразолидон, ломефлоксацин, офлоксацин, гентамицин, доксициклин, цефоперазон, бацитрацин, оптохин, линкомицин.

Выбор данных химиотерапевтических средств обусловлен необходимостью подобрать антибиотик или антимикробное вещество, к которому *A. salmonicida* устойчива и который одновременно ингибирует рост грамположительных и грамотрицательных кокков и палочек.

По результатам исследований (табл. 3), было выявлено, что штамм *A. salmonicida* ATCC 33658 чувствителен к большинству исследуемых антимикробных препаратов - канамицину, норфлоксацину, оксациклину, цефалотину, ампициллину, полимиксину, стрептомицину, бензилпенициллину, цефазолину, карбенициллину, левомецитину, эритромицину, энрофлоксацину, левофлоксацину, тетрациклину, цефамандолу, кларитромицину, амоксициклину, ципрофлоксацину, цефаклору, мономицину, фуразолидону, ломефлоксацину, офлоксацину, гентамицину, доксициклину, цефоперазону, обладает устойчивостью к бацитрацину, оптохину, линкомицину (рис. 7).



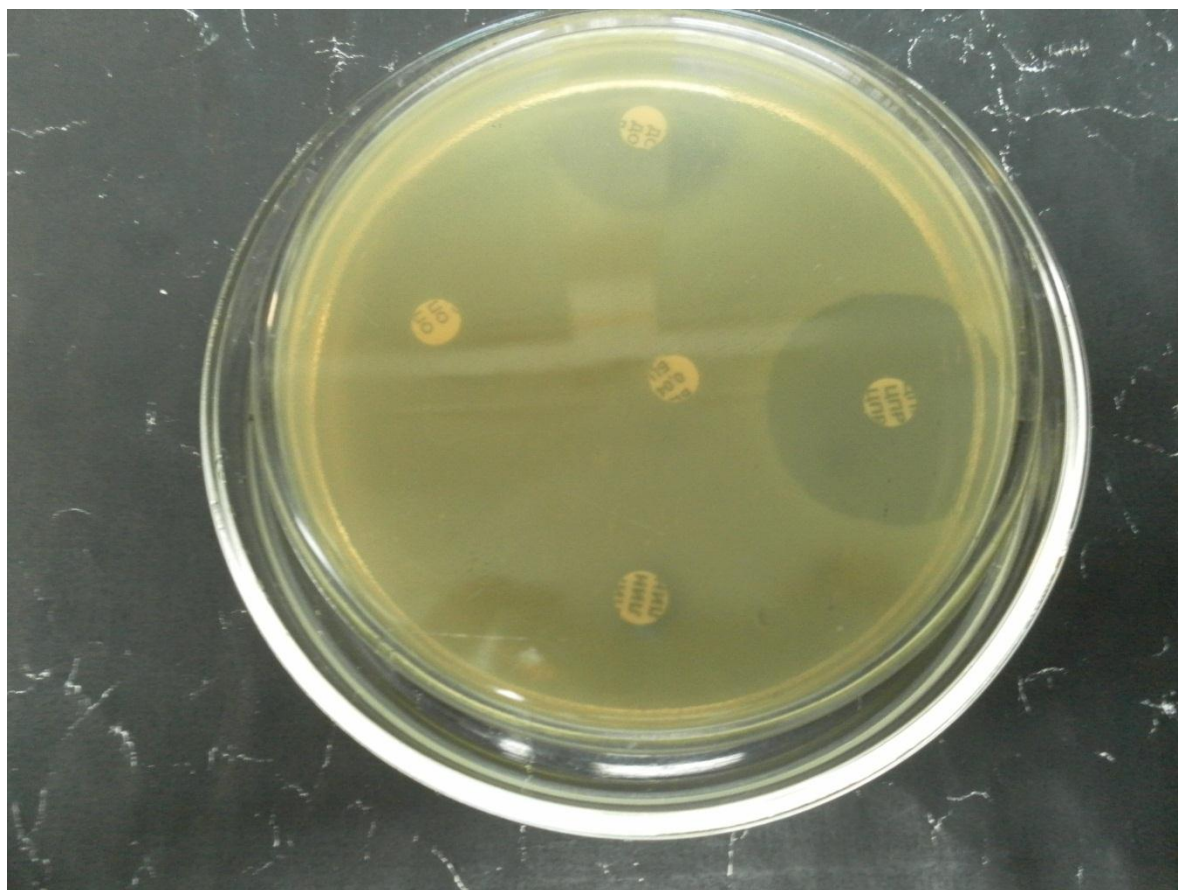


Рисунок 8. Результат исследования штамма *A. salmonicida* ATCC 33658 на устойчивость к антибиотикам: доксицилина (1), оптохину (2), линкомицину (3), бацитрацину (4), цефоперазону(5). Т-28°C, время культивирования – 18-24 ч

Таблица 3. Чувствительность штамма *A.salmonicida* ATCC 33658 к антибиотикам и антимикробным веществам.

№ п/п	Антибиотик	Штамм <i>A.salmonicida</i> ATCC 33658
1.	Канамицин	+
2.	Норфлоксацин	+
3.	Оксациклин	+
4.	Цефалотин	+
5.	Ампициллин	+
6.	Полимиксин	+
7.	Стрептомицин	+
8.	Бензилпенициллин	+
9.	Цефазолин	+
10.	Карбенициллин	+
11.	Левомецитин	+
12.	Эритромицин	+
13.	Энрофлоксацин	+
14.	Левифлоксацин	+
15.	Тетрациклин	+
16.	Цефамандол	+
17.	Кларитромицин	+
18.	Амоксициклин	+
19.	Ципрофлоксацин	+
20.	Цефаклор	+
21.	Мономицин	+
22.	Фуразолидон	+
23.	Ломефлоксацин	+
24.	Офлоксацин	+
25.	Гентамицин	+
26.	Доксициклин	+
27.	Цефоперазон	+
28.	Бацитрацин	-
29.	Оптохин	-
30.	Линкомицин	-

Примечание: «+» - чувствителен к антибиотику, «-» - устойчив к антибиотику

Данные микроорганизмы также обитают в водной среде и являются патогенами для животных и человека. Результаты показали, что все бактерио-ассоцианты устойчивы к бацитрацину, оптохину, линкомицину, также как и референс-штамм *A. salmonicida* ATCC 33658 (табл. 4).

Таблица 4. Устойчивость бактерий-ассоциантов к некоторым антибиотикам.

№ п/п	Название штамма	Антибиотики		
		Бацитрацин	Оптохин	Линкомицин
1.	<i>A. salmonicida</i> ATCC 33658	-	-	-
2.	<i>A. hydrophila</i> ATCC 49140	-	-	-
3.	<i>A. sobria</i> ATCC 9071	-	-	-
4.	<i>A. caviae</i> ATCC 15468	-	-	+
5.	<i>Ps. aeruginosa</i> №128	-	-	+
6.	<i>Ps. putida</i> №12633	-	-	-
7.	<i>Ps. fluorescens</i> №13525	-	-	-
8.	<i>P. mirabilis</i> №523	-	-	-
9.	<i>Y. ruckeri</i> №6	-	-	-
10.	<i>Y. enterocolitica</i>	-	-	-
11.	<i>Kl. pneumoniae</i> №4463	-	-	-

Примечание: «+»- неустойчивость к антибиотику, «-» - устойчивость к антибиотику

Таким образом, мы пришли к выводу что, антибиотики нельзя использовать в качестве селективного агента в питательной среде для выделения *A. salmonicida*.

### 2.2.3 Конструирование жидкой среды накопления и дифференциально-диагностической среды для выделения *A. salmonicida*

В качестве основы конструируемой жидкой среды, изучив литературные данные, было решено использовать пептон, являющийся источником аминокислот и витаминов, а в качестве источника углерода было решено использовать глюкозу. Для определения нужной концентрации данных веществ был проведен опыт по следующей схеме.

Суспензионную бактериальную культуру *A.salmonicida* ATCC 33658  $1 \times 10^9$  КОЕ/мл бактериальных клеток титровали 1:10. Затем брали пробирку с суспензионным разведением *A.salmonicida* в 100 бактериальных клеток в 1 мл и производили посев в чашки Петри на испытуемые прототипы накопительных сред.

Посев был произведен стерильными пастеровскими пипетками, трехкратно в три чашки Петри.

Конструирование основы для селективной среды:

№ 1 - пептон - 1,0 г; глюкоза - 3,0 г;

№2 - пептон - 2,0 г; глюкоза - 3,5 г;

№3 - пептон - 3,0 г; глюкоза - 4,0 г;

№4 - пептон - 4,0 г; глюкоза - 4,5 г;

№5 - пептон - 5,0 г; глюкоза - 5,0 г.

Контроль осуществляли на МПА. Чашки Петри культивировали при температуре 28°C в течение 24 часов. Далее производили подсчет колонеобразующих единиц (КОЕ).

Из таблицы 5 видно, что образец № 1 имеет показатель КОЕ в размере 41, образец № 2 - показатель КОЕ - 53, образец № 3 - 71 КОЕ, образец № 4 - 81 КОЕ, образец № 5 - 96 КОЕ.

По результатам эксперимента, можно сделать вывод, что образец № 5 имеет лучшие показатели по КОЕ. Следовательно, питательной основой конструируемой среды будет пептон и глюкоза (по 5,0 г).

Согласно литературным данным, хорошей минеральной базой оптимального состава для *A.salmonicida* является набор солей фосфата калия двузамещенного (1,0 г), сульфата магния (0,2 г), хлорида натрия (5,0 г), хлорида бария (2,0 г). Соли калия, магния, натрия необходимы для синтеза микробной клетки, для образования бактериальных белков необходимы анионы, содержащие серу. Соли бария эффективно ингибируют рост бактерий - ассоциантов рода *Pseudomonas*. Следовательно, данный набор солей целесообразно включить в накопительную среду в применяемых

концентрациях. *A. salmonicida* способна окислять глюкозу, поэтому в качестве индикатора снижения рН был добавлен бромтимоловый синий (0,03г).

Таблица 5. Показатель колониеобразующих единиц на основах селективных сред.

Ос но вы сел ект ив ны х сре д	Колониеобразующие единицы (КОЕ)														
	Чашки Петри														
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
№1	32	43	49												
	Ср 41 КОЕ														
№2				54	48	58									
				Ср 53 КОЕ											
№3							76	64	72						
							Ср 71 КОЕ								
№4										79	84	81			
										Ср 81 КОЕ					
№5													98	87	103
													Ср 96 КОЕ		

В результате сконструированная нами жидкая питательная среда накопления для бактерий *A. salmonicida* A.Sl.1 - УГСХА имеет следующий состав: вода дистиллированная - 1000 мл,  $K_2HPO_4$  - 1г,  $MgSO_4$  - 0,2 г, NaCl- 5г, пептон - 5 г, бромтимоловый синий - 0,03 г, глюкоза - 5 г,  $BaCl_2$  - 2 г. рН готовой среды накопления = 7,1.

Способ приготовления - в дистиллированную воду добавляют пептон, минеральные соли, глюкозу, бромтимоловый синий. Среду доводят до полного растворения частиц, разливают в стерильные пробирки по 5 мл и автоклавируют при 0,5 атм в течение 20 минут. Готовая среда прозрачная, травянисто-зеленого цвета.

При посеве в пробирки референс-штамма *A. salmonicida* ATCC 33658 цвет среды изменяется с зеленого на желтый (рис. 8).

При изучении антибиотикоустойчивости референс-штамма *A. salmonicida* ATCC 33658 нами было выявлено, что данный вид бактерий чувствителен к практически всем группам антибиотиков и антимикробных препаратов. Поэтому при конструировании плотной среды было решено использовать краситель конго рот, как ингибитор посторонней микрофлоры и индикатор роста, способный связываться с поверхностными белками.

Нами была сконструирована плотная дифференциально-диагностическая среда А. Sl.2-УГСХА следующего состава - вода дистиллированная - 1000 мл, агар-агар - 15 г, пептон - 5 г, дрожжевой экстракт - 3 г, MgSO<sub>4</sub> - 0,2 г, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - 1 г, глюкоза - 5 г, конго-рот - 3 г. Концентрацию указанных компонентов подбирали экспериментальным путем.

Используемые минеральные соли - калий фосфорнокислый двузамещенный и магний сернокислый обеспечивают электролитный состав среды, необходимый для биохимических процессов, пептон является источником аминокислот, дрожжевой экстракт - источник органического азота, углерода и витаминов. Агар-агар является желирующим субстратом растительного происхождения, для создания плотной консистенции среды. Краситель конго-рот является как ингибитором посторонней микрофлоры, так и индикатором роста микроорганизмов, способный связываться с поверхностными белками. Глюкоза - источник углерода, необходимый для питания микроорганизмов.

Способ приготовления - все компоненты смешивали и доводили до кипения. Затем автоклавировали в течение 20 минут при 112°C. pH готовой среды накопления - 7,1. Готовая среда - насыщенного красного цвета.

Колонии референс-штамма *A. salmonicida* ATCC 33658 мелкие, округлые, черного цвета, размером 0,2-0,5 мм, с гладкой поверхностью. Цвет среды рядом с колониями изменяется на черный (рис.9).

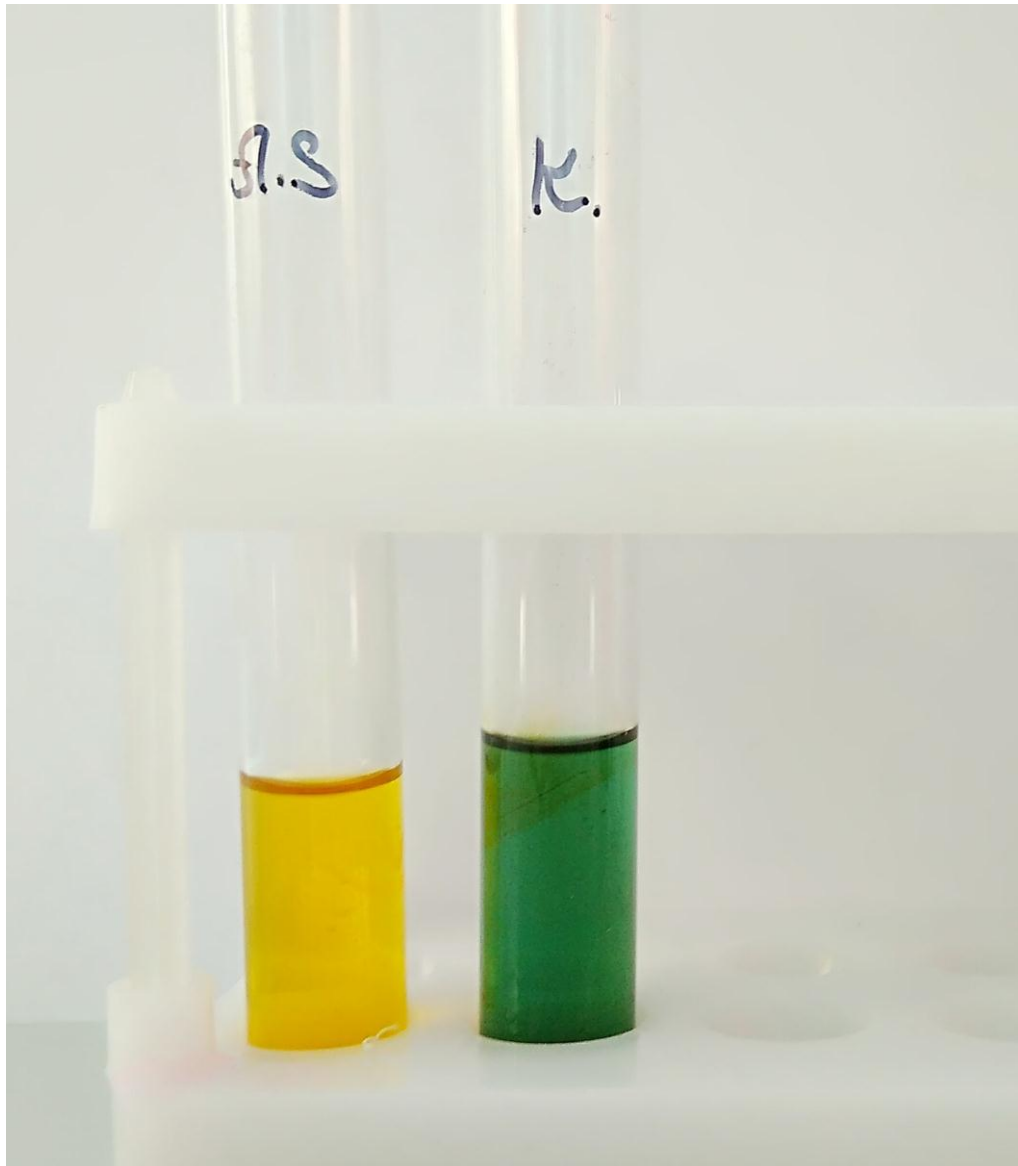


Рисунок 9. Рост референс-штамма *A. salmonicida* ATCC 33658 на среде A.SI.1-УГСХА (цвет среды изменяется с зеленого (правая – контрольная пробирка) на желтый, T-28°C, время культивирования – 18-24 ч)



Рисунок 10. Рост *A.salmonicida* ATCC 33658 на дифференциально-диагностической среде А.51.2-УГСХА (Т- 28°С, время культивирования 18-24 ч.)



## 2.2.4 Определение специфичности сконструированных сред

### А.51.1-УГСХА и А.51.2-УГСХА

Для определения специфичности разработанных нами сред – жидкой среды накопления А.51.1-УГСХА и дифференциально-диагностической среды А.51.2-УГСХА нами был проведен посев штаммов бактерий - ассоциантов других видов и родов в пробирки со средой. Параллельно был поставлен контроль роста бактерий в пробирках с МПБ и на чашках Петри с МПА. Посевы культивировали в термостате в течение 24 ч. при T - 28°C: *A. salmonicida* ATCC 33658, *Ps. putida* №12633, *Ps. fluorescens* №13525, *Y. ruckeri* №6, *Y. enterocolitica*; при T - 37°C: *Ps. aeruginosa* №128, *A. hydrophila* ATCC 49140, *A. sobria* ATCC 9071, *A. caviae* ATCC 12633, *P. mirabilis* №523, *Kl. pneumoniae* №4463, *E. coli* №4.

В результате исследования на жидкой накопительной среде были получены следующие данные – на жидкой накопительной среде отсутствует рост следующих штаммов бактерий – *Ps. aeruginosa* №128, *Ps. putida* №12633, *Ps. fluorescens* №13525 (рис. 11).

Помутнение бульона, изменение цвета среды с зеленого на желтый наблюдался у следующих бактерий - *A. salmonicida* ATCC 33658, *A. hydrophila* ATCC 49140, *A. sobria* ATCC 9071, *A. caviae* ATCC 15468, *P. mirabilis* №523, *Y. enterocolitica*, *E. coli* №4 (табл. 6).

Изучение роста бактерий-ассоциантов на дифференциально-диагностической среде показало, что *A. sobria* ATCC 9071 имеет сходный рост колоний с *A. salmonicida* ATCC 33658 – колонии мелкие, черные, размером 0,2-0,5 мм, с гладкой поверхностью. Цвет среды рядом с колониями изменяется на черный.

Остальные штаммы имеют отличительный рост колоний на данной среде (рис. 12).

Таблица 6. Определение специфичности жидкой среды накопления A.SI.1-УГСХА и дифференциально-диагностической среды A.SI.2-УГСХА

№ п/п	Вид бактерий	Рост на жидкой среде накопления A.SI.1-УГСХА	Контроль на МПБ	Рост на дифференциально-диагностической среде A.SI.2-УГСХА	Контроль роста на чашках Петри с МПА
1.	<i>A. salmonicida</i> ATCC 33658	Рост бактерий, помутнение бульона, изменение цвета среды с зеленого на желтый	Наличие роста, помутнение бульона.	мелкие, округлые, черного цвета, размером 0,2-0,5 мм, с гладкой поверхностью. Цвет среды рядом с колониями изменяется на черный.	+
2.	<i>A. hydrophila</i> ATCC 49140	Рост бактерий, помутнение бульона, изменение цвета среды с зеленого на желтый	Наличие роста, помутнение бульона	Колонии крупные, диаметром до 1 мм, с гладкой поверхностью светлые, цвет среды красный.	+
3.	<i>A. sobria</i> ATCC 9071	Рост бактерий, помутнение бульона, изменение цвета среды с зеленого на желтый	Наличие роста, помутнение бульона	мелкие, округлые, черного цвета, размером 0,5-0,7 мм, с гладкой поверхностью. Цвет среды рядом с колониями изменяется на черный.	+
4.	<i>A. caviae</i> ATCC 15468	Рост бактерий, помутнение бульона, изменение цвета среды с зеленого на желтый	Наличие роста, помутнение бульона	Колонии мелкие, диаметром до 0,7 мм, с гладкой поверхностью светлые, цвет среды красный.	+
5.	<i>Ps. aeruginosa</i> №128	Отсутствие роста, цвет среды не изменился.	Наличие роста, помутнение бульона	Колонии крупные, с гладкой поверхностью светлые, цвет среды красный.	+
6.	<i>Ps. putida</i> №12633	Отсутствие роста, цвет среды не изменился.	Наличие роста, помутнение бульона	Колонии крупные, с гладкой поверхностью светлые, цвет среды красный.	+
7.	<i>Ps. fluorescens</i> №13525	Отсутствие роста, цвет среды не изменился.	Наличие роста,	Колонии крупные, с гладкой	+

		изменился.	помутнение бульона	поверхностью светлые, цвет среды красный.	
7.	<i>P. mirabilis</i> №523	Рост бактерий, помутнение бульона, изменение цвета среды с зеленого на желтый	Наличие роста, помутнение бульона	Колонии крупные, с гладкой поверхностью светлые, цвет среды красный.	+
8.	<i>Y. ruckeri</i> №6	Отсутствие роста, цвет среды не изменился.	Наличие роста, помутнение бульона	Колонии крупные, с гладкой поверхностью светлые, цвет среды красный.	+
9.	<i>Y. enterocolitica</i>	Рост бактерий, помутнение бульона, изменение цвета среды с зеленого на желтый	Наличие роста, помутнение бульона	Колонии крупные, с гладкой поверхностью светлые, цвет среды красный.	+
10.	<i>Kl.pneumoniae</i> №4463	Отсутствие роста, цвет среды не изменился.	Наличие роста, помутнение бульона	Колонии крупные, с гладкой поверхностью светлые, цвет среды красный.	+
11.	<i>E. coli</i> №4	Рост бактерий, помутнение бульона, изменение цвета среды с зеленого на желтый	Наличие роста, помутнение бульона	Колонии крупные до 2 мм в диаметре, округлые, имеют серый цвет.	+

Примечание: «+» - наличие роста.



Рисунок 11. Рост штаммов *A. salmonicida* ATCC 33658 и бактерий ассоциантов на жидкой накопительной среде А.51 1- УГСХА (среда в пробирках с бактериями рода *Aeromonas* пожелтела, среда в пробирках с бактериями рода *Pseudomonas* осталась зеленого цвета, контрольная пробирка осталась зеленого цвета)

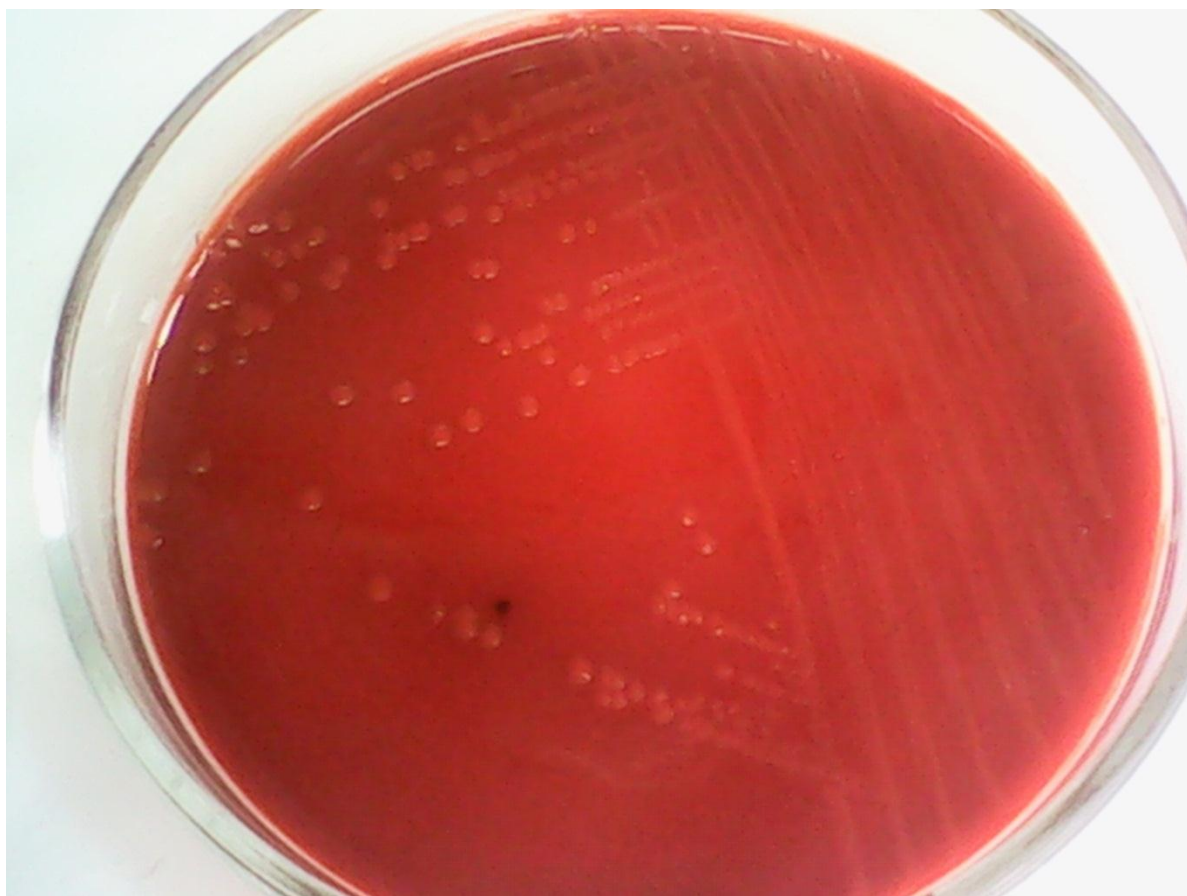


Рисунок 12. Рост колоний *Ps.aeruginosa* №128 на среде А.51.2 - УГСХА (Т - 37°C, время культивирования 18-24 ч.)

## 2.2.5 Разработка схемы выделения и идентификации

### бактерии *A. salmonicida*

Бактериологическая схема выделения включает в себя разработанные нами жидкую среду накопления А. Sl.1-УГСХА, дифференциально-диагностическую среду А. Sl.2-УГСХА, а также бактериологические тесты, выявляющие характерные для *A. salmonicida* свойства. Данные тесты были выбраны в ходе изучения биологических и биохимических свойств и включают в себя - тест на каталазу, оксидазу, окраска по Граму, OF-тест, подвижность, тест на наличие нитратредуктазной активности (способности восстанавливать нитраты в нитриты), на присутствие желатиназной активности.

Этапы исследования по разработанной нами схеме.

Референс-штамм *A. salmonicida* ATCC 33658 вносят в накопительную среду А. Sl.1-УГСХА объемом 4-5 мл и помещают в термостат на 18 ч при температуре 28°C. На жидкой накопительной среде бактерии рода *Aeromonas* дают положительную реакцию, характеризующуюся изменением цвета среды с зеленого на желтый, а также помутнением субстрата и образованием осадка.

Затем из жидкой среды накопления, бактериологической петлей делается посев на плотную дифференциально-диагностическую среду А. Sl.2-УГСХА и инкубируются 18 ч при температуре 28°C.

На среде А. Sl.2-УГСХА бактерии *A. salmonicida* образуют колонии округлой формы, размером 0,5-1 мм черного цвета, цвет среды вокруг колоний также чернеет.

Выросшие на селективной среде А. Sl.2-УГСХА колонии параллельно исследуют по тестам - на желатиназную активность, наличие нитратредуктазы, подвижность, OF-тест, а также пересевают отдельно стоящие колонии на МПА для последующего определения окраски по Граму и микроскопии, наличия каталазной и оксидазной активности.

Производят окраску по Граму и микроскопию. Клетки *A. salmonicida* выявляются как грамотрицательные палочки.

Для определения ферментов оксидазы и каталазы производят посев выросших на среде А. Sl.2-УГСХА колоний на чашки Петри с мясопептонным агаром. После инкубирования при 28°C в течение 18 ч на поверхность выросших на мясопептонном агаре колоний наносят 1% раствор 2-N-диметилпарафенилендиамина для определения оксидазы и 3% раствор перекиси водорода для определения каталазы. *A. salmonicida* является оксидазоположительной (покраснение реактива в течение 20 сек) и каталазоположительной (образование пузырьков газа).

Определяют подвижность методом укола в столбик застывшего 0,3% мясопептонного агара. После инкубирования в течение 18 ч при 28°C проводят учет результатов. Бактерии *A. salmonicida* неподвижны (наличие роста микроорганизмов на полужидком агаре только по линии укола). Исследуют способность восстанавливать нитраты в нитриты. Для этого производят посев при помощи бактериологической петли в МПБ с нитратом калия. После инкубирования при 28°C 18 ч в пробирки добавляют реактив – дистиллированная вода с крахмалом и йодистым калием и 10% водный раствор хлористоводородной кислоты. *A. salmonicida* способна к нитратредуктазе – происходит темно-синее окрашивание среды (рис. 13).

Уколом производится посев в пробирки с тестом на наличие желатиназы. После инкубирования в течение 18 ч при 28°C проводят учет результатов. Бактерии *A. salmonicida* разжижают желатин (среда в засеянной пробирке жидкая, в контрольной пробирке среда загустевает) (рис. 14).

Для исследования способности микроорганизмов к ферментации глюкозы в аэробных и анаэробных условиях готовят среду Хью-Лейфсона. После инкубирования 24-48 ч при T-28°C проводят учет результатов, *A. salmonicida* способна к ферментации глюкозы как в аэробных, так и в анаэробных условиях (изменение цвета в пробирках с зеленого на желтый как в аэробных условиях, так и в анаэробных условиях).

Таким образом, предложенная нами схема позволяет выделить бактерии *A.salmonicida* из объектов внешней среды в течение 60-84 часов (рис. 15).

С помощью предложенной схемы в результате лабораторных исследований нами были выделены 23 штамма бактерий вида *A.salmonicida* из объектов водной среды г. Ульяновска и Ульяновской области (табл.7).

Таблица 7. Объекты выделения штаммов *A.salmonicida*

№ п/п	Название штамма	Источник выделения
1.	1asl, 9asl	р. Волга, Железнодорожный район г. Ульяновска
2.	2asl, 25asl	р. Волга, Ленинский район г. Ульяновска
3.	7asl, 56asl	р. Волга, пос. Сланцевый рудник Ульяновская область
4.	30asl	Пруд, п. Дубровка Ульяновская область
5.	10asl, 11asl	Куйбышевское водохранилище, Старомайнский район
6.	31asl	Ульяновская область Майнский район п. Родниковые пруды
7.	13asl, 21asl	Ульяновская область Сенгилеевский район с. Тушна
8.	15asl	р. Свияга, р.п. Ишеевка
9.	20asl	р. Свияга, п. Дачный
10.	33asl	Пруд, р.п. им. Ленина, Барышский район, Ульяновская область
11.	22asl, 23asl	Озеро, с. Михайловка, Ульяновская область
12.	37asl	р. Волга, Ундоры, Ульяновская область
13.	40asl	р. Сура, Сурский район, Ульяновская область
14.	41asl	Пруд, р.п. Павловка, Ульяновская область
15.	44asl	Карьер, близ аэропорта Восточный
16.	58asl	р. Волга, парк 40-летия Победы, г. Ульяновск
17.	63asl	Пруд, Вешкаймский район, Ульяновская область

У выделенных штаммов были изучены культуральные и тинкториальным свойства для подтверждения их принадлежности к виду *A.salmonicida* (таб. 8). В результате практически все штаммы показывают биологические свойства, присущие изучаемому виду.





Рисунок 13. Определение способности к нитратредуктазе (положительная реакция – темно-синее окрашивание среды в пробирках, T- 28°C, время культивирования 18-24 ч.)



Рисунок 14. Реакция на наличие желатиназы (положительная реакция – разжижение среды, T- 28°C, время культивирования 18-24 ч.)

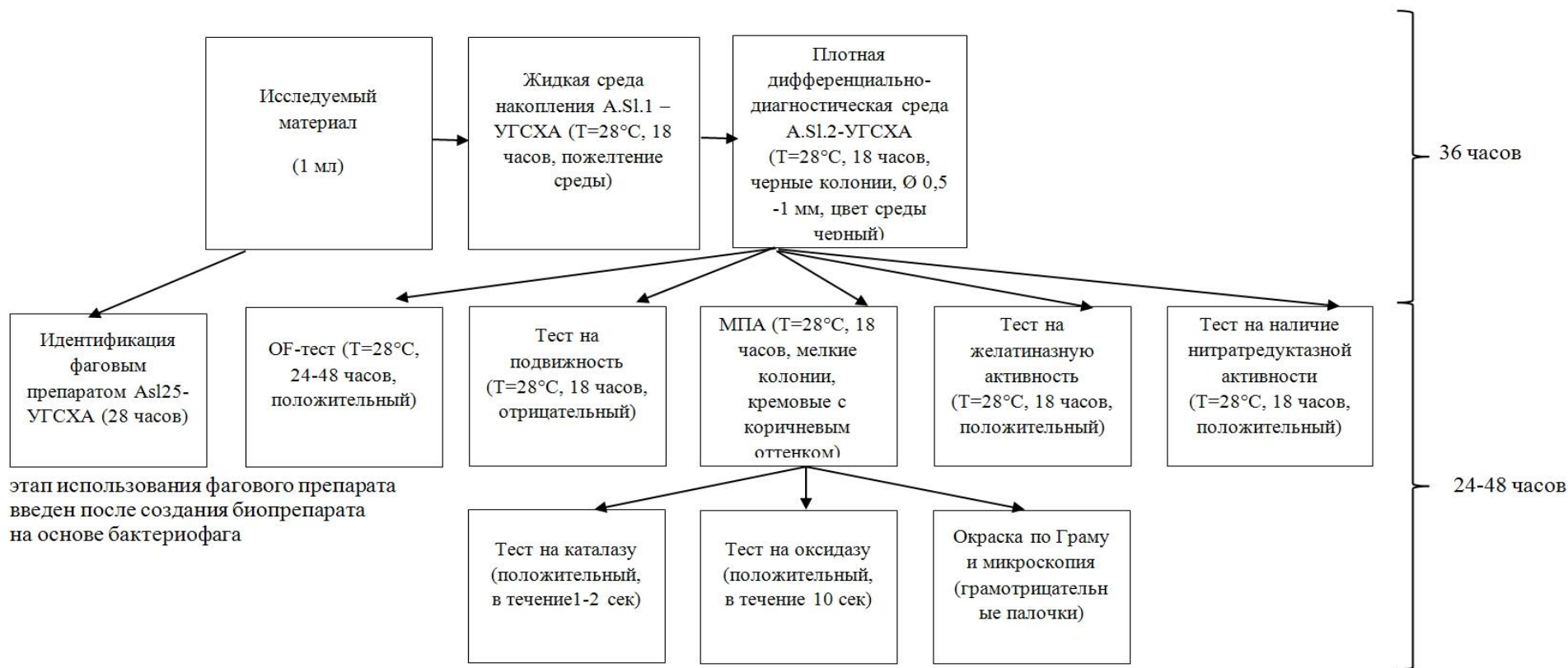


Рисунок 15. Предлагаемая нами схема выделения и идентификации бактерий *A. salmonicida*

Таблица 8. Результаты исследования культуральных и биохимических свойств выделенных штаммов *A. salmonicida*.

№ п/п	Штамм	Окраска по Граму	Подвижность	Оксидаза	Каталаза	Желагиназа	Нитратредуктаза	OF-тест	Лактоза	Цитрат	Мальгоза	Манноза	Раффиноза	Дульцитол	Ксилоза	Маннит	Рамноза
1.	ATCC 33658	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-
2.	1asl	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-
3.	2asl	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-
4.	7asl	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-
5.	9asl	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-
6.	10asl	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-
7.	11asl	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-
8.	13asl	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-
9.	15asl	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-
10.	20asl	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-
11.	21asl	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-
12.	22asl	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-

13.	23asl	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+
14.	25asl	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-
15.	30asl	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-
16.	31asl	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-
17.	33asl	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-
18.	37asl	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-
19.	40asl	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-
20.	41asl	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-
21.	44asl	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-
22.	56asl	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-
23.	58asl	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-
24.	63asl	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-

Примечание: «+» - положительный результат, «-» - отрицательный результат

### 2.2.6 Выделение бактериофагов *A. salmonicida*

С целью получения бактериофагов *A. salmonicida* из объектов внешней среды были исследованы пробы воды методом накопления.

Образцы воды отобраны из проб, имеющих положительный результат на наличие бактерии *A. salmonicida*, т.к. в них могут содержаться бактериофаги (табл. 7).

#### *Выделение фагов методом накопления.*

В колбу с концентрированным МПБ объемом 50 мл засеивали исследуемый материал объемом 50 мл, при этом вносили 1 мл суточной бульонной культуры *A. salmonicida* №1asl. Посевы были помещены в термостат при температуре 28°C на 24 ч. После инкубирования из колбы взяли 5 мл жидкости и поместили в стерильную центрифужную пробирку. Затем для удаления бактериальных клеток суспензию центрифугировали при 3000 оборотах в течение 20 минут, после чего фильтровали при помощи мембранных фильтров в стерильную пробирку с резиновой пробкой. Полученный фильтрат исследовали на наличие бактериофага методом агаровых слоев.

Для этого в стерильные чашки Петри разливали 1,5% МПА слоем 25-30 мл (1 слой). После застывания агара, чашки ставились в термостат при температуре 37°C на 1,5-2 часа для подсыхания. В пробирку с 2,5 мл 0,7% МПА, расплавленного и остуженного до температуры 45°C, вносили 1 мл исследуемого фильтрата и 0,2 мл суточной бульонной культуры штамма *A. salmonicida* №1asl. Содержимое пробирок быстро перемешивали вращением ладоней, чтобы не произошло застывания агара, и выливали в ту же чашку вторым слоем. После того, как агар застывал, чашки ставили в термостат при температуре 28°C.

Для контроля использовали ч. Петри с индикаторной культурой референс-штамма *A. salmonicida* №1asl, засеянную методом агаровых слоев с 1 мл стерильного МПБ. Посевы культивировали при температуре 28°C в

течение 18-24 часов. На следующий день на чашках Петри обнаружили прозрачные пятна, хорошо различимые на фоне глубинного роста бактерий (рис. 16).

В результате использования метода накопления нами было получено 15 штаммов вирулентных бактериофагов - Asl11-УГСХА, Asl23-УГСХА, Asl25-УГСХА, Asl1-УГСХА, Asl10-УГСХА, Asl24-УГСХА, Asl10/2-УГСХА, Asl27-УГСХА, Asl31/2-УГСХА, Asl33-УГСХА, Asl47-УГСХА, Asl52-УГСХА, Asl58/3-УГСХА, Asl64-УГСХА, Asl70-УГСХА.

#### *Выделение фагов методом индукции.*

В качестве тест – штаммов нами была использована культура № 1/2, в качестве индикаторных штаммов нами были использованы культуры №№ 23 asl, 11 asl.

Исследования были проведены с применением ультрафиолетового излучения в качестве индуцирующего мутагенного воздействия в три этапа по схеме, предложенной Викторовым (2013).

Первый этап - 0,5 мл суточной культуры штаммов *Aeromonas salmonicida* штамм № 23asl и штамм № 11asl наносили сплошным газоном на отдельные чашки Петри с мясопептонным агаром и подсушивали в термостате при температуре 28°C 15-30 минут. Затем на бактериальный газон в чашках воздействовали ультрафиолетовым излучением с длиной волны 250 нм с расстояния 1,0 м в течение 5 минут.

Облученную чашку инкубировали в термостате 24 ч при температуре 28°C. Через указанный срок чашку просматривали на наличие бактерий. На поверхности агара наблюдали рост отдельных колоний, которые затем с помощью шпателя Дригальского растирали по поверхности среды агара до получения однородного слоя.

Второй этап – повторное воздействие ультрафиолетовым излучением с длиной волны 250 нм на чашки со штаммами с расстояния 1,0 м в течение 10 минут и последующем инкубировании в термостате при аналогичных условиях (28°C, 24 ч). На следующий день на чашках наблюдалась

бактериальная масса, которую также растирали шпателем Дригальского до однородного слоя.

На третьем этапе снова проводили облучение с длиной волны 250 нм в течение 15 минут с расстояния 1,0 м и инкубировали чашки 24 ч при 28°C. Спустя сутки на чашках обнаруживалась бактериальная масса, без наличия зон лизиса.

Затем проводили смыв с поверхности агара мясопептонным бульоном в количестве 5,0 мл, фильтровали полученную суспензию через мембранный фильтр с диаметром пор 0,2 мкм для удаления бактериальных клеток, и переносили суспензию в пустую стерильную пробирку для дальнейших исследований на наличие в ней активных фаговых корпускул. Для этого сначала проводили накопление бактериофага. В пробирку с 4,5 мл мясопептонного бульона добавляли 0,2 мл 24-часовой индикаторной бульонной культуры *A. salmonicida* штаммы №23asl и №11asl и 1,0 мл исследуемой суспензии, инкубировали 24 ч при 28°C, после чего освобождали суспензию от бактериальных клеток фильтрованием и исследовали на наличие фага методом спот-теста на чашках со сплошным газоном штамма *A. salmonicida* № 2asl . Посевы инкубировали при 28°C 24 ч. Через указанное время на чашках Петри со сплошным бактериальным газоном наблюдалась дорожка лизиса (рис. 17).

В результате исследования было получено 2 штамма умеренных бактериофага - Asl05-УГСХА, Asl017-УГСХА.

Дальнейшим этапом нашего исследования был выбор индикаторного штамма, из числа «полевых» штаммов, полученных по своей оригинальной схеме выделения бактерии *A. salmonicida*.

Для этого на чашки Петри с МПА при помощи пастеровской петли было нанесено 3-4 капли 24-х часовой бульонной культуры исследуемых микроорганизмов и равномерно распределено по поверхности среды стерильным шпателем. Затем чашки были поставлены в термостат на 20-30 минут для подсушивания.



На поверхность засеянной среды по секторам пастеровской пипеткой легким прикосновением капли были нанесены бактериофаги, затем посеы инкубировались в течение 18-24 ч при температуре 28°C.

По результатам исследования в качестве индикаторного был выбран штамм №1as1, который лизировал все выделенные нами бактериофаги (табл. 9).

Для повышения литической активности фагов проводили пассирование на индикаторной культуре штамма *A. salmonicida* №1as1 с периодическим пересевом типичных для данного фага негативных колоний.

Для этого готовили разведение фагов в МПБ с предполагаемым наличием частиц фага в 1 мл от  $10^{-1}$  до  $10^{-10}$ . Фаги засекали по методу агаровых слоев на 3 чашки по 1 мл из разведений  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$  для получения изолированных колоний. Одну негативную колонию, расположенную от других колоний на расстоянии не менее 10 мм, отбирали бактериологической петлей и засекали в МПБ с индикаторной культурой *A. salmonicida* № 1as1. Одновременно с этим ставился контроль – пробирка с МПБ, засеянная индикаторной культурой без фага. Посеы инкубировались при температуре 28°C в течение 24 часов. За этот период времени питательная среда просветлялась, а в контроле оставалась мутной.

Содержимое опытной пробирки центрифугировали (3000 оборотов в течение 20 минут) и фильтровали через мембранные фильтры. Полученный фаголизат снова исследовали методом агаровых слоев, отбирая негативные колонии, идентичные исходной, с которой проводили такую же операцию. По этой методике выделенный фаг селекционировали 7-10 раз до получения популяции фагов с однородными негативными колониями, для повышения литической активности фага и стойкого проявления его свойств.

Таблица 9. Спектр литической активности выделенных бактериофагов *A.salmonicida*.

№ п/п	Штамм	Название фага																
		Asl10/2-УГСХА	Asl25-УГСХА	Asl11-УГСХА	Asl23-УГСХА	Asl1-УГСХА	Asl10-УГСХА	Asl24-УГСХА	Asl27-УГСХА	Asl31/2-УГСХА	Asl33-УГСХА	Asl47-УГСХА	Asl52-УГСХА	Asl58/3-УГСХА	Asl05-УГСХА	Asl017-УГСХА	Asl64-УГСХА	Asl70-УГСХА
1.	АТСС 33658	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2.	1asl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3.	6asl	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
4.	9asl	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+
5.	11asl	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
6.	18asl	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-
7.	23asl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8.	24asl	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+
9.	27asl	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+
10.	35asl	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+
11.	37asl	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-
12.	39asl	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13.	41asl	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
14.	42asl	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-

15.	43asl	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
16.	46asl	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+
17.	49asl	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
18.	50asl	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
19.	54asl	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
20.	56asl	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
21.	58asl	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+
22.	60asl	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-
23.	61asl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
24.	62asl	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+
Кол-во лизируемы х штаммов		19	21	17	17	19	17	18	18	19	20	16	15	19	19	16	20	19
Процент лизируемы х штаммов		79,2	87,5	70,8	70,8	79,2	70,8	75	75	79,2	83,3	66,7	62,5	79,2	79,2	66,7	83,3	79,2

Примечание: «+» - наличие лизиса, «-» - отсутствие лизиса

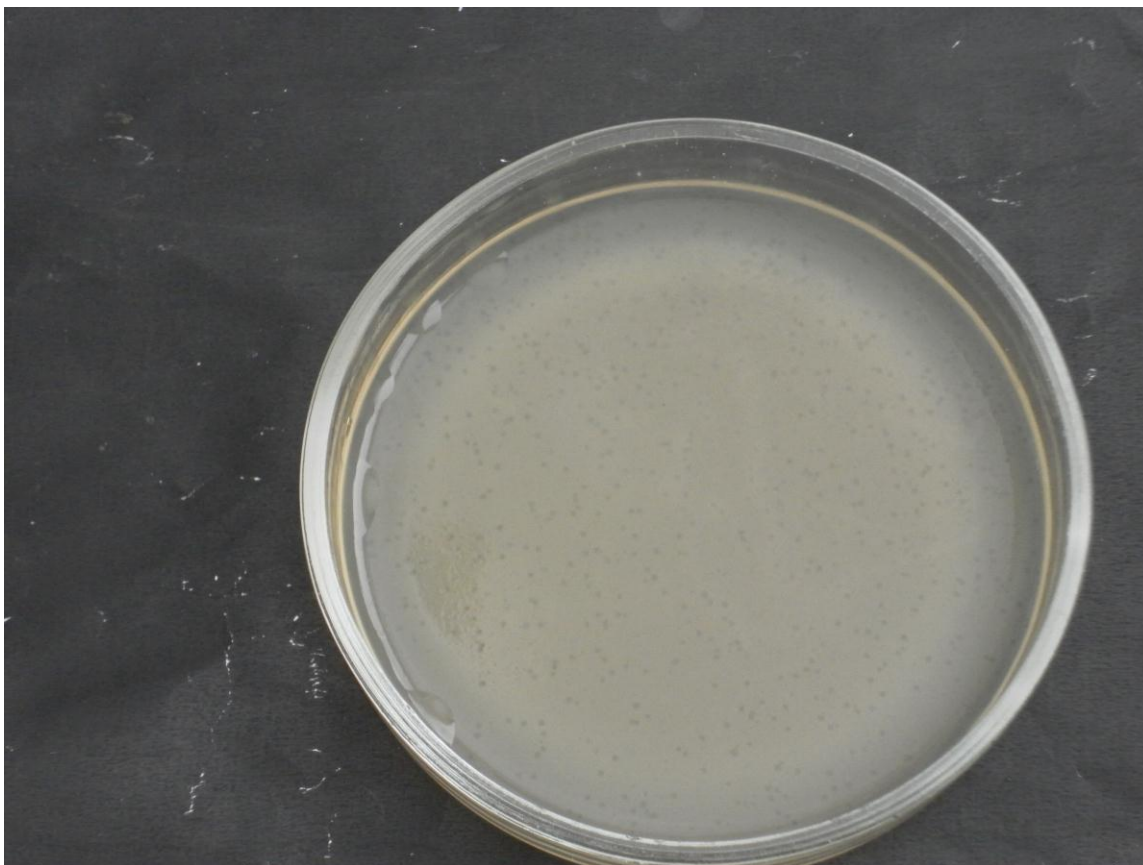


Рисунок 16. Морфология негативных колоний бактериофага As11- УГСХА (Т- 28°C, время культивирования 18-24 ч)

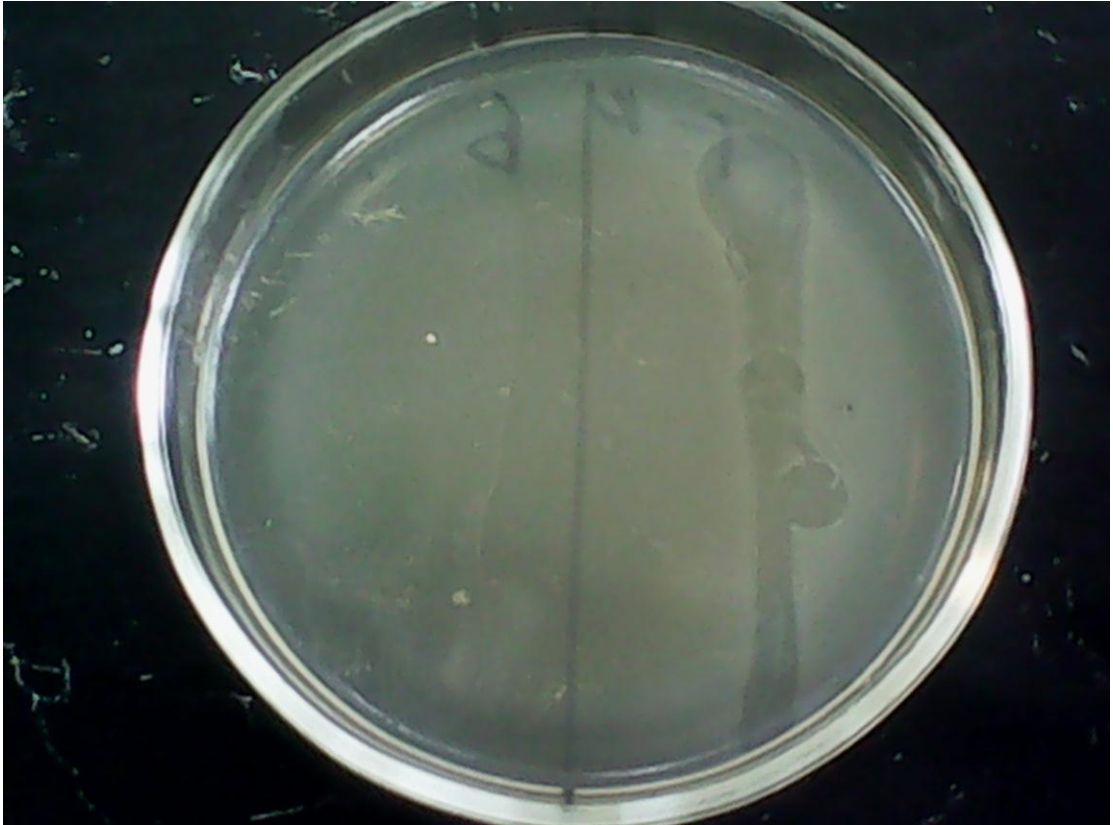


Рисунок 17. Спот-тест бактериофага Asl2- УГСХА (Т- 28°C, время культивирования 18-24 ч)

### 2.2.7 Изучение основных биологических свойств выделенных бактериофагов

Нами были изучены следующие биологические свойства выделенных бактериофагов – морфология негативных колоний, литическая активность, спектр литической активности, специфичность действия, температурная устойчивость, устойчивость к хлороформу.

#### *Морфология негативных колоний выделенных бактериофагов бактерий *A. salmonicida*.*

Морфологию негативных колоний бактериофагов изучали при помощи метода агаровых слоев. В пробирку с 2,5 мл 0,7% МПА, расплавленного и остуженного до 45°C вносили 1 мл фага в разведении  $10^{-7}$  (для получения изолированных негативных колоний) и 0,2 мл суточной бульонной культуры *A. salmonicida* №1asl. Содержимое пробирок тщательно перемещивали вращением между ладонями и выливали на поверхность 1,5% МПА. После застывания агара чашки помещали в термостат на 18-24 ч при температуре 28°C.

Негативные колонии бактериофагов Asl11-УГСХА, Asl23-УГСХА, Asl1-УГСХА, Asl31/2-УГСХА, Asl33-УГСХА, имеют диаметр 0,5-1 мм, полностью прозрачные, без зоны вторичного лизиса. Негативные колонии бактериофагов Asl 25-УГСХА, Asl24-УГСХА, Asl05-УГСХА, Asl07-УГСХА имеют диаметр 1-2 мм, полупрозрачные, без зоны вторичного лизиса. Негативные колонии бактериофагов Asl10-УГСХА, Asl10/2-УГСХА, Asl27-УГСХА, Asl47-УГСХА Asl52-УГСХА имеют диаметр 1-1,5 мм, прозрачные, без зоны вторичного лизиса; негативные колонии Asl58/3-УГСХА, Asl64-УГСХА, Asl70-УГСХА - диаметр 0,5-1 мм, имеют зону вторичного лизиса.

#### *Литическая активность выделенных бактериофагов *A. salmonicida*.*

Литическая активность фага оценивается по его способности лизировать бактериальную культуру на жидких или плотных питательных

средах и выражается максимальным разведением, в котором испытуемый бактериофаг проявляет свое литическое действие.

Для определения литической активности бактериофагов, выращивали суточную бульонную культуру *A. salmonicida* №1 asl.

Литическая активность выделенных нами бактериофагов была определена нами по методу Аппельмана и Грациа (табл. 10).

Таблица 10. Литическая активность фагов *A. salmonicida* по Аппельману и по Грациа.

№ п/п	Название фага	Титр по Грациа	Титр по Аппельману
1.	Asl11-УГСХА	$0,2 \times 10^9 \pm 0,1 \times 10^9$	$10^{-9}$
2.	Asl23-УГСХА	$0,7 \times 10^7 \pm 0,4 \times 10^7$	$10^{-6}$
3.	Asl25- УГСХА	$0,3 \times 10^9 \pm 0,2 \times 10^9$	$10^{-8}$
4.	Asl1- УГСХА	$0,5 \times 10^8 \pm 0,1 \times 10^8$	$10^{-9}$
5.	Asl10- УГСХА	$0,5 \times 10^8 \pm 0,3 \times 10^8$	$10^{-8}$
6.	Asl24- УГСХА	$0,5 \times 10^7 \pm 0,1 \times 10^7$	$10^{-6}$
7.	Asl10/2-УГСХА	$0,4 \times 10^9 \pm 0,1 \times 10^9$	$10^{-9}$
8.	Asl27-УГСХА	$0,7 \times 10^6 \pm 0,4 \times 10^6$	$10^{-5}$
9.	Asl31/2-УГСХА	$0,5 \times 10^7 \pm 0,1 \times 10^7$	$10^{-6}$
10.	Asl33-УГСХА	$0,8 \times 10^7 \pm 0,5 \times 10^7$	$10^{-7}$
11.	Asl47-УГСХА	$0,4 \times 10^4 \pm 0,3 \times 10^4$	$10^{-4}$
12.	Asl52-УГСХА	$0,5 \times 10^3 \pm 0,2 \times 10^3$	$10^{-4}$
13.	Asl58/3-УГСХА	$0,7 \times 10^6 \pm 0,1 \times 10^6$	$10^{-5}$
14.	Asl64-УГСХА	$0,2 \times 10^4 \pm 0,1 \times 10^4$	$10^{-5}$
15.	Asl70-УГСХА	$0,4 \times 10^6 \pm 0,2 \times 10^6$	$10^{-7}$
16.	Asl05-УГСХА	$0,7 \times 10^5 \pm 0,2 \times 10^5$	$10^{-6}$
17.	Asl017-УГСХА	$0,3 \times 10^6 \pm 0,1 \times 10^6$	$10^{-6}$

Исходя из полученных нами данных, в дальнейших исследованиях было решено использовать наиболее активные бактериофаги Asl10/2-УГСХА (титр по Грациа –  $0,4 \times 10^9 \pm 0,1 \times 10^9$ , титр по Аппельману -  $10^{-9}$ ), Asl25- УГСХА (титр по Грациа –  $0,3 \times 10^9 \pm 0,2 \times 10^9$ , титр по Аппельману -  $10^{-8}$ ), Asl11-УГСХА (титр по Грациа –  $0,2 \times 10^9 \pm 0,1 \times 10^9$ , титр по Аппельману -  $10^{-9}$ ), которые характеризуются наибольшим число активных корпускул в 1 мл.

*Специфичность действия исследуемых бактериофагов A.salmonicida*

В практике для дифференциации бактерий используется видовая специфичность фагов.

Для определения видовой специфичности отобранных бактериофагов, нами были использованы следующие штаммы бактерий: *A. hydrophila* ATCC 49140, *A. sobria* ATCC 9071, *A. caviae* ATCC 12633, *Ps. putida* №12633, *Ps. aeruginosa* №128, *Ps. fluorescens* №13525, *Y. ruckeri* №6, *Y. enterocolitica*, *Pr. mirabilis* №523, *Kl. pneumoniae* №4463, *E. coli* №4.

Определение видовой специфичности исследуемых фагов проводили следующим образом: в чашках Петри по поверхности с МПА равномерно распределяли 18-часовые бульонные культуры исследуемых бактерий, подсушивали в термостате 20-30 минут. Затем на поверхность засеянной среды, условно разделено по секторам, пастеровской пипеткой наносили бактериофаги Asl10/2-УГСХА, Asl25- УГСХА, Asl11-УГСХА и инкубировали при температуре 37°C, посева *Ps. fluorescens* №13525 при 28°C в течение 18-24 часов.

Результаты исследования показали, что все три бактериофага строго специфичны по отношению к *A. salmonicida* и не лизируют бактерии других видов и родов (табл. 11).

Таблица 11. Специфичность выделенных бактериофагов

№ п/п	Вид бактерий	Asl10/2-УГСХА	Asl25-УГСХА	Asl11-УГСХА
1.	<i>A. salmonicida</i> ATCC 33658	+	+	+
2.	<i>A. hydrophila</i> ATCC 49140	-	-	-
3.	<i>A. sobria</i> ATCC 9071	-	-	-
4.	<i>A. caviae</i> ATCC 15468	-	-	-
5.	<i>Ps. aeruginosa</i> №128	-	-	-
6.	<i>Ps. putida</i> №12633	-	-	-
7.	<i>Ps. fluorescens</i> №13525	-	-	-
8.	<i>Pr. mirabilis</i> №523	-	-	-
10.	<i>Y. ruckeri</i> №6	-	-	-
11.	<i>Y. enterocolitica</i>	-	-	-
12.	<i>Kl. pneumoniae</i> №4463	-	-	-

Примечание: «-» - отсутствие негативных колоний, «+» - наличие негативных колоний.



*Температурная устойчивость бактериофагов  
Asl10/2-УГСХА, Asl25- УГСХА, Asl11-УГСХА.*

Для определения температурной устойчивости фага пробирки в разведении 1:10 в МПБ прогревали в ультратермостате в течение 30 минут при температуре от 45°C и выше с шагом в 2°C. Одновременно с этим ставили контроль. После воздействия температуры активность фагов определяли по методу Грациа.

Результаты показали, что прогревание бактериофага Asl25-УГСХА при температуре 45-47°C не оказывает влияния на содержание активных корпускул фага в 1 мл. Дальнейшее повышение температуры приводит к снижению активности фага. Прогревание бактериофагов Asl10/2-УГСХА и Asl11-УГСХА до температуры 45°C не приводит к изменению числа титра фага, при повышении температуры – титр постепенно снижается. При нагревании фага до температуры 55°C и выше – бактериофаги погибают (табл. 12).

Таблица 12. Изменение титра бактериофагов Asl25-УГСХА, Asl10/2-УГСХА, Asl11-УГСХА при увеличении температуры культивирования

Температура, °С	Титр бактериофага Asl25- УГСХА	Титр бактериофага Asl10/2-УГСХА	Титр бактериофага Asl11-УГСХА
45	$0,3 \times 10^9 \pm 0,1 \times 10^9$	$0,9 \times 10^9 \pm 0,4 \times 10^9$	$0,2 \times 10^9 \pm 0,1 \times 10^9$
47	$0,3 \times 10^9 \pm 0,2 \times 10^9$	$0,5 \times 10^8 \pm 0,1 \times 10^8$	$0,2 \times 10^7 \pm 0,1 \times 10^7$
49	$0,4 \times 10^6 \pm 0,2 \times 10^6$	$0,9 \times 10^7 \pm 0,4 \times 10^7$	$0,4 \times 10^6 \pm 0,2 \times 10^6$
51	$0,7 \times 10^5 \pm 0,3 \times 10^5$	$0,8 \times 10^5 \pm 0,1 \times 10^5$	$0,3 \times 10^5 \pm 0,1 \times 10^5$
53	$0,5 \times 10^3 \pm 0,2 \times 10^3$	$0,8 \times 10^4 \pm 0,6 \times 10^4$	$0,5 \times 10^4 \pm 0,1 \times 10^4$
55	-	-	-
57	-	-	-
59	-	-	-
61	-	-	-
Контроль фага	$0,3 \times 10^9 \pm 0,2 \times 10^9$	$0,4 \times 10^9 \pm 0,1 \times 10^9$	$0,2 \times 10^9 \pm 0,1 \times 10^9$

Примечание: «-» - отсутствие негативных колоний.

*Устойчивость бактериофагов  
Asl10/2-УГСХА, Asl25- УГСХА, Asl11-УГСХА  
к воздействию хлороформа.*

Определение чувствительности бактериофага и бактерий было проведено путем обработки фаговой суспензии хлороформом 1:10 при постоянном встряхивании. Контролем служит пробирка с бактериофагом, необработанным хлороформом. После воздействия хлороформа активность бактериофаги определяли по методу Грациа.

Все три бактериофага оказались не устойчивы к воздействию хлороформа (табл. 13).

Таблица 13. Устойчивость фага Asl25-УГСХА к воздействию хлороформа

№	Фаг	Количество активных корпускул фага в 1 мл				
		Обработка 10 мин.	Обработка 20 мин.	Обработка 30 мин.	Обработка 40 мин.	Контроль
1.	Asl25-УГСХА	-	-	-	-	$0,3 \times 10^9 \pm 0,2 \times 10^9$
2.	Asl10/2-УГСХА	-	-	-	-	$0,4 \times 10^9 \pm 0,1 \times 10^9$
3.	Asl11-УГСХА	-	-	-	-	$0,2 \times 10^9 \pm 0,1 \times 10^9$

Примечание: «-» - отсутствие негативных колоний.

По результатам исследования основных биологических свойств выделенных бактериофагов для дальнейших исследований было решено использовать бактериофаг Asl25- УГСХА.

Выбранный бактериофаг имеет достаточно высокий спектр литической активности - 87,5%; уровень литической активности составляет  $0,3 \times 10^9 \pm 0,2 \times 10^9$  по Грациа и  $10^{-8}$  по Аппельману; строго специфичен; температурная устойчивость до 45-47°C, от 55°C погибает; к хлороформу не устойчив.

2.2.8 Определение технологических параметров изготовления и контроля бактериофагового биопрепарата для идентификации и индикации *A. salmonicida*

К технологическим параметрам изготовления и контроля биопрепарата на основе выбранного бактериофага относятся – температурные показатели культивирования, количественное соотношение фага и культуры, оптимальное соотношение между временем пассажа и активностью фага.

*Температурные показатели культивирования бактериофага Asl25-УГСХА*

В пробирку со стерильным МПБ в объеме 4,5 мл было внесено 0,2 мл бактериофага Asl25-УГСХА и 0,2 мл суточной культуры штамма *A. salmonicida* №1asl. Для постановки контроля в пробирки со стерильным МПБ в объеме 4,5 мл, была внесена суточная культура штамма *A. salmonicida* №1asl в количестве 0,2 мл. Далее пробирки были помещены в термостат для культивирования при различных температурных режимах от 20°C до 36°C с шагом 2°C на 24 ч. Помутнение пробирки указывало на отсутствие лизиса, просветление в сравнении с контролем – на наличие лизиса (табл. 14).

Таблица 14. Температурные показатели культивирования бактериофага Asl25-УГСХА

Фаг	Температура культивирования фага				
	20°C	24°C	28°C	32°C	36°C
	Выявление лизиса				
Asl25- УГСХА	+	+	+	-	-

Результаты исследования температурных показателей культивирования бактериофага свидетельствуют о том, что диапазон оптимальных температур культивирования фага Asl25-УГСХА составляет 20-28°C.

*Количественное соотношение фага и культуры при культивировании*

В пробирку, со стерильным МПБ в объеме 4,5 мл было внесено 0,2 мл фага Asl25-УГСХА, затем в пробирку вносили 24-х часовую культуру штамма *A. salmonicida* №1asl в количестве от 0,2 до 1 мл с шагом 0,2 мл. Одновременно был поставлен контроль. Для этого в пробирку, со стерильным МПБ в объеме 4,5 мл была внесена культура штамма *A. salmonicida* №1asl по 0,2 мл. Далее пробирки были помещены в термостат для культивирования при температуре 28°C. Затем подсчитывали количество активных корпускул фага в 1 мл по методу Грация (табл. 15).

Таблица 15. Зависимость титра бактериофага от соотношения с количеством суточной бактериальной культуры

Объем культуры, мл на 0,2 мл фага	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
Титр фага Asl25- УГСХА, БОЕ/мл	$0,5 \times 10^9 \pm$ $0,3 \times 10^9$	$0,3 \times 10^{10} \pm$ $0,2 \times 10^{10}$	$0,3 \times 10^8 \pm$ $0,1 \times 10^8$	$0,2 \times 10^8 \pm$ $0,1 \times 10^8$	$0,2 \times 10^7 \pm$ $0,1 \times 10^7$

В результате проведенных исследований установлено, что для бактериофага Asl25-УГСХА оптимальным соотношением фага и культуры является 1:2, т.е. 0,2 мл фага x 0,4 мл индикаторной культуры

*Оптимальное соотношение между временем пассажа и активностью фага*

В пробирку с 4,5 мл МПБ было добавлено 0,2 мл суточной культуры штамма *A. salmonicida* №1asl и 0,2 мл фага Asl25-УГСХА. Параллельно был поставлен контроль: пробирка с МПБ, засеянная суточной культурой без фага. Посевы были культивированы при температуре 28°C в течение 4, 6, 8, 10, 12, 14 часов. После культивирования пробирки с фагом были профильтрованы при помощи стерильных мембранных фильтров. Литическую активность полученных фаголизатов исследовали методом по Грация (табл. 16).

Таблица 16. Зависимость титра фага от времени пассажа

Название фага	Вариант эксперимента с фагом	Время пассажа, часы	Литическая активность по методу Грациа, БОЕ/мл
Asl25-УГСХА	1	4	$0,7 \times 10^6 \pm 0,6 \times 10^6$
	2	6	$0,9 \times 10^7 \pm 0,5 \times 10^7$
	3	8	$0,4 \times 10^8 \pm 0,2 \times 10^8$
	4	10	$0,3 \times 10^9 \pm 0,1 \times 10^9$
	5	12	$0,3 \times 10^{10} \pm 0,1 \times 10^{10}$
	6	14	$0,2 \times 10^{10} \pm 0,1 \times 10^{10}$

Установлено, что оптимальное время пассажа при температуре 28 °С для фага Asl25-УГСХА составляет 12 часов, после 14 часов не происходит заметного изменения литической активности фага.

### 2.2.9 Разработка оптимальных условий постановки реакции нарастания титра фага

Для разработки оптимальных условий постановки реакции нарастания титра фага (РНФ) нужно определить: оптимальное время, обеспечивающее полное взаимодействие фага с бактериями, количественный показатель реакции, имеющий диагностическое значение.

#### *Определение количественного показателя РНФ*

Количественный показатель – уровень нарастания титра фага по сравнению с контролем.

Нами была использована методика Ганюшкина (1984) для проведения постановки РНФ на МПБ, контаминированным *A.salmonicida* №1asl с различным числом микробных клеток (от 10 до  $10^5$ ). Использовали фаг Asl25-УГСХА в разведении  $10^3$  корпускул в 1 мл. в опытные колбы с 50 мл МПБ вносили индикаторные культуры штамма *A.salmonicida* №1asl в следующих концентрациях  $10^5$ ;  $10^4$ ;  $10^3$ ;  $10^2$ ; 10 м.к./мл и брали колбу с контрольным МПБ.

Реакция нарастания титра фага ставили по методике В.Д.Тимакова и Д.М. Гольдфарба. Оценку РНФ производили по таблице 17.

В случае наличия в исследуемом материале свободного фага число корпускул фага на чашке подсчитывали и вычитали из числа корпускул индикаторного фага в опытных чашках. Разницу сравнивали с контролем. При высоком титре свободного фага (сплошной лизис индикаторной культуры) реакция не учитывалась. РНФ, оцененная как сомнительная не имела диагностического значения.

Таблица 17. Оценка реакции нарастания титра фага (РНФ)

Увеличение количества корпускул индикаторного фага в опытной пробе (пробирка №1) в отношении к количеству корпускул в контроле (пробирка №3)	Оценка
Увеличение в 2,5 раза Увеличение от 3 до 5 раз Увеличение свыше 5 раз Увеличение более 10 раз	Сомнительная Слабо положительная Положительная Резко положительная

По результатам проведенных опытов было установлено, что при 7-часовой экспозиции фага с культурой количество фаговых частиц более в 5 раз превышает количество фаговых частиц в контрольных пробах, при контаминации МПБ штаммом *A. salmonicida* № 1asl в концентрации  $10^5$  м.к./мл для Asl25-УГСХА (табл. 18)

Таблица 18. Результаты РНФ бактериофага Asl25- УГСХА при времени контакта фага с культурой 7 часов, без предварительного подращивания

Концентрация индикаторной культуры, м.к./мл	Количество негативных колоний, шт.			Наращение титра фага, раз	Результат РНФ
	Чашка №1	Чашка №2	Чашка №3		
$10^1$	8	-	7	-	-
$10^2$	19	-	9	2	-
$10^3$	27	-	8	3	-
$10^4$	43	-	9	4	-
$10^5$	103	-	5	Более 20	+

Примечание: «+»- наличие лизиса, негативных колоний, «-»- отсутствие лизиса, негативных колоний.

### Определение оптимального времени РНФ

В разработку оптимальных условий постановки реакции нарастания титра фага входит установление времени, обеспечивающего наиболее полноценное взаимодействие бактериофага с бактериями.

Для этого были проведены эксперименты по выявлению наиболее эффективного режима взаимодействия фага и культуры при сохранении остальных параметров постановки РНФ. Был использован индикаторный штамм №1 as1.

Оптимальное время экспозиции было выбрано из следующих параметров:

- предварительное подращивание исследуемого материала (образцы воды) в течение 7, 14, 21, 28 часов при температуре 28°C, с последующим, после добавления фагов, инкубированием смеси при температуре 28°C в течение 7 часов.

- увеличение времени контакта исследуемого материала с фагом до 9, 14, 21, 28 часов при температуре 28°C.

- предварительное подращивание исследуемого материала в течение 7, 14, 21, 28 часов при температуре 28°C, с последующим, после добавления фагов, инкубированием смеси при температуре 28°C в течении 9 часов.

Для проведения РНФ с предварительным подращиванием исследуемого материала в течение 7, 14, 21, 28 часов и последующей экспозиции с фагом в течении 7 часов, в колбы с 50 мл МПБ, вносили 1 мл индикаторной культуры штамм *A.salmonicida* №1 as1 в концентрации от  $10^1$  до  $10^5$  м.к./мл. содержимое колб перемешивалось и культивировалось в термостате при 28°C в течение 7, 14, 21, 28 часов.

Для каждой исследуемой пробы брали три пробирки: №1 - для регистрации увеличения титра фага, №2 - контроль на свободный фаг, №3 - контроль титра индикаторного фага.

Исследуемый материал разливали в пробирки №1 и №2 по 9 мл, пробирки №3 содержали по 9 мл стерильного МПБ. Далее в пробирки №1 и

№3 добавляли по 1 мл индикаторных фагов в рабочих разведениях. В пробирки №2 добавляли 1 мл стерильного МПБ. Все пробирки ставили в термостат на 7 часов. Одновременно ставили контроль стерильности сред.

По окончании инкубации из каждой пробирки брали по 0,25 мл исследуемого материала и вносили в пробирки с 4,5 мл МПБ. Пробирки с фагами обрабатывали при помощи центрифугирования (3000 оборотов в течение 20 минут) и фильтрования и подвергали дальнейшему исследованию при помощи метода агаровых слоев, засеянные чашки помещались в термостат на 12 часов.

В результате определили чувствительность РНФ в зависимости от времени подращивания исходного материала при температуре 28°C в течение 7, 14, 21, 28 часов и дальнейшего инкубирования с фагом в течение 7 часов. Культивирование агаровых слоев для подсчета негативных колоний 12 часов. В результате время, затраченное на проведение исследования с помощью РНФ составляет 26, 33, 40, 47 часов соответственно (табл. 19)

Таблица 19. Чувствительность РНФ в зависимости от времени предварительного подращивания исследуемого материала при дальнейшей 7-часовой экспозиции с фагом

Время подращивания, часов	Концентрация индикаторной культуры м.к./мл					Время на исследование, часов
	10	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	
	Результат РНФ					
7	-	-	-	-	+	26
14	-	-	-	+	+	33
21	-	-	-	+	+	40
28	-	-	+	+	+	47

Примечание: «-» - отрицательный или сомнительный результат, «+» - положительный результат.

При использовании бактериологического метода на исследование затрачивается 84 часа.

Далее была изучена чувствительность РНФ в зависимости от времени инкубирования исследуемого материала с фагом.



Индикаторную культуру штамма *A.salmonicida* №1as1 в концентрации от  $10^1$  до  $10^5$  м.к./мл, не подрачивая в термостате, вносили в пробирки и исследовали в РНФ по схеме. Для каждой исследуемой пробы брали три пробирки: №1 – для регистрации увеличения титра фага, № 2 – контроль на свободный фаг, №3 – контроль титра индикаторного фага. Исследуемый материал разливали по 9 мл в пробирки №1 и №2, пробирки №3 содержали 9 мл стерильного МПБ. В пробирки №1 и №3 добавляли по 1 мл фага в рабочих разведениях. В пробирки №2 добавляли 1 мл стерильного МПБ. Все пробирки ставили в термостат на 9, 14, 21, 28 часа при температуре 28°C. Одновременно ставили контроль на стерильность сред. По окончании инкубации из каждой пробирки было взято по 0,25 мл исследуемого материала и вносили в пробирки с 4,5 мл МПБ. Пробирки с фагами обрабатывали при помощи центрифугирования (при 3000 оборотах в течение 20 минут) и фильтрации, а затем подвергали дальнейшему исследованию при помощи агаровых слоев. Засеянные таким образом чашки помещали в термостат на 12 часов. Таким образом, время затраченное на проведение исследования с помощью РНФ составляет 21, 26, 33, 40 часов соответственно.

В результате проведенных исследований было установлено, что при инкубировании материала в течение 9 и 14 часов бактерии *A. salmonicida* были обнаружены при помощи РНФ гомологичным фагом Asl25-УГСХА в концентрации  $10^4$  м.к./мл. При инкубировании в течение 21 и 28 часов –  $10^3$  м.к./мл. Таким образом, результаты проведенных исследований показали, что увеличение экспозиции с фагом без предварительного подрачивания исследуемого материала повышают чувствительность реакции по сравнению с 7-часовой экспозицией. При этом соотношение чувствительности к общему времени реакции при этом несколько ниже, чем в РНФ с предварительным подрачиванием исследуемого материала и последующей 7-часовой экспозицией с фагом.

Было установлено, что после предварительного подрачивания исследуемого материала в течение 7 часов удалось обнаружить *A.salmonicida* в

концентрации  $10^5$  м.к./мл. Увеличение времени предварительной инкубации до 14 часов позволило обнаружить *A.salmonicida* в концентрации  $10^4$  м.к./мл. 21-часовая экспозиция предварительного подращивания существенно не повлияла на результаты реакции. Увеличение времени до 28 часов позволило обнаружить *A.salmonicida* в концентрации  $10^3$  м.к./мл (табл.20).

Таблица 20. Чувствительность РНФ в зависимости от времени инкубирования исследуемого материала с фагом Asl25-УГСХА без предварительного подращивания исследуемого материала

Время контакта	Концентрация индикаторной культуры м.к./мл					Время на исследование, часов
	10	$10^2$	$10^3$	$10^4$	$10^5$	
	Результат РНФ					
7					+	19
9	-	-	-	+	+	21
14	-	-	-	+	+	26
21	-	-	+	+	+	33
28	-	-	+	+	+	40

Примечание: «-» - отрицательный или сомнительный результат, «+» - положительный результат.

Изучение чувствительности РНФ при предварительном подращивании исследуемого материала 7, 14, 21, 28 часов при температуре 28°C, с последующим, после добавления фагов инкубированием смеси при температуре 28°C в течение 9 часов.

В колбы с МПБ объемом 50 мл вносили 1 мл индикаторной культуры штамма *A.salmonicida* № 1as1 в концентрации от  $10^1$  до  $10^5$  м.к./мл. Содержимое колб в течение 10 минут перемещивали и культивировали в термостате в течение 7, 14, 21, 28 часов при температуре 28°C.

Для каждой исследуемой пробы брали три пробирки: №1 – для регистрации увеличения титра фага, №2 – контроль на свободный фаг, №3 – контроль титра индикаторного фага.

Исследуемый материал разливали по 9 мл в пробирки №1 и №2, пробирки №3 содержали 9 мл стерильного МПБ. Далее в пробирки №1 и №3 добавляли по 1 мл индикаторных фагов в рабочих разведениях. В пробирки №2

добавляли 1 мл стерильного МПБ. Все пробирки снова ставили в термостат на 9 часов. Одновременно ставили контроль стерильности сред.

По окончании инкубации из каждой пробирки брали по 0,25 мл исследуемого материала и вносили в пробирки с 4,5 мл МПБ, обрабатывали центрифугированием (3000 оборотов в течение 20 минут) и фильтрованием и подвергали дальнейшему исследованию при помощи метода агаровых слоев. Засеянные таким образом чашки ставили в термостат на 12 часов при температуре 28°C.

Установлено, что после предварительного подращивания исследуемого материала в течение 7 и 14 часов удалось обнаружить *A. salmonicida* в концентрации  $10^3$  м.к./мл. Увеличение времени инкубации до 21 часа позволило обнаружить *A. salmonicida* в концентрации  $10^2$  м.к./мл (табл.21).

Таблица 21. Чувствительность РНФ в зависимости от времени предварительного подращивания исследуемого материала при дальнейшей 9-часовой экспозиции с фагом

Время подращивания, часов	Концентрация индикаторной культуры м.к./мл					Время на исследование, часов
	10	$10^2$	$10^3$	$10^4$	$10^5$	
	Результат РНФ					
7	-	-	+	+	+	28
14	-	-	+	+	+	35
21	-	+	+	+	+	42
28	-	+	+	+	+	49

Примечание: «-»- отрицательный или сомнительный результат, «+»- положительный результат РНФ.

Обобщенные результаты серии исследований по выявлению наиболее эффективного режима РНФ представлены в таблице 22.

Схема постановки реакции нарастания титра фага при индикации бактерий *A. salmonicida* представлена на рисунке 18.

Таблица 22. Чувствительность РНФ при различных режимах.

Показатели экспозиции		Время контакта фага с исследуемым материалом, ч				
		7	9	14	21	28
Время предварительного подрачивания, ч	0	$10^5$	$10^4$	$10^4$	$10^3$	$10^3$
		19	21	26	33	40
	7	$10^5$	$10^3$	-	-	-
		26	28			
	14	$10^4$	$10^3$	-	-	-
		33	35			
	21	$10^4$	$10^2$	-	-	-
		40	42			
	28	$10^3$	$10^2$	-	-	-
		47	49			

Примечание: в числителе – чувствительность РНФ; в знаменателе – общее время, затраченное на реакцию; «-»- исследование не проводилось.

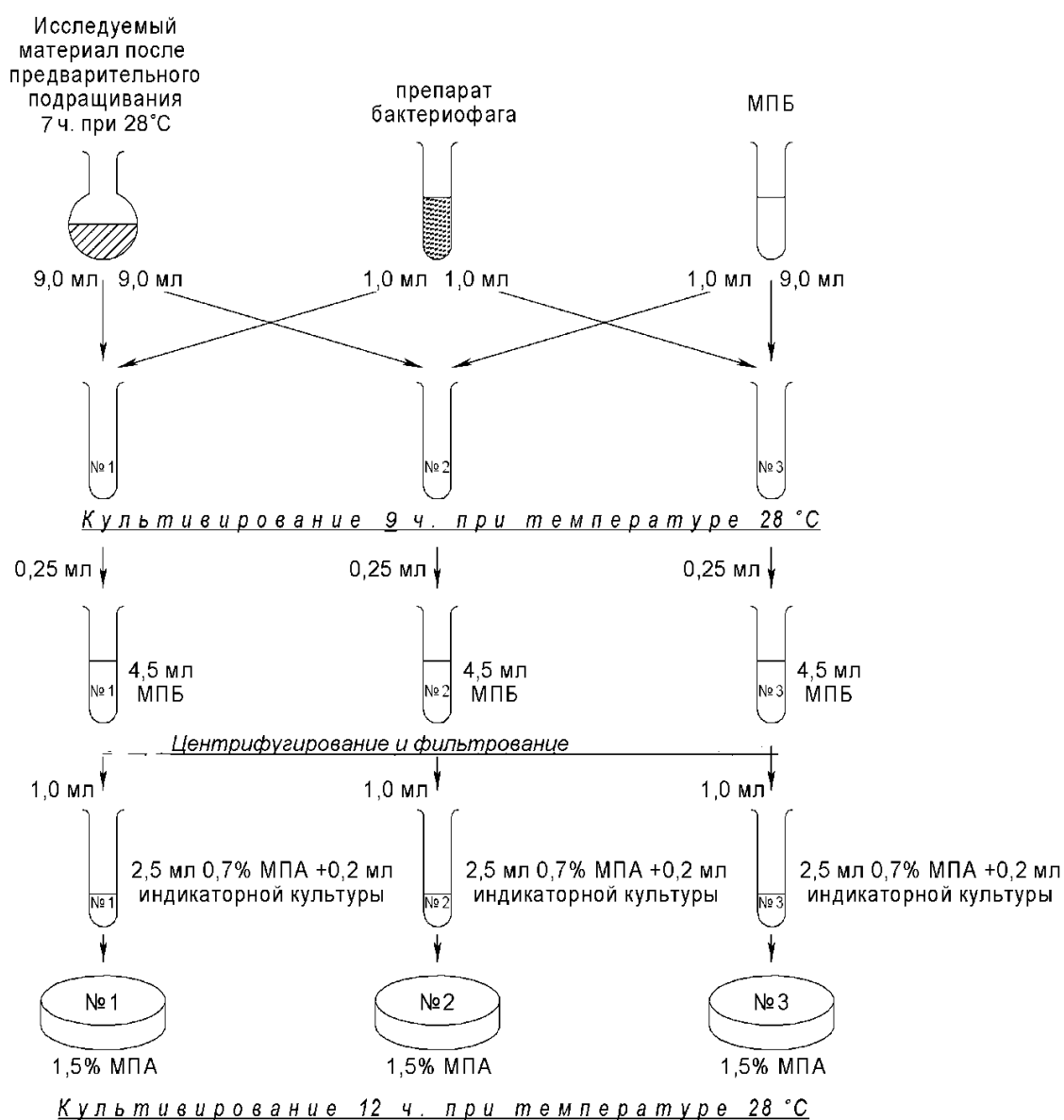


Рисунок 18. Схема постановки реакции нарастания титра фага при индикации бактерий *A. salmonicida*

Примечание: реакция считается положительной, если количество негативных колоний, образовавшихся на чашке Петри превышает количество негативных колоний, образовавшихся на чашке Петри №3 в 5 и более раз

Полученные результаты позволяют считать, что наиболее оптимальным является режим РНФ с предварительным подрачиванием исследуемого материала в течение 7 часов и 9-часовой экспозицией исследуемого материала с фагом.

Такой режим позволяет провести индикацию *A.salmonicida* в количестве  $10^3$  м.к./мл в течение 28 часов

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках диссертационных исследований нами изучены культуральные, тинкториальные и бактериологические свойства бактерии *A. salmonicida*.

Бактерия *A. salmonicida* является неподвижной грамотрицательной палочкой, обладает оксидазной и каталозной активностью, не ферментирует лактозу, раффинозу, ксилозу, рамнозу, способна к окислению и ферментации глюкозы, восстанавливать нитраты в нитриты, разжижает желатиназу, не способна к утилизации цитрата. При росте на чашках Петри с МПА на вторые сутки образует коричневый пигмент, что является одним из признаков штамма и описывается практически во всех литературных источниках (Griffin P. J. et al., 1953, Altwegg M., 1990). В разных ареалах могут встречаться штаммы, различающиеся по одному или нескольким биологическим и культуральным признакам. Кроме того, достаточно часто встречаются атипичные штаммы, проявляющие отличные биологические свойства, но относящиеся к виду *A. salmonicida* по генотипу. Выделенные нами «полевые» штаммы практически по всем биологическим признакам соответствуют штаммам, описываемым в Bergeys Manual of Systematics Bacteriology (2007), за исключением некоторых свойств (ферментация углеводов), что вероятнее всего связано с ареалом распространения микроорганизма.

Многие исследователи, как отечественные, так и зарубежные (Калина Г. П., Канаева, Т.И., 2009, Mishra S. et al, 1987, Kelly M. et al, 1988, Jeppesen C., 1995) указывают, что ампициллин возможно добавлять в среду в качестве селективного агента, наши исследования антибиотикочувствительности показали, что штамм *A. salmonicida* чувствителен к ампициллину и большинству антимикробных препаратов, за исключением оптахина, бацитрацина и линкомицина. При этом некоторые виды из возможных ассоциантов (*Ps. aeruginosa*, *Ps. putida*, *Ps. fluorescens*, *A. caviae*, *Pr. mirabilis*, *Y. ruckeri*, *Y. enterocolitica*, *Kl.pneumoniae*, *E. coli*) также устойчивы к данным антибиотикам. Таким образом, был сделан вывод, что антибиотики нельзя

использовать в качестве селективного агента в среде для выделения *A. salmonicida*.

При изучении существующих питательных сред для выделения *A. salmonicida* было обнаружено, что в качестве селективного агента добавляется ампициллин, что делает среду неэффективной для роста данного микроорганизма, либо не являются селективными, и на них могут вырасти как *A. salmonicida*, так и бактерии-ассоцианты.

В нормативных документах, регламентирующих бактериологическую диагностику *A. salmonicida* нет четко обозначенной схемы их выделения. Исследуемый материал высевают на среды общего назначения и диагностика занимает до 7-10 дней. Профилактика и лечение аэромоноза осуществляется антибиотиками широкого спектра и препаратами, содержащими йод, что негативно сказывается как на природных сообществах, так и на общем состоянии рыбы (Инструкция о мероприятиях по профилактике и мерам борьбы с фурункулезом лососевых рыб, 1997).

Предлагаемая нами оригинальная схема выделения, идентификации и индикации состоит из специфических дифференциально-диагностических сред, бактериологических тестов, а также с использованием фагового биопрепарата.

При разработке накопительной среды А.С1.1-УГСХА и плотной селективной среды А.С1.2-УГСХА была исследована способность данных бактерий к окислению глюкозы в аэробных условиях, а также особенности роста в присутствии конго-рот. В пробирках с накопительной средой А.С1.1-УГСХА бактерии *A. salmonicida* изменяют цвет среды с зеленого на желтый, вследствие окисления глюкозы. На дифференциально-диагностической среде А.С1.2-УГСХА колонии *A. salmonicida* мелкие, черного цвета, среда рядом с колониями также приобретает черный цвет. Комплексное использование данных сред дает возможность визуализировать бактериальные колонии, а также повышает эффективность выделения и идентификации *A. salmonicida*.



Подобранная в ходе работы система тестов бактериологической идентификации *A.salmonicida* учитывает основные биологические свойства данного вида бактерий - оксидаза, каталаза, подвижность, способность к окислению и ферментации глюкозы в аэробных и анаэробных условиях, разжижение желатина, способность к нитратредуктазе.

Использование разработанной оригинальной схемы имеет высокие показатели чувствительности и специфичности, позволяет проводить выделение и идентификацию *A.salmonicida* из объектов внешней среды в течение 60-84 часов.

Специфичность сконструированной схемы выделения и идентификации *A.salmonicida* проверена на 11 штаммах бактерий других видов и родов (*Ps. putida* №12633, *Ps. fluorescens* №13525, *Y. ruckeri* №6, *Y. enterocolitica*, *Ps. aeruginosa* №128, *A. hydrophila* ATCC 49140, *A. sobria* ATCC 9071, *A. caviae* ATCC 12633, *P. mirabilis* №523, *Kl. pneumoniae* №4463, *E. coli* №4). С использованием разработанной в рамках диссертационной работы схемы, из исследуемых нами 378 объектов внешней среды, тканевого материала и органокомплекса рыбы было выделено 23 «полевых» штамма *A.salmonicida*.

Высокое значение приобретает ускоренная индикация *A.salmonicida* для быстрого и точного обнаружения данных бактерий в объектах внешней среды. Вместе с тем применение современных генетических и иммунологических методов для решения этих задач зачастую претерпевает трудности, связанные с высокой стоимостью, либо сложностью выполнения исследований.

С середины 20 столетия бактериофаги широко используются для диагностики различных бактериальных инфекций (Алешкин, В.А., 2013).

Использование биопрепаратов на основе бактериофагов позволяет в кратчайшие сроки провести индикацию и идентификацию микроорганизмы из объектов внешней среды, по сравнению со стандартными бактериологическими методами (Золотухин, С.Н., 2006).

Нами было выделено 17 штаммов бактериофагов: 15 вирулентных и 2 умеренных бактериофага и изучены их основные биологические свойства: морфология негативных колоний, литическая активность, спектр литической активности, специфичность действия, температурная устойчивость, устойчивость к хлороформу.

Негативные колонии выделенных бактериофагов имеют диаметр от 0,5-2 мм, встречаются как с зоной вторичного лизиса, так и без нее.

Литическая активность бактериофагов *A. salmonicida* имеет более широкий диапазон значений (от  $0,2 \times 10^3 \pm 0,5 \times 10^3$  до  $0,3 \times 10^9 \pm 0,2 \times 10^9$  по методу Грация и от  $10^{-4}$  до  $10^{-9}$  по методу Аппельмана), по сравнению с литической активностью бактериофагов *A. sobria* (Горшков, И.Г., 2015) (от  $0,6(\pm 0,1) \times 10^6$  до  $2,0(\pm 0,2) \times 10^{10}$  БОЕ/мл) и литической активностью бактериофагов *A. hydrophila* (от  $5 \times 10^5$  до  $2 \times 10^8$  фаговых корпускул в 1 мл по методу Грация и от  $10^{-5}$  до  $10^{-8}$  по методу Аппельмана) (Насибуллин, И.Р., 2013).

Также как и другие бактериофаги рода *Aeromonas*, выделенные бактериофаги строго специфичны и лизируют бактерии только своего вида.

Бактериофаги *A. salmonicida* имеют более низкую температурную устойчивость по сравнению с другими бактериофагами рода *Aeromonas*. Прогревание до температуры  $45^\circ\text{C}$  не приводит к изменению числа титра фага, при повышении температуры – титр постепенно снижается. При нагревании фага до температуры  $55^\circ\text{C}$  и выше – бактериофаги погибают.

Бактериофаги *A. sobria* устойчивы к температуре  $48^\circ\text{C}$  в течение 20 минут и полностью инактивируются при  $54^\circ\text{C}$  (Горшков, И.Г., 2015), бактериофаги *A. hydrophila* устойчивы в условиях выше  $60^\circ\text{C}$  (Насибуллин, И.Р., 2014).

Для конструирования биопрепарата для индикации и идентификации *A. salmonicida* по критериям литической активности, спектру лизируемых культур и специфичности был отобран бактериофаг Asl25- УГСХА, имеющий оптимальные свойства – достаточно высокий спектр литической активности – 87,5%; уровень литической активности составляет  $0,3 \times 10^9 \pm 0,2 \times 10^9$  по Грация

и  $10^{-8}$  по Аппельману; строго специфичен; устойчив к температуре  $53^{\circ}\text{C}$ , не устойчив к хлороформу.

В ходе выполнения диссертационной работы были определены оптимальные технологические параметры для изготовления биопрепарата с высокой литической активностью: диапазон оптимальных температур культивирования фага Asl25-УГСХА составляет  $20-28^{\circ}\text{C}$ , оптимальным соотношением фага и культуры является 1:2, т.е. 0,2 мл фага x 0,4 мл индикаторной культуры, оптимальное время пассажа при температуре  $28^{\circ}\text{C}$  для фага Asl 25-УГСХА составляет 12 часов.

Для ускоренной индикации *A.salmonicida* в объектах внешней среды разработали биотехнологические параметры постановки реакции нарастания титра фага, включающие количественный показатель реакции, имеющий диагностическое значение и оптимальное время, обеспечивающее полноценное взаимодействие фага с бактериями.

Наиболее оптимальным оказался режим РНФ с предварительным подращиванием исследуемого материала в течение 7 часов и 9-часовой экспозицией исследуемого материала с фагом. Такой режим позволяет провести индикацию *A.salmonicida* в количестве  $10^3$  м.к./мл в течение 28 часов.

РНФ является чувствительным и специфическим методом диагностики, позволяющим за относительно короткий срок обнаружить искомые бактерии в субстрате, при наличии посторонней микрофлоры без выделения чистых культур.

## ВЫВОДЫ

1. Были изучены тинкториальные и биологические свойства референс-штамма *A. salmonicida* ATCC 33658. Полученные данные использовались для разработки комплексной схемы выделения, идентификации и индикации *A. salmonicida*: специальных бактериологических сред - жидкая накопительная среда A.SI.1-УГСХА с хлоридом бария и дифференциально-диагностическая среда A.SI.2-УГСХА с конго рот, подобранных бактериологических тестов и бактериофагового биопрепаратат для проведения спот-теста, позволяющая провести выделение и идентификацию за 60-84 часа. С помощью предложенной схемы в результате лабораторных исследований нами было выделено 23 штамма бактерий *A. salmonicida* из водных объектов г. Ульяновска и Ульяновской области, биологические особенности, которых подтверждают их принадлежность к исследуемому виду бактерий.

2. Из 23 «полевых» штаммов методом индукции было выделено 2 умеренных бактериофага, литическая активность которых составляет  $0,7 \times 10^5 \pm 0,2 \times 10^5$  и  $0,3 \times 10^6 \pm 0,1 \times 10^6$  по методу Грациа и  $10^6$  по методу Аппельмана. Из объектов внешней среды методом накопления было выделено и изучено по биологическим свойствам 15 культур бактериофагов бактерий *A. salmonicida*. Выделенные бактериофаги имели различные типы негативных колоний: диаметр от 0,5 до 2,0 мм, прозрачные и полупрозрачные, с зоной вторичного лизиса и без нее, литическая активность варьирует от  $10^{-7}$  до  $10^{-9}$  по методу Аппельмана, от  $0,5 \times 10^3 \pm 0,2 \times 10^3$  до  $0,4 \times 10^9 \pm 0,1 \times 10^9$  по методу Грациа, спектр литической активности составляет от 70,8% до 87,5%. Выделенные бактериофаги строго специфичны по отношению к *A. salmonicida* и не лизируют бактерии других видов и родов (*A. hydrophila* ATCC 49140, *A. sobria* ATCC 9071, *A. caviae* ATCC 12633, *Ps. putida* №12633, *Ps. aeruginosa* №128, *Ps. fluorescens* №13525, *Y. ruckeri* №6, *Y. enterocolitica*, *P. mirabilis* №523, *Kl. pneumonia* №4463, *E. coli* №4), не устойчивы к обработке хлороформом (в соотношении 1:10) и инактивируются при температуре 53°C.

3. Для фагового биопрепарата селекционирован бактериофаг Asl25-УГСХА, имеющий достаточно высокий спектр литической активности- 87,5%; уровень литической активности составляет  $0,3 \times 10^9 \pm 0,2 \times 10^9$  по Грациа и  $10^{-8}$  по Аппельману; строго специфичен; температурная устойчивость до 45-47°C, от 55°C погибает; к хлороформу не устойчив.

4. Определены оптимальные технологические параметры создания и хранения бактериофагового биопрепарата для идентификации и индикации *A.salmonicida*: температура культивирования фага Asl25-УГСХА 20-28°C, время пассажа – 12 часов, соотношение бактериофага и бактериальной культуры – 1:2, титр биопрепарата не ниже  $0,4 \times 10^9 \pm 0,1 \times 10^9$  по Грациа и не ниже  $10^{-9}$  по Аппельману. Биопрепарат хранится в условиях холодильника при температуре 4-6 °С в герметичных флаконах до 3-х месяцев без снижения активности (сроки наблюдения).

5. Определены оптимальные параметры постановки реакции нарастания титра фага с использованием биопрепарата на основе бактериофага Asl25-УГСХА, имеющего оптимальные для конструирования биопрепарата свойства, для ускоренной индикации бактерии *A.salmonicida*, позволяющие обнаружить в исследуемом материале указанные бактерии в концентрации не менее  $10^3$  КОЕ/мл в течение 28 часов. Наиболее оптимальным является режим РНФ с предварительным подрачиванием исследуемого материала в течение 7 часов и 9-часовой экспозицией исследуемого материала с фагом (титр  $0,4 \times 10^9 \pm 0,1 \times 10^9$  по Грациа), при температуре 28°C.

6. Апробация созданной системы выделения, идентификации и индикации показала, что из исследуемых нами 378 проб воды и тканевого материала и органокомплекса рыбы, в 23 были обнаружены бактерии *A. salmonicida* штаммов при помощи метода РНФ, что было подтверждено бактериологическим исследованием.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. Схема индикации и идентификации бактерии *A. salmonicida* включающая комплекс усовершенствованных специальных микробиологических сред (накопительную и дифференциально-диагностическую), бактериологические тесты, бактериофаговый биопрепарат для постановки спот-теста рекомендуется для применения в диагностике аэромоназа рыб с целью сокращения времени получения результатов до 60-84 ч при температуре 28°C.

2. Бактериофаговый биопрепарат на основе полученного бактериофага As125-УГСХА, имеющий высокий спектр литической активности (87,5%), уровень литической активности составляет  $0,3 \times 10^9 \pm 0,2 \times 10^9$  по Грациа и  $10^8$  по Аппельману; строго специфичен; температурная устойчивость до 45-47°C. Соотношение бактериальной культуры и бактериофага – 1:2, время пассажа – 12 часов, температура культивирования - 28°C. Биопрепарат хранится в условиях холодильника, при температуре 4-6°C в герметичных флаконах до 3-х месяцев без снижения активности.

3. Для выявления бактерий *A. salmonicida* в концентрации не менее  $10^3$  КОЕ/мл рекомендуется использовать биопрепарат на основе бактериофага As125-УГСХА в реакции нарастания титра фага.

4. Материалы научных исследований рекомендуются для использования в учебном процессе при чтении лекций, для практических занятий студентов, работы аспирантов на кафедрах Ульяновской ГСХА им. П.А. Столыпина и УлГПУ им. И. Н. Ульянова.

## **ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ**

В перспективе дальнейшие исследования будут направлены на сохранение биологической активности бактериофагового препарата при стабильности его биологических свойств, разработка НИОКР в области бактериофаг-опосредованного биоконтроля.

**СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ**

атм. – атмосфера

БОЕ – бляшкообразующая единица

ВАК – высшая аттестационная комиссия

ВСЭ – ветеринарно-санитарная экспертиза

Г – гуанин

г. – год

г. – грамм

ГНЦ – гематологический научный центр

ГОСТ – государственный стандарт

ГСХА – государственная сельскохозяйственная академия

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИФА – иммуноферментный анализ

КОЕ – колонеобразующая единица

м. – метр

м.к./мл – количество микробных клеток в 1 мл

мг./л. – миллиграмм/литр

мин. – минута

мкм. – микрометр

мл – миллилитр

мм. – миллиметр

МПА – мясо-пептонный агар

МПБ – мясо-пептонный бульон

МУ – методические указания

НПО – научно-производственное объединение

ПБДЭ – пластины биохимические дифференцирующие энтеробактерии

рис. – рисунок

РНФ – реакция нарастания титра фага

рРНК – рибосомальная рибонуклеиновая кислота

Т - температура



таб. – таблица

ФГБОУ ВПО – федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования

Ц – цитозин

ч – час

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Авдеева, Е. В. Предотвращение заражения бактериальными болезнями разводимой форели в форелевом рыбоводном хозяйстве «Прибрежное» Калининградской области / Е. В. Авдеева, О. В. Казимирченко // *Фундаментальные исследования*. – 2006. – №9. – С. 42.
2. Акимкин, В. Г. Бактериофаги: исторические и современные аспекты их применения: опыт и перспективы / В. Г. Акимкин, О. С. Дарбеева, В. Ф. Колков // *Клиническая практика*. – 2010. – №4. – С. 48-54.
3. Алешкин, А. В. Лекции по исследованию бактериофагов: учебное пособие/ А.В. Алешкин. – Ульяновск, 2016. – 112 с.
4. Алсынбаев, М. М. Биопрепараты и ведущие направления их лечебно–профилактического применения: монография / М. М. Алсынбаев и др. – Уфа: РИО филиала «Иммунопрепарат» ФГУП «НПО «Микроген» МЗ РФ, 2008. – 100 с.
5. Асадчая, Р. Л. Использование пробиотиков для профилактики бактериальных болезней рыб / Р. Л. Асадчая // *Весці нацыянальнай акадэміі навук беларусі*. – 2005. – № 5. – С. 183-185.
6. Бабенко, О. В. Опыт борьбы с аэромоназом карпа / О. В. Бабенко, Г. С. Оганесян // *Ветеринария*. – 1997. – № 7. – С. 14– 15.
7. Барт, Н.Г. Биотехнологические аспекты разработки фагового препарата для индикации и идентификации бактерий рода *Providencia* / автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.02.03; 03.01.06 / Барт Наталья Геннадьевна. – Ульяновск, 2013. – 21 с.
8. Бессарабов, Б. Ф. Инфекционные болезни животных / Б. Ф. Бессарабов, А. А. Вашутин, Е.С. Воронин и др.; под общ. ред. А. А. Сидорчука. – М.: Колос, 2007. – 671 с.
9. Блинов, А. И. Аэромонады: выделение, идентификация и дифференциация, учебно-методические рекомендации / А. И. Блинов, Н. А. Глушанова. – Новокузнецк, 1997. – С. 8-10.

10. Бойцов, А. Г. Бактериофаги / А. Г. Бойцов, А. А. Порин, О. Н. Ластовка, и др.; под ред. В. П. Иванова. – Санкт–Петербург: Санкт–Петербургская медицинская академия, 2006. – 99 с.
11. Борисенко, В. Ф. Свойства аэромонад и их значение в интенсивно эксплуатируемых рыбоводных прудах: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.10; 03.00.19 / Борисенко Валентина Федоровна. – М., 1991. – 30 с.
12. Борисова, М. Н. Дифференциальная диагностика аэромоноза карпов / М. Н. Борисова, Т. Д. Пичугина, И. П. Иренков, Т. М. Носкольцева, В. И. Козлова, М. В. Черкасова, Е. А. Завьялова // Ветеринария. – 2003. – № 9. – С. 25-27.
13. Борисова, М. Н. Новые препараты для лечения аэромоноза карпов / М. Н. Борисова, Т. М. Повоскольцева, И. П. Иренков // Ветеринарный консультант. – 2004. – № 5. – С. 20.
14. Браун, Т. А. Геномы. Руководство по молекулярной генетике: учебное пособие / Т. А. Браун, пер.: А. Светлов, А. Миронов. – М.: Институт компьютерных исследований, 2011. – 921 с.
15. Бутко, М. П. Дезинфекция зимовальных комплексов при аэромонозе карповых рыб / М. П. Бутко, М. В. Неретин // Ветеринария. – 2010. – N 7. – С. 38-43.
16. Васильев, Д. А. Разработка методов фагоидентификации и фагодетекции бактерий *Pseudomonas fluorescens* / Д. А. Васильев, Д. А. Викторов, А. М. Артамонов, Т. А. Гринева, Е. А. Ляшенко // Фундаментальные исследования. – 2014. – № 5–1. – С. 55– 58.
17. Васильев, Д. А. Разработка ускоренной схемы индикации бактерий родов *Pseudomonas* и *Bacillus*, вызывающих порчу продуктов питания / Д. А. Васильев, С. Н. Золотухин, Н. А. Феоктистова, Д. А. Викторов, М. А. Юдина, Т. А. Гринева, А. М. Артамонов, А. В. Алешкин // Биотехнология: реальность и перспективы в сельском хозяйстве: материалы Международной научно–практической конференции. – Саратов, 2013. – С. 171-173.

18. Васильев, Д.А. Учебно–методическое пособие по методам общей бактериологии / Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин, Н.М. Никишина.– Ульяновск, 1998. – 151 с.
19. Видишев, Ю. А. Диагностика аэромоназа лососевых рыб Магаданской области / Ю. А. Видишев // Международный вестник ветеринарии. – 2011. – № 3. – С. 46-48.
20. Викторов, Д. А. Применение реакции нарастания титра фага для индикации патогенных псевдомонад / Д. А. Викторов, Д .А. Васильев // Актуальные проблемы инфекционной патологии в ветеринарной медицине: Материалы II–ой конференции молодых ученых, Покров, 2012. – С. 108– 111.
21. Викторов, Д.А. Выделение и изучение биологических свойств бактериофагов *Pseudomonas fluorescens* / Д.А. Викторов, А. М. Артамонов, Д. А. Васильев // Ветеринария и кормление. – Москва: «ВЕТКОРМ», 2012. – № 5. – С. 8– 9.
22. Викторов, Д.А. Усовершенствование методов выделения, идентификации и индикации бактерий *Pseudomonas putida*: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.02.03; 03.01.06 / Викторов Денис Александрович. – Саратов, 2011. – 22 с.
23. Викторов, Д.А. Экспериментальное получение фагорезистентных мутантов на примере бактерий рода *Pseudomonas* / Д.А. Викторов, Т.А. Гринева, Д.А.Васильев, А.М. Артамонов, А.П. Воротников, П.А. Антошкин, С.Н. Золотухин // Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности: Материалы международной научно-практической конференции, Ульяновск, ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина», 23-25 апреля 2013. – Т. 1. – Ульяновск, 2013. – С. 38-43.
24. Вовк, Н. И. Адгезия бактерий к эритроцитам рыб / Н.И. Вовк // Проблемы иммунологии, патологии и охраны здоровья рыб и других

- гидробионтов – 2. // Расширенные материалы Международной научно-практической конференции. – Борок, 2007. – С. 12-13.
25. Волынкин, Ю. Л. Гематологическая характеристика карпа в зависимости от стадии развития аэромоноза / Ю. Л. Волынкин // Рыбное хозяйство.– 2007. – № 2. – С. 87-91.
26. Воробьев, А.А. Медицинская и санитарная микробиология [Текст]: учеб. пособие для студ. мед. вузов / А.А. Воробьев, Ю.С. Кривошеин, В.П. Ширококов. – М.: Академия, 2003. – 464 с.: 8 л. цв. ил.
27. Ворошилова, Н. Н. Изучение клинической эффективности препаратов бактериофагов при лечении энтеральных и гнойно-воспалительных заболеваний / Н. Н. Ворошилова и др. // Актуальные вопросы разработки и применения иммунобиологических и фармацевтических препаратов: материалы всероссийской конф.– Уфа, 2000. – С. 87-94.
28. Гаврилин, К. В. Методы специфической и неспецифической иммунопрофилактики бактериальной геморрагической септимии (аэромоноза) карпа (*Cyprinus carpio* L.): автореф. дис. ...биол. наук: 03.00.10; 03.00.07 / Гаврилин Кирилл Владимирович.– М., 2004.– 23 с
29. Гаврилин, К. В. Уровень чувствительности возбудителей бактериальных болезней рыб к антибактериальным препаратам / К. В. Гаврилин // Ветеринарная патология. – 2008.– № 3.– С. 91–94.
30. Галанина, Е.В. Исследования заболеваемости фурункулезом, вызванном инфицированием *A.salmonicida* у лососевых рыб южной части острова Сахалин / Е.В. Галанина, А.В. Ломакина // Известия РАН. Серия биологическая. – 2012. – № 5. – С. 1-7.
31. Ганюшкин, В.Я. Бактериофаги сальмонелл и их применение в ветеринарии / В.Я. Ганюшкин. – Ульяновск, 1988. – С.45.
32. Головина, Н. А. Ихтиопатология / Н. А. Головина, Ю. А. Стрелков, В. Н. Воронин, П. П. Головин, Е. Б. Евдокимова, Л. Н. Юхименко. Под ред. Н. А. Головиной, О. Н. Бауера. — М.: Мир, 2003. — 448 с.: ил.

33. Гончарова, М. Н. Лечебно-профилактическая эффективность Антибака при аэромонозе, псевдомонозе, флексибактериозе рыб: дис. ...канд. биол. наук: 06.02.02 / Гончарова Маргарита Николаевна.– М., 2012.– 173 с.
34. Горшков, И.Г. Викторов Д.А., Васильев Д.А. Выделение и изучение биологических свойств бактериофагов *Aeromonas sobria* // И.Г. Горшков, Д. А. Викторов, Д.А. Васильев // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2015. – №3(31) – DOI 10.18286/1816-4501-2015-3-59-63.
35. ГОСТ 26669-85 продукты пищевые и вкусовые. Подготовка проб для микробиологических анализов. – М.: Стандартинформ, 2010. – 9 с.
36. ГОСТ 31861-2012 Вода. Общие требования к отбору проб. – М.: Стандартинформ, 2013. – 32 с.
37. ГОСТ 31942-2012 Вода. Отбор проб для микробиологического анализа. – М.: Стандартинформ, 2013. – 24 с.
38. ГОСТ ISO 1113-1-2011 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Руководящие указания по приготовлению и производству культуральных сред. Часть 1. Общие руководящие указания по обеспечению качества приготовления культуральных сред в лаборатории. – М.: Стандартинформ, 2012. – 16 с.
39. ГОСТ Р 26670-91 Продукты пищевые. Методы культивирования микроорганизмов. – М.: Стандартинформ, 2008. – 7 с.
40. ГОСТ Р 51426-99 Микробиология. Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Общее руководство по приготовлению разведений для микробиологических исследований. – М.: Госстандарт России, 2002. – 7 с.
41. Добровольская, Т. Г. Физикохимия и биология торфа. Методы оценки численности и разнообразия бактериальных и актиномицетных комплексов торфяных почв: учебное пособие / Т.Г. Добровольская, А.В. Головченко, Л.В. Лысак, Г.М. Зенова. – Томск: Издательство Томского государственного педагогического университета, 2010. – 97 с.

42. Дрошнев, А. Е. Разработка комплексного препарата "Витарол-Е" для антиоксидантной и антибактериальной защиты карповых рыб при аэромонозе: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.01.06, 06.02.02 / Дрошнев Алексей Евгеньевич. – М., 2010. – 26 с.
43. Дугажурпова, Е. Д. Морфологические и биохимические характеристики аэромонад, выделенных от рыб из некоторых водоемов республики Бурятия / Е. Д. Дугажурпова, В. Ц. Цыдыпов // Вестник Бурятской государственной сельскохозяйственной академии им. В.Р. Филиппова. – 2012. – № 3 (12). – С. 11-16.
44. Журавлева, Л. А. Распространённость аэромонад в регионе дельты реки Волги и некоторые эпидемиологические особенности заболеваний, вызываемых ими: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.00.30 / Журавлева Лариса Анатольевна. – М., 1998. – 14 с.
45. Золотухин, С. Н. Бактериофаги малоизученных энтеробактерий и перспективы их применения в ветеринарии / С. Н. Золотухин, Д. А. Васильев, А. С. Мелехин, Е. А. Бульканова, Н. А. Феоктистова, Е. Н. Пожарникова // Ветеринарная патология. – 2006. – №3. – С.79-84.
46. Золотухин, С. Н. Создание и разработка схем применения диагностических биопрепаратов на основе выделенных и изученных бактериофагов энтеробактерий: автореф. дис. ... д-ра биол. наук: 03.00.23, 03.00.07 / Золотухин Сергей Николаевич. – Ульяновск, 2007. – 39 с.
47. Зурабов, А. Ю. Создание отечественной коллекции бактериофагов и принципы разработки лечебно-профилактических фаговых препаратов / А. Ю. Зурабов, Н. Н. Каркищенко, Д. В. Попов // Биомедицина. – 2012. – Т. 1. – № 1. – С. 134-138.
48. Инструкция о мероприятиях по борьбе с аэромонозом карповых рыб № 13-4-2/1366 от 17.08.1998. Департамент ветеринарии Министерства сельского хозяйства и продовольствия Российской Федерации.

49. Инструкция о мероприятиях по профилактике и мерам борьбы с фурункулезом лососевых рыб №13–4–2/1090 от 26.11.1997. Департамент ветеринарии министерство сельского хозяйства и продовольствия Российской Федерации.
50. Иренков, И. П. Адгезивные антигены у аэромонад / И. П. Иренков, Н. А. Соколова, М. Н. Борисова, Н. Г. Козаченко, Т. Д. Пичугина // Ветеринария. – 2001. – № 2. – С. 24-25.
51. Казьянин, А.В. Бактериофаги: опыт производства и применения / А.В. Казьянин, Е.В. Орлова, М.Г. Ефимова, Е.В. Функнер, О.И. Шитова // Фармация. – 2010. – №3. – С.36-37.
52. Канаева, Т. И. Разработка методов выделения и идентификации бактерии *Aeromonas hydrophila*: автореф. дис. ... канд. биол. наук.: 03.02.03 / Канаева Татьяна Ивановна. – Саратов, 2009.–24 с.
53. Катаева, Л.В. Биологическая характеристика бактерий рода *Aeromonas*, выделенных из моллюсков-битинид и водоема / Л. В. Катаева, Н.Б. Перунова, Н.Ф. Карпухина, Т.Ф. Степанова, О.В. Бухарин // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2015. –№ (179). – С. 236-239.
54. Катгер, Э. Бактериофаги: биология и практическое / Э. Катгер, А. Сулакведзе; пер. с англ.: коллектив пер.; науч. ред. рус. изд. А. В. Летаров. – Москва: Научный мир, 2012.– 636 с.
55. Ковалева Е.Н. Листерийные бактериофаги. Научное издание / Е.Н. Ковалева, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин. – Ульяновск, 2013. – 66 с.
56. Кочеткова, В. А. Фаготерапия послеоперационных гнойно-воспалительных осложнений у онкологических больных / В. А. Кочеткова, А. С. Мамонтов, Р. Л. Московичева // Советская медицина. – 1989. – № 6. – С. 23-26.
57. Лабинская, А. С. Общая и санитарная микробиология с техникой микробиологического исследования / А. С. Лабинская, Л. П. Блинкова, Л. П. Ещина.– М.: «Медицина», 2004.



58. Летаров, А.В. Экологические основы рациональной фаговой терапии / А. В. Летаров, А.К. Голомидова, К.К. Тарасян // Acta Naturae. – 2010. – Том 2 (1). – С.66- 79.
59. Методы исследования объектов окружающей среды и патологического материала на аэромонады: методические рекомендации / Г.П. Калина, Т.И. Графова. – М-во здравоохранения РСФСР, Гл. упр. н.–и. ин–тов и координации науч. исслед.; – М.: Б. и., 1980. – 11 с.
60. МУ № 133442/1116. Методические указания по определению патогенности аэромонад по степени ДНКазной активности. Министерство сельского хозяйства Российской Федерации. Департамент ветеринарии. Вед. 1997–12–09. 2 с.
61. МУК 4.2.2316-08 «Методы контроля бактериологических питательных сред».
62. Насибуллин И.Р. Влияние физических, химических факторов и режимов хранения на литическую активность аэромонадных бактериофагов / И.Р. Насибуллин, Д.А. Васильев, И.Г. Швиденко // Вестник УГСХА. – 2014. – №3(27).
63. Насибуллин, И.Р. Исследование литической активности бактериофагов *Aeromonas hydrophila* / И.Р. Насибуллин, Н.Г. Куклина, И.Г. ГоршковЮ Д.А. Викторов, Д.А. Васильев, А.А. Нафеев // Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности: Материалы международной научно-практической конференции, Ульяновск, ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина», 23-25 апреля 2013. – Т. 2. – Ульяновск, 2013. – С. 186.
64. Неретин, М. В. Инактивация возбудителя аэромонадоза карповых рыб в водной среде с применением озона / М. В. Неретин // Ветеринарная патология. – 2005. – № 2. – С.86-92.
65. Погорелова, Н. П. Бактерии рода *Aeromonas*, как возбудители сапронозной инфекции / Н. П. Погорелова, Л. А. Журавлева, Ф. Х.

- Ибрагимов, Г. В. Ющенко // Журнал Микробиологии эпидемиологии и иммунобиологии. – 1995. – № 4. – С. 9-12.
66. Подзорова, А. А. Аэромоназ производителей рыбца / А.А. Подзорова // Итоги научно – практических работ в ихтиологии. – 1997. – С.86-87.
67. Равилов, А.З. Микробиологические среды / А.З. Равилов, Р. Я. Гильмутдинов, М. Ш. Хусаинов. – Казань: Академкнига, 1999. – 189 с.
68. Ревенко И.П. Бактериофаги и их использование в ветеринарной практике / И.П. Ревенко. – Киев:Урожай, 1978. – С. 41-48.
69. Соколова, Н. А. К вопросу о факторах патогенности аэромонад / Н. А. Соколова, И. П. Иренков, М.Н. Борисова, Т.Д. Пичугина // Проблемы охраны здоровья рыб в аквакультуре: Сборник докладов научно–практической конференции – М.: Россельхозакадемия, 2000. – С. 118.
70. Суханова, Е. В. Определение индикаторных микроорганизмов мониторинга инфекционных заболеваний рыб на примере *Perca fluviatilis* (озеро Арахлей, Забайкальский край) / Е. В. Суханова, Е.В. Дзюба, Н.Н. деникина, И. Е. Михеев, Е. Б. Матюнина, Н. Л. Белькова // Известия Самарского научного центра Рос. Академии наук. – 2010. – Т. 12. - № 1 (4). – С. 1156-1161.
71. Феоктистова, Н. А. Методы выделения бактериофагов бактерий *Bacillus* / В. А. Макеев, М. А. Юдина, А. И. Калдыркаев // Вестник Ветеринарии. – 2011. – № 4 (59). – С. 88– 89.
72. Чушков, Ю.В. Бактериофаги в лечении и профилактике инфекционных заболеваний / В.Ю. Чушков // Фарматека. – 2011. – №6. – С. 34-41.
73. Шестаков А.Г. Усовершенствование методов выделения, идентификации и индикации бактерий *Pseudomonas aeruginosa* / автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.02.03; 03.01.06 / Шестаков Андрей Генндьевич. – Саратов, 2010. – 22 с.
74. Шимко, В. В. Адгезивные свойства аэромонад, выделенных от больных рыб / В. В. Шимко, Л. Н. Широгорова // Ветеринарная наука – производству: Межвед. сб. – Минск, 1991. – вып. 29. – С. 74-76.

75. Юдина, М. А. Разработка параметров нарастания титра фага для индикации бактерий *Bacillus mesentericus* в объектах санитарного надзора / М. А. Юдина, Н. А. Феоктистова, Д. А. Васильев [и др.] // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2012. – № 3 (19). – С. 69-73.
76. Юхименко, Л. Н. Биологические свойства аэромонад, их изменчивость и влияние на развитие инфекционного процесса / Л. Н. Юхименко, Н. В. Гусева // Паразиты и болезни рыб: сб. науч. тр. – М.: ВНИРО, 2000. – С. 152–156.
77. Ackermann H. W. *Aeromonas* bacteriophages: Reexamination and classification / H. W. Ackermann, C. Dauguet, W.D. Paterson, J.-F. Vieu // Annales de l'Institut Pasteur Virologie. – 1985. – Vol. 136E(2). – P.175-199.
78. Adams, H. Mark. Bacteriophages / H.M. Adams. – New York: Interscience Publisher Ltd., 1998. – Vol.36. – P.5-15.
79. Adams, C.A. Molecular characterization of plasmid-mediated oxytetracycline resistance in *Aeromonas salmonicida* / C.A. Adams, B. Austin, P.G. Meaden, D. McIntosh // Appl. and Environ. Microbiol. – 1998. – Vol. 64, N. 11. – P. 4194–4201.
80. Akinbowale, O. L. Antibiotic and heavy metal resistance in motile aeromonads and pseudomonads from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms in Australia / O. L. Akinbowale, H. Peng, P. Grant, M. D. Barton // Int J Antimicrob. Agents. – 2007. – Vol. 30. – P. 177 – 182.
81. Altwegg, M. Biochemical Identification of *Aeromonas* Genospecies Isolated from Humans / M. Altwegg, A. G. Steigerwalt, R. Altwegg-Bissig, J. Luthy-Hottenstein, D. J. Brenner // Journal Of Clinical Microbiology. – 1990. – Vol. 28 – №2. – P. 258 – 264.
82. Aoki, T. Detection of R factors in naturally occurring *Aeromonas salmonicida* strains / T. Aoki, S. Egusa, T. Kimura, T. Watanabe // Appl. Microbiol. – 1971. Vol. 22. – P. 716-717.

83. Arnadottir, H. The AsaP1 peptidase of *Aeromonas salmonicida* subsp. *achromogenes* is a highly conserved deuterolysin metalloprotease (family M35) and a major virulence factor / H. Arnadottir, I. Hvanndal, V. Andresdottir, S. E. Burr, J. Frey, B. K. Gudmundsdottir // J Bacteriol. – 2009. – Vol. 191, № 1. – P. 403-410.
84. Austin, B. Characterization of atypical *Aeromonas salmonicida* by different methods / B. Austin, D. A. Austin, I. Dalsgaard, B.K. Gudmundstottir, S. Hoie, J.M.Thornton, J.L. Larsen, B. O’Hici, R. Powell // Syst. Appl. Microbiol. – 1998. – Vol. 21. – P. 50 – 64.
85. Austin, D. A. Taxonomy of fish associated *Aeromonas* spp., with the description of *Aeromonas salmonicida* subsp. *smithia* subsp. *nov.*/ D. A. Austin, D. McIntosh, B. Austin // System. Appl. Microbiol. – 1989. – Vol. 11. – P. 277 – 290.
86. Austin, D.A. Bacterial Fish Pathogens: Disease in Farmed and Wild Fish/D. A. Austin.– New York: Springer, 2012.– 552 p.
87. Bergey’s Manual of Systematics Bacteriology / D. Bergey [et al.] – Baltimore: Williams and Wilkins Co., 1997. – 442 p.
88. Bergey’s Manual of Systematics Bacteriology / D. Bergey [et al.] – Baltimore: Williams and Wilkins Co., 2007. – 442 p.
89. Boltaña, S. Lipopolysaccharides isolated from *Aeromonas salmonicida* and *Vibrio anguillarum* show quantitative but not qualitative differences in inflammatory outcome in *Sparus aurata* (Gilthead seabream) / S. Boltaña, R. Tridico, M. Teles, S. Mackenzie, L. Tort // Fish Shellfish Immunol.– 2014.– Vol. 39 – № 2.–P. 475-482.
90. Boxmie, E.R. Methods isolation and identification *Aeromonas hydrophila* / E.R. Boxmie, A.J.G. Okaend // Microbiology Laboratory Guidebook. – 1998. – V. 3. – P. 31-34.
91. Boyd, J. M. Contribution of type IV pili to the virulence of *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) / J. M. Boyd, A.

- Dacanay, L.C. Knickle, A. Touhami, L. L. Brown, M. H. Jericho, S. C. Johnson, M. Reith // *Infect. Immun.* – 2008. – Vol. 76, № 4 – P. 1445 – 1455.
92. Braun, M. Characterization of an ADP–ribosyltransferase toxin (AexT) from *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* / M. Braun, K. Stuber, Y. Schlatter, T. Wahli, P. Kuhnert, J. Frey // *J Bacteriol.* – 2002. – Vol. 184, № 7. – P. 1851-1858.
93. Buller, N. B. *Bacteria from Fish and Other Aquatic Animals. A practical Identification Manual* / N. Buller. – Wallingford, United Kingdom: CABI Publishing, 2015. – 688 p.
94. Burr, S. E. Attenuated virulence of an *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* type III secretion mutant in a rainbow trout model / S. E. Burr, D. Pugovkin, T. Wahli, H. Segner, J. Frey // *Microbiology* – 2005.–Vol. 151. – № 6.– P. 2111-2118.
95. Carnahan, A. M. “Aeromonadaceae,” in *The Proteobacteria, Part B, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* / A.M. Carnahan, S. W. Joseph, D. J. Brenner, J. T. Krieg, and G. M. Garrity. – New York: Springer, 2005.
96. Chaudhury, A. Biochemical characterisation, enteropathogenicity and antimicrobial resistance plasmids of clinical and environmental *Aeromonas* isolates / A. Chaudhury, G. Nath, B.N. Shukla, S.C. Sanyal // *J. Med.Microbiol.* – 1996. – Vol.44. – P.434-437.
97. Cipriano, R.C. Furunculosis and other diseases by *Aeromonas salmonicida* / R.C. Cipriano, G.L.Bullock. – Washington: Fish Disease Leaflet 66, 2001. – 33 p.
98. Dalsgaard, I. Characterization of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*: a comparative study of strains of different geographic origin/ I. Dalsgaard, B. Nielsen, J.L. Larsen // *J. Appl. Bacteriol.* – 1994. –Vol. 77. – P.21-30.
99. Demarta, A. *Aeromonas tecta* sp. nov., isolated from clinical and environmental sources / A. Demarta, M. Kupfer, P. Riegel, C. Harf–Monteil, M. Tonolla, R.

- Peduzzi, A. Moneri, M.J. Saadvedra, A. Martinez–Murcia // Syst. Appl. Microbiol. – 2008. – Vol.31. – №4 – P. 278-286.
100. Diamanka, A. Infection of sea lamprey with an unusual strain of *Aeromonas salmonicida* / A. Diamanka, T. P. Loch, R. C. Cipriano, A. D. Winters, M. Faisal// J Wildl Dis.–2014.– Vol.50.– P.159-170.
101. Garduno, Rafael A. Physiological consequences of the S–layer of *A. salmonicida* in relation to growth, temperature, and outer membrane permeation / Rafael A. Garduno, Barry M. Phipps, William W. Kay// Can. J. Microbiol. – 1994. – Vol. 40, N 8. – C. 622-629.
102. Fernandez-Alvarez, C. First isolation of *Aeromonas salmonicida* subspecies *salmonicida* from diseased sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.) cultured in Spain / C. Fernandez-Alvarez, D. Gijon, M. Alvarez, Y. Santos // Aquaculture Reports. – 2016. – Vol. 4. – P. 36-41.
103. Gilardi, G. L. Unusual Fermentative, Gram–Negative Bacilli Isolated from Clinical Specimens. II. Characterization of *Aeromonas* Species / G. L. Gilardi, E. Bottone, M. Birnbaum // Applied Microbiology.–1970.– Vol. 20, №1.–P. 156–159.
104. Goodridge, D. Lawrence, Abedon T. Stephen. Bacteriophage biocontrol and bioprocessing: application of phage therapy to industry / D. L. Goodridge, T. S. Abedon // SIM News. – 2003. –Vol.53, № 6. – P.254-262.
105. Goodridge, D. Lawrence, Bisha Bledar. Phage – based biocontrol strategies to reduce foodborne pathogens in foods / D. L. Goodridge, B. Bledar // Bacteriophage. – 2011. – Vol.1. – P.130-137.
106. Greer, G. Gordon. Bacteriophage control of foodborne bacteria / G. G. Gordon // Journal of food Protection. – 2005. – Vol. 68, № 5. – P. 1102-1111.
107. Griffin, P.J. Pigment formation by *Bacterium salmonicida* / P.J. Griffin, S. F. Sniezko, S.B. Friddlle // Trans Am Fish Soc.–1953.–Vol.82.– P.129–138.

108. Gudmundsdottir B. K. Isolation of a new toxic protease from a strain of *Aeromonas salmonicida* subspecies *achromogenes* / B.K. Gudmundsdottir, T.S. Hasting, A.E. Ellis // *Dis Aquat Organ.*–1990.–Vol.9.–P.199–208.
109. Gudmundsdottir, S. Protection against atypical furunculosis in Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* (L.): a comparison of a commercial furunculosis vaccine and an autogenous vaccine / S. Gudmundsdottir, B. Magnadottir, B.K. Gudmundsdottir // *J Fisch Dis.*–2003.–Vol.26.– P.331–338.
110. Hayes, M.V. Three beta-lactamases isolated from *Aeromonas salmonicida*, including a carbapenemase not detectable by conventional methods / M.V. Hayes, C. J. Thomson, S. G. Amyes // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* – 1994. – Vol.13(10). – P.805-811.
111. Hiney, M. P. Detection of *Aeromonas salmonicida* in Atlantic Salmon with asymptomatic furunculosis infections / M.P.Hiney, J.J. Kilmartin, P.R. Smith // *Diseases of Aquatic Organisms.* – 1994. – Vo. 19. – P. 161-167.
112. Hirvela–Koski V. Fish pathogens *A. salmonicida* and *Renibacterium salmonarium*: diagnostic and epidemiological aspects/Academic dissertation, Helsinki.–2005.
113. Huguet, J. M. SGAP – 10 C Agar for the isolation and quantification of *Aeromonas* from water / J. M. Huguet, F. Ribas // *Journal of Applied Microbiology.* – 1991. – Vol. 70. – P. 81- 88.
114. Hussain, I. Suppression of the humoral immune response of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. by the 64 kDa serine protease of *Aeromonas salmonicida* / I. Hussain, C. Mackie, D. Cox, R. Alderson, T.H. Birkbeck//*Fish Shellfish Immunol.*– 2000.–Vol.10.–№4.–P.359-373.
115. Igbinosa, I.H. Emerging *Aeromonas* Species Infections and Their Significance in Public Health / I. H. Igbinosa, U. I. Ehimario, A. Farhad, T. Mvuyo, A.I. Okoh // *The Scientific World Journal.* – 2012. –Vol. 2012 (2012) – doi: 10.1100/2012/625023.

116. Imbeault, S. Using Bacteriophages to Prevent Furunculosis Caused by *Aeromonas salmonicida* in Farmed Brook Trout / S.Imbeault, S. Parent, M. Lagace, C. F. Uhland, J.-F. Blais // *Journal of Aquatic Animal Health*. – 2006. –Vol. 18. – P. 203-214.
117. Ishiguro, E. E. A lipopolysaccharide specific bacteriophage for *Aeromonas salmonicida* / E. E. Ishiguro, T. Ainsworth, D. H. Shaw, W.W. Kay, T. J. Trust // *Canadien Journal of Microbiology*. – 1983. – Vol. 29. – P. 1458- 1461.
118. Janda, J. M. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection/ J.M. Janda, S. L. Abbott // *Clinical Microbiology Reviews*.–2010.– Vol. 23.– №1.–P.35–73.
119. Janda, J.M. The pathogenicity of *Aeromonas* strains relative to genospecies and phenospecies identification / J. M. Janda, R. P. Kokka // *Fems Microbiol. Lett.* – 1991.–Vol. 90. – № 1 – P.29–34.
120. Jeppesen, C. Media for *Aeromonas* spp., *Plesiomonas shigelloides* and *Pseudomonas* spp. from food and environment / C. Jeppesen // *Int. J. Food Microbiol.* – 1995. – Vol. 26. – P. 25-41.
121. Kelly, M. T. Comparison of blood agar, ampicillin blood agar, MacConkey-ampicillin-Tween agar and modified cefsulodin-irgasan-novobiocin agar for isolation of *Aeromonas* spp from stool srecimens / M. T. Kelly, E. M. Stroh, J. Jessop // *J. Clin. Microb.* – 1988. – Vol. 26. – P. 1738-1740.
122. Khador, N., *Aeromonas* and *Plesiomonas* as etiological agents / N. Khadori, V. Fainstein // *Ann. Rev. Microbiol.* – 1988. – V. 42. – P. 395–419.
123. Kim, J.H. Complete genomic sequence of T4-like bacteriophage, phiAS4, infecting *A. salmonicida* subsp.*salmonicida* / J.H. Kim, J.S. Son, Y.J. Choi, C.H. Choresca, S.P. Shin, J.E. Han, J.W. Jun, S.C.Parc // *Arch Virol.* – 2012. – Vol.157. – Issue 2. – P.391-395.
124. Kim, J. H. Biologocal Control of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* Infection in Rainbow Trout (*Oncorhynchus myciss*) Using



- Aeromonas Phage PAS-1 / J. H. Kim, C. H. Choresca, S. P. Shin, J. E. Han, J. W. Yun, S.C. Park // *Transboundary and Emerging Diseases*. – 2015. – Vol. 62. – P. 81-86.
125. Kimura, T. A new subspecies of *Aeromonas salmonicida* as an etiological agent of furunculosis on «Sakurumasu» (*O. masou*) and pinc salmon (*O. gorbusha*) rearing for maturity 1 / T. Kimura // *Fish Pathol.*– Tokyo, 1969.– Vol. 3.– P. 34–44, 45–52.
126. Knut, K. Vorkommen von vermehrungsfähigen *Aeromonas*arten in Rohrkrustationen eines städtischen Wasserversorgungssystems / Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Zahnmedizin des Fachbereichs Humanmedizin der Johann Wolfgang Goethe Universität. – Frankfurt am Main, 2001. – 84 p.
127. Kumar, D. Furunculosis: the history of the diseases and of disease research, in *Furunculosis. Multidisciplinary Fish Disease Research* / D. Kumar, E. M. Bernoth, A. E. Ellis, P. J. Midtlyng, G. Olivier, P. Smith. - London, UK: Academic Press, 1997. – P.1–20.
128. Leung, K. Y. Morphological changes in carp epithelial cells infected with *Aeromonas hydrophila* / K. Y. Leung, T. M. Lim, T. J. Lam, Y. M. Sin // *Journal of Fish Diseases*. – 1996. – Vol.19(2). – P.167-174.
129. Martinez-Murcia, A.J. Phylogenetic interrelationships of members of the genera *Aeromonas* and *Plesiomonas* as determined by 16S ribosomal DNA sequencing: lack of congruence with results of DNA - DNA hybridizations // A.J. Martinez - Murcia, S. Benlloch, M. D. Collins // *Int J Syst Bacteriol.*– 1992.–Vol.42.–№3.–P.412–421.
130. McCarthy, D.H. Furunculosis of fish – the present state of our knowledge: *Advances in aquatic microbiology* / M. R. Droop, R. J. Roberts, D. H. McCarthy, H.W. Jannasch. - London: Academic Press, 1980. – P.293-341.

131. McCarthy, D.H. The identification and significance of atypical strains of *Aeromonas salmonicida* / D.H. McCarthy // Bull.Off.int.Epiz. – 1977. – Vol. 87. – P.459–463.
132. Michel, C. Chloramphenicol and florfenicol susceptibility of fish-pathogenic bacteria isolated in France: comparison of minimum inhibitory concentration, using recommended provisory standards for fish bacteria / C. Michel, B. Kerouault, C. Martin // J. Appl. Microbiol. – 2003. – Vol. 95, N 5. – C. 1008–1015.
133. Midtlyng, P. J. Nordic manual for the surveillance and diagnosis of infectious diseases in farmed salmonids. Nord 7. / P.J. Midtlyng, H. Bleie, S. Helgason, E. Jansson, J.L. Larsen, N.J. Olesen, A.B. Olsen, P. Vennerström. – Copenhagen: Nordic Council of Ministers, 2000. – 94 p.
134. Midtlyng, P.J. Nordic manual for the surveillance and diagnosis of diseases in farmed salmonids. Nordiske Seminarog Arbejdsrapporter № 545 / P. J. Midtlyng, S. Helgason, E. Jansson, A. Mortensen, E. Rimaila-Pärnänen. – Copenhagen: Nordisk Minister Æd, 1992. – 94 p.
135. Millership, S.E. Identification. In The Genus *Aeromonas* / S. E. Millership, B. Austin, M. Altwegg, P. J. Gosling, S.W. Joseph. – New York: John Wiley and Sons, 1996. – P.85–108.
136. Minana - Galbis, D. *Aeromonas bivalvium* sp. nov. isolated from bivalve mollusks // D. Minana - Galbis, M. Farfan, M.C. Fuste, J.G. Loren // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2007. – Vol. 57. – № .–P.582–587.
137. Minana-Galbis, D. Biochemical identification and numerical taxonomy of *Aeromonas* spp. isolated from environmental and clinical samples in Spain / D. Minana-Gabis, M. Farfan, J. G. Loren, M.C. Fuste // Journal of Applied Microbiology. – 2002. – Vol.93 (3). – P.420-430.
138. Mishra, S. Comparision of selective media for primary isolation of *Aeromonas* species from human and animal feces / S. Mishra, G. B. Nair, R. K. Bhadra, S. N. Sikder, S. C. Pal // J. Clin. Microbiol. – 1987. – Vol. 25. – P. 2040-2043.

139. Morgan, J. A. Survival of nonculturable *Aeromonas salmonicida* in lake Water / J. A. Morgan, G. Rhodes, R.W. Pickup // Appl Environ Microbiol. – 1993. – Vol.59(3). – P.874-880.
140. Munro, A.L.S. Furunculosis: Bacterial diseases of fish / A.L.S. Munro, T.S. Hastings, V. Inglis, R. J. Roberts, N. R. Bromage. – London: Blackwell Scientific Publishers, 1993. – P. 122-142.
141. Noonan, B. Molecular characterization of an *Aeromonas salmonicida* mutant with altered surface morphology and increased systemic virulence / B. Noonan, T. J. Trusto // Mol Microbiol.–1995.–Vol.15, №1.– P. 65–75.
142. Padra, J.T. *A. salmonicida* binds differentially to mucins isolated from skin and intestinal regions of Atlantic salmon in an N–acetylneuraminic acid dependent manner / J.T. Padra, H. Sundh, C. Jin, N.G. Karlsson, K. Sundell, S.K. Linden // Infect. Immun.–2014. – Vol. 82. – №12. – P. 5235-5245.
143. Paterson, W. D. Isolation and identification of an atypical *Aeromonas salmonicida* strain causing epizootic losses among Atlantic salmon (*Salmo salar*) reared in a Nova Scotian hatchery / W. D. Paterson, D. Douey, D. Desautels // Can. J. Fish. Aquat. Sci. – 1980. – Vol. 37(12). – P.2236-2241.
144. Pavan, M.E. *Aeromonas salmonicida* subsp. *pectinolytica* subsp. nov., a new pectinasepositive subspecies isolated from a heavily polluted river / M. E. Pavan, S. L. Abbot, J. Zorzopulos, J. M. Janda // Int.J.Syst.Evol.Bacteriol. – 2000. – Vol.50. – P.1119– 1124.
145. Popoff, M. Genus III. *Aeromonas*. Kluver and van Niel 1936. – In: Krieg, N.R., Holt, J.G. (Eds.): Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol.1. – Baltimore: Williams and Wilkins, 1984. – P.545–548.
146. Prabhakaran, R. *Aeromonas* phages encode tRNAs for their overused codons / R. Prabharan, S. Chithambaram, X. Xia // Int.J.Comput.Biol.Drug.Des. – 2014. –Vol.7(2-3). – P. 168-182.
147. Reith, M. E. The genome of *A. salmonicida* subsp. *salmonicida* A449: insights into the evolution of a fish pathogen/ M. E. Reith, R. K. Singh, B. Curtis et al.// BMC Genomics.– 2008.– Vol. 9– P. 427.

148. Saha, P. *Aeromonas sharmana* sp.nov., isolated from a warm spring / P. Saha, T. Chakrabarti // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2006. – Vol. 56. – №8. – P. 1905–1909.
149. Schubert, R.H.W. The Taxonomy and Nomenclature of the Genus *Aeromonas* Kluyver and van Niel 1936 / R.H.W. Schubert // International Journal of Systematic Bacteriology. – 1968 – Vol. – 18. – №1. – P.1–7.
150. Schubert, R.W.H. Das Vorkommen der Aeromonaden in oberirdischen Gewässern/ R.W.H. Schubert // Arch Hyg. – 1967. – Vol.150. – P.688–708.
151. Sharp, R. Bacteriophages: biology and history/ R. Sharp// Journal of Chemical Technology and Biotechnology. – 2011. – Vol. 76 (7). – P.667-672.
152. Silva Y. J. Biological Control of *Aeromonas salmonicida* Infection in juvenile Senegalese sole (*Solea senegalis*) with Phage AS-A / Y. J. Silva, C. Moreirinha, C. Pereira, L. Costa, R. J. M. Rocha, A. Cunha, N. C. M. Gomes, R. Calado, A. Almeida // Aquaculture. – 2016. – Vol. 450. – P. 225-233.
153. Smith, J.W. The classification of *Bacterium salmonicida* / J.W. Smith // J Gen Microbiol. – 1963. – Vol. 33. – P.263–274.
154. Soler, L. Evaluation of two miniaturized systems, Microscan W/A and BBLCrystal E/NF, for identification of clinical isolates of *Aeromonas* / L. Soler, F. Marco, J. Vila, M. R. Chason, J. Guarro, M.J. Figueras // J. clinical Microbiol. – 2003. – Vol. 41. – P.5732-5734.
155. Soler, L. Phylogenetic analyses of the genus *Aeromonas* based on two housekeeping genes / L. Soler, M.A. Yanez, M.R. Chacon, M.G. Aguilera – Arreola, V. Catalan, M.J. Figueras, A.J. Martinez– Murcia // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2004. – Vol. 54. – №5. – P.1511–1519.
156. Sorum, H. Integron-containing IncU R plasmids pRAS1 and pAr–32 from the fish pathogen *Aeromonas salmonicida*/ H. Sorum, T.M. L’Abe’e-Lund, A. Solberg, A. Wold // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2003. – Vol. 47(4). – P.1285–1290.

157. Sulakvelidze, A. Bacteriophage therapy / A. Sulakvelidze, Z. Alavidze, J. G. Jr. Morris // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2001. – Vol. 45. – P.649-659.
158. Yanez, M.A. Phylogenetic analyses of the genus *Aeromonas* based on *gypB* gene sequences / M.A. Yanez, V. Catalan, D. Apraiz, M.J. Figueras, A.J. Martinez–Murcia // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*– 2003. – Vol. 53. – №3. – P.875–883.
159. Zhang, X. Isolation and characterization of a new subspecies of *A. salmonicida* (*A. salmonicida* subsp. *flounderacida* subsp. nov.) from stone flounder (*Kareius bicoloratus* L.) / X. Zhang, W. Zhan, C. Chen, H. Fang // *High Technol. Lett.* – 2004. – Vol. 10, N 4. – C. 87–93.
160. Zhou, QL. Distribution and virulence gene comparison of *Aeromonas* strains isolated from diseased fish and water environment / Q.L. Zhou, Y.J. Wang, J. Xie, X.P. Ge, B.W. Xi, B.Pol. Liu // *J Microbiol.* – 2013. Vol.62.– №3.–P.299-302.







Утверждаю  
 Проректор по учебно-методической  
 работе

Петрищев И.О.

2017 год

**А К Т**  
**внедрения результатов исследования**  
**кандидатской диссертации в учебный процесс**  
**Федерального государственного бюджетного образовательного**  
**учреждения высшего образования «Ульяновский государственный**  
**педагогический университет имени И.Н. Ульянова»**

Данным актом подтверждается, что результаты исследования диссертационной работы на тему: «Бактериофаговый препарат для индикации и идентификации *Aeromonas salmonicida*», которая представлена на соискание ученой степени кандидата биологических наук, по специальности 06.02.02 - Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология, выполненной Куклиной Натальей Григорьевной, выполненная под руководством профессора, доктора медицинских наук, доцента кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ Нафеева А.А. на базе кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ ФГБОУ ВО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина», внедрены в учебный процесс дисциплин бакалавриата и магистратуры по следующим направлениям:

1. Направление подготовки «Биология» (бакалавриат)-  
 Профиль – 06.03.01 – Фитодизайн в садово-парковом и ландшафтном строительстве в следующие программы: Микробиология и вирусология, Введение в биотехнологию, Методы биомониторинга и биондикации;  
 Профиль – 06.03.01 – Экономика природопользования и экологический менеджмент в следующие программы: Микробиология и вирусология, Введение в биотехнологию, Экология микроорганизмов, Методы лабораторных исследований, Методы биомониторинга и биоиндикации;
2. Направление подготовки «Педагогическое образование» (бакалавриат) -  
 Профиль – 44.03.05 – Биология, химия / География , экология в следующие программы: Микробиология, Основы биотехнологии, Методы

биомониторинга и биоиндикации, Вирусология, Индикация состояния окружающей среды.

3. Направление подготовки «Биология» (магистратура) – Профиль – 06.04.01 – Биотехнология с основами нанотехнологии в следующие программы: биотехнология, клеточные технологии, частная микробиология, микробиологические методы исследования, нанотехнологии в биотехнологии.

В частности, в учебный процесс внедрены такие результаты работы, как:

- методы выделения микроорганизмов из проб воды согласно нормативно-правовым документам;
- специфика метода выделения бактериофагов из объектов водной среды как один из базовых методов, используемых для получения бактериофагов и дальнейшего изучения их биологических свойств;
- авторские разработки по этапам приготовления питательных сред для культивирования исследуемых микроорганизмов;
- разработанная автором схема выделения и идентификации бактерии до вида, что важно с позиции изучения разнообразия микроорганизмов и может являться образцом для составления подобных схем для других групп микроорганизмов.

Директор Научно-исследовательского центра фундаментальных и прикладных проблем биоэкологии и биотехнологии, доктор биологических наук, профессор кафедры биологии и химии



Антонова Е.И.

Декан естественно-географического факультета, кандидат географических наук, доцент



Федоров В.Н.

И. о. заведующая кафедрой биологии и химии, кандидат биологических наук, доцент



Беззубенкова О.Е.

