РАЗДЕЛ I. БИОЛОГИЯ

Булина К.Ю.

Этиологическое значение аэромонад различных видов при бактериальной геморрагической септицемии (БГС) карпов

ФГБНУ Федеральный научный центр-Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. К. И. Скрябина и Я. Р. Коваленко
(Россия, Москва)

doi: 10.18411/lj-05-2020-01

idsp: ljjournal-05-2020-01

Аннотация

Изучены культуральные, морфологические и биохимические свойства разных видов *Aeromonas*, выделенных от рыб с клиническими признаками заболеваний в ходе эпизоотического мониторинга в период 2016-2019 гг. Одновременно от рыб были изолированы микроорганизмы родов *Pseudomonas*, *Plesiomonas*, *Enterobacter*, *Klebsiella*. Изучено действие различных видов аэромонад на подопытных рыб, было показано что *A. hydrophila* является наиболее патогенной, высоковирулентна, токсигенна, токсин вызывает гибель карпов через 8-9 часов, без клинических признаков заболевания; *A. sobria* – вирулентна, слаботоксигенна, гибель рыб отмечена через 20-22 часа; *A. veronii* – культура вирулентна, нетоксигенна, гибель наступает через 70 часов. *A. eucrenophila* и *A. schubertii* не вызывали гибели подопытных рыб.

Ключевые слова: аквакультура, аэромоноз, аэромонады, вирулентность, патогенность.

Abstract

In this research article we've studied cultural, morphological and biochemical properties of different kinds of "*Aeromonas*", liberated from those fish with clinical disease markers as part of epizootic monitoring investigation held during the period from 2016 to 2019. "*Pseudomonas*", "*Plesiomonas*", "*Enterobacter*" and "*Klebsiella*" genera of microorganisms were isolated at the same time. We've studied the effect of various kinds of aeromonads on experimental fish. It has been discovered that "*A. hydrophila*" is the most pathogenic. This bacterium is highly virulent, toxicogenic. The toxin kills carps after 8-9 hours without any clinical disease markers; "*A. sobria*" is virulent, weakly toxicogenic. Death of fish recorded in 20-22 hours; "*A. veronii*" is virulent, non-toxicogenic. Fish dies after 70 hours; "*A. eucrenophila*" and "*A. schubertii*" do not cause fatalities of experimental fish.

Keywords: aquaculture, aeromonosis, aeromonas, virulence, pathogenicity.

Введение

Искусственное выращивание рыб в аквакультуре является перспективной и рентабельной отраслью сельского хозяйства в нашей стране. В прудовых хозяйствах центральных и южных районов для товарного разведения используется карп. Среди наиболее часто встречающихся заболеваний карповых рыб регистрируемых во многих регионах РФ являются аэромонозы. В большинстве случаев возбудители болезни относятся к подвижным аэромонадам (патогенные варианты) [1,2].

Бактерии рода *Aeromonas* постоянно представлены в водном микробиоценозе, а их эпизоотическая значимость определяется вирулентностью, количеством [3,4]. Подвижные *Aeromonas spp.* встречаются как нормальные обитатели кишечника рыб, однако при неблагоприятных условиях среды, бактерии способны проявлять патогенные свойства [5,6,7]. В тепловодной аквакультуре аэромонады могут быть причиной значительных экономических потерь, но при этом трудно определить прямые потери, которые возникают при вторичных инфекциях [8,9].

Факторы внешней среды, такие как скученность, пороговые концентрации кислорода в воде, высокое содержание органических веществ, индустриальные загрязнения, резкие колебания температуры, травматизация и гормональные сдвиги при половом созревании способствуют поражению организма рыб аэромонадами.

Патогенез, вызываемый бактериями рода *Aeromonas*, является многофакторным, т.е. факторы вирулентности, при совместном действии, могут значительно усилить патогенное влияние бактерий. Изучению биологических свойств возбудителей аэромоноза посвящен ряд работ отечественных и зарубежных исследователей [10,11,12].

Цель настоящего исследования – получение современной информации о видах аэромонад, выделяемых от карпов, и их значение в этиологии болезни.

Материалы и методы

Для бактериологических исследований использовали питательные среды: МПБ, МПА, МППА, Среда Хоттингера, Мак Конки, Шмиц-Шанделье, Клигlera, Хью-Лейфсона, Риппея-Кабелли, кровяной агар, агар с маннитом, среда Плоскирева, среды Гисса, пластины ПБДЭ, Арі – 20Э.

При вспышках аэромоноза от больных рыб с характерными клиническими признаками отбирали пробы крови, внутренних органов и проводили высеvy на дифференциально-диагностические среды. Выделенные микроорганизмы исследовали по культуральным, морфологическим, биохимическим и патогенным свойствам [13].

Морфологию и тинкториальные свойства определяли нативной фазоконтрастной микроскопией окрашенных по Граму препаратов. Подвижность определяли в полужидких питательных средах. Культуральные свойства микроорганизмов определяли на жидких, полужидких, плотных питательных средах: по морфологии колоний и особенностям роста. Пересев культуры проводили на среду с маннитом, проверяли реакцию на оксидазу, далее пересевали культуры в пробирки со скошенным агаром и в пробирки со средой Хью-Лейфсона для определения ферментации глюкозы в аэробных и анаэробных условиях. Для определения способности микроорганизмов ферментировать углеводы (сахаролитические свойства) использовали короткий ряд (относятся жидкие среды Гисса с моно- и дисахаридами: глюкозой, лактозой, сахарозой, мальтозой) и длинный «пестрый» ряд (среды с многочисленными моносахаридами, полисахаридами, спиртами, аминокислотами). Оксидаза-положительные культуры, ферментирующие глюкозу на среде Хью-Лейфсона в аэробных и анаэробных условиях для окончательной идентификации рассевали на дифференциально-диагностические среды: с глюкозой, лактозой, маннитом, мальтозой, сахарозой, глицерином, желатином для определения ферментативных свойств. На средах с желатином, сывороткой, пептоном выявляли протеолитические свойства микроорганизмов. Проверяли способность к гидролизу эскулина, ферментации глюкозы с образованием газа, образование индола, тест в реакции Фогес-Проскауэра.

Экспериментальное заражение проводили в лабораторных условиях путем внутрибрюшинного, внутримышечного введения культур аэромонад белым мышам и рыбам. Всего в опытах использовано 240 экз. рыб и 240 экз. белых мышей.

При определении вирулентности использовали двухлеток карпа средней штучной массой 150-200 г. и белых мышей живой массой – 18-20 г.

Рыб содержали в аквариумах при постоянной аэрации и фильтрации. После адаптации рыб подвергали экспериментальному заражению аэромонадами, выделенными от рыб с клиническими признаками заболевания.

Были исследованы различные виды аэромонад: *A. hydrophila*, *A. sobria*, *A. caviae*, *A. veronii*, *A. eucrenophila*, *A. schubertii* выделенные в ходе эпизоотологического мониторинга, проводимого в 2016-2019 годах сотрудниками лаборатории ихтиопатологии.

Перед использованием культуры пассировали через мясо-пептонный агар двукратно, затем карпов заражали 24-часовой агаровой культурой исследуемых штаммов в дозах: рыбам от 0,05 мл до 2 мл; мышам от 0,01 до 0,25 мл.

В контрольной группе карпам вводили стерильный физраствор. Температуру воды в аквариумах поддерживали в пределах 18-20 градусов по Цельсию. Результаты опыта учитывали в течение 7 суток.

Из внутренних органов погибших рыб делали посевы на среду Шмитц-Шанделье, МПА, РИппея-КАбелли. Посевы инкубировали при температуре 25 градусов по Цельсию, в течение 24 часов (идентифицировали исходные культуры).

По патогенности для карпов исследованные нами штаммы были условно разделены на высоковирулентные, слабовирулентные. Высоковирулентные для карпов штаммы вызывали гибель белых мышей. В то же время авирулентные штаммы не вызывали гибели белых мышей.

После введения вирулентной культуры *A. hydrophila* рыбы погибали в течение 8-9 часов без клинических признаков болезни и изменений во внутренних органах. При бактериологическом исследовании погибших карпов исходную культуру выделяли из крови, брюшного транссудата, печени, селезенки, почек.

Результаты и обсуждение

В результате бактериологических исследований от больных рыб с клиническими признаками заболевания из различных рыбоводческих хозяйств были изолированы и идентифицированы микроорганизмы родов: *Aeromonas*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Plesiomonas*. При изучении аэромонад было установлено, что изолируемые микроорганизмы принадлежат 6 различным видам: *A. hydrophila*, *A. sobria*, *A. caviae*, *A. veronii*, *A. eucrenophila*, *A. schubertii*. Высевы из крови, паренхиматозных органов, язв проводили на МПА и селективные среды. Посевы инкубировали при 25-26 °С. В МПБ аэромонады вызывали помутнение, при встряхивании - муаровые волны. На среде Риппея-Кабелли наблюдали рост в виде оранжево-желтых колоний, на среде Шмитц-Шанделье – колонии черные, на МПА - круглые, выпуклые, полупрозрачные. Оксидазоположительные культуры окрашивались в синий цвет. В среде Хью-Лейфсона проверяли культуры на тест окисления-ферментации, при отсутствии газообразования определяли способность выделенной культуры продуцировать сероводород. Подвижность культуры выявляли по характеру роста на полужидком агаре и прямой нативной фазовоконтрастной микроскопией..

При изучении патогенных свойств для белых мышей и рыб установлено, что *A. hydrophila* является наиболее патогенной.

Аэромонады четырех видов *A. hydrophila*, *A. sobria*, *A. caviae*, *A. veronii* при экспериментальном заражении вызывали гибель карпов и белых мышей. Два вида аэромонад (*A. eucrenophila* и *A. schubertii*) не обладали летальным действием для подопытных животных.

A. hydrophila – культура высоковирулентна, токсигенна, токсин вызывает гибель белых мышей и карпов через 8-9 часов, как молниеносное течение без развития клинических признаков заболевания.

A. sobria – культура вирулентна, слаботоксигенна, гибель животных через 20-22 часа.

A. veronii - вирулентна, гибель наступает более чем через 70 часов.

Выводы

1. В период эпизоотологического мониторинга 2016-2019 гг. от карпов с клиническими признаками заболевания изолированы и идентифицированы микроорганизмы следующих родов: *Aeromonas*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Plesiomonas*.

2. При изучении аэромонад было установлено, что изолируемые микроорганизмы относятся к 6 различным видам: *A. hydrophila*, *A. sobria*, *A. caviae*, *A. veronii*, *A. eucrenophila*, *A. schubertii*.

3. При тестировании биологических свойств для белых мышей и рыб установлено, что *A. hydrophila* является наиболее патогенной, культура высоковирулентна, токсигенна, токсин вызывает гибель подопытных через 8-9 часов, без клинических признаков заболевания. *A. sobria* – культура вирулентна, слаботоксигенна, гибель животных отмечена через 20-22 часа. *A. veronii* – культура вирулентна, нетоксигенна, гибель наступает через 70 часов. *A. eucrenophila* и *A. schubertii* не вызывали гибели подопытных животных.

1. Сборник инструкций по борьбе с болезнями рыб, 2 том, 1999. Москва, АМБ-агро, с.142-151
2. Гулюкин М.И., Завьялова Е.А., Дрошнев А.Е., Коломыцев С.А. Анализ эпизоотической ситуации по болезням рыб в России //Ветеринария. 2011. № 8. С. 3-7.
3. Юхименко Л.Н., Койдан Г.С. Современное состояние проблемы аэромоноза рыб//Рыбн.хоз-во. сер. аквакультура: информ.пакет «Болезни рыб» - М.: ВНИЭРХ. 1997. – Вып.2. – с.1-9
4. Юхименко Л.Н., Койдан Г.С., Бычкова Л.И., Смирнов Л.П. Биологические свойства аэромонад и их роль в патологии рыб// Рыбн.хоз-во. сер. Болезни гидробионтов в аквакультуре: Аналит. и реф. инф.- М.: ВНИЭРХ, - 2001. – Вып. 1 – с.1-10
5. Trust T.S.& Sparrow R.A. The bacterial flora in the alimentary tract of freshwater salmonid fishes. Canadian Journal of microbiology, 1974, 20, 1219-1228
6. Ventura M.T. & Grizzle J.M. Evaluation of portals of entry of *Aeromonas hydrophila* in channel catfish. Aquaculture, 1987, 65, 205-214
7. George W.I., Nakata M.M., Thompson J. & White M.I. *Aeromonas*-related diarrhea in adults. Archives of internal medicine, 1985, 145, 2207-2211
8. Amin N.E., Abdallah I.S., Elallawy T. & Ahmed S.M. Motile *Aeromonas* septicemia among *Tilapia nilotica* (*Sarotherodon niloticus*) in Upper Egypt. Fish pathology, 1985, 20, 93-97
9. Ruangpan L., Kitao T. & Yoshida T. Protective efficacy of *Aeromonas hydrophila* vaccines in Nile tilapia. Immunology & Immunopathology, 1986, 12, 345-350
10. Дрошнев А.Е. Разработка комплексного препарата "ВИТАРОЛ-Е" для антиоксидантной защиты карповых рыб при аэромонозе, Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности Российской академии сельскохозяйственных наук. Щёлково, 2010
11. Стаффорд В.В., Дрошнев А.Е. Патоморфологические изменения при экспериментальном аэромонозе карпов // В сборнике: Актуальные проблемы инфекционных болезней молодняка и других возрастных групп сельскохозяйственных животных, рыб и пчел Международная научно-практическая конференция, посвященная 50-летию со дня основания лаборатории лейкологии, лаборатории ихтиопатологии и отдела охраны полезной энтомофауны. 2011. С. 84-85
12. Пичугина Т.Д., Борисова М.Н., Завьялова Е.А., Козлова В.И. Взаимодействие различных видов аэромонад с культурой клеток эпителиальной папилломы карпа // В книге: Проблемы патологии, иммунологии и охраны здоровья рыб и других гидробионтов Сборник тезисов докладов Всероссийской научно-практической конференции. Москва, 2003. С. 104-105.
13. Определитель бактерий Берджи, Д.Холта и др./Под ред. Покровского В.И. 1997.

Рахманова Т.И., Даллакян А.Т., Мазур Е.И., Ситник С.А., Резникова М.Г., Ал-Кхаилани Г.Х.И.

Интенсивность свободнорадикального окисления в клетках *Yarrowia lipolytica* при выращивании в условиях экстремальных значений pH среды

*Воронежский государственный университет
(Россия, Воронеж)*

doi: 10.18411/lj-05-2020-02

idsp: ljjournal-05-2020-02

Аннотация

Исследована интенсивность свободнорадикального окисления в клетках дрожжей *Yarrowia lipolytica* при выращивании на средах с различными значениями pH