

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І
ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

НУБІП України

Факультет тваринництва та водних біоресурсів

УДК: 597-12:576.85.08

НУБІП України

ПОГОДЖЕНО

Декан факультету тваринництва та
водних біоресурсів

ДОПУСКАЄТЬСЯ ДО ЗАХИСТУ

Завідувач кафедри аквакультури

Бех В.В.

Кононенко Р.В.

НУБІП України

«___» _____ 2021 р.

«___» _____ 2021 р.

МАГІСТЕРСЬКА РОБОТА

на тему: «МОЛЕКУЛЯРНА ДІАГНОСТИКА АЕРОМОНОЗУ
ПРИСВОДНИХ РИБ ЗА МЕТОДОМ ПОЛІМЕРАЗНОЇ
ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ»

НУБІП України

Спеціальність 207 «Водні біоресурси та аквакультура»

(шифр і назва)

НУБІП України

Освітня програма _____ Магістр 2-го року

(назва)

Магістерська програма «Промислові гідробіоресурси»

Орієнтація освітньої програми _____ Освітньо-професійна

НУБІП України

(освітньо-професійна або освітньо-наукова)

Керівник магістерської роботи

д.с.-г.н., професор

В.В. Бех

(підпис)

НУБІП України

Виконав _____

Є.І. Залоїло

(підпис)

КИЇВ – 2021

РЕФЕРАТ

НУБІП України

Магістерська робота: 55 с., 5 рис., 8 табл., 55 використаних джерел.

Мета роботи - вивчення основних біологічних властивостей бактерій роду *Aeromonas*, виділених з прісноводних видів риби, та розробка комплексного методу діагностики аеромонозу на різних стадіях захворювання.

Об'єкт дослідження – бактерії роду *Aeromonas*, виділені з прісноводних видів риби: осетра, форелі, коропа, карася, товстолоба, сома та білого амура.

Предмет дослідження – морфологічні та біохімічні властивості бактерій роду *Aeromonas*.

Методи дослідження - мікробіологічний, мікроскопічний, біохімічний, експрес-ідентифікація, метод полімеразної ланцюгової реакції, визначення антибіотикочутливості методом дифузії в агар, метод біопробы.

Аеромоноз – поширене захворювання риби як у природі, так і в умовах аквакультури. Розробка молекулярного методу діагностики аеромонад може стати більш чутливою і менш затратною альтернативою традиційним підходам.

У першому розділі окреслено сучасні уявлення про збудників аеромонозу, перебіг захворювання та методи його діагностики.

У другому розділі окреслено загальну схему експериментів та надано детальні описи використаних методик. Особливу увагу приділено ПЛР-підходу, котрий ліг в основу розробленого методу діагностики аеромонозу.

У третьому розділі наведено та обговорено одержані практичні результати щодо молекулярного методу детекції аеромонад, з підготовчими проміжними й додатковими етапами (одержання та ідентифікація штамів, встановлення рівня їх патогенності, чутливості до поширених антибіотиків, тощо).

ЗМІСТ	
НУБІП України	4
ВСТУП	4
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	6
НУБІП України	6
1.1. Мікрофлора риб	6
1.1.1. Зовнішні покриви риб та зябра	6
1.1.2. Мікробіота шлунково-кишкового тракту та внутрішніх органів риб	7
1.2. Патогенні та умовно-патогенні бактерії риб	9
НУБІП України	14
1.3. Аеромоноз риб та його роль у виникненні патологічних процесів у риб	14
1.4. Сучасні методи профілактики та лікування бактеріальних інфекцій у риб	20
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	24
НУБІП України	25
2.1. Методи дослідження культуральних та морфологічних властивостей	25
2.2. Методи біохімічного аналізу	26
2.3. Метод ідентифікації бактерій роду <i>Aeromonas</i> на основі полімеразної ланцюгової реакції	31
2.4. Визначення чутливості бактерій роду <i>Aeromonas</i> до антибіотиків	33
2.5. Вивчення патогенності бактерій роду <i>Aeromonas</i>	34
НУБІП України	35
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	35
3.1. Морфологічні та культуральні властивості бактерій роду <i>Aeromonas</i>	35
3.2. Біохімічні властивості бактерій роду <i>Aeromonas</i>	37
3.3. Метод ідентифікації бактерій роду <i>Aeromonas</i> на основі полімеразної ланцюгової реакції	41
3.4. Чутливість бактерій до антибіотиків	44
3.5. Патогенність виділених бактерій	46
НУБІП України	48
ВИСНОВКИ	48
НУБІП України	49
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	49

ВСТУП

Продукція, котру виготовляють з риби, є джерелом цінних та унікальних макро- і мікроелементів, білків, жирів і вітамінів. Водночас інтенсифікація рибництва, для якої характерне стрімке зростання забрудненості водного середовища, призводить до суттєвого збільшення випадків бактеріальних захворювань практично серед усіх об'єктів рибництва. Хвороби риби негативно відбиваються на її товарних та смакових якостях. Крім того, у ряді випадків інфікована риба може бути і джерелом захворювань людини [1,2].

В умовах сучасної аквакультури причиною масової загибелі рибних стад та відчутних збитків промислового рибництву є певні види бактерій. Найбільш гострою у даному аспекті є бактеріальна геморагічна септицемія або аеромоноз. Збудником даного захворювання є грамнегативні бактерії *Aeromonas*.

Представники цього роду постійно мешкають у водоймах, не впливаючи на здоров'я риб, однак при погіршенні умов культивування об'єктів аквакультури стають збудниками захворювання аеромонозу [3].

«Традиційні» бактеріологічні методи ідентифікації аеромонад характеризуються значними затратами робочого часу та загальною складністю у виконанні, що може впливати як на точність результатів, так і на ефективність лікувально-профілактичних заходів [3]. Тож, для інтенсивного ведення аквакультури оперативна діагностика та попередження аеромонозу є гострою практичною проблемою, яка потребує вирішення. Реальною альтернативою бактеріологічним методикам може бути використання сучасних молекулярних методів діагностики та профілактики захворювань риб: при умові одержання достовірних результатів, дані підходи дозволять суттєво зменшити час та трудомісткість заходів і, відповідно, знизити матеріальні витрати.

Мета і завдання дослідження. Метою представленої роботи було вивчення основних біологічних властивостей представників роду *Aeromonas*,

виділених з прісноводних видів риби, та розробити комплексний метод їх діагностики.

У відповідності з поставленою метою досліджень вирішувались наступні завдання:

- виділити з прісноводних видів риби бактерії роду *Aeromonas* та встановити їх культуральні, морфологічні й біохімічні особливості;
- провести експрес-діагностику бактерій роду *Aeromonas* з використанням тест-системи «API» та порівняти ефективність цього підходу з традиційними мікробіологічними методами ідентифікації;
- розробити сучасну методiku ПЛР-діагностики бактерій роду *Aeromonas*;
- встановити рівень патогенності аеромонад шляхом експериментального відтворення загальної моделі захворювання.

Об'єкт дослідження – бактерії роду *Aeromonas*, виділені з прісноводних видів риби: осетра, форелі, коропа, карася, товстолоба, сома та білого амура.

Предмет дослідження – морфологічні та біохімічні властивості бактерій роду *Aeromonas*.

Для досягнення поставленої мети застосовувались наступні методи досліджень: мікробіологічний, мікроскопічний, біохімічний, експрес-ідентифікація, метод полімеразної ланцюгової реакції, визначення антибіотикочутливості методом дифузії в агар, метод біопроби.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

НУБІП України

1.1. Мікрофлора риб

В умовах аквакультури однією із серйозних проблем вирощування риби є зміна трофності середовища, зокрема - утворення токсичних сполук у результаті збільшення продуктів тваринного метаболізму. За таких умов умовно-патогенні мікроорганізми одержують комфортні умови, що може призводити до індукції бактеріальних інфекцій та росту рівня смертності об'єктів аквакультури. У вітчизняних рибних господарствах досить поширений комплекс бактеріальних захворювань, які об'єднують терміном "краснуха". До згаданого ряду відносять такі хвороби як власне аеромоноз, а також псевдомоноз, бактеріальна геморагічна септицемія (БГС) та змішані бактеріальні інфекції [4].

Дослідження щодо аспектів формування бактеріальної флори риб та її залежності від загальної мікрофлори середовища, а також - абіотичних факторів, способу живлення та якості корму, набули системного характеру лише протягом останніх 20 років і наразі не є завершеними. Тому моніторинг мікрофлори риб є необхідним як для наукового забезпечення показників якості і безпечності готової продукції, так і для вивчення патогенних бактерій та факторів, котрі сприяють профілактиці інфекційних захворювань [5].

1.1.1. Зовнішні покриви риб та зябра

Мікрофлора шкіряних покривів та зябер є нестабільною і формується внаслідок численних факторів. Дана концепція обгрунтовано доводиться у роботі, присвяченій вивченню змін мікрофлори зябер та шкіри атлантичного лосося протягом його міграції. За даними *Trust et al* (1998), видовий склад та чисельність бактерій змінювались синхронно з

варіабельністю складу водного оточення риби. Так, представники роду *Moraxella* склали 32% у морських видів риб та 8% у екземплярах риби вилученої з прісної водойми. Представники роду *Vibrio* були характерні виключно для періоду перебування лосося в солоних водоймах, тоді як аеромонади (*Aeromonas*) були виявлені лише у процесі міграції риб по прісноводним річкам. Найчастіше з шкіри та зябер атлантичного лосося виділяли бактерії родів *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Vibrio* та представників родини *Enterobacteriaceae* [6].

Видовий склад бактерій на шкірі кети та кижуча був досить різноманітним. Однак найчастіше виділяли представників роду *Pseudomonas* (49,9%). Частота зустрічності бактерій інших родів розподілялася так: *Achromobacter* (18,1%), *Flavobacterium* (8,6%), *Micrococcus* (6,9%), *Enterobacter* (5,2%). Nieto et al. (1999) відзначають, що всі виділені бактерії були присутні також і у водному середовищі, а отже - безпосередньо впливали на формування мікробіоти риб. Даний висновок підтверджується дослідженнями іспанських вчених, які встановили, що видовий спектр та чисельність виділених з риб псевдомонад, аеромонад, і ентеробактерій чітко корелювали з кількісними та якісними бактеріальними характеристиками води [7].

1.1.2. Мікробіота шлунково-кишкового тракту та внутрішніх органів риб

Бактерії, які мешкають у шлунково-кишковому тракті риб, виконують суттєві функції у активізації процесів травлення та метаболізму, розкладі целюлози, цукрів, синтезу вітамінів, амінокислот, ферментів, продукуванні антибіотичних речовин, котрі пригнічують розвиток представників алохтонної (занесеної) мікрофлори [8].

Очевидно, що видова різноманітність та концентрація бактерій у шлунково-кишковому тракті риби залежить у першу чергу від мікрофлори води й корму. Так, мікрофлора кишечника представників лососевих у прісній воді характеризується наявністю *Aeromonas*, *Enterobacter*, а у морській цю роль відіграють *Vibrio*, *Pseudomonas* та *Achromobacter* [9].

Порівняльний аналіз мікрофлори, притаманної різним органам риби показав, що найвища кількість і видове різноманіття мікроорганізмів наявні саме у кишковому тракті. Зокрема, чисельність бактерій у кишковому тракті форелі складає 10^9 м.к /г [10].

З травного тракту чотирьох видів прісноводних риби (коропи, тиліяпії, товстолоба та форелі) було виділено 25 видів бактерій, переважно аеробів. Облігатні ж анаероби були виділені з тепловодних видів риби таких як тиліяпія та товстолобик, натомість у холодноводних видів риби, включаючи форель, така мікрофлора була відсутня [11, 12].

У роботі [13] проведено масштабну ідентифікацію мікрофлори коропа. Було показано, що вона переважно представлена бактеріями родів *Aeromonas* і *Pseudomonas* та мікроорганізмами родини *Enterobacteriaceae*. Також у організмі коропа були знайдені сапрофітні бактерії роду *Bacillus*, *Micrococcus* та *Staphylococcus*, які являються представниками нормофлори риби, не виконуючи при цьому етіологічних функцій. Псевдомонади виділялись з зябер та крові. Аеромонади ж були присутні у зябрах та всіх внутрішніх органах коропа. Із санітарно-показових мікроорганізмів у посівах шкіри коропа були виявлені бактерії роду *Proteus*. Кров, печінку, селезінку заселяли бактерії роду *Enterobacter*.

При дослідженні мікрофлори кишечника коропа виділялися аеромонади, псевдомонади та аерококи. Серед аеромонад 37% складали бактерії *Aeromonas hydrophila*, 12,3% – *Aeromonas punctata*, 0,6% – *Aeromonas salmonicida*. Серед псевдомонад переважали *Ps. fluorescens* (19,8%). У результаті статистичного аналізу мікрофлори кишечника борозових риби, було показано, що

в усіх відділах переважають аеромонади (до 51 %), домінуючими серед яких були бактерії *A. hydrophila*. Найбільш різноманітним видовий склад мікроорганізмів спостерігали у передньому відділі кишкового тракту (виділено 16 видів і підвидів), при цьому 56,3% яких виявились ідентичними мікрофлорі водного середовища [14].

Дослідження по визначенню мікробної контамінації внутрішніх органів здорових коропів показало, що аеромонади та псевдомонади виділялись із селезінки, нирок та печінки. Також у цих внутрішніх органах були знайдені флавобактерії та мікрококи. У ході епізоотичних експериментів було встановлено, що загальна кількість мікроорганізмів із роду *Aeromonas* у кишково-желудковому тракту хворих коропів у 27,8 разів більше, порівняно з цим же показником для здорових особин, *Pseudomonas* – відповідно у 11,7 разів, а інші мікроорганізми – більше, ніж удвічі [14].

Відносну сталість кількісних показників мікрофлори кишкового тракту риб пояснюють резистентністю типових для даного органу бактерій до кислого середовища, що притаманне шлунку, а також - для травних ферментів, жовчних кислот й імуноглобулінів кишкового слизу.

1.2. Патогенні та умовно-патогенні бактерії риб

При підвищенні бактеріального фону води до та понад 3000 КУО/мл спостерігається часткове, а згодом – суттєве заміщення нормальної мікрофлори кишківника риб на водних представників. При наявності стресових факторів на організм риб, підвищується показник проникності стінок кишківника, що обумовлює масову перехід бактерій до внутрішніх органів. Така міграція практично завжди супроводжується появою та розвитком інфекційних процесів. Варто зазначити, що до тканин організму потрапляють ті бактерії, яким вдалося подолати «бар'єр» імунної системи: фагоцитарні клітини, котрі локалізовані у слизовій оболонці кишківника, макрофаги та лімфоїдні клітини, характерні

для нирок та селезінки, тощо. Вагоме зростання кількості бактерій незмінно негативно впливає на організм риби, провокуючи стрес імунної системи [15].

Виникнення масових інфекційних хвороб у рибній популяції характеризується складними механізмами, які вимагають наявності певних взаємозалежних елементів: патогенного збудника, чутливого до нього господаря, а також оптимальних умов зовнішнього середовища, які сприятимуть розвитку патології. Зокрема, саме різка зміна факторів зовнішнього середовища часто виконує роль «пускового механізму» епізоотій (зазвичай, стимулом до розвитку згаданих захворювань є підвищення температури води [16]). Пойкилотермний організм риби не передбачає існування фізіологічних терморегуляторних систем, тож, температура риби змінюється прямопропорційно до змін температури води.

Різним видам риби притаманний певний оптимальний температурний показник, узгоджений з максимальною ефективністю роботи імунної системи. Таким чином, виникнення інфекцій внаслідок різких суттєвих пов'язане з різкими температурними коливаннями, є логічно обгрунтованим, особливо - за наявності інших несприятливих факторів [17].

Бактерій з тривалою патогенною фазою можна переважно віднести до obligatних збудників, котрі стимулюють виникнення захворювання, яке не корелює з загальним станом організму риби, а також - і сукупністю факторів зовнішнього середовища. До даної групи зокрема відносяться *Vibrio anguillarum*, *Edwardsiella tarda* та *Renibacterium salmoninarum* (табл. 1).

Ще одну групу складають умовно-патогенні мікроорганізми. Її представники виконують перехід від сапрофітної до патогенної фази виключно за несприятливих для риби умов [18]. До умовно-патогенних відносяться бактерії роду *Aeromonas*, *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Citrobacter*, а також і ентеробактерії (табл. 1).

Суттєвим фактором росту чисельності бактерій у одиничному об'ємі є накопичення органічних речовин у воді. Зростаюча таким шляхом агресивність середовища у результаті часто призводить до мінімізації резистентності організму риби, а в подальшому - до появи бактеріальних хвороб, викликаних умовно-патогенними мікроорганізмами. Саме з цієї причини мікобактеріози, псевдомонози, протеози та аеромонози ще називають «хворобами забрудненої води». У останні роки в науковій періодиці з'явився ряд повідомлення про виділення з риб бактерій, нехарактерними представниками для їх типової мікрофлори, а також - і мікрофлори водного середовища [17].

Таблиця 1.1

Представники патогенної та умовно-патогенної мікрофлори риб

Родина	Представники
<i>Aeromonadaceae</i>	<i>A. hydrophila</i> , <i>A. bestiarum</i> , <i>A. salmonicida</i> , <i>A. veronii</i> bv. <i>sobria</i> , <i>A. jandjevi</i> , <i>A. Caviae</i>
<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Edwardsiella ictaluri</i> , <i>E. tarda</i> , <i>Yersinia ruckeri</i>
<i>Flavobacteriaceae</i>	<i>Flavobacterium psychrophilum</i> , <i>F. columnare</i> , <i>F. branchiophilum</i>
<i>Nocardiaceae</i>	<i>Nocardia asteroides</i> , <i>N. karpachi</i>
<i>Mycobacteriaceae</i>	<i>Mycobacterium fortuitum</i> , <i>M. chelonae</i>
<i>Pseudomonadacea</i>	<i>Pseudomonas anguilliseptica</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>P. putida</i>
Інші види	<i>Renibacterium salmoninarum</i> , <i>Flexibacter</i> sp.

Мікобактеріоз. Збудником даного захворювання є *Flexibacter columnaris*. Це грамнегативна видовжена паличка родини *Cytophagalis*.

Основними факторами, котрі викликають появу інфекції, є навіть незначне підвищення температури води, суттєво підвищена щільність посадки особин у вирощувальних резервуарах, механічні враження зовнішніх покривів риби. Як додатковий стимулюючий фактор виникнення й

поширення міксобактеріозу виступає забруднення водного середовища. Дана хвороба часто виникає у аквакультурі країн Північної Америки, Азії та Європи [19]. Інфекції міксобактеріального походження легко відрізнити від захворювань, спровокованих іншими бактеріальними збудниками за широким спектром клінічних проявів та форм перебігу.

Псевдомоноз. Псевдомонод можна зустріти у штучних та природних водоймах з прісним і солоним складом води. Окремі види даних мікроорганізмів можуть бути причиною захворювань риб з найрізноманітнішими клінічними проявами. Сезонно псевдомонози риб зазвичай виникають у холодний період року [20].

До псевдомонозів є чутливими усі без виключень види прісноводних і морських риб. В умовах ставових господарств протягом зимування на дану хворобу часто страждають популяції коропа та товстолобика (білого й строкатого). Бактерії, які входять до роду *Pseudomonas* – це грамнегативні, оксидазопозитивні палички, тонкі у діаметрі та досить витягнуті у довжину. Для деяких представників характерні фази інкапсуляції та наявність жовто-зеленого флюоресціюючого пігменту [2, 21].

Флавобактеріоз. Збудниками даного захворювання є бактерії роду *Flavobacterium*, факультативно-анаеробні палички, розповсюджені як у водному середовищі, так і у ґрунті. Такі мікроорганізми фіксують при виділенні як зі здорових, так і з хворих риб [22]. Зокрема *Flavobacterium* є типовими збудниками відомих захворювань «rainbow trout fry syndrome» (RTFS) та «bacterial cold water disease» (BCWD), які призводять до масової загибелі лососевих *Salmonidae* і аювих *Plecoglossus* риб в умовах аквакультури. Первинно *F. psychrophilum* було визначено як типовий патоген лососевих риб, однак кілька років тому даний вид було виділено безпосередньо зі зразків води, органічного детриту та навіть водоростей, взятих у ставових господарствах. Також згаданий патоген знайдено у хворих особин сазана *Cyprinus carpio*, лина *Linca tinca*, карася звичайного *Carassius carassius* (в аквакультурі), та в природних умовах у

річкового вугря *Anguilla anguilla*, зачко *Zacco platypus* й ряду представників лососевих [23, 24].

Ентеробактерії. Серед бактерій, які входять до складу нормальної мікрофлори риб, корму та є представниками типових гідробіонтів, значна частина, відноситься до родини *Enterobacteriaceae*. Цим мікроорганізмам притаманне видове різноманіття та широкий спектр властивостей. Серед представників роду часто зустрічаються й патогенні ентеробактерії: *Salmonella*, *Shigella*, санітарно – показова група – *Escherichia*, *Enterobacter*,

Citrobacter. За останні 15–20 років було суттєво розкрито роль ентеробактерій у патологічних процесах. Передусім подібні дослідження були присвячені представникам родів *Edwardsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Yersinia*, *Klebsiella* та *Proteus* [25].

Едвардсіельоз. Рід *Edwardsiella* широко представлений як безпосередньо у водному середовищі, так і у організмі риб та рептилій. Представники *Edwardsiella ictaluri* та *Edwardsiella tarda* – типові збудники хвороб риб – грамнегативні, оксидазоцегативні бактерії, які характеризуються низьким рівнем рухливості. Особливо чутливою до дії згаданих патогенів є молодь риб. Так, едвардсіельози вугря й каналного сома – часте явище у Північній Америці, Західній Європі, Австралії [26]. У вітчизняній аквакультурі *Edwardsiella tarda* був вперше виділений у 1993 р. (ВДРГ “Енергодар” з клінічно здорових однорічок коропа) [10].

Єрсиніоз. Представники роду *Yersinia* поширені у природі, їх у різні роки виділяли з креветок, риб, а також з ґрунту та безпосередньо води. Незважаючи на структурно-функціональну подібність з *Y. Enterocolitica*, інші представники роду *Yersinia* мають певні індивідуальні особливості щодо біохімічних властивостей. Вірулентність патогенів даного роду наразі не має чіткої моделі й потребує більш ґрунтового вивчення. У зарубіжних наукових джерелах неодноразово описані випадки ураження

риб захворюванням «червоного рота» («Enteric redmouth diseases»), збудником якого є *Y. ruckeri* [27].

Вібриоз. Бактерії роду *Vibrio* являють собою факультативно-анаеробні палички, які найчастіше можна зустріти у прісній та морській воді, а рідше - у організмі риби і людей. Серед представників роду є й хвороботворні форми. Найбільше описані збудники хвороб риби - *Vibrio anguillarum*, *V. damsella*, та *V. ordalii* [28].

Citrobacter freundii – бактерія, характерна для евтрофованих прісних водоемів. У роботі [29] даний мікроорганізм виділяли з коропа, атлантичного лосося та райдужної форелі. В усіх уражених особин спостерігались пошкодження шкіри, численні крововидиви на тлі, а також – симптоми ентериту та зміни внутрішніх органів патологічного характеру.

Отже, накопичення умовно-патогенних мікроорганізмів у воді з високою ймовірністю може призводити до структурних змін мікробіоценозу риби у напрямі росту його питої ваги. Наслідком подібних процесів є дисбактеріоз, котрий у свою чергу обумовлює появу патологій у організмі риби, зниження бар'єрних функцій слизової оболонки та розвитку септицемії.

1.3. Аеромоназ риби та його роль у виникненні патологічних процесів у риби

Бактерії роду *Aeromonas* ідентифіковані у кінці XIX ст. Санареллі (1891р). Вперше виділена з крові інфікованої жаби бактерія отримала назву *Bacillus hydrophilus fuscus*. Пізніше (1901р.) видова назва була змінена на *Bacterium hydrophilum*. Назва роду *Aeromonas* пов'язана зі здатністю його представників до газоутворення. У подальшому дану групи поділили на категорії рухливих і нерухомих видів. Наразі процес класифікації бактерій даного роду триває. сучасний визначник Бергді (2007) відносить *Aeromonas* до родини

Aeromonadaceae. Рід містить 15 видів бактерій: *A. hydrophila*, *A. bestiarum*, *A. salmonicida*, *A. caviae*, *A. eucrenophila*, *A. sobria*, *A. veroni*, *A. jandaei*, *A. schubertii*, *A. trola*, *A. allosaccharophila*, *A. endheleia*, *A. popoffii*. Особливе місце щодо патології риб посідає саме *Aeromonas hydrophila* [30].

Aeromonas являють собою грам-негативні палички, які можна виділити з середовища (вода, мул) та організмів гідробіонтів (амфібій та риб) [31]. Форма клітини представників варіює від прямих паличок з заокругленими кінцями до сферичних типів, 0,3-1,0х 1,0-3,5 мкм, поодинокі, в парах чи коротких ланцюгах. Рухливість відповідних видів досягається за рахунок полярного джгутика. Бактерії є факультативними аеробами з дихальним чи бродильним типом метаболізму. Оптимальний діапазон температур для життєдіяльності аеромонад лежить у діапазоні 22-28°C, при цьому більшість видів нормально функціонує й при 37°C (виключення становлять лише кілька штамів). Мікроорганізми здатні до каталізу D-глюкозу та ряду інших вуглеводів з подальшим утворенням газу й кислоти. Оксидазопозитивні та каталазопозитивні. У більшості описаних випадків є позитивними за аргініндігідролазою та негативними за орнітиндекарбоксилазою. Описане тестування на уреазу та фенілаланіндезаміназу мало негативний результат. За ДНКазою та желатиназою вони є навпаки, позитивними. Здатні до відновлення нітрату. Майже усі відомі штами здатні до зброджування вуглеводів, у тому числі мальтози, D-галактози та трегалози. В умовах природних середовищ *Aeromonas* розмножуються у діапазонах температур 4-45°C при рН 4,5-9,8 (хоча оптимальним вважається діапазон кислотності 6,5-7,5) [28]. Основні біохімічні властивості бактерій роду *Aeromonas* наведено у таблиці 1.2.

Антигени *Aeromonas hydrophila* локалізовані на капсулі, джгутиках, цитоплазматичній мембрані, клітинній стінці та цитоплазмі [32]. Бактеріям *A. hydrophila* притаманні як унікальні специфічні антигени, так і групові, котрі визначені для інших видів роду або навіть і представників інших родів. У літературі описана адгезивна здатність аеромонад з подальшою колонізацією на

поверхні слизової оболонки кишечника коропа, що є причиною порушення її цілісності. Масове розмноження аеромонад проходить у літній період. Основними факторами чисельності аеромонад у водоймах є підвищення температури води зі зниженою концентрацією розчиненого кисню, а також високий рівень органічної забрудненості і збільшення щільності посадки (підвищення ймовірної кількості чутливих до захворювань особин). При помірному кліматі аеромонадна септицемія найчастіше виникає навесні та у першій декаді червня, однак рецидиви ймовірні у будь-яку пору. Враження риб аеромонозом здійснюється ендогенно (через травний тракт) та екзогенно (через механічні пошкодження шкір й зябер) [33].

До захворювання на аеромоноз є чутливими численні філогенетично віддалені види морських та прісноводних риб, у тому числі й ті, які є популярними об'єктами аквакультури. Наразі відомі епізоотії аеромонозу форелі (*Oncorhynchus mykiss*), великих індійських коропів (*Ciprinus mrigala*), білого амура (*Stenopharingodon idella*), рибиця (*Vimba vimba*), товстолобика (*Hypophthalmichthys molitrix*), європейського вугра (*Anguilla rostrata*), тріски (*Gadus morhua*) [34, 35, 36, 37]. До захворювання схильні усі вікові групи риб, однак найбільш чутливими аргументовано вважаються дворічки та трирічки.

Резистентними до аеромонозу вважаються карасі, лини та ряд інших коропових (наразі не описано випадків зараження).

Інкубаційний період аеромонозу, залежно від температури та загального фізіологічного стану риб, триває 3-30 діб. Ступінь небезпеки представників роду *Aeromonas* для риб обумовлене також відмінностями у показнику вірулентності та значенні у мікробіоценозі для різних видів. Особини, які перехворіли на аеромоноз, набувають відносного імунітету [33].

НУБІП України

Таблиця 1.2

Основні біохімічні властивості представників роду *Aeromonas*

Біохімічні реакції	Представники роду			
	<i>A. veronii</i>	<i>A. salmonicida</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. caviae</i>
β-галактозидаза	+	-	+ ^{oo}	+
Дихідролаза аргініну	+	+	+	+
Декарбок. лізину	+	-	(v)	-
Декарбок. орнітину	-	-	-	-
Цитрат	+(v)	-	-(v)	-
H ₂ S	-	-	-	-
Уреаза	-	-	-	-
Дезаміназа триптофану	-	-	-	-
Індол	+	+	+ ^{oo}	+
Фогес-Проскауера	+(v)	+	(v)	-
Желатиназа	+	+	+	(v)
Глюкоза	+	+	+	+
Манітол	+	+	+ ^{oo}	+
Інозитол	-	-	-	-
Сорбітол	-	-	-	-
Рамноза	-	-	-	-
Сахароза	+	+	+ ^{oo}	+
Арабіноза	-	-	+(v)	+
NO ₂	+	+	+	+
оксидаза	+	+	+	+

Примітка: (v) - змінні реакції, залежно від штаму

Традиційна діагностика аеромонозу базується на аналізі зібраних клінічних, патолого-анатомічних та епізотичних даних. В сучасних умовах запорукою адекватної діагностики є обов'язкове проведення бактеріологічних та вірусологічних досліджень і забір біопроб.

Клініко-морфологічна картина аеромонози коропів має розлогий комплекс симптомів: поступова заміна гострої септичної, підгострої септично-виразкової та хронічної виразкової форм. Описані й випадки комбінації зазначених станів, враховують. Основною диференційно-діагностичною ознакою аеромонозу вважається наявність у риби септично-виразкового та виразкового синдромів. Аеромоноз риб може протікати у гострій, підгострій та хронічній формах.

Гострий перебіг характеризується масовою загибеллю риб. Найчастіше виникає у весняно-літні місяці року. Хвороба за гострого перебігу діагностується при появі серозно-геморагічних запалень на окремих ділянках зовнішніх покривів у комплексі крововиливами (плями варіюють за величиною й формою) й черевною водячкою (збільшенням об'єму черева). У лускатих коропів при цьому може спостерігатися настовбурчення луски на окремих ділянках чи по всій площі тіла, а у дзеркальних чи голих форм – поява підшкірних пухирів-везикул, з прозорою або кров'янистою рідиною всередині. Шавці риб при гострій формі аеромонозу нерідко є запаленими, часто стають забарвлені у нетиповий червоний колір. У окремих випадках може спостерігатися випадіння анусу.

Гострий перебіг хвороби призводить до мінімізації рухливості риб, вони переважно тримаються в прибережній зоні близько до поверхні води, слабо реагують на типові подразники, демонструють порушення координації рухів. При відсутності своєчасної діагностики та лікування риби з часом опускаються на дно і там гинуть [38].

Розтин загиблих від гострого аеромонозу особин показує наявність у черевній порожнині значної кількості рідини (прозорої, жовтуватої або

кров'янистої), ознак перитоніту, спайок між внутрішніми органами, запалень різних відділів кишечника, застійні процеси у колах кровообігу. Печінка таких риб часто набуває жовтуватого, темно-сірого, чи навіть зеленуватого відтінку з явними ознаками локального некрозу. Жовчний міхур при цьому є переповненим, а селезінка збільшена до 2 разів і має темно-вишневе забарвлення.

Кровоносні судини плавального міхура значно розширюються, а на перикарді є сліди краплинних крововиливів.

Підгострий перебіг Альтернативна назва - асцитно-виразкова форма.

Спостерігається в будь-який період року, переважно – у весняно-літні місяці.

Підгострий перебіг супроводжується появою у хворих риб асциту та серозно-геморагічного дерматиту, наслідком чого є виникнення на шкірі особин виразок.

У ряді випадків при даній формі хвороби може виникати глибокий м'язовий некроз, який можна діагностувати візуально: у риби руйнується черевна стінка і оголюються кістки та органи черевної порожнини. Також виразкова форма може призводити й до некрозу плавців та руйнування міжпроменевих перетинок.

Хронічний перебіг Інша назва - виразкова форма, типова для другої половини літа та осінніх місяців. На шкірі хронічно хворих особин помітні центри запалення, а також відкриті виразки та рубці. На шкірі й плавцях також є специфічні сполучно-тканинні утворення, утворені на місці виразок, які зажили.

Яскраві патологоанатомічні зміни виражені слабо або взагалі відсутні. У деяких випадках була встановлена незначна гіперемія на ділянках слизової оболонки кишечника, а також блідий відтінок печінки, збільшення розмірів жовчного міхура, набрякові процеси у нирках, спайки між внутрішніми органами, тощо.

Водночас, аналіз літературних джерел свідчить про те, що, незважаючи на наявність візуальних симптомів, у багатьох випадках виділити прогнозований етіологічний агент (штам рухливої аеромонади) у чистій культурі не вдається.

Для досягнення цієї мети проводять висів складних асоціації грам-негативних бактерій, однак проросла мікрофлора зазвичай містить лише декілька видів аеромонад (навіть авірулентних) та ентеробактеріями [39, 21, 40].

Для досягнення цієї мети проводять висів складних асоціації грам-негативних бактерій, однак проросла мікрофлора зазвичай містить лише декілька видів аеромонад (навіть авірулентних) та ентеробактеріями [39, 21, 40].

Для досягнення цієї мети проводять висів складних асоціації грам-негативних бактерій, однак проросла мікрофлора зазвичай містить лише декілька видів аеромонад (навіть авірулентних) та ентеробактеріями [39, 21, 40].

Для досягнення цієї мети проводять висів складних асоціації грам-негативних бактерій, однак проросла мікрофлора зазвичай містить лише декілька видів аеромонад (навіть авірулентних) та ентеробактеріями [39, 21, 40].

НУБІП України

1.4. Сучасні методи профілактики та лікування бактеріальних інфекцій у риб

НУБІП України

Традиційним у практиці рибництва методом боротьби з бактеріальними хворобами риб є терапія антибіотиками. Однак, наразі застосування таких препаратів суттєво обмежене в першу чергу - внаслідок формування антибіотикорезистентних штамів, розвитку імунодефіциту у риб під дією препарату та небезпеки непередбачуваних змін у екосистемі ставу. Крім того, встановлено наявність R – фактору у деяких умовно-патогенних бактерій риб, що може призвести до швидкого вироблення резистентності до антибіотиків [18]. Безумовно, негативним наслідком дії антибіотиків є й забруднення хіміопрепаратами кінцевого продукту, що впливає як на якість та безпеку, так і на його ліквідність. В умовах стрімкого росту насичення ринку продукцією аквакультури, конкурентоспроможною є виключно риба, вирощена без застосування антибіотиків..

НУБІП України

Бактеріологічні засоби діагностики не передбачають експрес-ідентифікацію збудника до виду включно, тож лікування захворювання зазвичай зводиться до застосування антибіотиків широкого спектру дії. Відомо, що такі препарати згубно діють на ріст та розвиток як мінімум кількох видів та навіть родів бактерій. У результаті антибіотичного втручання разом з патогенними гинуть і бактерії, які входять до складу природної сапрофітної мікрофлори, котра відіграє провідну роль у кругообігу азоту та інших речовин, розкладанні органічних залишків та інших механізмах, необхідних для нормального функціонування біоценозу [41].

НУБІП України

Альтернативою антибіотикам можуть стати препарати на основі бактеріофагів (бактеріальних вірусів) - строго специфічні та екологічно безпечні. Фагоіндикація є оперативним методом виявлення бактерій у різних матеріалах з

використанням специфічних індикаторів-бактеріофагів [42]. Фагам властива чітка вибіркова дії щодо конкретних видів бактерій. Внаслідок високої специфічності бактеріофаг-індикатор не реагує на «сторонні» види мікроорганізмів у зразках, що позбавляє необхідності виділення потрібного збудника у чистій культурі задля його ідентифікації [43]. Отже, у застосуванні бактеріофагів-індикаторів для діагностичних цілей, лікування й профілактики хвороб риб можна виділити наступні переваги порівняно з традиційними методиками:

- немає потреби у дорогому обладнанні й витратних матеріалах;
- значно зростає оперативність діагностики;
- біопрепарат для лікування – специфічний (впливає лише на конкретний вид бактерій);
- безпечність для людини і тварин;
- економність: індикаторні бактеріофаги є живими агентами, здатними до самостійного підтримання популяції.

Важливість підвищення резистентності риб до інфекцій в умовах промислової аквакультури складно переоцінити. Дана проблема може бути вирішена внаслідок застосування новітніх вакцин і пробіотичних препаратів у рибництві.

Застосування антибактеріальних вакцин у рибництві – дієвий спосіб контролю здоров'я риби з паралельним підвищенням її імунного рівня.

Вакцинація з профілактичною метою має ряд позитивних аспектів. Зокрема, застосування вакцини є економічно вигідним кроком, адже її використовують до епідемічних ознак чи локальних спалахів хвороби. Крім того, вакцини не є й джерелом забруднення рибної продукції [44].

У закордонній аквакультурі практикують цілий ряд комерційних вакцин від різних виробників: бактерини проти вібриозу (збудники - бактерії *V. anguillarum* і *V. ordalii*), холодноводного вібриозу (збудник - *V. salmonicida*), фурункульозу лососевих (*A. salmonicida*), проти ієрсиніозу (*Yersinia ruckeri*). Так,

позитивний досвід використання бактерина проти бактеріальної септицемії у китайській аквакультури описано у роботі [45].

Одержання вакцинного препарату проти рухливих аеромонад, дієвого для гомологічних та гетерологічних штамів було суттєво ускладненим внаслідок високої антигенної гетерогенності згаданих мікроорганізмів. Антимікробні пептиди (AMP) є важливою складовою вродженого імунітету риби. Це короткі фрагменти довжиною 12-50 амінокислот. Для пойкилотермних риби саме система вродженого імунітету є ключовою у захисті від інфекції. Отже, вивчення ролі пептидних факторів у антимікробних механізмах є актуальною практичною проблемою. Наразі у літературі описано кілька типів AMP, виділених зі шкіри, лейкоцитів та слизової оболонки кишечника різних видів риби. Так, було показано, що, на відміну від антибіотиків, бактерії не виробляють стійкості до антимікробних пептидів. Тому AMP можуть розглядатися як альтернатива антибіотикам та потребують більш детального вивчення [46].

Відчутний лікувально-профілактичний, а також імуностимулюючий ефект позитивно характеризують пробіотики для використання у аквакультури. Сучасні пробіотики є добавкою до корму, з живими мікроорганізмами у складі.

Такі препарати сприятливо впливають на організм риби, оздоровлюючи мікрофлору її кишечника [47].

Значне зростання бактеріального впливу на рибу відбивається і на імунологічних показниках (бактерицидній активності сироватки крові та титрі аглютинуючих антитіл, що пов'язане з суттєвими втратами енергетичних ресурсів риби у боротьбі з патогенами). Таким чином, найбільш дієвим методом лікування й запобігання інфекційним захворюванням у аквакультури є комплексне застосування вакцин з пробіотиками, у поєднанні з дезінфікуючими заходами води та стабілізації решти умов для утримання риби [18].

Для ефективної оптимізації мікробіологічних характеристик води та загальної профілактики стану риби, варто регулярно обробляти стави гіпохлоридом кальцію й негашеним вапном [48, 49]. Ще одним ефективним

заходом підтримання гігієнічних умов вирощування риби є очистка ставів та їх літування [50, 51]. Згадані заходи при регулярному проведенні дійсно дозволяють знизити органічне забруднення водою, відповідно поліпшивши гідрохімічний склад та мінімізувавши бактеріальний вплив на рибу.

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

НУБІП України

Робота виконувалась у лабораторії біотехнологій у рибництві

Інституту рибного господарства НААН України.

НУБІП України

Одним з результатів проведених досліджень стало одержання 29 штамів бактерій роду *Aeromonas* з організму прісноводних видів риби (коропа, осетра, форелі, карася, товстолоба, чорного амура та сома).

У відповідності до завдань було здійснено етапи досліджень, схематично наведені на рис. 1.1.

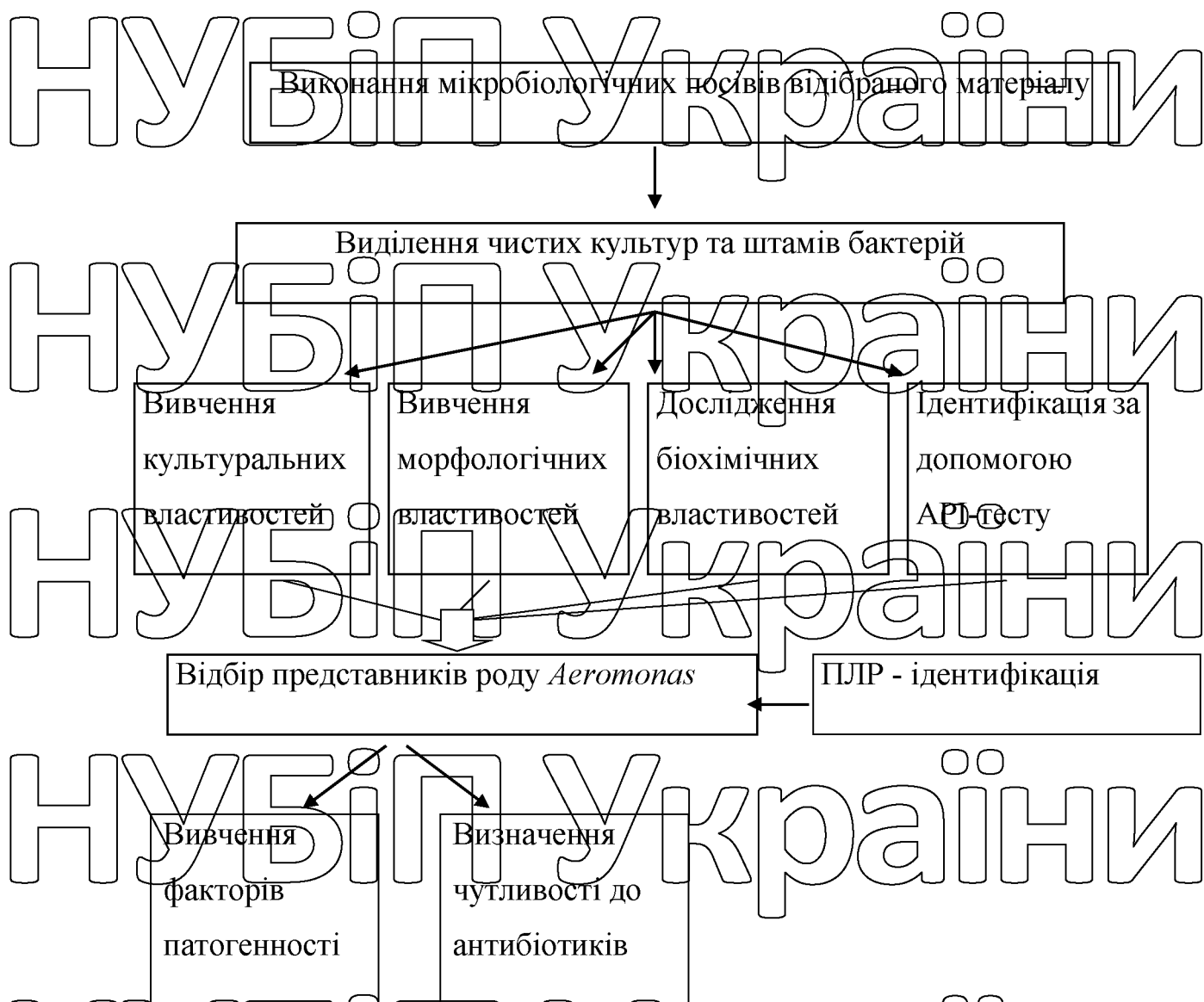


Рис. 1.1. Схема дослідження виділених бактерій.

2.1. Методи дослідження культуральних та морфологічних властивостей

Мікробіологічні дослідження проводили двоетапно. Спочатку виконували первинний посів патологічних матеріалів на поживному середовищі м'ясо-пептонному агарі (МПА), котре попередньо інкубували у термостаті при 26°C протягом доби. Зменшення вологості поверхні середовища у чашках Петрі досягали шляхом їх підсушування у термостаті.

На другому етапі виділяли чисті культури мікроорганізмів. Для цього на чашку з поживним середовищем, поверхня якого була попередньо поділена на сектори, стерильною петлею наносили культуру мікроорганізмів з окремої колонії, формуючи зигзагоподібний штрих на поверхні першого сектора, а потім так само послідовно засівали й інші сектори, без стерилізації петлі. У результаті на перших секторах прогнозовано одержували суцільний ріст, а вздовж решти штрихів - окремі колонії. Після цього вивчали культуральні та морфологічні властивості матеріалу [52].

Культуральні властивості вивчали на рідких та щільних середовищах. Колонії оцінювали за розмірами (середні й дрібні), формою (округлі, неправильної форми), ступенем прозорості (прозорі, напівпрозорі), кольором (матові та пігментовані), станом поверхні (пласкі, опуклі, зморшкуваті, гладенькі), консистенцією та структурою [53].

Морфологічні властивості мікроорганізмів досліджували з допомогою мікроскопа *Microscope XS-3320*. При цьому перевіряли чистоту одержаної культури, паралельно оцінюючи форму та розміри окремої бактеріальної клітини на мазках. Фарбування виконували за Грамом у модифікації Бурке.

Фарбування за Грамом у модифікації Бурке: на попередньо знежирене предметне скло наносили культуру, котру потім підсушували, фіксуючи тепловим способом. Потім наносили кілька крапель розчину А (1% водний розчин кристалічного фіолегового) та одну краплю розчину Б (1% розчин Na_2CO_3) на 2 хв. Після відмивки препарату й одною протравкою Бурке наносили

повторно свіжу протравку ще на 2 хв. Готовий препарат промивали у воді, після чого знебарвлювали його у етанолі до повного зникнення фарби у стікаючому розчиннику. Додаткове фарбування реалізували 2% розчином сафраніну протягом 1 хв. Після фінального промивання препарату у воді досліджували його під мікроскопом з використанням імерсії при 100-кратному збільшенні.

2.2. Методи біохімічного аналізу

У представлених дослідженнях використано 18 біохімічних тестів, а також тест-систему API, котра власне містить 21 біохімічний тест.

- **Тест на оксидазу.** На фільтрувальний папір наносили кілька крапель 1% -го розчину диметил-п-фенілєндіамін дигідрохлориду і культуру бактерій. Про наявність оксидази свідчила зміна вихідного кольору на рожевий;
- **Тест на каталазу.** Однодобова культура суспензувалася в одній краплі 3% -го розчину пероксиду водню. Про наявність каталази свідчило газоутворення (поява бульбашок) [53];
- **O/F тест для визначення типу утилізації глюкози та газоутворення.** Інокулювали 2 пробірки середовища Хью-Лейфсона – одна мала доступ кисню, інша була залита стерильним вазеліновим маслом. До складу O/F середовища входить індикатор бромтимоловий синій (при нейтральному рН має зелене забарвлення), котрий здатен змінювати первинний колір на жовтий у присутності кислот, що сигналізує про існування вуглеводневого метаболізму. У випадку наявності метаболізму вуглеводнів у обох пробірках, можна стверджувати про існування процесів бродіння. Зміна кольору у відкритій пробірці свідчить про те, що бактерії культури можуть споживати вуглевод шляхом окиснення. Газоутворення констатували при появі дрібних розривів та бульбашок у напіврідкому середовищі.

Середовище Хью-Лейфсона (г/л): пептон – 2; NaCl – 5; K₂HPO₄ – 0,3; агар – 3; бромтимоловий синій 0,4% в 50% етанолі, глюкоза 10% водний р-н, 100 мл; H₂O – 1000 мл; рН 7,3. Стерилізацію здійснювали протягом 20 хвилин шляхом автоклавування при 121°C та 1 атм. Після цієї процедури у препарат додавали розчин глюкози (стерильний).

MRVP – тест. Дві пробірки з бульйоном MRVP і добовою культурою інкулювали. Після інкубації тривалістю 72-98 год. при 26°C до однієї з пробірок вносили 5 крапель метилового червоного. Про утворення кислоти свідчило почервоніння середовища. До другої пробірки додавали 0,6 мл розчину *a* – нафтолу у комплексі з 0,2 мл 40%-го розчину КОН. Тут почервоніння було результатом наявності ацетону [54].

Середовище Кларка (г/л): пептон – 7; глюкоза – 5; K₂HPO₄ – 5; H₂O – 1000 мл; рН 6,9. Розчин метилового червоного масою 0,1 г розчиняли у 300 мл 95% етанолу та доводили водою до об'єму 500 мл.

Виявлення відновлення нітрату до нітриту. До кожної пробірки з нітратним бульйоном після попереднього культивування мікроорганізмів додавали реактив Грісса (містить сульфанілову кислоту і α -нафтиламін). Відновлення мікроорганізмами нітрату до нітриту сигналізувалося накопиченням у середовищі азотистої кислоти HNO₂. Візуально це можна було оцінити за почервонінням сульфанілової кислоти діазотувалася, реагуючи з азотистою і цей продукт у реакції з α -нафтиламином утворює червоний колір.

Нітратний бульйон (г/л): KNO₃ – 0,1; МПБ 1000 мл.

Реакція визначення сірководню. Інкулювали МПБ культурою мікроорганізму, безпосередньо перед початком інкубації фіксували на пробці шматок індикаторного паперу, просочений ацетатом свинцю. Виділений у простір сірководень призводив до почорніння індикаторного паперу приблизно через добу;

Реакція визначення індолу. Дана методика також передбачає застосування індикаторного паперу, просоченого вже водним розчином шавлевої кислоти (за Морелем). Папірець фіксували пробкою безпосередньо над поверхнею рідкого середовища. Бактерії культивували протягом доби при 37°C. Проявність індолу свідчило почервоніння паперу у спектрі відтінків від рожевого до малинового [53].

Ферментація вуглеводів. Методика проводилася з використанням напіврідкого середовища Гісса (містить пептон, індикатор бромкрезоловий пурпуровий та певний вуглевод). Середовище інокулювали добовою культурою, а потім інкубували його при 26°C. При зброжуванні вуглеводу було очевидним пожовтіння середовища (утворювалась кислота) та ознаки газоутворення [53];

Середовище Гісса для утилізації цукрів (г/л): пептон – 10; KNO_3 – 0,1;

NaCl – 5; Na_2CO_3 – 0,7; H_2O - 900 мл; бромкрезоловий пурпуровий - 1,6%-ий розчин 1 мл; рН 7,7.

Додавали 5% необхідного вуглеводу або спирту на 100 мл середовища. Готове середовище Гісса з індикатором бромтимоловим має пурпурово-фіолетовий колір, що змінюється на жовтий у процесі утворення кислоти;

Тест на уреазу. Інокулювали агар Крістенса (скошений) у присутності сечовини та інкубували це середовище. При наявності уреазу відбувається відщеплення амонійної групи від сечовини, про що свідчила поява червоно-фіолетового кольору;

Середовище Крістенсена: дріжджовий екстракт - 0,5; L-цистеїну гідрохлорид - 0,1; натрію цитрат - 3; глюкоза - 0,2; K_2HPO_4 - 1; NaCl 5; феноловий червоний - 0,012; агар - 15; H_2O - 1000 мл, рН 6,9.

Готове середовище має помаранчевий колір, при впливі луку воно замінює своє забарвлення на малинові відтінки;

Використання цитрату. Суспензовані мікроорганізми наносили штрихами на скошену поверхню цитратного агару Сімонса. Проводили інкубування

зразка протягом 7 діб. При використанні цитрата прогнозовано здійснювалося піддування середовища, про що сигналізувало блакитне забарвлення індикатора;

Середовище Сімонса (г/л): агар – 20; NaCl – 5; натрію цитрат – 2; K_2HPO_4 – 1; $NH_4H_2PO_4$ – 1; $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0,2; бромтимоловий синій - 0,08; H_2O – 1000 мл. Готове середовище має зелений колір.

Визначення орнітин-, лізіндекарбоксілази та аргініндегідролази.

Середовище для визначення декарбоксілази (також і аргініндегідролази) за

Falkow (індикатор бромкрезоловий пурпуровий) розподіляли на 4 частини. До

кожної з трьох частин додавали одну з тестових амінокислот, четверту

залишали без амінокислоти (для контролю). Приготовані середовища

розливали по 5 мл у пробірки і стерилізували їх. До однієї пробірки з

амінокислотами лишали незасіяними (як контроль 1, необхідний для певності

у дійсній зміні індикаторного забарвлення). Решту пробірок засівали

мікробною культурою уколом. три дослідні пробірки з амінокислотами і одну

без амінокислоти (контроль 2, потрібний для певності у здатності

мікроорганізмів до утилізації глюкози з утворенням кислоти). Після цього

пробірки герметизували вазеліновим маслом (шаром 4-5 мм товщиною).

Інкубували зразки при 30-37°C протягом 4-6 діб. На перших 6-8 годинах

культивування мікроорганізми зброджують глюкозу, виділяючи органічні

кислоти. При цьому водневий показник знижувався, що призводило до

пожовтіння індикаторів. Однак, рН знижували усі мікроорганізми, здатні до

збродження глюкози, незалежно від наявності у них декарбоксілаз (чи

аргініндегідролази). Тож, пониження рН і зміна кольору індикатора не

свідчить про однозначно позитивні результати тесту. Через добу і протягом

наступного періоду культивування рівень рН у пробірках зростав через

накопичення алкіламінів. У результаті спостерігалось піддування

середовища та зміни кольору індикатора. Про позитивній реакції у дослідних

пробірках індикатор ставав пурпуровим, сигналізуючи про лужність. У

пробірки з контролем 2 середовище у відсутності амінокислот лишалося кислим, тобто середовище ставало жовтим. Тобто, позитивним результатом тесту є наступне підлучення середовища. При негативній реакції жовтість усі зразки у дослідних пробірках та контроль 2..

Середовище для визначення декарбоксилази (і аргінідегідролази)

за Falkow, г/л: пептон – 5,0; дріжджовий екстракт – 3,0; глюкоза – 1,0; L-амінокислоти – 5,0, або DL-амінокислоти – 10,0; бромкрезоловий пурпуровий – 0,02 або 1,6%-ний спиртовий розчин - 1 мл; рН 6,3-6,7. Готове середовище має сіро-фіолетове (до пурпурового) забарвлення.

Експрес-ідентифікацію бактерій проводили з використанням стандартизованої тест-системи *API 20E "Bio Merieux"* (виробництво - Франція). У лунки з дегідратованими субстратами для визначення 21 тесту (утворення індолу, сірководню, ацетоїну; наявності β-галактозидази, аргініндегідролази, лізиндекарбоксилази, орнітиндекарбоксилази, уреаз, триптофандезамінази, желатинази; ферментації цитрату, глюкози, манітола, інозитола, сорбітола, амідаліна, рамнози, сахарози, меліцитози, арабінози) вносили по 100 мкл 24-годинної суспензії бактерій, додаючи по 50 мкл вазелінового масла у лунки з тестами на уреазу, орнітиндекарбоксилазу, лізиндекарбоксилазу, аргініндегідролазу і сірководень. Також додатково визначали цитохромсксидазу, окислення та ферментацію глюкози і рухливість мікроорганізмів.

Інкубування посівів тривало від 18 до 24 год., після чого до культур додавали реактиви на ацетоїн, індол, триптофандезаміназу і нітрити. Дані отримували візуально, шляхом порівняння кольору продуктів реакції з штатною ідентифікаційною таблицею.

2.3. Метод ідентифікації бактерій роду *Aeromonas* на основі полімеразної ланцюгової реакції

Екстрагування ДНК. До суспензії бактерій додавали лізуючий буфер (10mM TRIS-HCl, pH=8,0, 0,1M NaCl, 25 mM EDTA, 0,5 % DCH) і протеїназу К.

Отриманий розчин перемішували та інкубували протягом 1 години при 37 °С.

ДНК екстрагували з допомогою фенолу та центрифугували протягом 5 хв в

умовах 13000 об/хв, використовуючи мікроцентрифугу "Eppendorf" (виробництво

- Німеччина). Надосадковий шар рідини відбирали, після чого повторювали

екстрагування ДНК, застосовуючи на цей раз суміш хлороформ-ізоаміловий

спирт у співвідношенні 24:1. Експериментальну суспензію центрифугували за

тих же умов, що й на першому етапі екстрагування. До супернатанту додавали

0,1 об'єм 3M нагріт ацетату з pH 5,2 та 2,5 об'єми абсолютного етанолу,

оохолодженого до -20°C. Преципітацію ДНК здійснювали при кімнатній

температурі (+20 °С) впродовж 1 години. Осадження ДНК реалізували,

використовуючи мікроцентрифугу (13000 об/хв упродовж 10-ти хвилин). Для

промивання одержаного осаду ДНК використовували 70% етанол. Екстраговану

ДНК розчиняли в TE-буфері (10mM TRIS-HCl, 1mM EDTA, pH=7,5) або у

деіонізованій воді.

Концентрацію очищеної ДНК встановлювали з допомогою

спектрофотометра "APEL PD-303 UV" (використовували кварцові кювети).

Концентрація ДНК у нашому випадку складала 654 мкг/см³.

Підбір олігонуклеотидних праймерів. Для підбору праймерів,

визначення їхньої специфічності та властивостей використовували програмне

забезпечення Vector NTI 11 (INVITROGEN) та Primer Premier 5.

Використовуючи усі відомі нуклеотидні послідовності гену аеролізину AerA

власивого бактеріям роду *Aeromonas*, нами було підбрано та синтезовано

специфічні до нього олігонуклеотидні праймери. Перевірка специфічності

праймерів проводилася з використанням онлайн-сервісу BLAST

(www.ncbi.nlm.nih.gov/blast). Послідовність олігонуклеотидів була наступною:

Aero-F 5' - GGTGTTATCCGACCAATCCTG - 3'

Aero R 5' – GGATGTAACGCTTGTCCCACT 3'

Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР). Ампліфікацію проводили, використовуючи термоциклер “Eppendorf MasterCycler”. У склад реакційної суміші входили: 12,5 мкл 2×MasterMix (Fermentas), олігонуклеотиди (Metabion) по 1 мкл кожного, 2 мкл виділеної ДНК та стерильна деіонізована вода до загального об'єму 25 мкл. Ампліфікація ДНК передбачала 1 цикл попередньої денатурації при температурі 95°C (тривалість - 2 хвилини) та 30 циклів денатурації при температурі 95°C (тривалість 30 секунд), відпалу праймерів при температурі 60°C (тривалість - 1 хвилина), елонгації при температурі 72 °C (тривалість - 1 хвилина) та додатковий кінцевий цикл синтезу при температурі 72 °C протягом 2 хвилин. Після цього ПЛР продукти аналізували у 1,5% агарозному гелі в TAE-буфері (40 мМ TRIS-HCl, 20 мМ оцтова кислота, 1 мМ EDTA), застосовуючи ДНК-маркер 100 пар нуклеотидів (Fermentas). Результати електрофорезу відслідковували під ультрафіолетовим транслюмінатором.

Визначення нуклеотидної послідовності ампліфікованої ДНК. Нуклеотидні послідовності ампліфікованої ДНК культури бактерій досліджували з використанням автоматичного ДНК-секвенатора “Genetic Analyser 3130” (“Applied Biosystems”, США), застосовуючи набір для секвенування “BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit”. Даний набір базується на використанні мічених 4-ма кольорами дідеоксирибонуклеотидів-термінаторів: G, A, T та C (“DyeDeoxy™ terminators”). Термінатори замінювали стандартні дідеоксинуклеотиди у ферментативному секвенуванні, утворюючи 3'-мічені продукти, котрі автоматично аналізувалися системою. Для кожної з матриць додавали 8 мкл BigDye® Terminator v3.1, яка містила “DyeDeoxy™ dNTPs” та “AmpliTag” ДНК-полімерази, 20 нг дволанцюгової ДНК-матриці та 4 пмолі праймеру. Кінцевий об'єм реакційної суміші доводили до 20 мкл. Продукти реакції очищали за допомогою спеціалізованих реагентів з набору “BigDye X Terminator® Purification Kit” (“Applied Biosystems”). Для цього зразки розводили у 20 мкл формаміду, ретельно перемішували та денатурували розчин

при 95 °С протягом 2 хвилин. Електрофорез проводили на автоматичному секвенаторі, згідно рекомендаційного протоколу виробника. Отриману послідовність аналізували з використанням спеціального програмного забезпечення “Sequencing Analysis” (“Applied Biosystems”).

Нуклеотидні послідовності бактерій роду *Aeromonas* отримували з бази даних Національного Центру Біотехнологічної Інформації (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov).

2.4. Визначення чутливості бактерій роду *Aeromonas* до антибіотиків

Чутливість досліджуваних бактерій до антибіотиків визначали за методом дифузії у агарі з використанням паперових дисків. При цьому на поверхню підсушеного середовища МПА, розлитого у чашках Петрі вносили культуру бактерій та розтирали шпателем. Потім розміщували у чашках стандартні диски з антибіотиками. Затримку діаметрів зон затримки росту рахували після добової інкубації при температурі 27°C.

Ступінь чутливості бактерій до препаратів кількісно оцінювали, орієнтуючись на діаметр зони інгібованого росту. До високочутливих були віднесені штами з діаметром більшим ніж 25 мм, до чутливих – 15 – 25 мм, до малочутливих – 10 – 14 мм, до резистентних – 10 мм і менше чи з відсутністю ознак пригнічення росту культури [53].

2.5. Вивчення патогенності бактерій роду *Aeromonas*

НУБІП УКРАЇНИ

Патогенність бактерій досліджували за методом біопроб на цьоголітках

коропа, узятого з господарства, благополучного щодо інфекційних хвороб. Для

НУБІП УКРАЇНИ

повноцінного моделювання процесу захворювання з 1-добової бактеріальної

культури готували інокулят $1,5 \cdot 10^5$ м. к. / мл, який шприцом вводили у черевну

порожнину підослідних особин. Об'єм підбирали індивідуально у залежності

від маси підослідної риби: 0,1 мл – 20-40 г; 0,2 мл – 40-50 г; 0,3 мл – 50-100г.; 0,

5 мл – 200-300г.

НУБІП УКРАЇНИ

На вивчення кожної з одержаних культур використовували 5 особин риби.

Контрольним об'єктам вводили фізіологічний розчин. Після внесення культури

проводили моніторинг підослідних тварин, звертаючи увагу на зміну поведінки,

НУБІП УКРАЇНИ

ознаки гіперемії, набряків та виразок. Рибу, яка загинула досліджували,

піддавши патологоанатомічному розтину, фіксуючи зміни у внутрішніх органах та

роблячи робили з них посіви.

Біопроба вважалася позитивною, при загибелі не менш, як 50% заражених

НУБІП УКРАЇНИ

особин. При цьому приймали до уваги можливість виживання риби навіть при

наявності типових ознак захворювання [55].

НУБІП УКРАЇНИ

НУБІП УКРАЇНИ

РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

НУБІП УКРАЇНИ

3.1. Морфологічні та культуральні властивості бактерій роду *Aeromonas*

У процесі проведених бактеріологічних досліджень з прісноводних видів риби було виділено загалом понад 30 бактеріальних культур. Серед них було ідентифіковано представників наступних родин: *Aeromonadaceae*,

Enterobacteriaceae, *Pseudomonadaceae*, *Flavobacteriaceae*, *Micrococcaceae*. З

хворих на геморагічну септицемію коропів та товстолобів, а також форелі, хворої на фурункульоз, було виділено 7 штамів бактерій роду *Aeromonas*. За морфологічними, молекулярними та біохімічними методами штами було віднесено до 3 видів аеромонад: *A. hydrophila*, *A. salmonicida* та *A. sobria*. У

таблиці 3.1 представлено основні культуральні й морфологічні властивості одержаних нами штамів аеромонад. Штам *A. hydrophila* 1412 було виділено з

асцитної рідини коропа на Львівському об'єднанні рибкомбінаті. Бактерії *A. salmonicida* 0712 та 1512 ізолювали з нирок та селезінки форелі, а мезофільний штам *A.*

salmonicida 1411 був виділений з зябер коропа з Волинського рибкомбінату

форелевої станції «Оконськ». З поверхні тіла товстолобів та зябер коропа з ознаками хронічної форми аеромонозу був ізолюваний штам *A. sobria* зі Сквирівського рибкомбінату.

З допомогою мікроскопа у мазках чистих культур виявляли короткі Грам

(-) палички з характерними заокругленими кінцями чи кокопалички.

Встановлено, що дані бактерії демонструють позитивний тест на оксидазу. За типом дихання при постановці О/Е тесту на середовищі Хью-Лейфсона бактерії були віднесені до факультативних анаеробів. Ізолювані таким чином штами

характеризувались дихальним та ферментативним шляхами розщеплення

глюкози. Штамам бактерій *A. sobria* та *A. hydrophila* на цьому ж середовищі були

притаманні рухливість та газоутворення, при цьому штами *A. salmonicida* таких властивостей не демонстрували (табл. 3.1).

Таблиця 3.1.

Морфологічні та культуральні властивості бактерій роду *Aeromonas*

№ штаму/ Вид бактерій	Риба, з якої виділено	Розміри клітин	Окси- база	Рухли- вість	Ріст при		Пігмен- тоутв.	Тип дихання
					26°C	42°C		
1011 <i>A. sobria</i>	Короп, зябра	0,5- 0,8x0,8- 2 мкм	+	+	+	+	-	Факультативний анаероб
1411 <i>A. salmonicida</i>	Короп, нирки	0,5x1,5 мкм	+	-	+	+	-	Факультативний анаероб
6111 <i>A. sobria</i>	Товстолоб, поверхня	0,5- 0,8x0,8- 2 мкм	+	+	+	+	-	Факультативний анаероб
6611 <i>A. sobria</i>	Товстолоб, поверхня	0,5- 0,8x0,8- 2 мкм	+	+	+	+	-	Факультативний анаероб
0712 <i>A. salmonicida</i>	Форель, нирки	0,5x1,5 мкм	+	+	+	+	-	Факультативний анаероб
1412 <i>A. hydrophila</i>	Короп, асцитна рідина	0,5x1,5 мкм	+	+	+	+	-	Факультативний анаероб
1512 <i>A. salmonicida</i>	Форель, селезінка	0,5x1,5 мкм	+	+	+	+	-	Факультативний анаероб

Бактерії *A. hydrophila* та *A. sobria* активно росли на живильних середовищах при температурі 26°C-37°C, у формі напівпрозорих з сірватим відтінком колоній, котрі легко знімалися з субстрату. Через 48 годин інкубації при температурі

26°C діаметр колонії вже сягав 3-4 мм. При цьому була помічена відсутність пігментоутворення. На середовищі МПБ виділені нами штами аеромонад утворювали рівномірне помутніння, а на дні осад.

Мікроскопія штамів *A. salmonicida* виявила грам-негативні кокопалічки невеликого розміру. Через 72 год. психрофільні штами *A. salmonicida* 0712 та 1512 виділяли характерний водорозчинний пігмент коричневого кольору. При температурі 42°C ріст колоній цих бактерій не спостерігався, а оптимальний розвиток відзначали при діапазоні температур 20 – 25°C. Мезофільний штам *A. salmonicida* 1411, виділений з коропа, хворого на еритродерматит, виявився ахромогенним, пігментоутворення було відсутнє. На середовищі МНБ виділені штами *A. salmonicida* утворювали тонку плівку, при чому бульйон лишався прозорим, однак на дні спостерігався помітний осад.

3.2. Біохімічні властивості бактерій роду *Aeromonas*

Ідентифікація бактерій *Aeromonas* до виду - складна процедура, адже навіть у складі одного виду можуть існувати варіативні реакції для різних штамів. Ми проводили видову ідентифікацію ізольованих штамів аеромонад за 13 основними біохімічними тестами, результати яких наведено у таблиці 3.2.

Усі одержані нами штами *Aeromonas* не окислювали сорбіт та лактозу, натомість гідролізуючи до кислоти мальтозу та глюкозу. Усі штами виявились негативними за орнітіндекарбоксілазою та здатними до відновлення нітратів.

Всі досліджені штами *A.sobria* окислювали сахарозу до кислоти, а штами 611 та 6611 - до кислоти та газу. Маніт окислювали штами 6611 до кислоти, а штам 1011 - до кислоти та газу. Штами *A.sobria* виявились позитивними за аргініндегідролазою та лізиндекарбоксілазою, розкладали цитрат Сіммонса й продукували ацетоїн (реакція Фога-Проскауера).

Бактерії *A. salmonicida* окислювали маніт до кислоти, а штам 0712 гідролізував цей субстрат до кислоти та газу. Усі штами *A. salmonicida* були негативними за лізиндекарбоксілазою та аргініндегідролазою й не утворювали ацетоїн. При цьому, на відміну від штамів 0712 та 1512, мезофільний штам

Таблиця 3.2.

Біохімічні властивості бактерій *Aeromonas*

Біохімічна реакція	№ штаму						
	1011 <i>A.sobria</i>	1411 <i>A.salmo- nicida</i>	6111 <i>A.sobria</i>	6611 <i>A.sobria</i>	0712 <i>A.salmo- nicida</i>	1412 <i>A.hydro- phila</i>	1512 <i>A.salmo- nicida</i>
Маніт	+г	+	-	+	+г	+	+
Сорбіт	-	-	-	-	-	-	-
Лактоза	-	-	-	-	-	-	-
Мальтоза	+	+	+	+	+	+	+
Глюкоза	+	+	+	+	+	+	+
Сахароза	+	-	+г	+г	+	+	-
Лізин- декарбоксилаза	+	-	+	+	-	-	-
Орнітин- декарбоксилаза	-	-	-	-	-	-	-
Аргінін- дигідролаза	+	+	+	+	+	+	+
VP (Фогес- Проскауера)	+	-	+	+	-	-	-
NO ₂ (нітратредуктаза)	+	+	+	+	+	+	+
Цитрат (Сіммонса)	+	+	+	+	-	-	-
Уреаза (Крістенсена)	+	+	+	-	-	-	-

A. salmonicida 1411 давав позитивну реакцію на цитрат Сіммонса та Крістенсена й аргініндегідролазу.

Одержаний штамп *A. hydrophila* 1412 окислював маніт, а також мальтозу, глюкозу та сахарозу. Штамп 1412 був негативним за лізин- та орнітиндекарбоксилазою, але позитивним за аргініндегідролазою. Виділений

штамп *A. hydrophila* не використовував цитрат Сіммонса та не виробляв ацетонін.

Паралельно з біохімічним аналізом виділених аеромонад, ми провели ідентифікацію виділених штамів *Aeromonas* з допомогою стандартизованої тест-

системи API 20E (BioMerieux, Франція), призначеної саме для ідентифікації

Грам(-) паличок, на основі 21 біохімічної реакції. Останній метод мав ряд

переваг: простота у використанні, зменшення витрат часу та мінімальні витрати поживних середовищ. Так, наприклад, результати за допомогою тест-системи

API 20E були отримані через 24 год., а традиційні методи потребували 7 діб. У

86% випадків результати біохімічних реакцій між комерційною і традиційною системами співпадали (табл. 3.3).

Усі штами *Aeromonas* не виділяли сірководню та виявилися неспроможними гідролізувати сечовину, були негативними за

орнітиндекарбоксилазою. Натомість, бактерії окислювали глюкозу, маніт, однак

не окислювали інозитол та рамнозу. Мікроорганізми давали позитивний результат у тестах за желатиназою та відновлювали нітрати до нітритів.

Усі штами *A. sobria* не були здатними до розкладання цитрату й целобіози, а за β -галактозидазою давали позитивну відповідь. Штами *A. sobria* окислювали

амігдалін та виробляли ацетоїн. Штами 1011 та 6611 були позитивними за лізиндекарбоксилазою, а за аргініндегідролазою позитивну відповідь мали

штами 6111 та 6611. На відміну від інших виділених штамів *A. sobria*, штамп 6611 окислював сорбіт, арабінозу та виробляв триптофандезаміназу. Штамп 1011 давав

позитивну реакцію на індол.

Таблиця 3.3

Біохімічні властивості бактерій роду *Aeromonas* за тест-системою API 20E

Реакція	Штами бактерій						
	1011 <i>A.sobri</i> a	1411 <i>A.salmo-</i> <i>nicida</i>	6111 <i>A.sobri</i> a	6611 <i>A.sobri</i> a	0712 <i>A.salmo-</i> <i>nicida</i>	1415 <i>A.hydro-</i> <i>phila</i>	1512 <i>A.salmo-</i> <i>nicida</i>
β-галакто- зидаза	+	+	+	+	+	+	-
Аргініндегідролізаза	-	+	+	+	+	+	-
Лізиндекар- боксілаза	+	+	-	+	-	-	-
Орнітиндекар- боксілаза	-	-	-	-	-	-	-
Цитрат Сіммонса	-	+	-	-	-	-	-
H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-
Уреаза	-	-	-	-	-	-	-
Триптофан- дезаміназа	-	-	-	+	-	-	-
Індол	+	+	-	-	-	+	-
VP(Фог- Проскауера)	+	+	+	+	+	-	-
Желатиназа	+	+	+	+	+	+	+
Глюкоза	+	+	+	+	+	+	+
Маноза	+	+	+	+	+	+	+
Інозитом	-	-	-	-	-	-	-
Сорбіт	-	+	-	+	-	-	-
Рамноза	-	-	-	-	-	-	-
Сахароза	+	+	+	+	-	+	-
Целобіоза	-	+	-	-	-	-	-
Амігдалін	+	+	+	+	-	+	-
Арабіноза	-	+	-	+	-	+	-
NO ₂	+	+	+	+	+	+	+

Штами *A. salmonicida* 1411 та 0712 виявились позитивними за β -галактозидазою й аргініндегідролазою та виробляли ацетоїн. Мезофільний штам *A. salmonicida* 1411 давав позитивну реакцію на лізин декарбоксилазу, виробляв індол, окислював сорбіт, сахарозу, целобіозу й амігдалін.

A. hydrophila 1415 мав позитивну реакцію на β -галактозидазу та аргініндегідролазу, здатен до продукування індолу, окислював сахарозу, арабінозу та амігдалін.

Таким чином, результати біохімічних тестів API 20E підтвердили, що навіть різні штамми одного виду бактерій можуть мати суттєві відмінності у біохімічних властивостях.

3.3 Метод ідентифікації бактерій роду *Aeromonas* на основі полімеразної ланцюгової реакції

Згідно з результатами наших досліджень, підібрані олігонуклеотидні праймери, специфічні до ділянки гену аеропізіну (*aerA*) представників *Aeromonas*, ампліфікували фрагмент ДНК прогнозованого розміру амплікону - близько 900 пар нуклеотидів. У результаті подальших дослідів з 18 штамів грам (-) бактерій попередньо виділених з коропа та товстолаба, нам вдалося ідентифікувати 4 штамми аеромонад (рис. 3.1). З 11 зразків грам (-) бактерій, виділених з райдужної форелі, ідентифікували ще три штамми бактерій *Aeromonas* (рис. 3.2).

Таким чином, у цілому з організмів прісноводних видів риб нами було виділено 7 «робочих» штамів аеромонад. Для встановлення видової належності ідентифікованих штамів *Aeromonas* ми використовували рестрикційний аналіз ампліфікованих зразків. Праймери було підібрано таким чином, щоб реалізувати ампліфікацію саме того фрагмента гена аеропізіну, котрий містив визначений сайт рестрикції, специфічний для конкретного виду аеромонад. Наприклад, ген *aerA* у *A. hydrophila* містить сайт рестрикції *EcoRI*, у *A. salmonicida* та *A. sobria* знайдено сайти для

*Bam*HI у *A. caviae* - аналогічний сайт рестриктази *Ava*I. Як показали результати наших подальших досліджень, зразки, взяті з коропа, ідентифіковані як *A. hydrophila*, а у товстолюба ідентифікували ще шість штамів *A. hydrophila* та два штами *A. sobria*. Три штами аеромонад, виділені з райдужної форелі виявились представниками *A. salmonicida*. Рестриктаза *Bam*HI розрізала амплікон на 2 фрагменти довжиною близько 350 та 550 п.н. (рис. 3.3).



Рис. 3.1. Ампліфікація ділянки гену аеролізіну *aerA* бактерій роду *Aeromonas* виділених з коропа та товстолюба: 1-18 – зразки ДНК виділених бактерій, К – контроль, М – ДНК-маркер.



Рис. 3.2. Ампліфікація ділянки гену аеролізіну *aerA* бактерій роду *Aeromonas*, виділених з райдужної форелі: 1-11 – зразки ДНК виділених бактерій, М – ДНК-маркер.

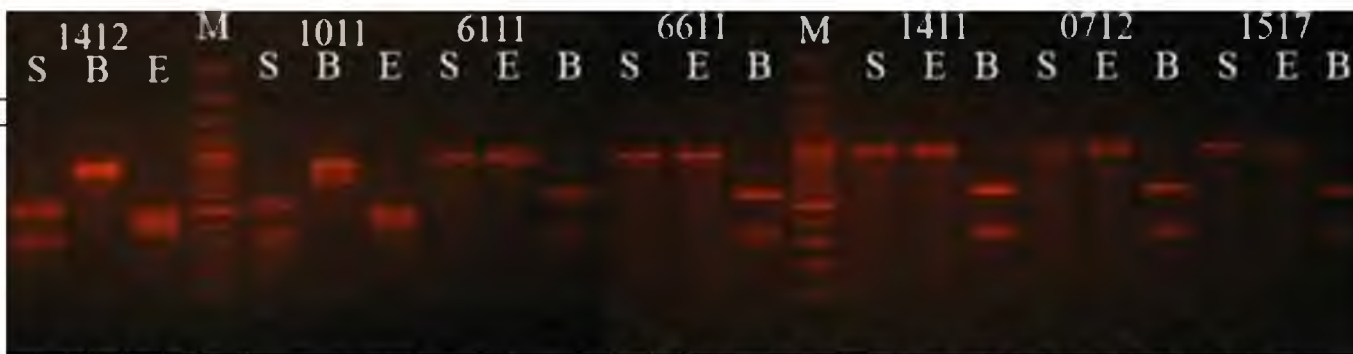


Рис. 3.3. Рестрикційний аналіз ампліфікованих фрагментів гену аеролізину бактерій *Aeromonas*, виділених з коропа, товстолоба та райдужної форелі: 1412 – *A. hydrophila* (короп); 1011 – *A. hydrophila* (товстолоб); 6111 та 6611 – *A. sobria* (товстолоб); 1411, 0712 та 1517 – *A. salmonicida* (форель); B – *Bam*HI, E – *Eco*RI, S – *Sma*I, M – ДНК-маркер.

Специфічність ампліфікації перевіряли, досліджуючи нуклеотидну послідовність продуктів ПЛР. Результати секвенсу продемонстрували відповідність ампліфікованого фрагменту ділянці гену *OerA* бактерії *A. hydrophila*, а його довжина складала 890 пар нуклеотидів. Ступінь ідентичності нуклеотидної послідовності ампліфікованої ДНК становила 94,7% (рис. 3.4)

Таким чином, запропоновані у роботі методи діагностики бактеріальних інфекцій з використанням ПЛР показують очевидну перевагу порівняно з класичними мікробіологічними методами, і можуть стати альтернативною основою молекулярно-генетичного моніторингу асоційованої мікрофлори риб. Описані підходи потребують набагато менше часу та є ефективними для виявлення й ідентифікації конкретних патогенів, незалежно від стадії захворювання. ПЛР-діагностика – швидкий чутливий метод, котрий дозволяє ідентифікувати мікроорганізми, культивування та визначення яких за традиційними біохімічними тестами є досить трудомістким.

100 matching sequences reported

Score	Expected	Identifier	Description
1216	0	gi11419751gb IN14495.1 AACHRTPA	A. hydrophila whole genome sequencing preparation (Aeromonas hydrophila strain 283A) DNA sequence for hemolysin (2070 bp)
1029	0	gi1268161omb X65043.11	A. hydrophila (strain 283A) DNA sequence for hemolysin (2070 bp)
1025	0	gi1254967251 gb FJ3969271.11	Synthetic construct truncated aerolysin gene, partial cds
1025	0	gi1142849896 gb CP000644.11	Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida A442, complete genome
1025	0	gi1288141omb X65044.11	A. hydrophila (strain 283A) DNA sequence for hemolysin (2274 bp)
1007	0	gi1210063282 gb FJ3380998.11	Aeromonas hydrophila strain TP3-30 hemolysin (Hly) gene, complete cds
1007	0	gi157062671 dbj AD021152.11	Aeromonas hydrophila gene for hemolysin, complete cds
991	0	gi1217141320 gb KQ656578.11	Aeromonas hydrophila strain MB1 hemolysin (hly) gene, partial cds
991	0	gi1117558884 gb CP000462.11	Aeromonas hydrophila subsp. hydrophila ATCC 7966, complete genome
982	0	gi189276774 gb DQ408262.11	Aeromonas hydrophila strain Ah-31 hemolysin gene, complete cds
976	0	gi1230275238 gb KQ425626.11	Aeromonas hydrophila clone AH362 aerolysin (aerA) gene, complete cds
976	0	gi1202124412 gb GU169709.11	Aeromonas hydrophila strain YBN090730L hemolysin (hly) gene, partial cds
973	0	gi1283856119 gb GU229024.11	Aeromonas hydrophila strain wp3 aerolysin gene, partial cds
973	0	gi125766674 gb DQ186611.11	Aeromonas hydrophila strain X391-4-1 aerolysin (aerA) gene, complete cds
973	0	gi184105170 gb DQ202123.11	Aeromonas hydrophila strain MA7 hemolysin (hly) gene, complete cds
971	0	gi1148841077 gb EF450825.11	Aeromonas hydrophila strain MK aerolysin (aerA) gene, partial cds
971	0	gi1122938405 gb EF189591.11	Aeromonas hydrophila strain 2W1 hemolysin (panMA) gene, partial cds

Score = 1216, Identity = (774/817) 94.74
Expect = 0

Рис. 3.4. Аналіз нуклеотидної послідовності ампліфікованого фрагменту

гену аеролізіну бактерій роду *Aeromonas* з використанням онлайн-сервісу BLAST.

Отже, підібрані нами праймери цілком можуть бути використані для

ПДР-діагностики бактерій роду *Aeromonas*, а рестрикційний аналіз ампліконів є придатним для видової ідентифікації цих мікроорганізмів.

3.4 Чутливість бактерій до антибіотиків

У представленій роботі нами було досліджено чутливість 7 штамів бактерій роду *Aeromonas* до шести антибіотиків, котрі набули широкого застосування у ветеринарній медицині, зокрема і в аквакультурі: гентаміцину, доксицикліну, стрептоміцину, амікацину, левоміцетину, енрофлоксацину. Отримані дані наведені в таблиці 3.4.

Найвища антибактеріальна активність була встановлена для доксицикліну (зона затримки росту колоній складала 22-26 мм) та енрофлоксацину (зона затримки росту колоній складала 15-22 мм). Значна чутливість виділених штамів бактерій відзначена і до левоміцетину (зона затримки росту колоній складала 18-25 мм).

До амікацину усі досліджені штами виявились менш чутливими: діаметр зон затримки росту перебував у діапазоні від 16 до 19 мм для різних штамів

Штам *A. sobria* 1011 продемонстрував чутливість до стрептоміцину, при цьому решта штами до даного антибіотика, як і до гентаміцину виявились малочутливими.

Чітко регламентований перелік препаратів для застосування в умовах вітчизняної аквакультури відсутній. З цієї причини вибір препаратів обумовлюється індивідуальними особливостями кожного конкретного випадку з огляду на доцільність їх використання. Як показали результати наших досліджень, препарати доксициклін та енрофлоксацин є найбільш ефективними для інгібування росту аеромонад з усіх одержаних у роботі бактеріальних культур. Стосовно згаданих препаратів проводились спеціальні лабораторні дослідження їх впливу на організм риби та затверджені галузеві інструкції щодо їх використання у рибористві. Таким чином, можна стверджувати про доцільність використання цих антибіотиків при спалахах аеромонозу у вітчизняних рибних господарствах.

Таблиця 3/4.

Чутливість виділених бактерій роду *Aeromonas* до антибіотиків

Назва антибіотика	Діаметр зон затримки росту різних штамів <i>Aeromonas</i> через 24 год інкубації, мм						
	1011 <i>A. sobria</i>	1411 <i>A. salmonicida</i>	6011 <i>A. sobria</i>	6611 <i>A. sobria</i>	0712 <i>A. salmonicida</i>	1412 <i>A. hydrophila</i>	1512 <i>A. salmonicida</i>
Стрептоміцин	20	12±	11	14	15	13	14
Амікацин	19	16	16	18	18	16	17
Гентаміцин	16	14	13	10	12	9	11
Доксициклін	26	24	23	23	22	25	24
Левоміцетин	18	24	25	20	18	23	21
Енрофлоксацин	32	25	19	30	23	15	17

3.5. Патогенність виділених бактерій

Для встановлення ролі виділених нами штамів бактерій у етіології аеромонозу та визначення їх патогенності були проведені експериментальні досліді з цьоголітками коропа. Для перевірки на патогенність було обрано 2 штами: *A. hydrophila* 1412 та *A. salmonicida* 0712. Загальна схема проведення дослідів наведена у табл. 3.5.

Таблиця 3.5

Загальна схема дослідів з вивчення патогенності виділених штамів *Aeromonas*

№ штамів	Піддослідна Риба	Кількість	Маса, г	Спосіб	Доза
0712	Однорічки	10	50-100	внутрішньо-черевні ін'єкції	$1,5 \times 10^5$ м.к.
1412	коропа	10			
Контроль		10			фізіологічний р-н

Як показали результати проведених за схемою досліджень, більшу вірулентність демонструє штам *A. salmonicida* 0712, який викликав загибель 100% піддослідних короців вже через 7 діб після зараження. Перші клінічні прояви захворювання (утворенням геморагічних виразок у довільних локаціях тіла інфікованої риби), у очевидній формі можна було спостерігати вже через 48 годин після інфікування. Впродовж третьої доби після інфікування смертність піддослідних тварин сягнула 30%. На 7 день після інфікування смертність склала 100 % (табл. 3.6).

Таблиця 3.6

Патогенність виділених штамів *Aeromonas*

Вид бактерій	Смертність, %							
	1	2	3	4	5	6	7	8
<i>A. hydrophila</i> 1412	0	0	0	10	10	20	20	20
<i>A. salmonicida</i> 0712	0	0	30	40	60	90	100	
КОНТРОЛЬ	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	2	3	4	5	6	7	8
День після інфікування								

При патологоанатомічному дослідженні загиблих особин спостерігалася класична картина прогресуючого аеромонозу (порівнювали з ілюстраціями розтинів риб, загиблих від аеромонозу у природних умовах). Для повторної ідентифікації збудника були зроблені мікробіологічні посіви зразків, узятих з геморагічних виразок різних особин загиблої риби. Після проростання виділених культур нами були проведені мікроскопічні дослідження, котрі підтвердили наявність бактерій *A. salmonicida*.

ВИСНОВКИ

НУБІП України

1. Розроблено і апробовано ПЛР-метод діагностики та ідентифікації бактерій роду *Aeromonas*, які є збудниками захворювання на аеромоноз у риб.

Запропонований підхід може використовуватись як альтернатива традиційним мікробіологічним методам діагностики. Розроблений метод характеризується високою оперативністю й чутливістю, не потребує значних витрат.

2. З використанням розробленої ПЛР-методики з організмів прісноводних риб було виділено понад 30 бактеріальних культур.

3. З допомогою рестрикційного аналізу ампліфікованих фрагментів ДНК виділених бактерій було ідентифіковано 7 штамів аеромонад: *A. hydrophila*, *A. sobria* та *A. salmonicida*.

4. Дослідженнями ідентифікованих штамів при використанні біохімічних тестів доведено можливість суттєвих відмінностей у властивостей різних штамів бактерій одного виду.

5. Здійснено підбір специфічних праймерів для ПЛР-діагностики бактерій роду *Aeromonas*.

6. Перевірено чутливість одержаних штамів аеромонад до дії ряду антибіотиків, які часто застосовуються у аквакультурі. Встановлено, що найбільш дієвими проти аеромонозу є доксициклін та енрофлоксацин.

7. Проведено порівняльний аналіз патогенності штамів *A. hydrophila* 1412 та *A. salmonicida* 0712. Показано високу вірулентність *A. salmonicida* 0712 (100% смертність піддослідних риб). Смертність від зараження *A. hydrophila* 1412 за цей же період не перевищувала 20%.

НУБІП України

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

НУБІП УКРАЇНИ

¹ Асланов А.П., Чугунов А.А. Прибрежное рыбоводство России. //Обзорная информация. «Рыбное хозяйство». Серия «Промышленное рыболовство и флот». М, 2002. 23 с.

НУБІП УКРАЇНИ

² Мамонтов Ю.П., Павлович Г.М. Современное состояние и перспективы развития аквакультуры России // Эпизодологический мониторинг в аквакультуре: Состояние и перспективы. Москва, 2005.

НУБІП УКРАЇНИ

³ Асадчая Р.В. Биологические свойства аеромонад и псевдомонад и их роль в развитии патологического процесса у растительноядных рыб: Автореф. канд. дисс. М., 2008. - 22 с.

⁴ Грищенко Л. И., Акбаев М. Ш., Васильков Г. В. Болезни рыб и основы рыбоводства. – М. : Колос, 1999. – 456 с.

НУБІП УКРАЇНИ

⁵ Извекова Г. И., Извеков Е. И., Плотников А. С. Симбионтная микрофлора рыб различных экологических групп // Известия РАН. Серия биологическая. - 2007. - № 6. - С. 728–737.

НУБІП УКРАЇНИ

⁶ Trust T. J. Bacteriol. associated with the gills of salmonid fishes in fresh water // J. Appl. Bacteriol. – 1975. - № 38. – p. 225–233.

НУБІП УКРАЇНИ

⁷ Nieto T. P., Toranzo A. E., Barja J. L. Comparison between the bacterial flora associated with fingerling rainbbou trout cultured in two different hatcheries in the north – west of Spain // Aquacult. – 1984. - № 42 – p. 193 – 206 .

НУБІП УКРАЇНИ

⁸ Юзомнене В. Ю., Лубянскене В. Н. Нитрогеназная активность бактерий пищеварительного тракта белого амура // Труды АН Лит. ССР. сер. В. 1989. – т. 3. с. 122–126.

НУБІП УКРАЇНИ

⁹ Sugita H., Tsunohara M., Ohkoshi T., Deguchi Y. The establishment of an intestinal microflora in developing gold fish (Carassius auratus) of culture ponds // Microb. Ecol. – 1988. - № 15 – p. 335–344.

¹⁰ Бовк Н. І. Мікрофлора каналічного сома та її зміни при патологічних процесах за умов його вирощування в тепловодних рибних господарствах: Автореф. дис. д-ра біол. наук. – Київ, 1995. – 24 с.

¹¹ Cahill Marian M. Bacterial flora of fishes : A review // Microbial Ecol . – 1990 – V. 19 , №1 . р. 21–41

¹² Баздеркина С. А. Эколого-физиологическая характеристика микрофлоры пищеварительной системы карповых рыб при выращивании на теплых водах: Автореферат дис. канд. биол. наук. – Борок, 1992. – 17 с.

¹³ Авдеева Е. В., Казимирченко О.В. Итоги бактериологических исследований рыб в рыбоводных хозяйствах различного типа и естественных водоемах Калининградской области // Успехи современного естествознания. – М., 2006. - №1. – С. 29.

¹⁴ Помаранцев Д.А. Обитатели водной среды – соактанты инфекционных и паразитарных систем в условиях Поволжского региона / Автореф. д-ра ветер. наук. дисс. Н.Новгород, 2010. - 29 с

¹⁵ Калина Г.П. Теоретические обоснования изучения потенциально-патогенных микроорганизмов в объектах окружающей среды // Гигиена и санитария. 1983. - N 10. - С. 4-7.

¹⁶ Wedemeyer G.A., Meyer F.P. Diseases of fish. Book 5: Environmental' stress and fish disease (eds. Sniesco S.F., Axelord H.R.). Neptune city: T.F.II. Publications, 1976. - 192 p.

¹⁷ Roberts R. I. Bacterial Disease of Farmed Fishes // Microbiology in agriculture , Fishies and Food . – 1976 . – р. 56 –62

¹⁸ Бычкова Л.И., Юхименко Л.Н. Роль иммунокорекции в повышении устойчивости организма рыб к оппортунистическим инфекциям // Российско-Китайский семинар. Молекулярно-клеточные механизмы патогенного и иммуогенного действия *Aeromonas sp.* 2007г., С.60-73.

¹⁹ Sugita H., Tsunohara M., Ohkoshi T., Deguchi Y. The establishment of an intestinal microflora in developing gold fish (*carassius auratus*) of culture ponds // Microb. Ecol. – 1988. – № 15. – p. 333 – 344

²⁰ Каховский А.Е. Распределение сапротрофных бактерий *Pseudomonas* по акватории рыбоводного пруда // Сб. науч. тр. / Болезни рыб и водная токсикология. М.: ВНИИПРХ, 1987. -Вып. 50.-С. 21-30.

²¹ 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. информ.-М.: ВНИЭРХ, 2001. -Вып. 1.-С. 1-10.

²² Fryer J. L., Rohovec J. S. Bacterial Diseases of Fish. // Patolobiology of Marine and estuarine organisms. – CRC Press. – 1993. – № 4. – p. 53 – 83.

²³ Суханова Е.В., Дзюба Е.В. Определение индикаторных микроорганизмов для мониторинга инфекционных заболеваний рыб на примере *Percia fluviatilis* (озеро Арахлей, Забайкальский край) // Известия Самарского научного центра Российской академии наук, т. 12, № 1 (4), 2010. – С.1156-1161.

²⁴ Madetoja, J. Occurrence of *Flavobacterium psychrophilum* in fish-farming environments / J. Madetoja, I. Dalsgaard, T. Wiklund // Dis. Aquatic Organ. – 2002. – V. 52. – P. 109-118.

²⁵ Жезмер В.Ю., Белякова Н.В., Заливака Л.В. Энтеробактерии в установках с замкнутым циклом водоснабжения / Сб. научн. тр. / Индустр. методы рыб-ва в замкнутых системах.- М.: ВНИИПРХ, 1988. -Вып. 55. С. 84-88.

²⁶ Couch J. A., Fournie J. W. Pathobiology of marine and estuarine organisms. // Bact. dis. of Fish. – CRC Press. – 1993. – p. 55 – 56

²⁷ Rageswari S., Rageswari B.R., Srangi N., Bandyopandhyay A.K. Etiological characterization of acute infection abdominal dropsy outbreak affecting Indian major carp *Cirrinus mrigala* in South Andaman // *Curr. Sci. (India)*, 1996. -70, N 8. P. 744-747.

²⁸ Yiagnisis M. Review of bacterial isolates in Greek Mariculture during the period of 1995 – 1998 // *Book of abstracts 9th International conference “Diseases of Fish and Shell fish “*, 19 – 24th September, 1999, Rhodes, Greece. - P. 56-60.

²⁹ Gallardo C. S., Gallego A. R., Real F. J., Acosta F. Psychrophilic and halofilic behaviour of *Hafnia alvei*: Significant role in aquaculture // *Book of abstracts 9th International Conference “Diseases of Fish and Shellfish “* 19 – 24th September, 1999, Rhodes, Greece. p. -081.

³⁰ Берджи. Определитель бактерий. М.: Мир, 1997. - 761 с

³¹ Oupokwasila Gideon C. *Aeromonas hydrophila*: variability in biochemical characteristics of environmental isolates // *J. Basic. Microbiol.* 1991. - V. 31, № 3. - p. 169 – 176.

³² Krovacek, K. Antimicrobial susceptibility of *Aeromonas* spp., *Vibrio* spp. and *Plesiomonas shigelloides* isolated in the Philippines and Thailand / K. Krovacek // *J Food Prot* 2006. - V. 69. - P. 1713.

33

Гаврилин К. В. Методы специфической и неспецифической иммунопрофилактики бактериальной геморрагической септицемии (аэромоноза) карпа (*CYPRINUS CARPIO* L.) / Автореф. канд. дисс. М., 2004.

³⁴ Larsen P.C., Jensen N.J. An *Aeromonas* species implicated in ulcer-disease of the cod (*Gadus morhua*) // *Nordisk Veterinaermedicin*. 1977. - N 29. -P. 199-211.145

³⁵ Rageswari S., Rageswari B.R., Srangi N., Bandyopandhyay A.K. Etiological characterization of acute infection abdominal dropsy outbreak affecting Indian

major carp *Cirrhinus mrigala* in South Andaman // Curr. Sci. (India), 1996 -70, N 8. P. 744-747.

³⁶ . Подзорова А.А. Аэромоноз производителей рыба // Итоги науч. -практ. работ в ихтиол. М.: МИК, 1997. - С. 86-87.

³⁷ . Волынкин Ю.Л., Ноздрин С.П., Евсюкова Т.Ф., Борисов А.Г., Прохоров С.В. Шимко В.В. Краснуха в рыбхозах Белгородской области // Рыбн. хоз.-во. 1991.-N9.-С.

³⁸ Инструкция о мероприятиях по борьбе с аэромонозом карповых рыб. Минсельхозпрод России, Департамент ветеринарии, 1998.

³⁹ Boonyaratpalin S. Bacterial pathogens involved in the epizootic ulcerative syndrome of fish in Southeast Asia // Aquat. Anim. Health, 1989. V. 1, N 4.-P. 271-276.

⁴⁰ Юхименко Л.П., Бычкова Л.И., Гаврилин К.В. Испытания лечебного комбикорма с субалином в рыбхозах Московской области // Рыбн. хоз.-во. Сер. Болезни гидробионтов в аквакультуре. Аналит. и реф. информ. М.:ВНИЭРХ. 2002. - Вып. 2. - С. 18-27.

⁴¹ Инструкция о мероприятиях по профилактике и ликвидации псевдомоноза рыб, Минсельхозпрод России, Департамент ветеринарии, 1998.

⁴² Бактериофаги и их использование в ветеринарной практике. И.П. Ревенко. К., «Урожай», 1978.

⁴³ Каховский А.Е. Распределение сапротрофных бактерий *Pseudomonas* по акватории рыбоводного пруда / Сб. науч. тр. / Болезни рыб и водная токсикология. М.: ВНИИПРХ, 1987. -Вып. 50.-С. 21-30.

⁴⁴ Д. А. Викторов, О.А. Ген, И.И. Богданов. Разработка методов диагностики, лечения и профилактики псевдомоноза рыб с использованием

биопрепарата на основе бактериофагов // Материалы III-й Международной научно-практической конференции молодых ученых. Молодёжь и наука XXI века. – Ульяновск 2010. – С. 6 - 8.

⁴⁵ Chen Yuenying, Quan Dong, Shen Zhihua, ShenJihyu, Cao Zhen, Yin Welin, Zhang Nianci. Production of bacterin for fishes disease of bacterial septicaemia//Fish China, 1996. 20, N 2. - P. 125-131.

⁴⁶ Concha, M.I., V.J. Smith, K. Castro, A. Bastias, A. Romero and R.J. Amthauer, 2004. Apolipoproteins A-I and A-II are potentially important effectors of innate immunity in the teleost fish *Cyprinus carpio*. Eur. J. Biochem., 271: 2984-2990.

⁴⁷ І. А. Залоїло, О. В. Залоїло, Ю. П. Рудь, І. І. Грициняк, Є. І. Залоїло. Застосування пробіотиків у аквакультурі (огляд) // Ribogospod. nauka Ukr / 2021; 2(56): 59-81.

⁴⁸ Каховский Д.Е. Профилактика болезней рыб бактериальной этиологии в интенсивно эксплуатируемых рыбоводных прудах / Автореф. канд. дис.-М., 1991.-26

⁴⁹ Каховский А.Е., Тромбицкий И.Д., Михайловская Л.В, Синяева Т. Контроль качества воды, прогноз и профилактика бактериальных заболеваний рыб в рыбоводстве Молдовы // Тез. докл. I конгр. ихтиологов России. Астрахань, 1997. - С. 397

⁵⁰ Сборник инструкций по борьбе с болезнями рыб. Ч. 1.- М.: Отдел маркетинга АМБ-агро, 1998. 310 с.

⁵¹ Бабенко О.В., Оганесян Г.С. Опыт борьбы с аэромоназом карпа// Ветеринария. 1997.-N7.-С. 14-15.

⁵² Методичні вказівки до спецпрактикуму «Виділення чистих культур мікрорганізмів» для студентів біологічного факультету/ Упорядн. І. В.

Домбровська. К.: Видавничо-поліграфічний центр «Київський університет»
2000. – 23 с.

⁵³ Лабинская А.С. Микробиология с техникой микробиологических исследований. М.: Медицина, 1978. - 394 с.

⁵⁴ Красильников А. П., Романовская Т.Р. Микробиологический словарь-справочник // Минск: Асар, 1999. –с.156.

⁵⁵ Лабораторний практикум з біології, патології та ветсанекспертизи прісноводних риб. / П. В. Микитюк, В. В. Просяна, Н. В. Буракова. – Біла Церква, 1994 – 121 с.

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України

НУБІП України