

РАЗРАБОТКА СХЕМЫ ИНДИКАЦИИ БАКТЕРИЙ *AEROMONAS SALMONICIDA* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БАКТЕРИОФАГОВ

Молофеева Надежда Ивановна, кандидат биологических наук, доцент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

Калдыркаев Андрей Иванович, кандидат биологических наук, доцент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

Шестаков Андрей Геннадьевич, кандидат биологических наук, доцент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ

432017, г. Ульяновск, бульвар Новый Венец, 1; 8(8422)55-95-47

e-mail: nadezhda.molofeeva.67@mail.ru

Ключевые слова: *Aeromonas salmonicida*, схема индикации, биологические свойства, фурункулез, бактериофаги, РНФ.

Возбудитель фурункулеза *Aeromonas salmonicida* широко распространен по всему миру и, как правило, поражает многих холодноводных рыб (форель), лососевых, реже рыб из других семейств. В настоящее время отсутствует схема индикации бактерии вида *A. salmonicida* из объектов внешней среды с использованием бактериофагов и сред накопления, что усложняет изучение ареала распространения упомянутого микроорганизма и быструю индикацию возбудителя. По этой причине целью исследования стала разработка схемы индикации бактерий *A. salmonicida* с использованием бактериофагов. Для выявления полевых штаммов *A. salmonicida* нами были исследованы 56 образцов водных объектов г. Ульяновска и Ульяновской области. С использованием среды накопления А.С1.1 и дифференциально-диагностической среды А.С1.2. из 56 образцов выделены и типированы 7 штаммов *A. salmonicida*. Нами разработана схема индикации бактерий *A. Salmonicida*, основанная на модификации реакции нарастания титра фага (РНФ) с использованием среды накопления А.С1.1. Данная схема позволяет в течение 24 часов выявить *A. salmonicida* в количестве 10^3 м.к./мл. Предлагаемая схема имеет потенциал к модифицированию и применению для целого спектра микроорганизмов, чувствительная и специфичная, позволяющая в короткий срок обнаружить бактерии в субстрате, при наличии посторонней микрофлоры без выделения чистых культур.

Введение

Бактерии, вирусы и паразиты всегда были врагами аквакультуры, которые могли вызывать инфекционные заболевания и приносить огромные экономические убытки во всем мире [1, 2, 3, 4, 5]. Особенно в условиях современного водного культивирования рыба, выращиваемая с высокой плотностью, обычно сталкивается с большим стрессом, чем рыба в дикой природе потому, что высокий выход часто сопровождается такими проблемами, как плохое качество воды и агрессивное взаимодействие. В состоянии стресса рыбы легче заражаются различными условно-патогенными микроорганизмами [1,2, 3, 4, 5]. Атлантический лосось (*Salmo salar*), выращиваемый в системе рециркуляции аквакультуры (RAS), всегда находится под смертельной угрозой фурункулеза, который несколько лет ставит в тупик крупнейших производителей аквакультуры европейских и китайских хозяйств. Возбудитель фурункулеза *Aeromonas salmonicida* (*A. salmonicida*) широко распространен по всему миру и, как правило, поражает многих холодноводных рыб, включая лососевых [1,2, 3, 4, 5].

В середине семидесятых годов прошлого столетия при обнаружении возбудителя фурунку-

леза *Aeromonas salmonicida* на все заводы и водоразделы рек Сахалинской области был наложен карантин, что в значительной степени осложнило работу рыбоводных предприятий [1, 2, 6].

Данное заболевание может протекать в латентной форме без проявления каких-либо клинических признаков, присутствие бактерионосителей в популяции может привести к вспышке заболевания и передачи инфекции.

По нашим данным, в настоящее время отсутствует схема индикации бактерии вида *A. salmonicida* из объектов внешней среды, с использованием бактериофагов и сред накопления, что усложняет изучение ареала распространения упомянутого микроорганизма и быстрой индикации возбудителя [1, 2, 6].

Цель исследования: Разработать схему индикации бактерий *Aeromonas salmonicida* с использованием бактериофагов.

Задачи:

1. Выделить полевые штаммы бактерий *A. salmonicida*.

2. Изучить биологические, морфологические и тинкторальные свойства выделенных полевых штаммов *A. salmonicida* в сравнении с референс культурой.

3. Изучить свойства фагов ASN№1 и ASN№15 (*A.salmonicida*), полученных из коллекции кафедры после 3-х летнего хранения и отобрать наиболее подходящий.

4. Разработать схему индикации бактерий *A. salmonicida* с использованием бактериофагов и среды накопления.

Материалы и методы исследований

Объекты исследования: референс-штамм *A. salmonicida* ATCC 33658, бактериофаги ASN№1 и ASN№15, полученные из коллекции кафедры МВЭ и ВСЭ ФГБОУ ВО Ульяновского ГАУ [4], а также 7 «полевых» штаммов *A.salmonicida*, выделенных из водных объектов Ульяновской области. Для изучения биологических свойств бактериофагов использовали референс штаммы бактерий: *A. hydrophila* ATCC 37232, *A. sobria* ATCC 8041, *A. caveae* ATCC 13451, *P. putida* №12633, *P. aeruginosa* №421, *P. fluorescens* №13525, *Y. ruckeri* №4, *Y. enterocolitica* №8, *P. mirabilis* №623, *B. bronchiseptica* №12056, *K. pneumonia* №1452, *E. coli* №4, полученные из коллекции кафедры МВЭ и ВСЭ ФГБОУ ВО Ульяновского ГАУ.

Материалы: ГРМ агар, мясопептонный бульон, среды Хью-Лейфсона, жидкая среда накопления А.Сl.1, дифференциально-диагностическая среда А.Сl.2, химические реактивы, набор окраски по Граму, тест наборы для изучения биологических свойств.

Методы исследования: Проведение исследований осуществлялось, в основном, по методам, предложенным сотрудниками кафедры МВЭ и ВСЭ ФГБОУ ВО Ульяновского ГАУ [7, 8, 9, 10, 11, 12].

Идентификация и индикация изолированных штаммов бактерий с использованием стандартных бактериологических методов (Васильев, Золотухин, и др., 2004; Лабинская, 2020) [13, 14].

Изучение биологических свойств (тинкториальных, морфологических, биохимических) штаммов *A.salmonicida* проводили в сопоставлении с тестами из справочника Берджи 2015 г [15].

Ферменты группы оксидаз выявляли, визуально применяя 1% раствор ди-N-диметилпарафенилендиамин. Ферменты группы каталаз выявляли, визуально применяя перекись водорода. Ферменты группы нитратредуктаз выявляли с использованием среды с нитритом натрия. В работе использовали следующие стандарты: ГОСТ 26669-85, ГОСТ Р 26670-91. Подготовленные к экспериментам среды стандартизировали в соответствии с МУК 4.2.2316-08 «Методы контроля бактериологических питательных сред» [1, 2].

Литическую активность и специфичность бактериофагов ASN№1 и ASN№15 исследовали классически по Грациа и Аппельману [16, 17]. С целью индикации *A. salmonicida* в объектах внешней сре-

ды использовали модифицированную нами реакцию нарастания титра фага Д.М. Гольдфарба и В.Д. Тимакова, дополненную индикаторной средой. Работы с бактериофагами проводили по критериям, разработанным С.Н. Золотухиным [11, 16, 17].

Результаты исследований

Выделение полевых штаммов бактерий A. salmonicida

С целью выявления полевых штаммов *A. salmonicida* нами были исследованы следующие 56 образцов:

- 17 образцов свежей рыбы (2-форель, 3-судак, 6- карп, 6-лосось);

-14 образцов мороженой рыбы непотрошенной (4-форель, 4-кета, 6-лосось) закупки проводились на рынке и в магазинах г. Ульяновска;

- 10 образцов воды из прудов д. Заводская Решетка, Барышского района Ульяновской области;

- 10 образцов воды из р. Свияга г. Ульяновск;

- 5 образцов воды из р. Волга г.Ульяновск.

Пробоподготовка проходила следующим образом: у каждого из образцов рыбы отбирались: жабры, слизь с кожного покрова, почки и часть кишечника у анального отверстия. Образцы воды встряхивались перед внесением.

Бактериологическая схема выделения бактерий *A.salmonicida* включала в себя разработанные сотрудниками кафедры жидкую среду накопления А.Сl.1, имеющую следующий состав: вода дистиллированная – 1000 мл, ферментативный пептон – 5,0 г, декстроза – 5,0 г, MgSO₄ – 0,2 г, K₂HPO₄ – 1,0г, NaCl - 5,0г, бромтимолсульфон фталеин – 0,03 г, BaCl – 2,0 г, pH готовой среды накопления = 7,1 и дифференциально-диагностическую среду А.Сl.2 имеющую следующий состав: вода дистиллированная – 1000 мл, агар – 15,0 г, ферментативный пептон – 5,0 г, декстроза – 5,0 г, экстракт пекарских дрожжей – 2,5г, индикатор конго-красный – 3,0 г, K₂HPO₄ – 1,0 г, MgSO₄ – 0,2 г , а также биохимические тесты [18].

Пробу объемом 1-3 г (для рыбы) и 5 мл (для воды) вносили в 50 мл жидкой среды накопления А.Сl.1 и культивировали в термостате 19 ч при статической температуре 28°C. Рост бактерий *Aeromonas* на жидкой среде накопления характеризовался положительной реакцией, проявляющейся изменением цвета среды с первоначально-го зеленого на желтый и помутнением с образованием осадка.

Затем производили высев из жидкой накопительной среды методом Дригальского на поверхность дифференциально-диагностической среды А.Сl.2 и инкубировали 18 ч при статической температуре 28°C. На среде А.Сl.2 бактерии *A. salmonicida* образовывали круглые колонии, диаметром 0,6-1,1 мм черного цвета, среда меняла

Таблица 1
Результаты исследования образцов рыбы и воды

№ п/п	Название объекта водной среды и количество проб	Количество выделенных штаммов
1.	Свежая рыба (17 проб рыбы)	3 штамма
2.	Мороженная рыба (14 проб рыбы)	2 штамма
3.	Ульяновская область, Барышский район, д. Заводская Решетка 3 пруда (10 проб воды)	1 штамм
4.	г.Ульяновск, р.Свияга (10 проб воды)	1 штамм
5.	г.Ульяновск, р.Волга (5 проб воды)	нет

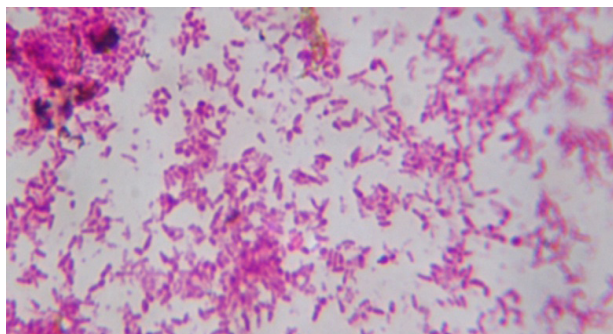


Рис. 1 – Микроскопия окрашенного по Граму мазка из штамма *Aeromonas salmonicida* ATCC 33658

цвет колоний на черный [1, 2].

С использованием сред накопления и дифференциально-диагностической выделено 7 предполагаемых штаммов бактерий вида *A. salmonicida* из объектов водной среды (табл.1).

У 7 штаммов бактерий вида *A.salmonicida*, выделенных из объектов водной среды, в сравнении с референс штаммом *A.salmonicida* ATCC 33658 были изучены морфологические, тинкториальные и биохимические свойства (табл.2).

Выросшие на селективной среде A.SI.2 колонии параллельно исследовали по тестам, с окраской клеток и микрокопированием.

Микроскопия предполагаемых колоний *A.salmonicida* показала, что клетки бактерии представляют собой грамтрицательные палочки с закругленными концами (рис. 1).

Подвижность бактерий определяли путем укола петлей в полужидкий агар, результаты учитывали после термостатирования при 28°C в течение 19-20 часов. Выявлено, что *A. salmonicida* растут лишь по линии укола, что говорит о неподвижности бактерий.

Для изучения биохимических свойств *A.salmonicida* были использованы тесты: определение оксидазы, каталазы, желатиназы, ферментация и окисление декстрозы (тест Хью-Лейфсона), нитратредуктазы, ферментация лактобиозы, способность к утилизации цитрата (табл.2).

Кроме того, для изучения сахаролитических

Таблица 2
Исследования биологических свойств различных штаммов *A.salmonicida*

№ п/п	Штамм	Окраска по Граму	Подвижность	каталаза	оксидаза	разжижение желатина	нитратредуктаза	тест Хью-Лейфсона	лактобиоза	цитрат	мальтоза	манноза	раффиноза	дульцитол	рамноза	маннит	ксилоза
1	ATCC 33658	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-
2	1 asl	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-
3	2 asl	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-
4	7 asl	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-
5	9 asl	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-
6	10 asl	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-
7	11 asl	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-
8	13 asl	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-

Таблица 3
Литическая активность фагов *A. salmonicida* по Грация и Апельману

№ п/п	Название фага	Литическая активность по Грация	Литическая активность по Апельману
1.	ASN№1	$1,1 \times 10^{10} \pm 0,1 \times 10^{10}$	10^{-9}
2.	ASN№15	$1,2 \times 10^9 \pm 0,2 \times 10^9$	10^{-8}

свойств использовали: мальтозу, маннозу, рамнозу, раффинозу, лактобиозу, дульцитол, ксилозу, маннит.

В результате проведенных исследований были подтверждены ряд биохимических свойств: каталаза, оксидаза, разжижение желатина, тест Хью-Лейфсона, нитратредуктаза реагирующих положительно. Тесты с лактобиозой, раффинозой, ксилозой, рамнозой дали отрицательную реакцию (табл.2).

Таким образом, все 7 штаммов выделенных и типированных можно отнести к виду *Aeromonas salmonicida*.

Изучение биологических свойств бактериофагов ASN№1 и ASN№15

Для разработки схемы индикации бактерий с использованием бактериофага необходим производственно-перспективный штамм фага с высоким титром и широким спектром действия.

Первым этапом исследований стала проверка литической активности фагов *A.salmonicida* ASN№1 и ASN№15 после 3 летнего хранения.

Оценка титра по Грация показала заметное снижение титра фагов ASN№1 - $1,3 \times 10^5$ и ASN№15 - $1,5 \times 10^5$ от заявленных $1,5 \times 10^9$ и 2×10^{10} БОЕ/мл.

Для дальнейшей работы необходимо было повысить литическую активность путем последовательных 5-6-кратных пассажей на чувствительной культуре.

Так же необходимо было изучить биологи-

Таблица 4

Спектр литической активности фагов по отношению к штаммам *A. salmonicida*

№ п/п	Название фага	Количество изучаемых культур <i>A. salmonicida</i>	Количество лизируемых культур <i>A. salmonicida</i>	Процент лизируемых культур <i>A. salmonicida</i> , %
1.	ASN№1	8	8	100
2.	ASN№15	8	8	100

Таблица 5

Специфичность изучаемых бактериофагов

№ п/п	Вид бактерий	ASN№1	ASN№15
1.	<i>A. salmonicida</i> ATCC 33658	+	+
2.	<i>A. hydrophila</i> ATCC 37232	-	-
3.	<i>A. sobria</i> ATCC 8041	-	-
4.	<i>A. caviae</i> ATCC 13451	-	-
5.	<i>P. aeruginosa</i> №421	-	-
6.	<i>P. putida</i> №12633	-	-
7.	<i>P. fluorescens</i> №13525	-	-
8.	<i>P. mirabilis</i> №623	-	-
9.	<i>B. bronchiseptica</i> №22067	-	-
10.	<i>Y. ruckeri</i> №4	-	-
11.	<i>Y. enterocolitica</i> №8	-	-
12.	<i>K. pneumonia</i> №1452	-	-
13.	<i>E. coli</i> №4	-	-

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

ческие свойства фагов ASN№1 и ASN№15 после хранения: внешний вид (морфологию) колоний, литическую активность, спектр, специфичность, устойчивость к высокой температуре, устойчивость к трихлорметану [17; 19].

Морфологию негативных колоний бактериофагов изучали методом двухслойного агара [8;16]. Установили, что негативные колонии бактериофага ASN№1- округлой формы диаметром 0,6–1,3 мм без зоны вторичного лизиса, полностью прозрачные. Негативные колонии бактериофага ASN№15 – круглой формы, имеют диаметр 1-2 мм без зоны вторичного лизиса, полупрозрачные.

Литическую активность бактериофага проверяли по его способности лизировать индикаторную культуру *A. salmonicida* на плотных или жидких средах, результат учитывался по наивысшему разведению, в котором наблюдали лизис культуры. Результаты оценки литической активности бактериофагов по методу Грация и Аппельмана представлены в таблице 3.

Для изучения спектра литической активности бактериофагов применяли метод нанесения фага на газон с бактериальной культурой [17; 19].

Спектр литической активности определяли на 8 культурах (1 референс-штамм *A. salmonicida* ATCC 33658 и 7 полевых штаммов *A. Salmonicida*).

Результаты показали, что изучаемые фаги имеют одинаковый спектр литической активности (табл. 4).

Для изучения специфичности исследуемых бактериофагов были отобраны следующие штаммы бактерий: *A. hydrophila* ATCC 37232, *A. sobria* ATCC 8041, *A. caviae* ATCC 13451, *P. putida* №12633, *P. aeruginosa* №421, *P. fluorescens* №13525, *Y. ruckeri* №4, *Y. enterocolitica* №8, *P. mirabilis* №623, *B. bronchiseptica* №12056, *K. pneumonia* №1452, *E. coli* №4.

Ход опыта по изучению специфичности бактериофагов следующий: на поверхность чашки Петри со стерильным ГРМ агаром наносили суточную культуру изучаемого микроорганизма, подсушивали в суховоздушном термостате не более 30 минут. После чего делали условную маркировку на дне засеянной чашки, деля ее на 2 сектора, после чего на размеченные сектора наносились бактериофаги ASN№1 и ASN№15 и термостатировали при температуре 28°C в течение 18-24 часов.

По результатам опыта выявлено, что изучаемые фаги строго специфичны по отношению к *A. salmonicida* и не лизировали бактерии других видов и родов (табл. 5).

На основании изучения биологических свойств бактериофагов ASN№1 и ASN№15 для раз-

работки схемы индикации бактерий *A. salmonicida* был выбран бактериофаг ASN№1.

Разработка схемы индикации бактерий *A. salmonicida* с использованием бактериофагов

В основе схемы индикации бактерий *A. salmonicida* нами предложена модификация реакции нарастания титра фага (РНФ) с использованием среды накопления А.СІ.1 [1;2]. С целью подбора оптимальных параметров схемы индикации бактерий *A. salmonicida* нами воспроизведена реакция нарастания титра фага с контролем титра выбранного бактериофага и учета индикаторных свойств среды накопления (рис. 2) [10, 11, 12, 15, 16].

В качестве пробы использовали «полевые» штаммы *A. salmonicida*, выделенные нами ранее с показателем КОЕ $1 \cdot 10^3$. Одновременно готовили разведения с использованием индикаторного штамма *A. salmonicida* и бактериофага ASN№1 в титре 10^4 БОЕ/мл.

Данные варианты культивировали в течение 12 часов при температуре 28°C. После указанного времени визуально учитывали изменение цвета среды и количество бляшкообразующих единиц методом агаровых слоев по Грация.

В случае если цвет среды менялся на желтый, а результат подсчета титра фага составлял

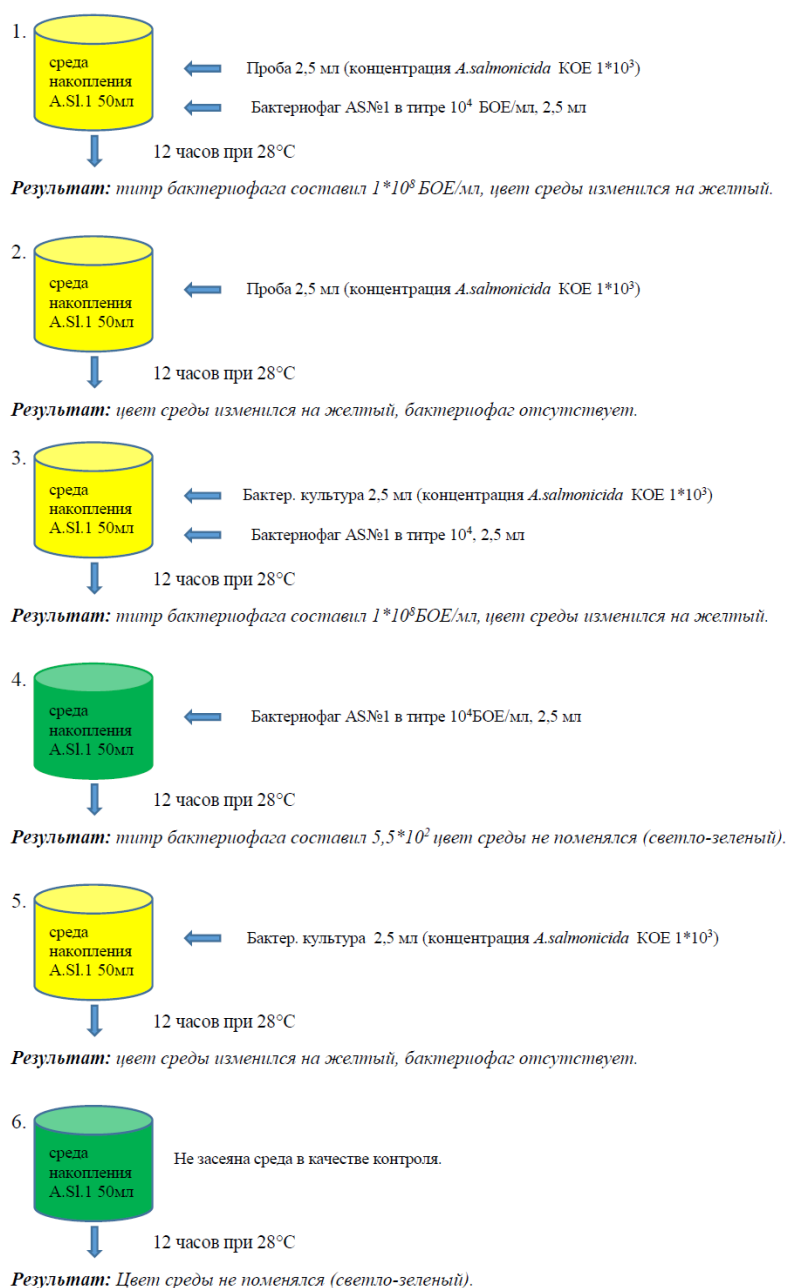


Рис. 2 – Схема индикации бактерий *A.salmonicida* с использованием бактериофага

не менее 10^8 БОЕ/мл, что говорило о присутствии бактерий *A. salmonicida*, то реакцию считали положительной.

Обсуждение

Данные эксперименты позволили установить, что для индикации бактерий вида *A.salmonicida* целесообразно использовать среду накопления A.SI.1 и бактериофаг AS№1 в титре 10^4 БОЕ/мл в 1мл [1].

Проведенные исследования позволяют наиболее полно охарактеризовать успешное сочетание реакции нарастания титра фага и диагностической среды [2]. Предложенная схема уско-

ренной индикации *A.salmonicida* с использованием бактериофагов ничуть не уступает альтернативным методам идентификации [20] и может выполняться с использованием рутинных микробиологических методов в классической лаборатории с традиционным оснащением, персоналом, имеющим базовые допуски к работе с микроорганизмами минимальных групп патогенности. Основная задача разработанной нами схемы индикации *A.salmonicida* заключается в том, что она повышает чувствительность обнаружения указанных бактерий с визуализацией процесса индикации. В процессе индикации искомые штаммы изменяют цвет среды, а так же увеличивается титр индикаторного бактериофага. Аналогов разработанной нами схемы индикации *A.salmonicida* не обнаружено.

Заключение

Ускоренная индикация *A.salmonicida* крайне важна для быстрого и точного обнаружения данных бактерий в объектах ветеринарно-санитарного надзора.

Разработанная схема позволяет в течение 12 часов экспозиции и 12 часов учета результатов выявить *A.salmonicida* в количестве 10^3 м.к./мл в (общее время исследований 24 часа).

Предлагаемая схема имеет потенциал к модифицированию для целей усовершенствования схем целого спектра бактериальных видов и родов, чувствительная и специфичная, позволяющая в короткий срок обнаружить бактерии в субстрате при наличии посторонней микрофлоры без выделения чистых культур. Кроме того, данную схему индикации можно модифицировать и совместить с современными молекулярно-генетическими методами исследования, например с технологией LAMP, для выявления штаммов *A.salmonicida*, устойчивых к бактериофагу. Таким образом, будет учтена ферментативная активность *in vitro*, рецептор клеточной стенки к бактериофагу и специфичный видовой праймер. Как следствие, индикация составит точность 100% с учетом всех современных методов исследования. Это является целью нашей дальнейшей работы.

Дополнительно, в случае успешного поиска новых штаммов вирулентных бактериофагов *A.salmonicida* и изучения их биологических свойств, появится возможность менять индикаторный бактериофаг ASN№1 на более перспективные штаммы фагов, тем самым обеспечивая формирование базы данных фаготипов вида *A.salmonicida*. Быстрая и точная индикация с помощью разработанной схемы будет иметь огромное значение для эпизоотологии, эпидемиологии и, в целом, формирования представления о циркуляции штаммов *A.salmonicida* в различных экологических нишах.

Библиографический список

1. Куклина, Н.Г. Бактериофаговый препарат для индикации и идентификации *Aeromonas salmonicida*: автореферат дис. ... кандидата биологических наук : 06.02.02 / Куклина Наталья Григорьевна; [Место защиты: Башкир. гос. аграр. ун-т]. - Уфа, 2017. - 23 с.
2. Васильев, Д.А. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофага *Aeromonas salmonicida* / Д.А. Васильев, А.В. Алёшкин, С.Н.Золотухин и др. // Естественные и технические науки. -2017. -№ 12 (114).- С. 39-47.
3. Nganso Y. O. D. et al. Identification of Peptides in the Leaves of *Bauhinia rufescens* Lam (Fabaceae) and Evaluation of Their Antimicrobial Activities Against Pathogens for Aquaculture //Science. – 2020. – Т. 8. – №. 4. – С. 81-91.
4. Nikapitiya, C., Dananjaya, S.H.S., Chandrarathna, H.P.S.U. et al. Isolation and Characterization of Multidrug Resistance *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* and Its Infecting Novel Phage ASP-1 from Goldfish (*Carassius auratus*). *Indian J Microbiol* 59, 161–170 (2019).
5. Sharma, S., Chatterjee, S., Datta, S. et al. Bacteriophages and its applications: an overview. *Folia Microbiol* 62, 17–55 (2017).
6. Майоров, П.С. Разработка схемы ускоренной идентификации бактерий *Xanthomonas campestris* с применением бактериофага в лабораторных условиях / П.С. Майоров, Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев //Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. - 2020. -Т. 23. - № 3. - С. 13-17.
7. Молофеева, Н.И. Индикация *Escherichia coli* O157 в воде с использованием РНФ / Н.И. Молофеева, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин, С.В. Мерчина, Н.С. Кузьмина, А.Г. Шестаков, В.С. Маланина // В кн: Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности. Материалы Четвертой научно-практической конференции с международным участием к 70-летию профессора В.А. Алешкина. -2018. - С. 54.
8. Рыскалиева, Б.Ж. Исследование некоторых биологических свойств бактериофагов *Pectobacterium carotovorum* / Б.Ж. Рыскалиева, Д.А. Васильев, Н.А. Феоктистова, Е.А. Ляшенко // В сб.: Зыкинские чтения. Материалы национальной научно-практической конференции, посвященной памяти доктора медицинских наук, профессора Л.Ф. Зыкина. /Под ред. О.С. Ларионовой, И.А. Сазионовой. -Саратов, 2020. - С. 133-137.
9. Феоктистова, Н.А. Разработка метода фагоиндикации бактерии *Pseudomonas syringae* в объектах санитарного надзора / Н.А. Феоктистова, А.К. Беккалиева, Д.А. Васильев, Е.В. Сульдина // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2020. - № 3 (51). - С. 148-157.
10. Феоктистова, Н.А. Подбор параметров постановки реакции нарастания титра фага для сибирияезвенного бактериофага / Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин и др. // Третья научно-практической конференция с международным участием «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности». – Москва, 2016. -С. 87.
11. Шестаков, А.Г. Разработка параметров получения максимального титра бактериофага PA04 *Pseudomonas aeruginosa* в клеточной культуре на плотной среде / А.Г. Шестаков, А.И. Калдыркаев, Н.И. Молофеева, Д.А. Васильев // Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения: материалы IX Международной научно-практической конференции, посвященной 75-летию Ульяновского государственного аграрного университета имени П.А. Столыпина. 20-21 июня 2018 года. - Ульяновск : УлГАУ, 2018. - Часть 2. - С. 166-171
12. Васильев, Д.А. Новые изоляты бактериофагов *Yersinia enterocolitica* / Д.А. Васильев, Е.В. Сульдина, С.Н. Золотухин //В кн.: Инфекционные болезни в современном мире: эволюция, текущие и будущие угрозы. Материалы X Ежегодного Всероссийского конгресса по инфекционным болезням с международным участием. - 2018. - С. 43
13. Васильев, Д.А. Методы частной бактериологии / Д.А. Васильев, А.А. Щербаков, Л.В. Карпунина, С.Н. Золотухин. -Ульяновск, Ульяновская ГСХА, 2004. – 233с.
14. Общая и санитарная микробиология с техникой микробиологических исследований: учебное пособие / А.С. Лабинская, Л. П. Блинкова, А.С. Ещина [и др.]; под редакцией А. С. Лабинской [и др.]. - 4-е изд., стер. - Санкт-Петербург : Лань, 2020. - 588 с.
15. Определитель бактерий Берджи (2015) [Электронный ресурс] / Под ред. Мартина-Карнахана А. и Жесеф С.В. – Режим доступа: <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm01081>, свободный. – Загл. с экрана.
16. Беккалиева, А.К. Изучение некоторых свойств выделенных бактериофагов *Pseudomonas*

syringae / А.К. Беккалиева, Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев // Естественные и технические науки. - 2020. - № 3-2. - С. 11-13.

17. Золотухин, С.Н. Создание и разработка схем применения диагностических биопрепаратов на основе выделенных и изученных бактериофагов энтеробактерий: автореф. дис. ...докт. биол. наук: 03.00.07, 03.00.23 / Золотухин Сергей Николаевич. – Ульяновск, 2007. –32 с.

18. Воротников, А.П. Разработка селективной среды для бактерии *Y. ruckeri* / А.П. Воротников, Д.А. Васильев, Б.И. Шморгун // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной

академии. - 2020. - № 2 (50). - С. 138-142.

19. Васильев, Д.А. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов *Pseudomonas putida* / Д.А. Васильев, Н.А. Феоктистова, А.В. Алёшкин и др. // Естественные и технические науки. -2018.- №11 (125). -С. 58-63.

20. Ломакин, А.А. Разработка системы идентификации *B. avium* и *B. trematum* на основе ПЦР в реальном времени / А.А. Ломакин, А.В. Мاستиленко, Д.А. Васильев // В кн.: Биология – наука XXI века. Сборник тезисов 24-ой Международной Пушчинской школы-конференции молодых ученых. - 2020. - С. 356-357

DEVELOPMENT OF AN INDICATION SCHEME FOR AEROMONAS SALMONICIDA BACTERIA USING BACTERIOPHAGES

Molofeeva N. I., Kaldyrkaev A.I., Shestakov A.G.

FSBEI HE Ulyanovsk SAU

432017, Ulyanovsk, Novy Venets boulevard, 1; 8(8422)55-95-47

e-mail: nadezhda.molofeeva.67@mail.ru

Key words: Aeromonas salmonicida, indication scheme, biological properties, furunculosis, bacteriophages, RSF.

The causative agent of furunculosis *Aeromonas salmonicida* is widely spread around the world and usually affects many cold-water fish (trout, salmon, and less often fish from other families). Currently, there is no scheme for indicating the bacterium of the species *A. salmonicida* from objects of the external environment, using bacteriophages and accumulation media, which complicates the study of the distribution area of the mentioned microorganism and rapid indication of the pathogen. For this reason, the aim of the study was to develop a scheme for the indication of *A. salmonicida* bacteria using bacteriophages. To identify field strains of *A. salmonicida*, we examined 56 samples of water objects in Ulyanovsk and the Ulyanovsk region. Using the environment of accumulation of *A. Sl.1* and the differential diagnostic environment *A.Sl.2.7 A. salmonicida* strains were isolated and typed from 56 samples. We have developed a scheme for the indication of *A. salmonicida* bacteria based on the modification of the phage titer increase reaction (RSF) using the accumulation medium *A.Sl.1*. This scheme allows detecting *A. salmonicida* in the amount of 103m.k./ml within 24 hours. The proposed scheme has the potential to be modified and applied to a whole range of microorganisms, sensitive and specific, allowing to detect bacteria in the substrate in a short time, in the presence of foreign microflora without isolation of pure cultures.

Bibliography

1. Kuklina, N. G. Bacteriophage preparation for indication and identification of *Aeromonas salmonicida*: spec. 06.02.02-Veterinary microbiology, virology, epizootology, mycology with mycotoxicology and immunology: abstract of the dissertation for the degree of candidate of biological Sciences / Kuklina Natalia Grigorievna; Bashkir state agrarian university. - Ufa, 2017. - 23 p.
2. Isolation and study of the main biological properties of the bacteriophage *Aeromonas salmonicida* / D. A. Vasiliev, A. V. Aleshkin, S. N. Zolotukhin [et al.] // Natural and technical sciences. - 2017. - № 12 (114). - P. 39-47.
3. Identification of Peptides in the Leaves of *Bauhinia rufescens* Lam (Fabaceae) and Evaluation of Their Antimicrobial Activities Against Pathogens for Aquaculture / Y. O. D. Nganso [et al.] // Science. - 2020. - V. 8, № 4. - P. 81-91.
4. Isolation and Characterization of Multidrug Resistance *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* and Its Infecting Novel Phage ASP-1 from Goldfish (*Carassius auratus*) / C. Nikapitiya, S. H. S. Dananjaya, H. P. S. U. Chandrarathna [et al.] // Indian J. Microbiol. - 2019. - 59. - С. 161-170.
5. Bacteriophages and its applications: an overview / S. Sharma, S. Chatterjee, S. Datta [et al.] // Folia Microbiol. - 2017. - 62. - P. 17-55.
6. Mayorov, P. S. Development of fast identification scheme for *Xanthomonas campestris* bacteria using bacteriophage in laboratory conditions / P. S. Mayorov, N. A. Feoktistova, D. A. Vasiliev // Questions of biological, medical and pharmaceutical chemistry. - 2020. - V. 23, № 3. - P. 13-17.
7. Indication of *Escherichia coli* O157 in water using RSF / N. I. Molofeeva, D. A. Vasiliev, S. N. Zolotukhin, S. V. Merchina, N. S. Kuzmina, A. G. Shestakov, V. S. Malanina // Bacteriophages: theoretical and practical aspects of application in medicine, veterinary medicine and food industry: materials of the Fourth scientific and practical conference with international participation, to the 70th anniversary of professor V. A. Aleshkin. - 2018. - P. 54.
8. Study of some biological properties of bacteriophages *Pectobacterium carotovorum* / B. Zh. Ryskaliyeva, D. A. Vasiliev, N. A. Feoktistova, E. A. Lyashenko // Zykin readings: materials of the national scientific and practical conference dedicated to the memory of doctor of medical sciences, Professor L. F. Zykin; edited by O. S. Larionova, I. A. Sazonova. - Saratov, 2020. - P. 133-137.
9. Development of phagoindication method for *Pseudomonas syringae* bacteria in sanitary control objects / N. A. Feoktistova, A. K. Bekkalieva, D. A. Vasiliev, E. V. Suldina // Vestnik of Ulyanovsk state agricultural academy. - 2020. - № 3 (51). - P. 148-157.
10. Selection of parameters for setting the phage titer increase reaction for anthrax bacteriophage / N. A. Feoktistova, D. A. Vasiliev, S. N. Zolotukhin [et al.] // Bacteriophages: theoretical and practical aspects of application in medicine, veterinary medicine and food industry : third research to practice conference with international participation. - Moscow, 2016. - P. 87.
11. Development of parameters for obtaining the maximum titer of bacteriophage PA04 *Pseudomonas aeruginosa* in cell culture on a dense medium / A. G. Shestakov, A. I. Kaldyrkaev, N. I. Molofeeva, D. A. Vasiliev // Agrarian science and education at the current stage of development: experience, problems and ways to solve them : materials of the IX International research to practice conference dedicated to the 75th anniversary of the Ulyanovsk state agrarian University named after P. A. Stolypin. June 20-21, 2018. - Ulyanovsk: UISAU, 2018. - P. 2. - P. 166-171.
12. Vasiliev, D. A. New isolates of *Yersinia enterocolitica* bacteriophages / D. A. Vasiliev, E. V. Suldina, S. N. Zolotukhin // Infectious diseases in the modern world: evolution, current and future threats: materials of the X Annual All-Russian Congress on infectious diseases with international participation. - 2018. - P. 43.
13. Methods of private bacteriology / D. A. Vasiliev, A. A. Shcherbakov, L. V. Karpunina, S. N. Zolotukhin. - Ulyanovsk : Ulyanovsk SAA, 2004. - 233p.
14. General and sanitary microbiology with the technique of microbiological research: textbook / A. S. Labinskaya, L. P. Blinkova, A. S. Eshina [et al.]; edited by A. S. Labinskaya [et al.]. - 4th ed., ster. - Saint-Petersburg : Lan, 2020. - 588 p.
15. Determinant of Bergey's bacteria / edited by A. Martin-Carnahan, S. V. Jeseff. - URL : <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm01081>, free. - Title from the screen.
16. Bekkalieva, A. K. Study of some properties of isolated bacteriophages *Pseudomonas syringae* / A. K. Bekkalieva, N. A. Feoktistova, D. A. Vasiliev // Natural and technical sciences. - 2020. - № 3-2. - P. 11-13.
17. Zolotukhin, S. N. Creation and development of schemes for the application of diagnostic biopreparations based on isolated and studied enterobacteria bacteriophages: 03.00.07-Microbiology, 03.00.23-biotechnology: abstract of the dissertation for the degree of doctor of biological Sciences/ Zolotukhin Sergey Nikolaevich, Ulyanovsk SAA. - Ulyanovsk, 2007. - 32 p.
18. Vorotnikov, A. P. Development of selective medium for the *Y. ruckeri* bacterium / A. P. Vorotnikov, D. A. Vasiliev, B. I. Shmorgun // Vestnik of Ulyanovsk state agricultural academy. - 2020. - № 2 (50). - P. 138-142.
19. Isolation and study of the main biological properties of *Pseudomonas putida* bacteriophages / D. A. Vasiliev, N. A. Feoktistova, A.V. Aleshkin [et al.] // Natural and technical sciences. - 2018. - №11 (125). - P. 58-63.
20. Lomakin, A. A. Development of the identification system of *V. avium* and *V. trematum* based on real-time PCR / A. A. Lomakin, A.V. Mastilenko, D. A. Vasiliev // Biology-science of the XXI century: collection of abstracts of the 24th international Pushcho school-conference of young scientists. - 2020. - P. 356-357.