

УДК 579(24)

ИЗУЧЕНИЕ БИОХИМИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ ВИДА *AEROMONAS HYDROPHILA*

Никитина П.А., ученица 9 класса Областного государственного бюджетного общеобразовательного учреждения «Гимназия №1 имени В.И.Ленина», polinaok81@gmail.com
Научные руководители: Ломакин А.А., аспирант 2-го года; Минаева А.Н., аспирант 1-го года
ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ

Ключевые слова: *Aeromonas, Aeromonas hydrophila*, биохимические свойства.

Статья посвящена изучению биохимических бактерий рода *Aeromonas, A. hydrophila*. В результате проведенного исследования нами были изучены основные биологические свойства бактерий штамма *A. hydrophila* А1. Бактерии продуцируют ферменты оксидазу и каталазу, расщепляет цитрат, лактат и рад сахаров. Полученные результаты лягут в основу разработке схемы выделения, индикации и идентификации бактерий вида *A. hydrophila*.

Введение. Бактерии *Aeromonas hydrophila* являются гетеротрофными, грамотрицательными палочками. *Aeromonas hydrophila* – самый известный из шести видов, принадлежащих к роду *Aeromonas*. Обычно клетки имеют размеры от 0,3 до 1,0 мкм в диаметре и от 1,0 до 3,5 мкм в длину. Микроорганизм не образует эндоспор и может расти при температуре до 4 ° С. Эта бактерия передвигается по полярным жгутиками. *A. hydrophila* является основным патогеном как для рыб и земноводных, но так же может вызывать заболевания у человека. Одно из заболеваний, которое он может вызвать у людей, гастроэнтерит, чаще всего встречается у маленьких детей и людей с ослабленной иммунной системой или проблемами роста. Эта бактерия может быть найдена в пресной, соленой, устьевой, морской, хлорированной и нехлорированной воде во всем мире, причем наибольшее количество наблюдается в более теплом климате [1,2,4].

Виды *Aeromonas* известны своей высокой однородностью [6-9], что затрудняет идентификацию этих видов только по внешне проявляемым признакам – свойствам (фенотипам). Например, несмотря

на то, что бактерии *A. hydrophila* обладают типичными характеристиками микроорганизмов рода *Aeromonas*, такими как: подвижность, грамотрицательность, способность восстанавливать нитраты до нитритов, их часто ошибочно принимают за *A. dhakensis*. Кроме того, маркерные гены, такие как гены 16S рРНК, *groD* и *gyrB*, ненадежны для различения близкородственных видов *Aeromonas* или для идентификации *Aeromonas* на уровне вида из-за их низкой различаемости (гетерогенности) [1,2,5,6].

Целью данного исследования является изучение биохимических особенностей бактерий *A. hydrophila*.

Материалы и методы. В работе нам был использован полевой штамм бактерий *Aeromonas hydrophilia* A1 полученный из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы ФГБОУ ВО «Ульяновская ГАУ».

Материалы: бульон с лизином (HIMEDIA, Индия), бульон с аргинином (HIMEDIA, Индия), бульон с орнитином (HIMEDIA, Индия), среда Симманса (ФБУН «ГНЦ ПМБ», Оболенск), среда для выявления ДНКазы (Condalab, Испания), среды Гисса (НПО «Питательные среды», г. Махачкала), уреазный агар Кристенсена (HIMEDIA, Индия), Питательная Среда №15 ГРМ (ФБУН ГНЦПМиБ, Россия, г. Оболенск), натрий хлорид (ДИАМ, Россия), лактат (JINDAN, Китай), сульфат магния (ЛенРеактив, г. Санкт-Петербург), гидрофосфат натрия (AppliChem, Испания), хлорид аммония (ЛенРеактив, г. Санкт-Петербург), 6% перекись водорода (ООО «Химмед», г. СанктПетербург), тетраметил-р-фенилендиаминдигидрохлорид (AppliChem, Испания).

Оборудование: микроскоп ZEISS Primo Star, Германия; тринокуляр с видеосистемой; термостат ТС-80М-2; автоклав ГК-100-3; шкаф сушильностерилизационный ШСС-80п УХЛ 424; установка бактерицидная УГД-2; лабораторная посуда общего назначения, мерная лабораторная посуда.

Методы: Исследования проводили по рекомендациям «Методы исследований объектов окружающей среды и патологического материала на аэромонады», разработанные Московским научно-исследовательским институтом гигиены им. Ф.Ф. Эрисмана в 1980 году. Морфологические, культуральные, биохимические свойства определяли по методам рекомендованным А.С. Лабинской (1974). Подвижность бактерий исследовали двумя методом посева «уколом» в полужидкий агар (Лабинская, 1974). Для определения чувствительности

Aeromonas hydrophila к химиотерапевтическим средствам использовали метод диффузии в агар с применением стандартных дисков, содержащих антибиотики (Паркер, 1988).

Результаты собственных исследований. Нами была изучена способность продуцировать бактериями штамма *Aeromonas hydrophila* A1 ферменты оксидаза и каталаза.

В результате исследований на наличия *A. hydrophilia* фермента цитохромоксидазы, путем нанесения на колонии каплю 1% раствора тетраметил-р-фенилендиаминдигидрохлорида, наблюдали появление розового окрашивания. Данный факт указывает на присутствие фермента цитохромоксидазы у изучаемой бактерии.

Путем нанесения на выросшие колонии *A. hydrophila* 25 мкл 6% перекиси водорода, было выявлено, что исследуемый штамм проявляет каталазную активность, о чем свидетельствует активное газообразование и вспенивание после контакта перекиси водорода 6% с колониями бактерий.

Бактериальные культуры штамма *A. hydrophila* через 72 ч инкубирования при 30°C на среде ДНКазы агар формировали крупные, прозрачные, круглые, с ровными краями, выпуклые, глянцевые колонии. При добавлении 1 N раствора HCl, наблюдалось появление прозрачных зон вокруг колоний. Из полученных результатов можно сделать вывод о том, что у исследуемого штамма микроорганизма присутствует дезоксирибонуклеазная активность.

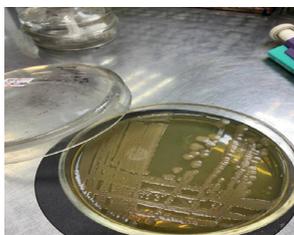


Рисунок 1 –Изучение ДНКазной активности бактерий *A. hydrophila* A1 на среде для определения ДНКазы через 48 часов культивирования при 30°C

Так же было установлено, что бактерии *A. hydrophila* A1 продуцируют такие ферменты такие как индол. Для выявления индола в среду

№15 после 30°C через 72 часа был добавлен реактив Эрлиха, через 2 минуты было обнаружено изменение цвета среды на розовой, что свидетельствует о способности бактериями продуцировать индол.

Для выявления способности нашего штамма бактерий к редукции нитрата был произведен посев на нитратный бульон, через 72 часа культивирования при 30°C в пробирке были добавлены сульфаниловая кислота, альфа-Нафтиламиновый реактив и цинковую пыль. Через 2 минуты было выявлено изменение цвета среды на розовый, что указывает на редукцию нитрата.

При культивировании штамма *A. hydrophila* A1 на агаре Симмонса при температуре культивирования 30°C в течении 24 ч роста не наблюдается, через 48 ч культивирования – отмечается рост по скосу в виде штриха снизу-вверх, происходят изменения цвета среды, через 72 часа культивирования – отмечается более выраженный рост бактерий по поверхности скоса вверх, происходит изменения цвета среды на синий. При культивировании штамма *Aeromonas hydrophila* A1 на агаре Симмонса при температуре культивирования 30°C в течении 24 ч роста не наблюдается, через 48 ч культивирования – отмечается рост по скосу в виде штриха снизу-вверх, происходят изменения цвета среды, через 72 часа культивирования – отмечается более выраженный рост бактерий по поверхности скоса вверх, происходит изменения цвета среды на синий, что свидетельствует о расщеплении цитрата.

Нами было установлено, что бактерии *Aeromonas hydrophila* A1 способны утилизировать лактат натрия в качестве единственного источника углерода в среде.

Исследуемый штамм *A. hydrophila* A1 хорошо растет на уреазном агаре Кристенсена при культивировании при температуре 30°C в течение 72 часов. Изменения цвета среды не произошло в течение 72 ч наблюдений, что позволяет сделать вывод о том, что штамм не разлагает мочевины, то есть не продуцирует уреазу (изменение цвета среды под колониями обусловлено защелачивание среды из-за утилизации пептонов среды).

При культивировании штамма *A. hydrophila* A1 в пробирках со средами Гисса при температуре культивирования 30°C в течении 24 ч помутнения среды и изменения цвета не наблюдается. Через 48 ч культивирования в пробирках с глюкозой наблюдается слабое помутнение среды и изменение цвета на желтый, в пробирке с сорбитом – выявляется окислительный процесс в верхних слоях. Также выявля-

ется рост и изменение цвета в пробирках с глюкозой, лактозой, сорбитом, фруктозой, маннитом, мальтозой и сахарозой. В пробирке с раффинозой изменений не наблюдается.

При культивировании штамма *Aeromonas hydrophila* в пробирке со средой бульон для определения лизиндекарбоксилазы, орнитиндекарбоксилазы, аргининдекарбоксилазы при температуре культивирования 30°C в течении 72ч наблюдается помутнение среды. Изменение цвета среды изменение цвета наблюдается в на среде с лизином и аргинином, что свидетельствует о способности бактерий расщеплять лизин и аргинином.

В результате проведенного исследования нами были изучены основные биологические свойства бактерий штамма *A. hydrophila* A1. Бактерии продуцируют ферменты оксидазу и каталазу, расщепляет цитрат, лактат и ряд сахаров (глюкоза, лактоза, сорбит, фруктоза, маннит, мальтоза и сахараза).

Полученные результаты лягут в основу разработке схемы выделения, индикации и идентификации бактерий вида *A. hydrophila*.

Библиографический список:

1. Awan, F. et al. The fight for invincibility: environmental stress response mechanisms and *Aeromonas hydrophila* // *Microbial pathogenesis*. – 2018. – Т. 116. – С. 135-145.
2. Ghatak, S. et al. Pan-genome analysis of *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas veronii* and *Aeromonas caviae* indicates phylogenomic diversity and greater pathogenic potential for *Aeromonas hydrophila* // *Antonie Van Leeuwenhoek*. – 2016. – Т. 109. – №. 7. – С. 945-956.
3. Rasmussen-Ivey, C. R. et al. Virulence factors of *Aeromonas hydrophila*: in the wake of reclassification // *Frontiers in Microbiology*. – 2016. – Т. 7. – С. 1337.
4. Stratev, D., Odeyemi, O. A. Antimicrobial resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from different food sources: A mini-review // *Journal of infection and public health*. – 2016. – Т. 9. – №. 5. – С. 535-544.
5. Zhong, C. et al. Comprehensive analysis reveals the evolution and pathogenicity of *Aeromonas*, viewed from both single isolated species and microbial communities // *Msystems*. – 2019. – Т. 4. – №. 5.
6. Zhu, W., Zhou, S., Chu, W. Comparative proteomic analysis of sensitive and multi-drug resistant *Aeromonas hydrophila* isolated from diseased fish // *Microbial pathogenesis*. – 2020. – Т. 139. – С. 103930.
7. Маланина, В.С. Ареал распространения культуры *Aeromonas hydrophila* /

- В.С. Маланина, К.В. Мартынова, Н.А. Феоктистова, Е.В. Сульдина, А.В. Мастиленко, Д.А. Васильев// Приоритетные векторы развития промышленности и сельского хозяйства: материалы международной научно-практической конференции. – 2018. – С. 115-118.
8. Васильев, Д.А. Конструирование экспериментального биопрепарата на основе бактериофага ARS25-УГСХА для проведения биопроцессинга/ Д.А. Васильев, А.В. Алёшкин, Н.А. Феоктистова, Е.В. Сульдина [и др.] // Естественные и технические науки. – 2018. – № 2 (116). – С. 33-37.
 9. Васильев, Д.А. Разработка фагового биопрепарата *Aeromonas hydrophila* для деконтаминации рыбного, мясного сырья и готовых продуктов питания из них/ Д.А. Васильев, А.В. Алёшкин, С.Н. Золотухин, Н.А. Феоктистова, К.В. Мартынова, И.Р. Насибуллин, П.С. Майоров, Е.В. Сульдина, А.В. Мастиленко, А.Г. Шестаков, И.Г. Швиденко, И.Л. Обухов// Естественные и технические науки. – 2018. – № 1 (115). – С. 21-26.
 10. Васильев, Д.А. Выделение культуры *Aeromonas hydrophila* из объектов окружающей среды/ Д.А. Васильев, В.С. Маланина, К.В. Мартынова, Н.А. Феоктистова, Е.В. Сульдина, А.В. Мастиленко// 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. – 2018. – С. 78-81.

STUDY OF THE BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF THE SPECIES *AEROMONAS HYDROPHILA*

Nikitina P.A.

Key words: *Aeromonas*, *Aeromonas hydrophila*, biochemical properties.

The article is devoted to the study of biochemical bacteria of the genus Aeromonas, A. hydrophila. As a result of our research, we have studied the main biological properties of bacteria of the A. hydrophila A1 strain. The bacteria produce enzymes oxidase and catalase, break down citrate, lactate and rad of sugars. The results obtained will form the basis for the development of a scheme for the isolation, indication and identification of bacteria of the A. hydrophila species.