

БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БАКТЕРИЙ ВИДА *ORNITHOBACTERIUM RHINOTRACHEALE* – ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ОРНИТОБАКТЕРИОЗА ПТИЦ

Васильев Дмитрий Аркадьевич, доктор биологических наук, профессор*
Феоктистова Наталья Александровна, кандидат биологических наук, доцент*
Батраков Владимир Васильевич, кандидат биологических наук, доцент**
Меркулов Анатолий Викторович, кандидат биологических наук, доцент*
Курьянова Надежда Хусаиновна, аспирант*
Постнов Александр Сергеевич, студент*
*ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина»
** ФГБОУ ВПО «Ульяновский ГПУ им. И.Н. Ульянова»
432017, г. Ульяновск, бульвар Новый Венец, 1, feokna@yandex.ru

Ключевые слова: свойства, *Ornithobacterium rhinotracheale*, тинкториальные, культуральные, биохимические, питательные среды.

В статье описаны результаты исследований по изучению тинкториальных, культуральных и биохимических свойств бактерий вида *Ornithobacterium rhinotracheale* – возбудителей орнитобактериоза птиц. Подобраны плотные и жидкие питательные среды для культивирования вышеназванных микроорганизмов для наработки бактериальной массы.

Бактерии вида *Ornithobacterium rhinotracheale* сравнительно недавно признали в качестве патогенного возбудителя заболевания респираторных путей у значительного числа цыплят и индеек [4].

Первоначально возбудитель орнитобактериоза был описан как *Pasteurella*-подобный или *Kingella*-подобный [8] микроорганизм или полиморфная грамм-отрицательная палочка (PGNR) [5]. В 1994 году было предложено назвать возбудителя *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT), gen. nov., sp. nov [4]. По данным от 3 мая 1999 года, (Anonymous) род *Ornithobacterium* [6] относят к семейству *Flavobacteriaceae*. посредством генетического метода классифицируют и определяют как *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT), gen. nov., sp. nov в rRNA суперсемействе V [7], находящимся в таксономической близости родов *Cytophaga*, *Riemerella*, *Flavobacterium*, *Weekseela*, *Sporocytophaga*, *Capnocytophaga* [6].

Особенности, характеризующие болезнь, вызываемую орнитобактериями, включают относительно слабые респираторные симптомы у молодых птиц, которые начинаются с чихания и исчезают через 1-2 недели. У погибшей птицы наиболее часто регистрируют аэросаккулиты, одно- или

двухсторонние пневмонии, пенистые скопления жидкости в грудной полости, анемию, перикардиты и перитониты [4].

Заболевание, вызываемое орнитобактериями, может принести значительный экономический ущерб за счет увеличения процента смертности, снижения яйценоскости, снижения вывода птенцов, повышения процента выбраковки и низкого показателя прироста. Для изучения возможности создания инактивированной вакцины против орнитобактериоза птиц необходимо было изучить биологические свойства этого, малоизученного в нашей стране, инфекционного агента [8].

Цель и задачи исследования

Цель: изучить основные биологические свойства бактерий *Ornithobacterium rhinotracheale* на штаммах К 282 и К 33, полученных из музея НИИЦМиБ ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА имени П.А. Столыпина».

Для достижения поставленной цели необходимо изучить тинкториальные, культуральные и биохимические свойства *Ornithobacterium rhinotracheale*; подобрать плотные и жидкие питательные среды для культивирования вышеназванных микроорганизмов для получения бактериальной массы.

Материалы и методы

Для бактериологического исследования использовали питательные среды: мясо-пептонный бульон (МПБ) (НПО «Питательные среды», г.Махачкала), мясо-пептонный агар (МПА) (НПО «Питательные среды», г.Махачкала), среды: Симмонса (НИИ питательных сред, г.Махачкала), Эндо (ГНЦ прикладной микробиологии, г.Оболensk), Клигера (НИИ питательных сред, г.Махачкала), Blood agar base (bioMerieux, Франция), Tryptase soy broth (bioMerieux, Франция), PPL0 agar (Difco, USA), Brain Heart infusion (Difco, USA), Purple Broth base (Difco, USA), Tryptose Blood agar base (Difco, USA), Bacto-Peptone (Difco, USA), DNase Test Agar, w/Toluidine Blue (HiMedia, Индия), Гисса с индикатором Андраде (глюкоза, лактоза, сахароза, манит, арабиноза, дульцит, ксилоза, адонит, инозит, салицин) (НПО «Питательные среды», г.Махачкала), наборы для ускоренного микрообъемного определения уреазы, орнитиндекарбоксилазы, аргининдегидролазы, продукции сероводорода, лизиндекарбоксилазы, ферментации углеводов и спиртов бактериями (сахароза, манноза, арабиноза, глюкоза, лактоза, манит, сорбит, адонит), нитратредуктазы бактерий нетоксичными реактивами, ферментации ацетата натрия, ферментации цитрата натрия (ФГУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, г.Санкт-Петербург), реактив Ковача на индол (ФГУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, г.Санкт-Петербург), реактив на триптофандезаминазу и фенилаланиндезаминазу (ФГУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, г.Санкт-Петербург).

В работе использовали следующее лабораторное оборудование: электронный микроскоп HV-12A (фирмы Hitachi), весы аналитические, II класс; стандарт мутности ГИСК им. Л.А.Тарасевича 10 ед.; ламинарный шкаф фирмы «Bellco Glass, Inc»; термостаты ТС-80М-2; микроскопы МБИ-3; холодильники бытовые, колбы мерные, пипетки пастеровские, пипетки мерные на 1,0; 2,0; 5,0; 10,0 см³, флаконы емкостью 50, 100 см³, стекла предметные, чашки Петри, пробирки, универсальные индикаторные бумаги

pH 0-12 (Lachema, Чехия), холодильник бытовой, сушильный шкаф, машина для изготовления ватных пробок.

Изучение биологических свойств бактерий вида *Ornithobacterium rhinotracheale* проводили по классическим методикам [1, 2, 3].

Результаты исследований

Тинкториальные свойства бактерий *Ornithobacterium rhinotracheale* определяли методом микроскопии под иммерсионной системой мазка суточной культуры, окрашенной по Граму. Увеличение светового микроскопа составляло $\times 100 \times 15$.

Препараты для электронной микроскопии готовили методом негативного контрастирования 1,5% фосфорно-вольфрамовой кислотой (ФВК). Просматривали препараты на электронном микроскопе HV-12A (фирмы Hitachi) при ускоряющем напряжении 75 кВ и увеличении 35×10^3 . Фиксировали культуру 2%-ным раствором OsO₄.

При исследовании морфологических свойств бактерий *Ornithobacterium rhinotracheale* нами было установлено, что это небольшие грамм-отрицательные палочки с округлыми концами. Споры и капсулы не образуют. Результаты электронной микроскопии, представленные на рисунке 1, дают характерную информацию о данном микроорганизме.

Для изучения культуральных свойств использовали тесты, которые наиболее полно характеризуют ферментативные свойства бактерий вида *Ornithobacterium rhinotracheale* согласно литературным данным [4].

Изученные штаммы орнитобактерий проявили следующие ферментативные свойства: положительная реакция на цитохромоксидазу; индол и сероводород не образуют; цитрат не утилизировали. При ферментации углеводов положительная реакция на лактозу, глюкозу, сахарозу, мальтозу, маннит, маннозу. Результаты исследований представлены в таблице 1.

Длительность исследований по изучению культуральных свойств бактерий *Ornithobacterium rhinotracheale* подтолкнула нас к использованию тест-систем для ускорен-

ного типирования микроорганизмов, произведенные ФГУН НИИЭМ им. Пастера. Нами были получены результаты, отраженные в таблице 2.

Использование тест-систем позволило расширить спектр изученных культуральных свойств референс-штаммов бактерий *Ornithobacterium rhinotracheale* по еще 7 показателям. В результате исследований нами изучены 22 биохимических свойства вышеназванных бактерий.

Определение гемолитической активности проводили на триптозо-соевом агаре (Difco) с добавлением 10% овечьей и человеческой дефибрированной крови. Для этого культуру предварительно культивировали в течение 48 часов при 37 °С на бульоне Хоттингера. При изучении гемолитической активности бактерий *Ornithobacterium rhinotracheale* было установлено, что независимо от вида донора, чья кровь была использована, зона разрушения эритроцитов не была обнаружена.

Следующей целью исследований было проведение сравнительного анализа ростовых характеристик орнитобактерий на различных средах, предлагаемых для оптимального культивирования чистой культуры, что обусловлено получением больших объемов бактериальной массы для цели наших исследований.

Из плотных питательных сред активный рост бактерий вида *Ornithobacterium rhinotracheale* был на кровяном агаре, содержащем 5-10% дефибрированной овечьей крови. Экспериментально установлено, что его основу могут составлять **Blood agar base (bioMerieux, Франция)**, **Purple Broth base (Difco, USA)**, **Tryptose Blood agar base (Difco, USA)**. Рекомендуется инкубировать на агаре в чашках Петри при 37°С в течение

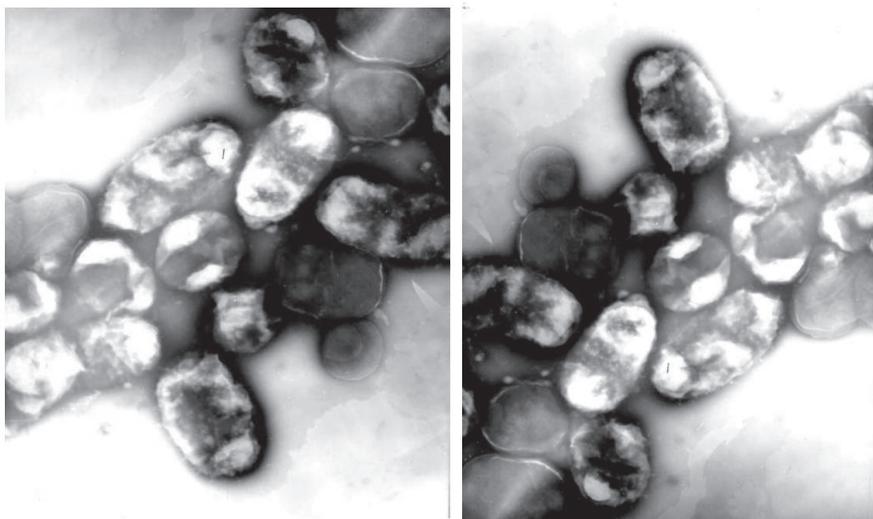


Рис. 1. - Электронная микроскопия *O. rhinotracheale* K 282 увеличение 35×10³

48-72 часов в анаэробных или микроаэробных условиях (5-10% CO₂). Слабый рост либо его отсутствие возникает при 24°С. Установлено, что вышеназванные микроорганизмы растут на триптозо-соевом агаре фирм: (bio Merieux, Франция), Tryptose agar base (Difco, USA), на PPLO agar (Difco, USA). Из жидких питательных сред оптимум роста

Таблица 1
Показатели исследований на биохимические свойства бактерий вида *Ornithobacterium rhinotracheale*

тесты	<i>Ornithobacterium rhinotracheale</i> K 282	<i>Ornithobacterium rhinotracheale</i> K33
каталаза	-	-
оксидаза	+	+
индол	-	-
сероводород	-	-
метиловый красный	-	-
утилизация цитрата	-	-
ДНКаза	-	-
О/Ф	+	+
лактоза	+	+
сахароза	+	+
глюкоза	+	+
мальтоза	+	+
гемолиз	-	-
манноза	+	+
маннит	+	+

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

Таблица 2

Показатели ферментативной активности бактерий вида *Ornithobacterium rhinotracheale* по тест - системе ускоренной типизации ФГУН НИИЭМ им. Пастера

тесты	<i>Ornithobacterium rhinotracheale</i> K 282	<i>Ornithobacterium rhinotracheale</i> K33
сероводород	-	-
орнитиндекарбоксилаза	+	+
лизиндегидролаза	-	-
аргининдегидролаза	-	-
уреаза	-	-
индол	-	-
арабиноза	-	-
манноза	+	+
сахароза	+	+
глюкоза	+	+
маннит	+	+
адонит	-	-
сорбит	-	-
лактоза	+	+

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

предоставляют бульон Хоттингера, сердечно-мозговой экстракт и пептонная вода.

Ornithobacterium rhinotracheale

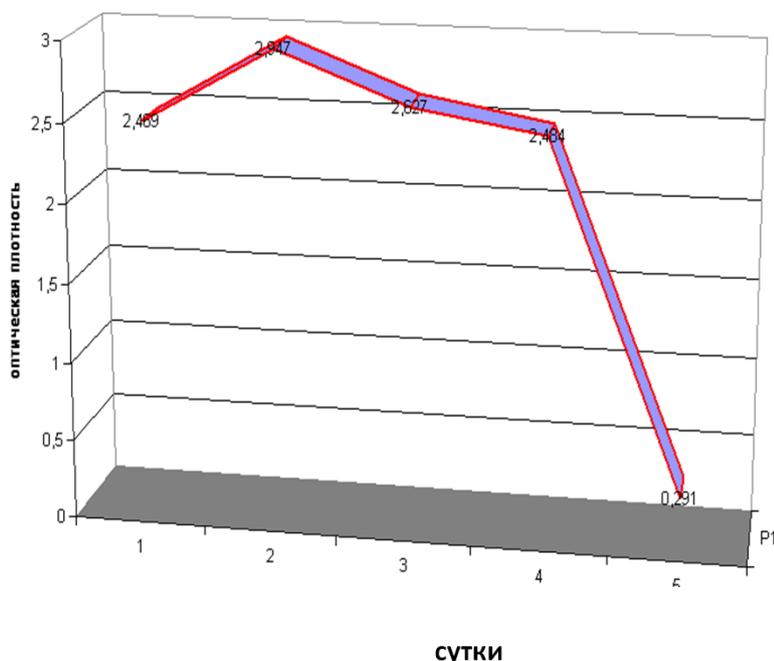


Рис. 2. - Характеристика роста на обогащенной питательной среде (PLO агаре) бактерий вида *Ornithobacterium rhinotracheale*

В наших экспериментах по определению оптимальной среды культивирования установлено, что бактерии вида *Ornithobacterium rhinotracheale* не растут на агаре МакКонки, Дригальского, Эндо, Симмонса.

Оптимальное время культивирования бактерий вида *Ornithobacterium rhinotracheale* на выбранных нами питательных средах – 48 часов. На рисунке 2 отражены ростовые характеристики бактерий вида *Ornithobacterium rhinotracheale* на PLO агаре. Экспериментальным путем было установлено, что ростовые характеристики бактерий вида *Ornithobacterium rhinotracheale* на кровяном агаре, содержащем 5-10% дефибринированной овечьей крови, триптозо-соевом агаре и PLO агаре, примерно аналогичны.

В результате проведенных исследований были изучены тинкториальные, культуральные и биохимические свойства бактерий вида *Ornithobacterium rhinotracheale*, экспериментальным путем подобраны плотные и жидкие питательные среды для культивирования вышеназванных микроорганизмов для наработки бактериальной массы.

Библиографический список

1. Васильев, Д.А. Методы общей бактериологии / Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин, Н.М. Никишина – Ульяновск: Копиринг, 1998. – С.89-100.
2. Лабинская, А.С. Общая и санитарная микробиология с техникой микробиологических исследований / А.С. Лабинская, Л.П. Блинкова, А.С. Ещина – М.; Медицина, 2004. – С. 34-37.
3. Кисленко, В.Н. Ветеринарная микробиология и иммунология Часть 1. Общая микробиология./ Кисленко В.Н., Кольчев Н.М.– М.: КолосС, 2006. – С.37-38.
4. De Rosa, M. *Ornithobacterium rhinotracheale* infection in turkey breeders / M. De Rosa, R.

Droual, R.P. Chin, H.P. Shivaprasad, R.L. Walker // Avian Dis., 1996, 40:865-874.

5. Hafez, H.M. Investigation on different *Ornithobacterium rhinotracheale* «ORT» isolates / H.M. Hafez, R.R. Sting. // Avian Dis., 1999, 43:1-7.

6. Van Beek, P.P. Ademhaligs problemen, groeivertraging en gewrichtsontsteking bij kalkoenen en Vleeskuikens door een Pasteurella-achtige bacterie *Ornithobacterium rhinotracheale* "Taxon 28" / P.P. van Beek, P.H.

van Empel, H.F. van den Bosch, P.P. Storm, J.E. Bongers, J.W. du Preez // Tijdschr.Diergeneesk., 1994, 119:99-101.

7. Van Empel, P.H. *Ornithobacterium rhinotracheale*: a review / P.H. van Empel., H.M. Hafez // Avian pathology, 1999, 28:217-227.

8. Van Empel, P.H. Identification and serotyping of *Ornithobacterium rhinotracheale* / P.H. van Empel P.H., T.U. van Den Bosch, P.R. Loeffen, P.P. Storm // J. CLIN. MICROBIOL. 1997, 35:418-421.

УДК 602.3:579.8

РАЗРАБОТКА ПАРАМЕТРОВ ПОСТАНОВКИ РЕАКЦИИ НАРАСТАНИЯ ТИТРА ФАГА ДЛЯ ИНДИКАЦИИ БАКТЕРИЙ *VACILLUS MESENERICUS* В ОБЪЕКТАХ САНИТАРНОГО НАДЗОРА

Васильев Дмитрий Аркадьевич, доктор биологических наук, профессор*

Золотухин Сергей Николаевич, доктор биологических наук, профессор*

Алешкин Андрей Владимирович, доктор биологических наук **

Феоктистова Наталья Александровна, кандидат биологических наук, доцент*

Мерчина Светлана Васильевна, кандидат биологических наук, доцент*

Батраков Владимир Васильевич, кандидат биологических наук, доцент***

Юдина Мария Александровна, аспирант*

Макеев Владимир Александрович, аспирант*

Романова Надежда Александровна, аспирант*

*ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина»

**ФБУН «Московский НИИЭиМ им. Г.Н. Габричевского»

***ФГБОУ ВПО «Ульяновский ГПУ им. И.Н. Ульянова»

432017, г Ульяновск, бульвар Новый Венец, 1 feokna@yandex.ru

Ключевые слова: *Vacillus mesentericus*, фаги, реакция нарастания титра фага, параметры, объекты санитарного надзора.

В статье описаны результаты исследований по разработке схемы ускоренной индикации бактерий *Vacillus mesentericus* в пищевом сырье и продуктах питания при помощи реакции нарастания титра фага. Время исследования составляет 25 часов. Определяемая при постановке реакции нарастания титра фага концентрация микроорганизмов - 10^2 м.к. бактерий *V. mesentericus* бб в 1 мл водопроводной воды и 10^3 м.к. бактерий *V. mesentericus* бб – в 1 г муки пшеничной, перца черного молотого и мяса.

Бактерии *Vacillus mesentericus*, так же как и *Vacillus subtilis* являются возбудителями болезней печеного хлеба и макарон. Разрушение структуры хлеба и разложение содержащихся в нем веществ, связано с продуцированием этими видами бактерий активных протеолитических и амилаолити-

ческих ферментов. При контаминации пищевых продуктов *Vacillus mesentericus* происходит ферментативный распад белковых и липидных компонентов с образованием опасных для здоровья соединений. Поэтому использование в пищевой и консервной промышленности некоторых добавок, на-