

ОСНОВНЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БАКТЕРИЙ ВИДА AEROMONAS VERONII

THE MAIN BIOLOGICAL PROPERTIES OF BACTERIA OF THE SPECIES AEROMONAS VERONII

A. Minaeva
A. Lomakin
D. Vasiliev
A. Shestacov

Summary. The article is devoted to the study of the main biological properties of bacteria *Aeromonas veronii*. The results of the study of the peculiarities of their morphological, cultural and enzymatic properties are presented. According to the research results, we found that *A. veronii* bacteria are gram-negative, mobile, straight rods, showing the ability to grow both on ordinary and on differential diagnostic media. It was revealed that the studied culture of *A. veronii* bacteria exhibits saccharolytic, proteolytic, lecithinase, gelatinase and deoxyribonuclease activities, in addition, it utilizes a number of amino acids, and has a positive reaction to catalase and oxidase. The results obtained by us will be used in the future to create a scheme for the isolation and bacteriological typing of this microorganism.

Keywords: *g. Aeromonas*, *A. veronii*, *A. veronii* biovar *sobria*, tinctorial properties, morphological properties, cultural properties, biochemical activity.

Минаева Ангелина Николаевна

Аспирант, ФГБОУ ВО Ульяновский государственный
аграрный университет имени П.А. Столыпина,
Ульяновск
lina.minaeva.11@mail.ru

Ломакин Артём Андреевич

Аспирант, ФГБОУ ВО Ульяновский государственный
аграрный университет имени П.А. Столыпина,
Ульяновск
artemy.lomakin@yandex.ru

Васильев Дмитрий Аркадьевич

Д.б.н., профессор, ФГБОУ ВО Ульяновский
государственный аграрный университет имени
П.А. Столыпина, Ульяновск
dav_ul@mail.ru

Шестаков Андрей Геннадьевич

К.б.н., доцент, ФГБОУ ВО Ульяновский
государственный аграрный университет имени
П.А. Столыпина, Ульяновск
andrewschestakov@yandex.ru

Аннотация. Статья посвящена изучению основных биологических свойств бактерий *Aeromonas veronii*. Представлены результаты исследования особенностей их морфологических, культуральных и ферментативных свойств. По результатам исследований нами было установлено, что бактерии *A. veronii* являются грамотрицательными, подвижными, прямыми стержнями, проявляющими способность к росту как на обычных, так и на дифференциально-диагностических средах. Было выявлено, что исследуемая культура бактерий *A. veronii* проявляет сахаролитическую, протеолитическую, лецитиназную, желатиназную и дезоксирибонуклеазную активности, кроме того, утилизирует ряд аминокислот, обладает положительной реакцией на каталазу и оксидазу. Полученные нами результаты в дальнейшем будут использованы в создании схемы выделения и бактериологического типирования указанного микроорганизма.

Ключевые слова: бактерия, р. *Aeromonas*, *A. veronii*, *A. veronii* biovar *sobria*, тинкториальные свойства, морфологические свойства, культуральные свойства, биохимическая активность.

Введение

Бактерии рода *Aeromonas* имеют широкое распространение в окружающей среде. Выделение отмечается из пресной воды, сточных вод, почвы, от гидробионтов, растений, теплокровных животных (Gonçalves, 2019). В связи с чем, на протяжении многих

лет их считали сапрофитами, но исследования последних лет позволяют отнести их к условно патогенным микроорганизмам, вызывающим, при определенных условиях, заболевания как у животных, так и у людей (Parker, 2011). Основными патогенными представителями рода *Aeromonas* являются бактерии видов *A. hydrophila*, *A. veronii*, *A. sobria* и *A. caviae* (Igbinosa,

2012). Указанные выше микроорганизмы представляют серьезную проблему для многих стран Европы и Азии, в которых аэромонадная инфекция является причиной от 1 до 10% острых кишечных заболеваний у взрослых и до 50% у детей.

Бактерия вида *A. veronii* включает в себя две биогруппы *sobria* и *veronii*. Являясь возбудителями инфекционных заболеваний у разных рыб, наносят огромный экономический урон отрасли аквакультуры (Zepeda-Velázquez, 2017). У человека ассоциируются с желудочно-кишечными заболеваниями и широким спектром системных заболеваний, включая сепсис, раневые инфекции, менингит, перитонит и заболевание гепатобилиарной системы (Hassan, 2017). Широкое распространение и высокая инвазивность этих микроорганизмов объясняется наличием разнообразных факторов вирулентности (поверхностные полисахариды, экзотоксины и внеклеточные ферменты) (Beaz-Hidalgo, 2013; Hoel, 2017).

На сегодняшний день в нашей стране биологические свойства *A. veronii* изучены недостаточно, и стандартизированная методология для ее типизации не разработана. Потому изучение биологических свойств *A. veronii* является актуальным.

Цель исследования

Изучение основных биологических свойств бактерий *A. veronii*, необходимых для разработки схем их выделения и идентификации.

Материалы и методы

Для опыта был использован из международной коллекции штамм *Aeromonas veronii-9071*, хранящийся в музее кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы ФГБОУ ВО «Ульяновская ГАУ».

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

Питательные среды и реактивы: биохимическая тест-система KB013R HiCarbo Набор для изучения ферментации углеводов, ГРМ-бульон (ФБУН «ГНЦ ПМБ», Оболенск), бульон с лизином (HIMEDIA, Индия), бульон с аргинином (HIMEDIA, Индия), бульон с орнитином (HIMEDIA, Индия), среда Симманса (ФБУН «ГНЦ ПМБ», Оболенск), ГРМ-агар (ФБУН «ГНЦ ПМБ», Оболенск),

агар МакКонки (Condalab, Испания), дифтерийный агар (TM MEDIA, Индия), среда для выявления ДНКазы (Condalab, Испания), среды Гисса (НПО «Питательные среды», г. Махачкала), *Pseudomonas Aeromonas Selective agar base* (GSP-agar) (Химэкс Лимитед, г. Санкт-Петербург), Лактозный ТТХ агар с Тергитолом 7 (ФБУН «ГНЦ ПМБ», Оболенск), 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), бромтимоловый синий (ЛенРеактив, г. Санкт-Петербург), 1% раствор Теллурита калия (Sigma-Aldrich, Франция), реактив Эрлиха (НИЦФ, Россия), 6% перекись водорода (ООО «Химмед», г. Санкт-Петербург), желатин (Нева реактив, г. Санкт-Петербург), кровь барана, яйцо.

Для проведения микроскопического исследования использовали набор для окраски по Граму («НИЦФ ООО» Санкт-Петербург). Активность цитохромоксидазы изучали с использованием 1% тетраметил-р-фенилендиаминдигидрохлорид (Aldrich-sigma), дезоксирибонуклеазную активность выявляли с помощью 1 N раствора HCl (Aldrich-sigma). Наличие капсулы определяли по методу Ольта, с использованием 2% раствора сафранина.

Методы

Морфологические, культуральные и биохимические свойства штамма *Aeromonas veronii-9071* изучали с использованием общепринятых микробиологических методов выделения и идентификации бактерий (Герхардт, 1984; Лабинская, 1978); инструкция по применению «Набора для ускоренного определения биохимических свойств».

Результаты исследований

Метод окраски по Граму позволил подтвердить, что микроорганизмы *Aeromonas veronii* являются грамотрицательными палочками, расположенными поодиночке или парами.

Культивирование исследуемого штамма на полужидком ГРМ-агаре при температуре 20°C и 30°C в течение 72 ч дает диффузный рост культуры в месте посева, что свидетельствует о подвижности *Aeromonas veronii*.

В результате проведенных исследований было установлено, что штамм *Aeromonas veronii* способен расти в температурном диапазоне 8–36°C. Культивирование при температуре 8°C характеризуется ростом колоний

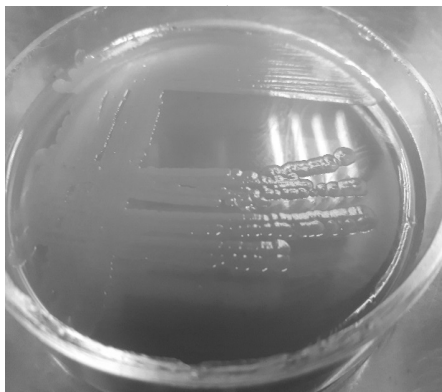


Рис. 1. Рост штамма *A. veronii* на агаре МакКонки в течение 72 ч культивирования при 300С

лишь на 4 сутки. Независимо от использования в экспериментах питательных сред оптимальной температурой для роста штамма *A. veronii-9071* являлось 30°C.

Для исследуемого штамма *A. veronii-9071* уже через 24 часа культивирования при температуре 26°C и 36°C на ГРМ-бульоне было характерно хорошо выраженное равномерное помутнение среды. Культивирование 48, 72 ч сильных изменений не дает. При 8°C обильный рост отмечается после 168 ч инкубирования.

Культивирование штамма *A. veronii-9071* на ГРМ-агаре при температуре культивирования 30°C через 72 ч характеризуется ростом мелких (диаметром 1,5 мм), молочных, выпуклых и глянцевых колоний с ровными краями.

На агаре МакКонки колонии *A. veronii-9071* вырастают через 24 часа в виде мелких диаметром меньше 1 мм серых с розовым оттенком, круглых с ровными краями, выпуклых и глянцевых колоний. Последующее культивирование через 48, 72 часа при температуре 30°C отличается незначительным увеличением размеров колоний до 2 мм (рис. 72 ч).

На среде Кильвейна (GSP агар) *A. veronii-9071* уже через 24 ч дает рост мелким, круглым $d < 1,0$ мм, белым, выпуклым, глянцевым, с ровным краем колониям. При дальнейшем культивировании (48 ч и 72 ч) отмечается изменение цвета колоний с белого на желтый и незначительное увеличение их размеров в диаметре до 1–1,5 мм.

При культивировании штамма *A. veronii-9071* на кровяном агаре, при температуре 30°C в течение 72 ч, был выявлен рост круглых, с ровными краями, серых, глянцевых, выпуклых, диаметром до 2 мм колоний. На 2 сутки культивирования агар под колониями приобрел зеленоватую окраску, что указывает на способность ис-

следуемого штамма проявлять неполный гемолиз (α -гемолиз).

В результате исследований на наличия *A. veronii* 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.

Было установлено, 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. veronii* через 72 ч инкубирования при 30°C на среде ДНКза 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.

Для выявления желатиназной активности, культуру *A. veronii* инкубировали в среде с 12% содержанием желатина. Было установлено, что исследуемый штамм способен разжижать желатин, т.е. у него присутствует фермент желатиназа.

При использовании тест-системы KB013R HiCarbo (Набор для изучения ферментации углеводов), было выявлено, что исследуемый штамм проявляет α -галактозидазную и каталазную активности, ферментируют аргинин, окисляют арабинозу, сахарозу, глюкозу, не проявляют нитратредуктазную активность, не способны продуцировать ацетоин, не утилизируют маннит, малонат, цитрат и трегалозу.

При культивировании штамма *A. veronii* на цитратном агаре Симмонса, предназначенном для определения утилизации цитрата натрия, при 36°C и 26°C появление роста и изменение цвета среды не наблюдалось на всем протяжении исследования (72 ч). Данный факт свидетельствует о том, что исследуемый штамм не использует цитрат в качестве источника углерода.

Изучение биохимической активности на средах Гисса с различными углеводами (мальтоза, фруктоза, сахароза, ксилоза, сорбит, арабиноза, манит, манноза, рамноза, раффиноза, глюкоза, галактоза, дульцит и инозит) позволило установить, что штамм *Aeromonas veronii* проявляет сахаролитическую активность в отношении глюкозы, сахарозы, маннита, маннозы, мальтозы, галактозы и арабинозы.

Инкубирование культуры с аминокислотами (лизин, аргинин и орнитин) при температуре 36°C и 26°C в течение 72 ч, показало, что штамм *Aeromonas veronii* не способен утилизировать орнитин (рост и изменение цвета среды не наблюдается), но декарбокселирует лизин и аргинин.

Способность исследуемого штамма *A. veronii-9071* образовывать индол, определяли при помощи культивирования исследуемого штамма на среде № 15 ГРМ в течение 48 ч при 36°C и 30°C. Добавление реактива Эрлиха после культивирования в пробирки с бактериями к появлению розового цвета не привело. Полученный результат свидетельствует о том, что штамм *Aeromonas veronii* не способен образовывать индол.

На уреазном агаре Кристенсена исследуемый штамм *A. veronii-9071* при культивировании при температуре 26°C и 36°C в течение 72 часов роста не дает. Изменения цвета среды тоже не происходит. Это позволяет сделать вывод о том, что штамм *Aeromonas veronii* не разлагает мочевины, то есть не продуцирует уреазу.

Обсуждение

Бактерии *Aeromonas veronii* представляют собой подвижные, грамотрицательные, палочковидные ми-

кроорганизмы. В настоящее время в отечественной литературе отсутствуют рекомендации для осуществления выделения и идентификации бактерий вида *A. veronii*. Изучение основных биологических свойств *A. veronii* может лечь за основу бактериологической схемы их типизации и идентификации.

Выводы

Таким образом, нами были изучены тинкториальные, морфологические, культуральные и биохимические свойства штамма *Aeromonas veronii*. Анализ полученных результатов показал, что они являются подвижными, грамотрицательными, неинкапсулированными палочками. Полученные данные согласуются с данными, представленными в "Руководство Берджи по систематике архей и бактерий" (Martin-Carnahan, 2015). Однако наличие капсулы при помощи используемого нами метода обнаружить не удалось, несмотря на то что зарубежными авторами отмечается способность у данного биовара образовывать капсулу (Tomás, 2012).

По результатам изучения особенностей культивирования исследуемого микроорганизма, было установлено, что *Aeromonas veronii* способны расти как на обычных питательных средах, так и на дифференциально-диагностических. При этом оптимальной температурой культивирования была 30°C.

По изучению биохимических свойств выявлено, что бактерии *A. veronii*, проявляют положительные реакции на каталазу и оксидазу. Так же было установлено, что культуры исследуемого микроорганизма обладают сахаролитической, дезоксирибонуклеазной, протеолитической, лецитиназной и желатиназной активностями, не утилизируют мочевины, цитраты, не восстанавливают нитраты, не образуют ацетоин и индол.

В рамках проводимой нами работы по изучению основных биологических свойств бактерий *A. veronii*, впервые в нашей стране подошли к вопросу создания схемы выделения и бактериологического тестирования указанного микроорганизма.

ЛИТЕРАТУРА

1. Abbott S.L. Case of *Aeromonas veronii* (DNA Group 10) bacteremia / S.L. Abbott, H. Serve, J.M. Janda // J. Clin. Microbiol. — 1994. — № 32. — P. 3091–3092.
2. Alcaide E. Mechanisms of quinolone resistance in *Aeromonas* species isolated from humans, water and eels / E. Alcaide, M.D. Blasco, C. Esteve // Research in Microbiology. — 2010. — № 161. — P. 40–45.
3. Beaz-Hidalgo R. *Aeromonas* spp. whole genomes and virulence factors implicated in fish disease / R. Beaz-Hidalgo, M.J. Figueras // J. Fish Dis. — 2013. — № 36. — P. 371–388.
4. Bhowmick U.D. Bacteriological, clinical and virulence aspects of *Aeromonas*-associated diseases in humans / U.D. Bhowmick, S. Bhattacharjee // Pol. J. Microbiol. — 2018. — № 67. — P. 137–149.

5. Multi-drug resistance mediated by class 1 integrons in *Aeromonas* isolated from farmed fresh water animals / Y. Deng, Y. Wu, L. Jiang, A. Tan, R. Zhang, L. Luo // *Frontiers in Microbiology*. — 2016. — № 7. — P. 935–942.
6. Graf J. Symbiosis of *Aeromonas veronii* biovar *sobria* and *Hirudo medicinalis*, theme dicing alleech: a novel model for digestive tract associations / J. Graf // *Infect. Immun.* — 1999. — № 67. — P. 1–7.
7. Phylogenetic characterization of bacteria in the gut of house flies (*Musca domestica* L.) / A.K. Gupta, D. Nayduch, P. Verma et al. // *FEMS Microbiol. Ecol.* — 2012. — № 79. — P. 581–593.
8. Molecular identification and epizootiology of *Aeromonas veronii* infection among farmed *Oreochromis niloticus* in Eastern Province, KSA, Egypt / M.A. Hassan, E.A. Noureldin, M.A. Mahmoud, N.A. Fita // *J Aquat Res.* — 2017. — № 43. — P. 161–167.
9. Hoel S. Species distribution and prevalence of putative virulence factors in Mesophilic *Aeromonas* spp. isolated from fresh retail sushi / S. Hoel, O. Vadstein, A.N. Jakobsen // *Front. Microbiol.* — 2017. — № 8. — P. 1–11.
10. *Aeromonas veronii*, a New Ornithine Decarboxylase-Positive Species / F.W. Hickman-Brenner, K.L. MacDonald, A.G. Steigerwalt, G.R. Fanning, D.J. Brenner, J.J. Farmer // *Journal of clinical microbiology*. — 1987. — № 5. — P. 900–906.
11. Emerging *Aeromonas* species infections and their significance in public health / I.H. Igbinosa, E.U. Igumbor, F. Aghdasi, M. Tom, A.I. Okoh // *Sci.World J.* — 2012. — P. 1–13.
12. Parker J.L. *Aeromonas* spp. clinical microbiology and disease / J.L. Parker, J.G. Shaw // *J. Infect.* — 2011. — № 62. — P. 109–118.
13. The genus *Aeromonas*: A general approach / Rafael Bastos Gonçalves Pessoa, Wesley Felix de Oliveira, Diego Santa Clara Marques, Maria Tereza dos Santos Correia, Elba Verônica Matoso Maciel de Carvalho, Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho // *Microbial Pathogenesis*. — 2019. — № 130. — P. 81–94.
14. Tomás J.M. The Main *Aeromonas* Pathogenic Factors / J.M. Tomás // *International Scholarly Research Network ISRN Microbiology*. — 2012. — 22 P.
15. Pathogenicity of Mexican isolates of *Aeromonas* sp. in immersion experimentally-infected rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792) / A.P. Zepeda-Velázquez, V. Vega-Sánchez, C. Ortega-Santana, M. Rubio-Godoy, D.M. de Oca-Mira, E. Soriano-Vargas // *Acta Trop.* — 2017. — № 169. — P. 122–124.

© Минаева Ангелина Николаевна (lina.minaeva.11@mail.ru), Ломакин Артём Андреевич (artemy.lomakin@yandex.ru),

Васильев Дмитрий Аркадьевич (dav_ul@mail.ru), Шестаков Андрей Геннадьевич (andrewschestakov@yandex.ru).

Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»



Ульяновский государственный аграрный университет им. П. А. Столыпина