

Бактерии рода *Aeromonas* – патогенные представители микробиоты промысловых рыб и водоемов: свойства и выявление методом ПЦР

ГНПО «Химический синтез и биотехнологии», Минск, Беларусь,
электронный адрес: pros@biotech.bas-net.by

Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь,
электронный адрес: helenayushko@gmail.com

Проскурнина И.А.¹, Юшко Е.Ю.²,
Сверчкова Н.В.¹, Коломиец Э.И.¹,
Новикова А.С.¹, Бруякин С.Д.¹



ВВЕДЕНИЕ

Бактерии рода *Aeromonas* – мезофильные грамотрицательные палочковидные бактерии, возбудители геморрагической септицемии и эритродерматита рыб. В условиях аквакультуры эти заболевания приобретают характер эпидемий, обусловленных скученным выращиванием рыбы и сниженным иммунным статусом животных, приводя к значительным экономическим ущербам. Многочисленные факторы вирулентности, такие как способность к продукции липаз, пептидаз и гемолизinov, подвижность, а также резистентность к некоторым антибиотикам и способность формировать биопленки, делают представителей рода *Aeromonas* потенциально опасными патогенами человека. Известно, что некоторые формы кишечных расстройств ассоциированы с присутствием в организме представителей этих бактерий, особенно у детей и у пациентов с нарушенным иммунным статусом.

В связи с вышеизложенным детекция бактерий рода *Aeromonas* в пищевой продукции и образцах воды представляется необходимым для обеспечения безопасности населения и деятельности рыбного хозяйства. В настоящее время для идентификации данных бактерий в основном используются ресурсоёмкие морфологические и биохимические методы. Альтернативным, быстрым и надежным методом идентификации бактерий рода *Aeromonas* является ПЦР со специфическими праймерами.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Культуральные свойства различались по степени выраженности между изолятами *A. veronii* АКВ, *A. veronii* НВ1 и клиническими штаммами *A. salmonicida* 16, *A. salmonicida* 56. У изолята *A. veronii* НВ1 отмечена более выраженная пептидазная активность, в то время как изолят *A. veronii* АКВ проявлял способность гидролизовать липиды на уровне штамма *A. salmonicida* 56. Также показано, что изолят *A. veronii* АКВ разрушает эритроциты по типу бета-гемолиза и проявляет гемолитическую активность на уровне клинических штаммов *A. salmonicida* 16 и *A. salmonicida* 56 с выраженными вирулентными свойствами. Вокруг колоний изолята *A. veronii* НВ1 определялась слабо выраженная зона гемолиза, что может свидетельствовать о гамма-гемолитической активности штамма (рисунок 1). . Все изучаемые изоляты способны к движению.

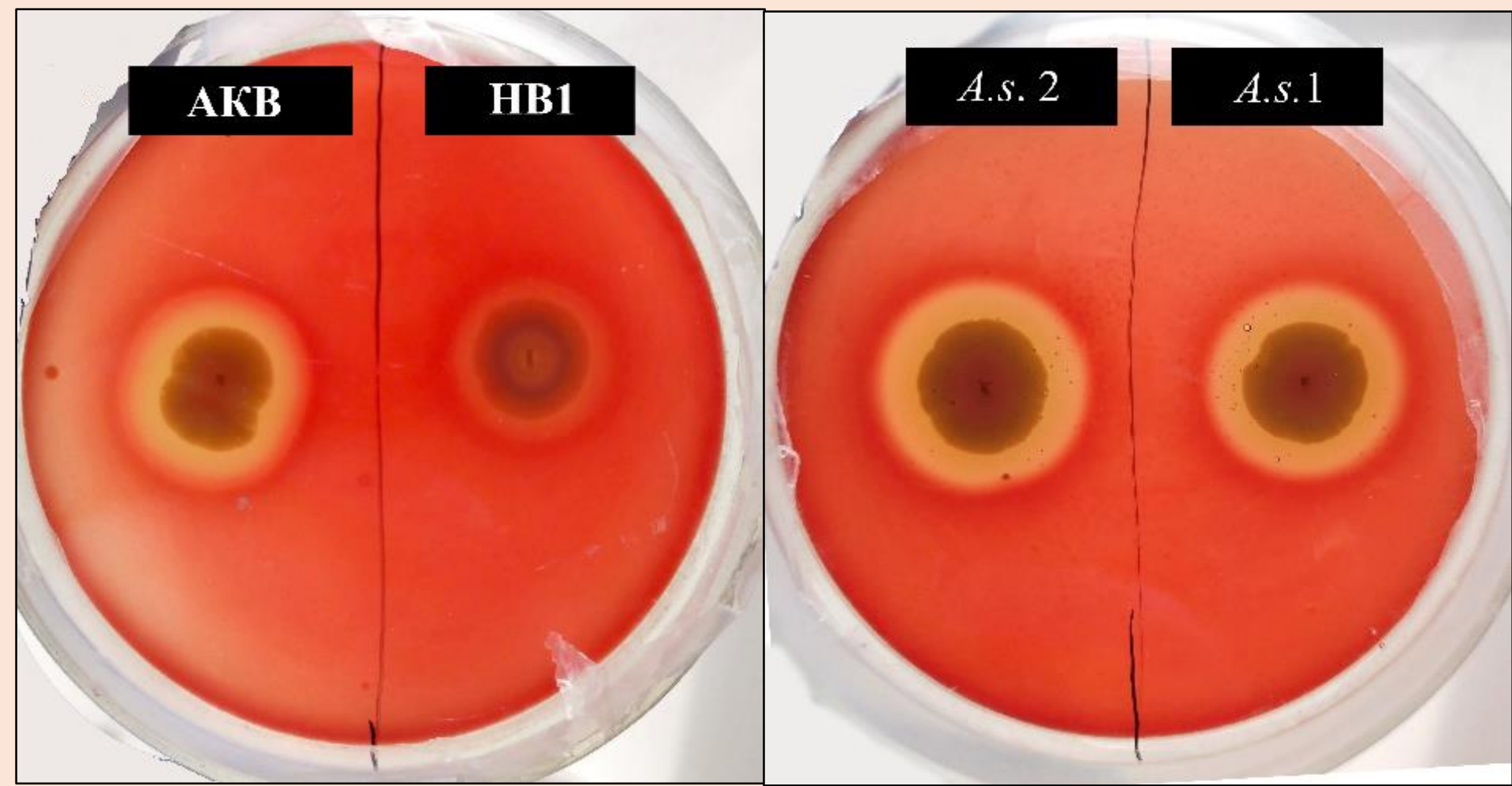


Рисунок 1 – Гемолитическая активность штаммов *A. veronii* АКВ, *A. veronii* НВ1, *A. salmonicida* 16 (1), *A. salmonicida* 56 (2) на кровяном агаре.

При оценке специфичности отобранных праймеров ожидаемые ампликоны определялись в 12 из 14 реакций с бактериальными ДНК рода *Aeromonas*, при этом из 7 образцов с *A. veronii* продукт наблюдался только в 6, а из 4 образцов с *A. salmonicida* целевой ампликон обнаружился только в 3 (рисунок 2). Также бенд, полученный при гибридизации с ДНК *A. hydrophila*, был менее ярким. Такой результат может быть связан как с недостаточной видовой специфичностью праймеров, так и с ошибочной идентификацией изолятов. Тем не менее, целевые продукты ПЦР ожидаемого размера определялись только для представителей рода *Aeromonas* и не визуализировались в реакциях с геномной ДНК бактерий других родов.

Результаты детекции бактерий рода *Aeromonas* в образцах воды зарыбленных водоемов, полученные методом ПЦР с применением отобранных специфических праймеров, совпадали с данными, полученными культуральными методами. Так, целевые ампликоны в ПЦР определялись во всех образцах, кроме воды с оз. Солонец, что подтверждено микробиологическими тестами и может свидетельствовать о различном бактериологическом статусе водоемов (рисунок 3).

Целью работы являлось изучение культуральных свойств бактериальных изолятов наиболее частых возбудителей аэромонозов – бактерий *A. veronii*, а также гомологичных им *A. hydrophila*, *A. sobria*, *A. salmonicida*, выделенных из образцов воды различной степени эвтрофикации, а также апробация специфичных праймеров к различным видам рода *Aeromonas*, полученных из литературных источников, с целью их использования для детекции данной группы микроорганизмов в образцах воды методом ПЦР.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Из образцов воды рыбоводных водоемов различной степени эвтрофикации выделены бактериальные изоляты, отнесенные по культурально-морфологическим признакам и физиолого-биохимическим свойствам к роду *Aeromonas*. Предварительная идентификация с помощью метода MALDI-TOF масс-спектрометрии позволила идентифицировать изоляты как *A. veronii* (рабочие индексы НВ1 и АКВ). Изучение культуральных свойств (оценка пептидазной, липазной, гемолитической активности) проводилось с использованием дифференциально-диагностических сред в сравнении с клиническими изолятами *A. salmonicida*, выделенными ранее. Специфичность отобранных праймеров оценивалась постановкой ПЦР по оптимизированному протоколу в агарозном геле с использованием экстрагированной фенол-хлороформным методом геномной ДНК изолятов *A. veronii* АКВ, *A. veronii* НВ1 и ДНК 12 условно-патогенных тест-культур рода *Aeromonas*: *A. salmonicida* (4 штамма), *A. veronii* (5 штаммов), *A. hydrophila* (1 штамм), *A. finlandensis* (1 штамм), *A. sobria* (1 штамм), а также ДНК штаммов, относящихся к видам *E. coli*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*. С целью оценки пригодности отобранных по литературным данным видоспецифичных праймеров для детекции аэромонад в образцах воды в качестве матрицы для ПЦР использована тотальная ДНК из образцов зарыбленных водоемов с различной степенью эвтрофикации. Качество проводимых ПЦР оценивалось с помощью электрофореза продуктов амплификации в агарозном геле.

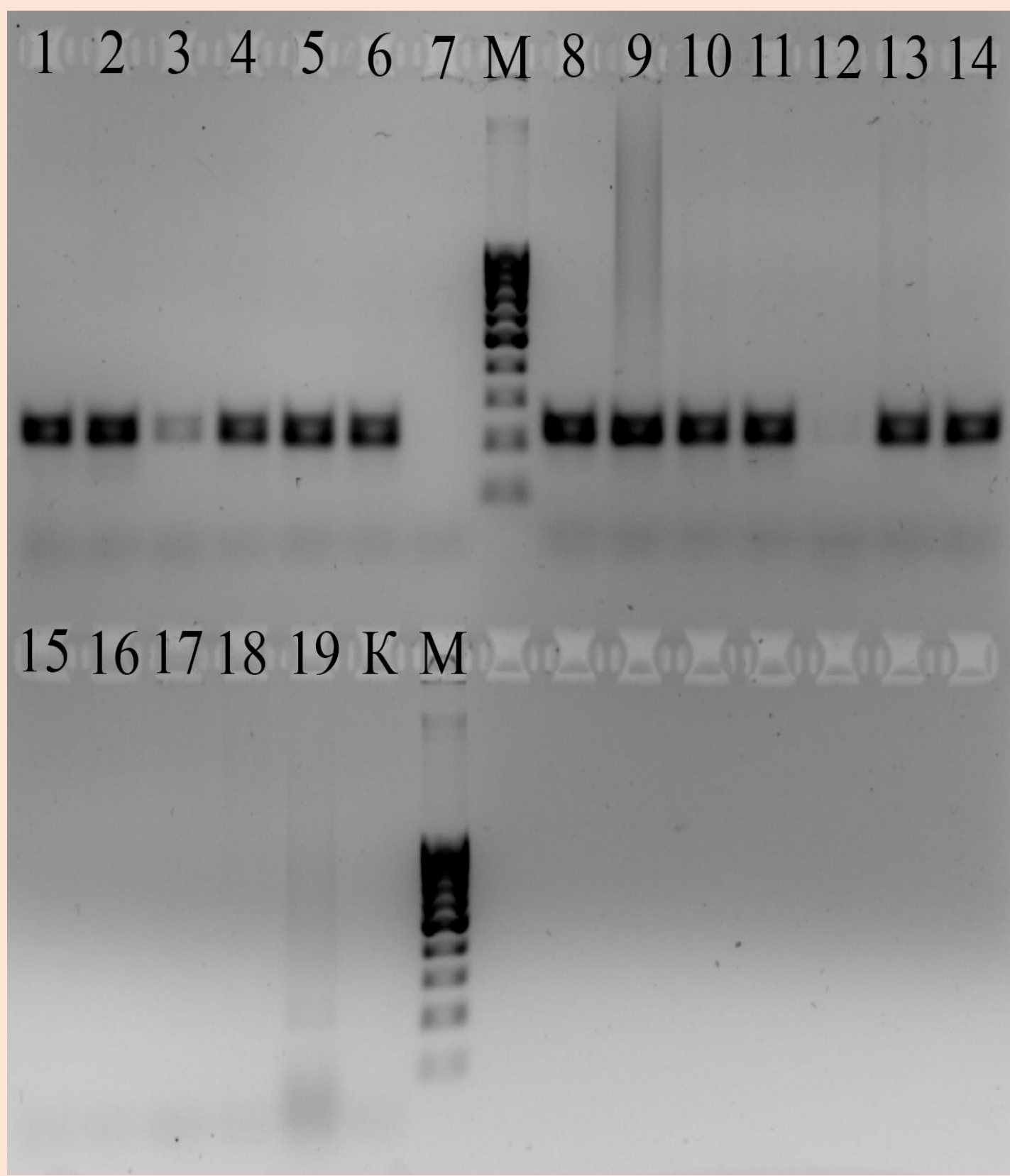


Рисунок 2 – Электрофореграмма продуктов ПЦР с использованием видоспецифичных праймеров к *A. veronii*.

К – отрицательный контроль, М – маркер молекулярного веса, 1 – *A. sobria*, 2 – *A. finlandensis*, 3 – *A. hydrophila*, 4-5, 12-13 – штаммы *A. salmonicida*, 6 – *A. veronii* АКВ, 7 – *A. veronii* НВ1, 8 -11, 14 – штаммы *A. veronii*, 15 – *E. coli*, 16 – *S. aureus*, 17 – *E. faecalis*, 18 – *B. subtilis*, 19 – *P. aeruginosa*.

ВЫВОДЫ

- Апробированные праймеры не обладают абсолютной видовой специфичностью, однако могут использоваться для выявления бактерий рода *Aeromonas* в образцах воды.
- У выделенных изолятов вида *A. veronii* в различной степени выражены вирулентные свойства, что может свидетельствовать о возможном проявлении культурами патогенных свойств в отношении гидробионтов в микробиоценозах водоемов.
- Исследуемые праймеры могут служить ориентировочным инструментом установления присутствия бактерий рода *Aeromonas* в поверхностных и придонных слоях зарыбленных водоемов.

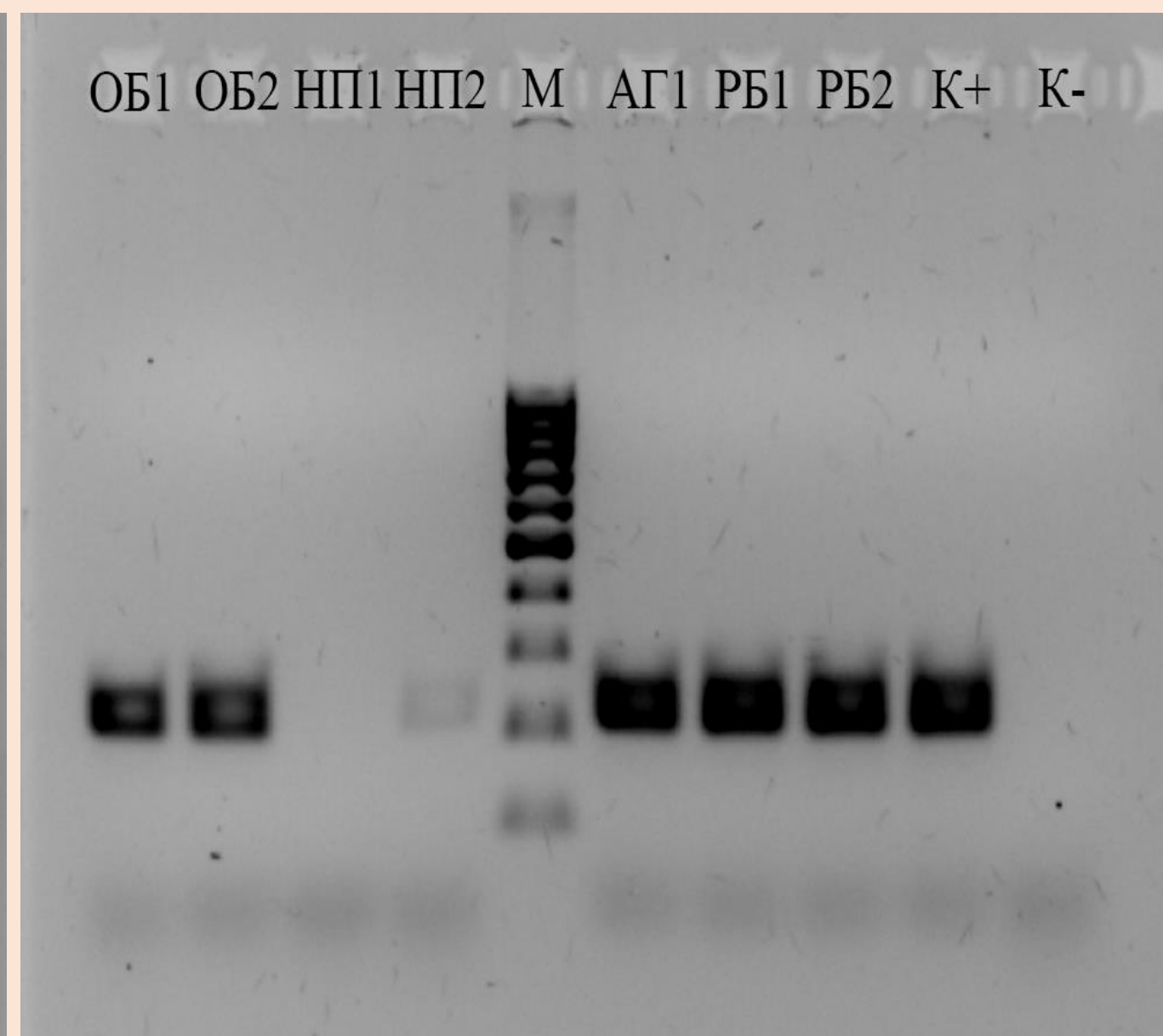


Рисунок 3 – Электрофореграмма продуктов ПЦР с использованием видоспецифичных праймеров к *A. veronii*.

ОБ1 – пруд в г. Бобруйск, НП – оз. Солонец, АГ – придонные воды пруда, РБ – река Березина, М- маркер молекулярного веса, К+ - *A. veronii* 56, К- - отрицательный контроль. индексы 1, 2 – повторности опыта.