

На правах рукописи

КУКЛИНА НАТАЛЬЯ ГРИГОРЬЕВНА

**БАКТЕРИОФАГОВЫЙ ПРЕПАРАТ
ДЛЯ ИНДИКАЦИИ И ИДЕНТИФИКАЦИИ
*AEROMONAS SALMONICIDA***

06.02.02- ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология,
микология с микотоксикологией и иммунология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

УФА - 2017

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия имени П.А. Столыпина».

Научный руководитель: **Нафеев Александр Анатольевич**
доктор медицинских наук, профессор.

Официальные оппоненты: **Тихомирова Елена Ивановна**, доктор биологических наук, профессор, ФГБОУ ВО «Саратовский государственный технический университет имени Ю.А. Гагарина», заведующая кафедрой «Экология»;

Киселева Ирина Анатольевна, кандидат биологических наук, ФБУН МНИИЭМ имени Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора, старший научный сотрудник лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии бактериофагов.

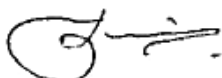
Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова».

Защита диссертации состоится 10 ноября 2017 года в 14.00 часов на заседании диссертационного совета Д 220.003.03 при ФГБОУ ВО Башкирский ГАУ по адресу: 450001, г. Уфа, ул. 50-летия Октября, 34, ауд. 325/2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБОУ ВО Башкирский ГАУ <http://www.bsau.ru>, а с авторефератом в сети Интернет на официальном сайте Министерства образования и науки Российской Федерации <http://www.vak.ed.gov.ru>.

Автореферат разослан «__» _____ 2017 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор с.-х. наук, профессор



Гиниятуллин
Марат Гиндуллинович

1 ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности. Бактерии рода *Aeromonas* были идентифицированы еще в конце XIX века, длительное время их считали сапрофитами, циркулирующими в воде открытых водоемов. Аэромонады широко распространены в окружающей среде: их выделяют из речной и морской воды, сточных вод, почвы, от гидробионтов (рыб, кальмаров, крабов, креветок и т.п.) (Khadori N., Fainstein V., 1988). Бактерия *Aeromonas salmonicida* является возбудителем фурункулеза (аэромоноза) лососевых, который был впервые описан Эммерихом и Вайбелем еще в 1894 году в Германии (Kumar D., 1997). До недавнего времени считалось, что *A. salmonicida* поражает рыб только семейства лососевые, но современные исследования показывают увеличение количество инфицированных рыб других семейств (Janda J.M. et al., 2010, Fernandez-Alvarez C. et al, 2016). Фурункулез - это высококонтагиозная болезнь, протекающая остро, подостро и хронически. Зараженные рыбы с открытыми ранами являются источниками распространения *A. salmonicida*. В связи с высокой плотностью выращивания рыбы в хозяйствах, эта болезнь быстро распространяется с высоким процентом летальности (Головина Н.А. и др., 2003).

В настоящее время не существует достаточно четкой разработанной схемы выделения и идентификации данного микроорганизма, а значит и бактериологической диагностики данного заболевания.

Цель исследования – усовершенствование методов выделения, идентификации и индикации бактерии *A. salmonicida*.

Для достижения поставленной цели решались следующие **задачи**:

1. Изучить биологические свойства референс-штамма бактерии *A. salmonicida*, по результатам проведенных исследований разработать комплекс специальных бактериологических сред, состоящий из - жидкой накопительной и дифференциально-диагностических сред – для выделения и идентификации *A. salmonicida*, а также комплексную схему выделения и идентификации бактерии *A. salmonicida*, с подобранными бактериологическими тестами по идентификации бактерий и фаговым биопрепаратом для постановки спот-теста;

2. Выделить из объектов окружающей среды бактериофаги, специфичные для *A. salmonicida* и изучить их основные биологические свойства - морфологию негативных колоний, литическую активность, спектр литической активности, специфичность действия, устойчивость к температуре и хлороформу;

3. Селекционировать бактериофаг для разработки фагового биопрепарат;

4. Оработать технологию получения и определить оптимальный срок и условия хранения сконструированного фагового биопрепарата;
5. Модернизировать схему реакции нарастания титра фага (РНФ) для индикации *A. salmonicida* в соответствии с биологическими свойствами бактерии данного вида и селекционированного бактериофага;
6. Изучить ареал распространения *A. salmonicida* в Ульяновской области.

Научная новизна. Впервые предложена комплексная схема выделения и идентификации *A. salmonicida*, включающая использование специализированных бактериологических сред - среды накопления А. Sl.1-УГСХА, дифференциально-диагностической среды А. Sl.2-УГСХА, ряд бактериологических тестов, направленных на идентификацию тинкториальных, биохимических и культуральных свойств бактерии искомого вида и сконструированный бактериофаговый биопрепарат для постановки спот-теста. Использование данной схемы позволяет выделять и типировать штаммы *A. salmonicida* из объектов санитарного надзора за 60-84 часа.

Выделены и селекционированы бактериофаги, специфичные к бактериям *A. salmonicida*, с изученными, по заданным параметрам, биологическими свойствами, на основе отобранного бактериофага разработан биопрепарат для индикации *A. salmonicida*.

Определены биотехнологические параметры для конструирования фагового биопрепарата и апробирована постановка схемы реакции нарастания титра фага для выявления бактерии *A. salmonicida* из объектов санитарного надзора.

Теоретическая и практическая значимость работы. Предложена комплексная схема выделения и идентификации до вида бактерии *A. salmonicida* из объектов санитарного надзора, которая включает в себя разработанную среду накопления А. Sl.1-УГСХА, дифференциально-диагностическую среду А. Sl.2-УГСХА, систему бактериологических тестов и фаговый биопрепарат для спот-теста. Разработана технология получения фагового препарата, отработана и апробирована схема индикации и идентификации бактерий *A. salmonicida* методом реакции нарастания титра фага. Материалы диссертационной работы используются в учебном процессе при чтении лекций, для практических занятий студентов, работы аспирантов на кафедрах Ульяновской ГСХА имени П.А. Столыпина и УлГПУ имени И. Н. Ульянова.

Методология и методы исследования. При проведении исследований были использованы общенаучные и специальные методы: теоретико-методологический

анализ литературных источников, микробиологические методы исследования, экспериментальные методы и методы статистического анализа.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Комплексная схема выделения и идентификации бактерии *A. salmonicida*, включающая сконструированные бактериологические питательные среды (жидкая среда накопления А. Sl.1-УГСХА, обеспечивающая преимущественный рост и размножение бактерий *A. salmonicida* и плотная дифференциально-диагностическая среда А. Sl.2-УГСХА, позволяющая дифференцировать штаммы *A. salmonicida* от бактерий других видов и родов), бактериологические тесты и фаговый биопрепарат Asl25-УГСХА для постановки спот-теста;

2. Выделены бактериофаги *A. salmonicida* в количестве 15 штаммов из объектов водной среды и 2 штамма методом индукции;

3. Селекционирован бактериофаг Asl25-УГСХА как основа биопрепарата для идентификации и индикации *A. salmonicida* в объектах санитарного надзора, разработаны технологические параметры создания и определены оптимальные сроки и условия хранения фагового препарата;

4. Модифицирована схема индикации бактерии *A. salmonicida* методом РНФ с применением предлагаемого биопрепарата бактериофага Asl25-УГСХА, позволяющая выявлять бактерии *A. salmonicida* за 28 часов.

Степень достоверности и апробация работы. Высокая степень достоверности результатов проведенных исследований подтверждается применением общепринятых и современных микробиологических и вирусологических методов и обработки информации. Использование перечисленных методов и статистический анализ экспериментальных данных обеспечили объективность и достоверность полученных результатов и выводов. Основное содержание и материалы диссертации представлены на: III-й Международной научно-практической конференции молодых ученых «Молодежь и наука XXI века» (Ульяновск, 2010), Международной научно-практической конференции «Ветеринарная медицина XXI века: инновации, опыт, проблемы и пути их решения» (Ульяновск, 2011), Международной научно-практической конференции «Задачи ветеринарной науки в реализации доктрины продовольственной безопасности Российской Федерации» (Покров, 2011), Международной научно – практической конференции молодых ученых и специалистов, (Троицк, 2012), IV-й, V-й, VI-й Международных научно-практических конференциях «Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения» (Ульяновск, 2012, 2013, 2014), Международной научно-практической конференции «Бактериофаги:

теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности» (Ульяновск, 2013), Международной научно-практической конференции «Биотехнология: реальность и перспективы в сельском хозяйстве» (Саратов, 2013), Международной научно-практической конференции «Стратегия инновационного развития агропромышленного комплекса» (Курган, 2013), VIII-й Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика» (Москва, 2014), VIII-й Всероссийской научно-практической конференции «Аграрная наука в XXI веке: проблемы и перспективы» (Саратов, 2014), III-й Международной научной Интернет-конференции «Биотехнология. Взгляд в будущее» (Казань, 2014), Всероссийской научной конференции с международным участием, посвященная 10-летию создания кафедры ботаники и экологии растений и кафедры микробиологии СурГУ (Сургут, 2015), III-й научно-практической конференции с международным участием «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности» (Москва, 2016).

Публикации. По теме диссертации было опубликовано 23 работы, из них 4 статьи в изданиях, рекомендованных ВАК РФ.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, трех глав: обзора литературы, собственных исследований, состоящих из объекта, материалов и методов, заключения, выводов, практических предложений, перспективы дальнейшей разработки темы, списка литературы, приложений. Материалы диссертации изложены на 128 страницах, включает в себя 22 таблицы и 18 рисунков. Список использованных литературных источников включает в себя 160 наименований – 76 отечественных и 84 иностранных.

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на кафедре микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы ФГБОУ ВО «Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия имени П.А. Столыпина». Общая схема проведения исследования представлена на рис.1.

Штаммы. Для определения специфичности сконструированных нами сред, а также для изучения специфичности бактериофагов нами были использованы следующие референс-штаммы бактерий - *A. salmonicida* ATCC 33658, *A. hydrophila* ATCC 49140, *A. sobria* ATCC 9071, *A. caveae* ATCC 12633, *Ps. putida* №12633, *Ps. aeruginosa* №128, *Ps. fluorescens* №13525, *Y. ruckeri* №6, *Y. enterocolitica*, *P. mirabilis* №523, *Kl. pneumoniae* №4463, *E. coli* №4, полученные из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ при

ФГБОУ ВО Ульяновской ГСХА имени П.А. Столыпина, а также 23 «полевых» штамма, выделенных из объектов водной среды г. Ульяновска и Ульяновской области. Все штаммы обладают типичными биологическими свойствами для бактерий указанного вида.



Рисунок 1. Общая схема проведения исследования

Методы. Выделение, идентификация и индикация бактерий была проведена по общепринятым бактериологическим методам (Лабинская, 2008). Культуральные, биохимические и морфологические свойства бактерий *A. salmonicida* определяли по тестам, указанным в Bergey`s Manual of Determinative Bacteriology 2007. Тест на оксидазу был проведен с применением 1% раствора N-N-диметил-пара-фенилендиамин. Каталазную активность изучали с применением 3% раствора перекиси водорода. Приготовление и стерилизацию питательных сред, а также окраску мазков проводили согласно ГОСТ ISO 1113-1-2011. Приготовление разведений и суспензий – ГОСТ Р 51426-99. Посев на питательные среды согласно ГОСТ Р 26670-91. Отбор и подготовку лабораторных проб проводили по ГОСТ 26669-85, ГОСТ 31942-2012, ГОСТ

31861-2012. Контроль разработанных питательных сред проводили согласно МУК 4.2.2316-08 «Методы контроля бактериологических питательных сред».

Выделение и изучение биологических свойств фагов проводили по методам И.П. Ревенко (1978), С.Н. Золотухина (2007), Э. Каттер (2012). Литическую активность определяли по методам Грациа и Аппельмана, в модификации Васильева Д.А. (2011), Викторова Д.А. (2012). Реакцию нарастания титра фага для индикации *A. salmonicida* в объектах внешней среды проводили по методам В.Д. Тимакова и Д.М. Гольдфарба (дополненных в соответствии с Феоктистовой Н. А., (2006), Барт Н.Г.,(2013) и Юдиной М. А., (2013).

Статистическую обработку результатов исследований проводили с помощью пакета прикладных программ Statistica 6.0. (for Windows; «Stat Soft Ins.», США), Microsoft Exsel 2003 (for Windows XP).

3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Биологические свойства

референс-штамма *A. salmonicida* ATCC 33658

При разработке комплексной схемы выделения и идентификации изучаемых бактерий, с целью определения стабильности свойств нами были определены культуральные и тинкториальные свойства референс-штамма *A. salmonicida* ATCC 33658.

Референс-штамм *A. salmonicida* ATCC 33658 представляет собой мелкие, неподвижные, грамотрицательные короткие палочки, размером 0,5-1,0x1,5-2,0 мкм, с закругленными концами. Бактериальные колонии референс-штамм *A. salmonicida* ATCC 33658 на МПА имеют гладкую, блестящую поверхность, округлую и ровную форму, диаметром до 3,0 мм, цвет колоний желтоватый (кремовый). На вторые сутки роста цвет среды приобретает коричневый оттенок за счет выделения пигмента.

На среде Эндо – колонии мелкие, светлые, округлые, цвет среды при этом не изменяется. При изучении бактериологических свойств референс-штамма *A. salmonicida* ATCC 33658 были установлены отличия, характерные для данного вида бактерий: окисление и ферментация глюкозы, положительная реакция на оксидазу и каталазу, тест на способность восстановления нитратов в нитриты (нитратредуктаза), тест на подвижность, тест на наличие фермента желатиназы. Был выявлен температурный оптимум культивирования референс-штамма *A. salmonicida* ATCC 33658, который составляет 25-28°C.

3.2 Конструирование жидкой накопительной среды и плотной дифференциально-диагностической среды для выделения *A.salmonicida*

При выделении *A. salmonicida* из объектов санитарного надзора существуют сложности, связанные с ростом бактерий-ассоциантов рода *Pseudomonas*. Поэтому актуальным является конструирование накопительной среды, способной подавлять рост сопутствующих микроорганизмов. Согласно литературным данным, наиболее оптимальной минеральной базой для *Aeromonas* является набор солей фосфата калия двузамещенного, сульфата магния, хлорида натрия. Соли калия, магния, натрия необходимы для обеспечения биохимических процессов в клетках бактерий рода *Aeromonas*, для образования бактериальных белков необходимы анионы, содержащие серу. Соли бария эффективно ингибируют рост бактерий-ассоциантов рода *Pseudomonas*. Следовательно, данный набор солей целесообразно включить в среду в применяемых концентрациях, которые были установлены экспериментальным путем. Источником энергии в данной среде служит глюкоза. Бромтимоловый синий является индикатором снижения рН среды вследствие окисления глюкозы, что указывает на рост бактерии вида *A. salmonicida*. Пептон является источником азота и аминокислот, необходимых для нормального развития бактерий. Нужные концентрации пептона и глюкозы были установлены экспериментально. В результате сконструированная нами жидкая среда накопления для бактерий *A. salmonicida* А.51.1-УГСХА имеет следующий состав: вода дистиллированная - 1000 мл, K_2HPO_4 - 1,0 г, $MgSO_4$ - 0,2 г, NaCl - 5,0 г, пептон - 5,0 г, бромтимоловый синий - 0,03 г, глюкоза - 5,0 г, $BaCl_2$ - 2,0 г. Все компоненты смешивали, кипятили 2-3 минуты, разливали в пробирки по 5 мл, а затем стерилизовали в течение 20 минут при 112 °С. рН готовой среды накопления - 7,2, цвет готовой среды - зеленый.

Для определения специфичности разработанной нами среды накопления, был проведен контрольный посев бактерий-ассоциантов других видов и родов. Посевы культивировали в термостате в течение 24 ч. при Т- 28°С: *A. salmonicida* ATCC 33658, *Ps. putida* №12633, *Ps. fluorescens* №13525, *Y. ruckeri* №6, *Y. enterocolitica*; при Т - 37°С: *Ps. aeruginosa* №128, *A. hydrophila* ATCC 49140, *A. sobria* ATCC 9071, *A. caveae* ATCC 12633, *P. mirabilis* №523, *Kl. pneumoniae* №4463, *E. coli* №4 (табл.1).

С целью подбора селективного компонента для конструирования плотной среды нами было проведено изучение антибиотикоустойчивости референс-штамма *A. salmonicida* ATCC 33658. Результаты показали, что данный вид бактерий чувствителен к большинству групп антибиотиков – аминогликозидам, хинолам и фторхинолам, пенициллинам, цефалоспорином, полимиксином,

макролидам, тетрациклинам и не чувствителен к линкозамидам. Поэтому при конструировании плотной среды было решено использовать краситель конго-рот, как ингибитор посторонней микрофлоры и индикатор роста, способный к специфическому связыванию с поверхностными белками. В результате усваивания данного красителя колонии приобретают черный цвет.

Нами была сконструирована плотная дифференциально-диагностическая среда А. Sl.2-УГСХА следующего состава - вода дистиллированная - 1000 мл, агар-агар – 15,0 г, пептон – 5,0 г, дрожжевой экстракт – 3,0 г, MgSO₄ - 0,2 г, K₂HPO₄ -1,0 г, глюкоза – 5,0 г, конго-рот – 3,0 г. Концентрацию указанных компонентов подбирали экспериментальным путем.

Используемые минеральные соли – калий фосфорнокислый двузамещенный и магний сернокислый обеспечивают электролитный состав среды, необходимый для обмена веществ в бактериальной клетке, пептон является источником аминокислот, дрожжевой экстракт – источник органического азота, углерода и витаминов. Краситель конго-рот – ингибитор посторонней микрофлоры и индикатор роста. Глюкоза – источник углерода, необходимый для питания микроорганизмов.

Способ приготовления – все компоненты смешивали и доводили до кипения. Затем автоклавировали в течение 20 минут при 112°C. рН готовой среды накопления – 7,1. Готовая среда – насыщенного красного цвета.

На данной среде колонии референс-штамма *A. salmonicida* ATCC 33658 мелкие, округлые, черного цвета, размером 0,5-1,0 мм, с гладкой поверхностью. Цвет среды рядом с колониями изменяется с красного на черный.

Специфичность плотной дифференциально-диагностической среды была определена следующим образом: брали суточные бульонные культуры *A. salmonicida* ATCC 33658, *A. hydrophila* ATCC 49140, *A. sobria* ATCC 9071, *A. caveae* ATCC 12633, *Ps. putida* №12633, *Ps. aeruginosa* №128, *Ps. fluorescens* №13525, *Y. ruckeri* №6, *Y. enterocolitica*, *P. mirabilis* №523, *Kl. pneumoniae* №4463, *E. coli* №4 и производили посев методом Дригальского. Одновременно ставили контроль на МПА. Посевы помещали в термостат на 24 ч при T-28°C: *A. salmonicida* ATCC 33658, *Ps. putida* №12633, *Ps. fluorescens* №13525, *Y. ruckeri* №6, *Y. enterocolitica*; при T - 37 °C: *Ps. aeruginosa* №128, *A. hydrophila* ATCC 49140, *A. sobria* ATCC 9071, *A. caveae* ATCC 12633, *P. mirabilis* №523, *Kl. pneumoniae* №4463, *E. coli* №4. Полученные результаты представлены в таблице 1.

На плотной дифференциально-диагностической среде А. Sl.2-УГСХА бактерии *A. salmonicida* и *A. sobria* имеют схожий рост, возможные бактерио-ассоцианты имеют отличительный цвет колоний, благодаря наличию красителя конго-рот.

Таблица 1. Определение специфичности жидкой среды накопления A.SI.1-УГСХА и дифференциально-диагностической среды A.SI.2-УГСХА

№ п/п	Вид бактерий	Рост на жидкой среде накопления A.SI.1-УГСХА	Контроль роста в пробирках с МПБ	Рост на дифференциально-диагностической среде A.SI.2-УГСХА	Контроль роста на чашках Петри с МПА
1.	<i>A. salmonicida</i> ATCC 33658	Рост бактерий, помутнение бульона, изменение цвета среды с зеленого на желтый.	Наличие роста, помутнение бульона.	Мелкие, округлые, черного цвета, размером 0,2-0,5 мм, с гладкой поверхностью. Цвет среды рядом с колониями изменяется на черный.	+
2.	<i>A. hydrophila</i> ATCC 49140	Рост бактерий, помутнение бульона, изменение цвета среды с зеленого на желтый.	Наличие роста, помутнение бульона.	Колонии крупные, диаметром до 1 мм, с гладкой поверхностью светлые, цвет среды красный.	+
3	<i>A. sobrea</i> ATCC 9071	Рост бактерий, помутнение бульона, изменение цвета среды с зеленого на желтый.	Наличие роста, помутнение бульона.	мелкие, округлые, черного цвета, размером 0,5-0,7 мм, с гладкой поверхностью. Цвет среды рядом с колониями изменяется на черный.	+
3.	<i>A. caviae</i> ATCC 15468	Рост бактерий, помутнение бульона, изменение цвета среды с зеленого на желтый.	Наличие роста, помутнение бульона.	Колонии мелкие, диаметром до 0,7 мм, с гладкой поверхностью светлые, цвет среды красный.	+
4.	<i>Ps. aeruginosa</i> №128	Отсутствие роста, цвет среды не изменился.	Наличие роста, помутнение бульона.	Колонии крупные, с гладкой поверхностью светлые, цвет среды красный.	+
5.	<i>Ps. putida</i> №12633	Отсутствие роста, цвет среды не изменился.	Наличие роста, помутнение бульона.	Колонии крупные, с гладкой поверхностью светлые, цвет среды красный.	+
6.	<i>Ps. fluorescens</i> №13525	Отсутствие роста, цвет среды не изменился.	Наличие роста, помутнение бульона.	Колонии крупные, с гладкой поверхностью светлые, цвет среды красный.	+
7.	<i>P. mirabilis</i> №523	Рост бактерий, помутнение бульона, изменение цвета среды с зеленого на желтый.	Наличие роста, помутнение бульона.	Колонии крупные, с гладкой поверхностью светлые, цвет среды красный.	+
8.	<i>Y. ruckeri</i> №6	Отсутствие роста, цвет среды не изменился.	Наличие роста, помутнение бульона.	Колонии крупные, с гладкой поверхностью светлые, цвет среды красный.	+
9.	<i>Y. enterocolitica</i>	Рост бактерий, помутнение бульона, изменение цвета среды с зеленого на желтый.	Наличие роста, помутнение бульона.	Колонии крупные, с гладкой поверхностью светлые, цвет среды красный.	+
10.	<i>Kl.pneumonia</i> №4463	Отсутствие роста, цвет среды не изменился.	Наличие роста, помутнение бульона.	Колонии крупные, с гладкой поверхностью светлые, цвет среды красный.	+
11.	<i>E. coli</i> №4	Рост бактерий, помутнение бульона, изменение цвета среды с зеленого на желтый.	Наличие роста, помутнение бульона.	Колонии крупные до 2 мм в диаметре, округлые, имеют серый цвет.	+

Примечание: «+» - наличие роста.

Результаты, приведенные в таблице 1, показывают, что при росте *A. salmonicida* ATCC 33658 на среде А.СI.1-УГСХА наблюдается изменение цвета среды с зеленого на желтый (вследствие использования глюкозы в качестве источника углевода), а также помутнение среды и небольшой осадок желтоватого цвета. Таким образом, плотная дифференциально-диагностическая среда обладает специфичностью и позволяет проводить первичную дифференциацию бактерий *A. salmonicida* по характерному росту колоний.

3.3 Разработка бактериологической схемы выделения *A. salmonicida*

На основании проведенных исследований для бактериологической идентификации *A. salmonicida* нами были выбраны следующие тесты, характерные для данного вида бактерии – тест на каталазу, оксидазу, окраска по Граму, OF-тест, подвижность, тест на наличие нитратредуктазной активности (способность восстанавливать нитраты в нитриты), на желатиназную активность. Разработанная нами бактериологическая схема выделения *A. salmonicida* из объектов санитарного надзора представлена на рис. 2. Данная схема позволяет выделить бактерии *A. salmonicida* из объектов санитарного надзора в течение 60-84 часов.

По результатам применения разработанной бактериологической схемы в весенне-осенний период 2010-2013 гг. был проведён забор из объектов водной среды на территории Ульяновской области из рек, озер, прудов, сточных вод, а также тканевой материал и органокомплекс рыбы в количестве 378 единиц образцов. Отбор проб воды и тканевой материал и органокомплекс рыбы проводился в соответствии с ГОСТ Р 26668-85, ГОСТ 26669-85, ГОСТ Р 51419-9.

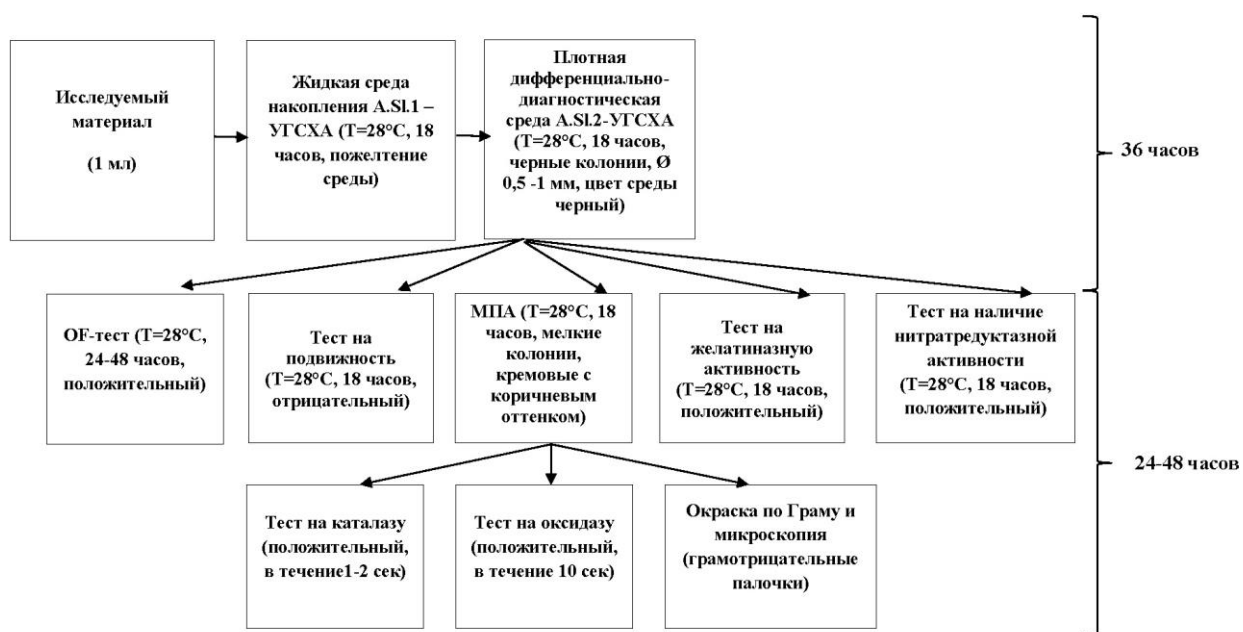


Рисунок 2. Предлагаемая нами схема выделения и идентификации бактерий *A. salmonicida*

С помощью предложенной схемы в результате лабораторных исследований нами было выделено 23 штамма бактерий *A. salmonicida* из водных объектов г. Ульяновска и Ульяновской области, биологические особенности, которых подтверждают их принадлежность к *A. salmonicida* и представлены в таблице 2.

Таблица 2. Биологические свойства референс-штамма и выделенных нами полевых штаммов *A. salmonicida*

№ п/п	Штамм	Подвижность	Окраска по Гамму	Оксидаза	Каталаза	Желатиназа	Нитратредуктаза	OF-тест	Лактоза	Цитрат	Мальтоза	Манноза	Раффиноза	Дульцитол	Ксиллоза	Маннит	Рамноза
1.	ATCC 33658	-	-	+	+	+	+	OF	-	-	+	+	-	-	-	+	-
2.	1asl	-	-	+	+	+	+	OF	-	-	+	+	-	-	-	+	-
3.	6asl	-	-	+	+	+	+	OF	-	-	+	+	-	-	-	+	-
4.	9asl	-	-	+	+	+	+	OF	-	-	+	+	-	-	-	+	-
5.	12asl	-	-	+	+	+	+	OF	-	-	+	+	-	-	+	+	-
6.	18asl	-	-	+	+	+	+	OF	-	-	+	+	-	-	-	+	-
7.	23asl	-	-	+	+	+	+	OF	-	-	-	+	-	-	-	+	-
8.	24asl	-	-	+	+	+	+	OF	-	-	+	+	-	-	-	+	-
9.	27asl	-	-	+	+	+	+	OF	-	-	+	+	-	-	-	+	-
10.	35asl	-	-	+	+	+	+	OF	-	-	+	+	-	-	-	+	-
11.	37asl	-	-	+	+	+	+	OF	-	-	+	+	-	+	-	+	-
12.	39asl	-	-	+	+	+	+	OF	-	-	+	+	-	-	-	+	-
13.	41asl	-	-	+	+	+	+	OF	-	-	+	-	-	-	-	+	+
14.	42asl	-	-	+	+	+	+	OF	-	-	+	+	-	-	-	+	-
15.	43asl	-	-	+	+	+	+	OF	-	-	+	+	-	-	-	+	-
16.	46asl	-	-	+	+	+	+	OF	-	-	+	+	-	-	-	+	-
17.	49asl	-	-	+	+	+	+	OF	-	-	+	+	-	-	-	+	-
18.	50asl	-	-	+	+	+	+	OF	-	-	+	+	-	-	-	+	-
19.	54asl	-	-	+	+	+	+	OF	-	-	-	+	-	-	-	+	-
20.	56asl	-	-	+	+	+	+	OF	-	-	+	+	-	-	-	+	-
21.	58asl	-	-	+	+	+	+	OF	-	-	+	+	-	-	-	+	-
22.	60asl	-	-	+	+	+	+	OF	-	-	+	+	+	-	-	-	-
23.	61asl	-	-	+	+	+	+	OF	-	-	+	+	-	-	-	+	-
24.	62asl	-	-	+	+	+	+	OF	-	-	+	+	-	-	-	+	-

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

3.4 Характеристика выделенных бактериофагов *A. salmonicida*

Для получения искомых бактериофагов с целью использования их согласно поставленным задачам нами были проведены эксперименты по двум схемам выделение фагов: первая - из объектов санитарного надзора методом накопления, предложенным Гольдфарбом (1961) в модификации Викторова Д.А. (2011), вторая - методом индукции (Каттер, 2012).

При постановке эксперимента по выделению фагов методом накопления использовался индикаторный штамм *A. salmonicida* №1asl, в результате получено 15 активных фагов (Asl11-УГСХА, Asl23-УГСХА, Asl25-УГСХА, Asl11-УГСХА, Asl10-УГСХА, Asl24-УГСХА, Asl10/2-УГСХА, Asl27-УГСХА, Asl31/2-УГСХА, Asl33-УГСХА, Asl47-УГСХА, Asl52-УГСХА, Asl58/3-УГСХА, Asl64-УГСХА, Asl70-УГСХА). Методом индукции было выделено 2 штамма бактериофага (Asl05-УГСХА, Asl017-УГСХА).

После выделения нами были изучены следующие биологические свойства фагов: морфология негативных колоний, литическая активность, спектр литической активности, специфичность действия, температурная устойчивость и устойчивость к воздействию хлороформа.

Выделенные бактериофаги имели различные типы негативных колоний: диаметр от 0,5 до 2,0 мм, прозрачные и полупрозрачные, с зоной вторичного лизиса и без нее.

Результаты определения специфичности всех выделенных бактериофагов с бактериями вышеуказанных видов и родов показали, что они строго специфичны по отношению к *A. salmonicida* и не лизируют бактерии других видов. Литическая активность выделенных фагов по Грациа и Аппельмана представлена в таблице 3.

Таблица 3. Литическая активность выделенных бактериофагов по Грациа и Аппельмана

№ п/п	Название фага	Титр по Грациа	Титр по Аппельмана
1.	Asl11-УГСХА	$0,2 \times 10^9 \pm 0,1 \times 10^9$	10^{-9}
2.	Asl23-УГСХА	$0,7 \times 10^7 \pm 0,4 \times 10^7$	10^{-6}
3.	Asl25-УГСХА	$0,3 \times 10^9 \pm 0,2 \times 10^9$	10^{-8}
4.	Asl11-УГСХА	$0,5 \times 10^8 \pm 0,1 \times 10^8$	10^{-9}
5.	Asl10-УГСХА	$0,5 \times 10^8 \pm 0,3 \times 10^8$	10^{-8}
6.	Asl24-УГСХА	$0,5 \times 10^7 \pm 0,1 \times 10^7$	10^{-6}
7.	Asl10/2-УГСХА	$0,4 \times 10^9 \pm 0,1 \times 10^9$	10^{-9}
8.	Asl27-УГСХА	$0,7 \times 10^6 \pm 0,4 \times 10^6$	10^{-5}
9.	Asl31/2-УГСХА	$0,5 \times 10^7 \pm 0,1 \times 10^7$	10^{-6}
10.	Asl33-УГСХА	$0,8 \times 10^7 \pm 0,5 \times 10^7$	10^{-7}
11.	Asl47-УГСХА	$0,4 \times 10^4 \pm 0,3 \times 10^4$	10^{-4}
12.	Asl52-УГСХА	$0,5 \times 10^3 \pm 0,2 \times 10^3$	10^{-4}
13.	Asl58/3-УГСХА	$0,7 \times 10^6 \pm 0,1 \times 10^6$	10^{-5}
14.	Asl64-УГСХА	$0,2 \times 10^4 \pm 0,1 \times 10^4$	10^{-5}
15.	Asl70-УГСХА	$0,4 \times 10^6 \pm 0,2 \times 10^6$	10^{-7}
16.	Asl05-УГСХА	$0,7 \times 10^5 \pm 0,2 \times 10^5$	10^{-6}
17.	Asl017-УГСХА	$0,3 \times 10^6 \pm 0,1 \times 10^6$	10^{-6}

По результатам полученных данных в дальнейших исследованиях было решено использовать в качестве базовых для создания биопрепарата наиболее активные бактериофаги Asl10/2-УГСХА, Asl25-УГСХА, Asl11-УГСХА, которые характеризуются наибольшим числом активных корпускул в 1 мл.

Спектр литической активности нами был изучен на 24 штаммах - 1 референс-штамм *A. salmonicida* и 23 «полевых» штамма. Наиболее широким спектром литической активности к исследуемым культурам обладал штамм фага Asl25-УГСХА, который лизировал 21 из 24 штаммов *A. salmonicida* (87,5%). Фаг Asl10/2-УГСХА лизировал 19 из 24 штаммов (79,2%). Фаг Asl11-УГСХА лизировал 17 из 24 штаммов (70,8%).

Результаты изучения температурной устойчивости показали, что прогревание бактериофага Asl25-УГСХА при температуре 45-47°C не оказывает влияния на содержание активных корпускул фага в 1 мл. Прогревание бактериофагов Asl10/2-УГСХА и Asl11-УГСХА до температуры 45°C не приводит к изменению числа титра фага, при повышении температуры - титр постепенно снижается. Дальнейшее повышение температуры приводит к снижению активности фага. При нагревании фага до температуры 55°C и выше - бактериофаги погибают (табл. 4).

Таблица 4. Изменение титра бактериофагов Asl25-УГСХА, Asl10/2-УГСХА, Asl11-УГСХА при увеличении температуры культивирования

Температура, °С	Титр бактериофага Asl25-УГСХА	Титр бактериофага Asl10/2-УГСХА	Титр бактериофага Asl11-УГСХА
45	$0,3 \times 10^9 \pm 0,1 \times 10^9$	$0,9 \times 10^9 \pm 0,4 \times 10^9$	$0,2 \times 10^9 \pm 0,1 \times 10^9$
47	$0,3 \times 10^9 \pm 0,2 \times 10^9$	$0,5 \times 10^8 \pm 0,1 \times 10^8$	$0,2 \times 10^7 \pm 0,1 \times 10^7$
49	$0,4 \times 10^6 \pm 0,2 \times 10^6$	$0,9 \times 10^7 \pm 0,4 \times 10^7$	$0,4 \times 10^6 \pm 0,2 \times 10^6$
51	$0,7 \times 10^5 \pm 0,3 \times 10^5$	$0,8 \times 10^5 \pm 0,1 \times 10^5$	$0,3 \times 10^5 \pm 0,1 \times 10^5$
53	$0,5 \times 10^3 \pm 0,2 \times 10^3$	$0,8 \times 10^4 \pm 0,6 \times 10^4$	$0,5 \times 10^4 \pm 0,1 \times 10^4$
55	-	-	-
57	-	-	-
59	-	-	-
61	-	-	-
Контроль фага	$0,3 \times 10^9 \pm 0,2 \times 10^9$	$0,4 \times 10^9 \pm 0,1 \times 10^9$	$0,2 \times 10^9 \pm 0,1 \times 10^9$

Примечание: «-» - отсутствие негативных колоний

Все три бактериофага оказались не устойчивы к воздействию хлороформа.

По результатам исследования основных биологических свойств выделенных бактериофагов для дальнейшего конструирования бактериофагового биопрепарата был выбран бактериофаг Asl25-УГСХА, имеющий достаточно высокий спектр литической активности - 87,5%; уровень литической активности составляет $0,3 \times 10^9 \pm 0,2 \times 10^9$ по Грациа и 10^8 по Аппельману; строго специфичен; температурная устойчивость до 45-47°C, от 55°C погибает; к хлороформу не устойчив.

3.5 Определение технологических параметров изготовления и контроля бактериофагового биопрепарата для идентификации и индикации *A. salmonicida*

Для лабораторного производства и контроля качества разрабатываемого фагового биопрепарата нами были проведены исследования по определению оптимальных технологических параметров изготовления и контроля биопрепарата для идентификации и индикации *A. salmonicida*. Фаговый препарат готовится на МПБ. Оптимальные технологические параметры: температура культивирования фага Asl25-УГСХА 20-28°C, время пассажа – 12 часов, соотношение бактериофага и бактериальной культуры – 1:2, титр биопрепарата не ниже $0,4 \times 10^9 \pm 0,1 \times 10^9$ по Грациа и не ниже 10^9 по Аппельману. Биопрепарат хранится в условиях холодильника при температуре 4-6°C в герметичных флаконах до 3-х месяцев без снижения активности (сроки наблюдения).

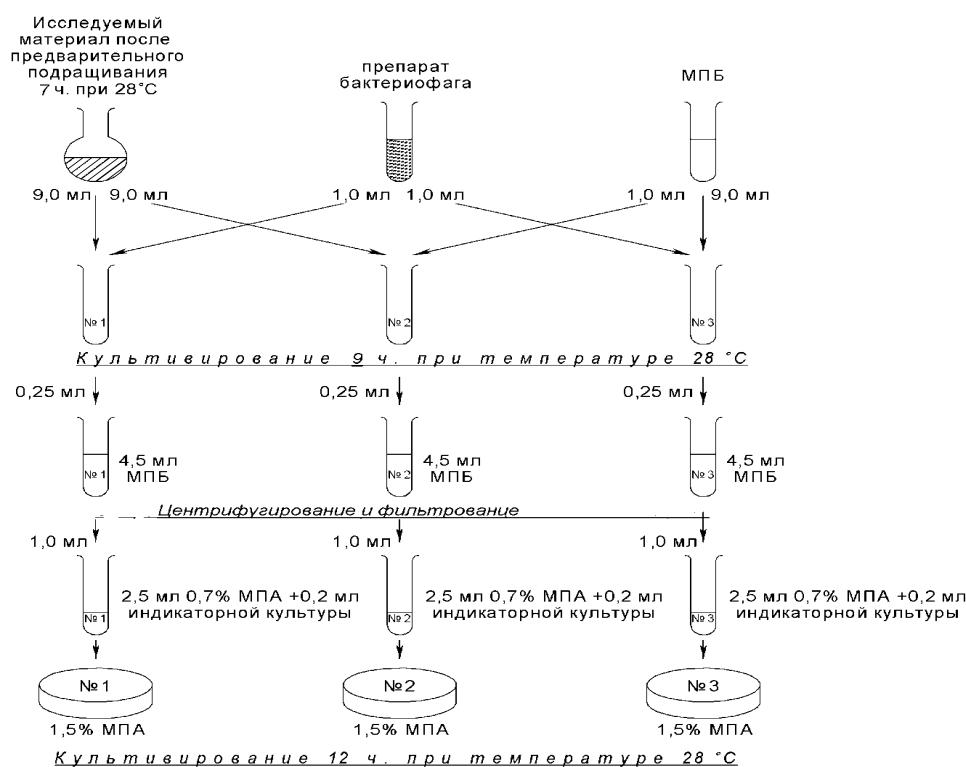
3.6 Разработка оптимальных условий постановки реакции нарастания титра фага с применением биопрепарата бактериофага Asl25-УГСХА

Для индикации бактерий *A. salmonicida* при помощи бактериофагового биопрепарата созданного на основе бактериофага Asl25-УГСХА были разработаны и модифицированы применительно к указанным бактериям и бактериофагам оптимальные условия постановки РНФ.

В разработку оптимальных условий постановки реакции нарастания титра фага входит: установление времени, обеспечивающего наиболее полноценное взаимодействие бактериофага с бактериями, температурный режим этапов постановки РНФ, количественный показатель реакции.

По результатам проведенных опытов было установлено, что наиболее оптимальным является режим РНФ с предварительным подрачиванием исследуемого материала в течение 7 часов и 9-часовой экспозицией исследуемого материала с фагом (титр $0,4 \times 10^9 \pm 0,1 \times 10^9$ по Грациа) при температуре 28°C (рис. 3).

Установленные параметры позволяют провести индикацию *A. salmonicida* в количестве не менее 10^3 КОЕ/мл в течение 28 часов.



Примечание: реакция считается положительной, если количество негативных колоний, образовавшихся на чашке Петри №1 превышает количество негативных колоний, образовавшихся на чашке Петри №3 в 5 и более раз.

Рисунок 3. Схема постановки реакции нарастания титра фага для индикации бактерий *A. salmonicida*

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенных исследований и их анализ позволяют сделать следующие выводы:

1. Были изучены тинкториальные и биологические свойства референс-штамма *A. salmonicida* ATCC 33658. Полученные данные использовались для разработки комплексной схемы выделения, идентификации и индикации *A. salmonicida*: специальных бактериологических сред - жидкая накопительная среда А.С1.1-УГСХА с хлоридом бария и дифференциально-диагностическая среда А.С1.2-УГСХА с конго рот, подобранных бактериологических тестов и бактериофагового биопрепарата для проведения спот-теста, позволяющая провести выделение и идентификацию за 60-84 часа. С помощью предложенной схемы в результате лабораторных исследований нами было выделено 23 штамма бактерий *A. salmonicida* из водных объектов г. Ульяновска и Ульяновской области, биологические особенности, которых подтверждают их принадлежность к исследуемому виду бактерий.

2. Из 23 «полевых» штаммов методом индукции было выделено 2 умеренных бактериофага, литическая активность которых составляет $0,7 \times 10^5 \pm 0,2 \times 10^5$ и $0,3 \times 10^6 \pm 0,1 \times 10^6$ по методу Грациа и 10^{-6} по методу Аппельмана.

Из объектов внешней среды методом накопления было выделено и изучено по биологическим свойствам 15 культур бактериофагов бактерий *A. salmonicida*. Выделенные бактериофаги имели различные типы негативных колоний: диаметр от 0,5 до 2,0 мм, прозрачные и полупрозрачные, с зоной вторичного лизиса и без нее, литическая активность варьирует от 10^{-7} до 10^{-9} по методу Аппельмана, от $0,5 \times 10^3 \pm 0,2 \times 10^3$ до $0,4 \times 10^9 \pm 0,1 \times 10^9$ по методу Грациа, спектр литической активности составляет от 70,8% до 87,5%. Выделенные бактериофаги строго специфичны по отношению к *A. salmonicida* и не лизируют бактерии других видов и родов (*A. hydrophila* ATCC 49140, *A. sobria* ATCC 9071, *A. caveae* ATCC 12633, *Ps. putida* №12633, *Ps. aeruginosa* №128, *Ps. fluorescens* №13525, *Y. ruckeri* №6, *Y. enterocolitica*, *P. mirabilis* №523, *Kl. pneumoniae* №4463, *E. coli* №4), не устойчивы к обработке хлороформом (в соотношении 1:10) и инактивируются при температуре 53°C.

3. Для фагового биопрепарата селекционирован бактериофаг Asl25- УГСХА, имеющий достаточно высокий спектр литической активности - 87,5%; уровень литической активности составляет $0,3 \times 10^9 \pm 0,2 \times 10^9$ по Грациа и 10^{-8} по Аппельману; строго специфичен; температурная устойчивость до 45-47°C, от 55°C погибает; к хлороформу не устойчив.

4. Определены оптимальные технологические параметры создания и хранения бактериофагового биопрепарата для идентификации и индикации *A. salmonicida*: температура культивирования фага Asl25-УГСХА 20-28°C, время пассажа – 12 часов, соотношение бактериофага и бактериальной культуры – 1:2, титр биопрепарата не ниже $0,4 \times 10^9 \pm 0,1 \times 10^9$ по Грациа и не ниже 10^{-9} по Аппельману. Биопрепарат хранится в условиях холодильника при температуре 4-6°C в герметичных флаконах до 3-х месяцев без снижения активности (сроки наблюдения).

5. Модифицированы оптимальные параметры постановки реакции нарастания титра фага с использованием биопрепарата на основе бактериофага Asl25-УГСХА, имеющего оптимальные для конструирования биопрепарата свойства, для ускоренной индикации бактерии *A. salmonicida*, позволяющие обнаружить в исследуемом материале указанные бактерии в концентрации 10^3 КОЕ/мл в течение 28 часов. Наиболее оптимальным является режим РНФ с предварительным подращиванием исследуемого материала в течение 7 часов и 9-часовой экспозицией исследуемого материала с фагом (титр $0,4 \times 10^9 \pm 0,1 \times 10^9$ по Грациа), при температуре 28°C.

6. Апробация созданной системы выделения, идентификации и индикации показала, что из исследуемых нами 378 проб воды и тканевого материала и органокомплекса рыбы, в 23 были обнаружены бактерии *A. salmonicida* штаммов

при помощи метода РНФ, что было подтверждено бактериологическим исследованием.

Практические предложения

1. Схема индикации и идентификации бактерии *A. salmonicida* включающая комплекс усовершенствованных специальных микробиологических сред (накопительную и дифференциально-диагностическую), бактериологические тесты, бактериофаговый биопрепарат для постановки спот-теста рекомендуется для применения в диагностике аэромоноза рыб с целью сокращения времени получения результатов до 60-84 ч при температуре 28°C.
2. Бактериофаговый биопрепарат на основе полученного бактериофага Asl25-УГСХА, имеющий высокий спектр литической активности (87,5%), уровень литической активности составляет $0,3 \times 10^9 \pm 0,2 \times 10^9$ по Грациа и 10^8 по Аппельману; строго специфичен; температурная устойчивость до 45-47°C. Соотношение бактериальной культуры и бактериофага – 1:2, время пассажа – 12 часов, температура культивирования - 28°C. Биопрепарат хранится в условиях холодильника, при температуре 4-6°C в герметичных флаконах до 3-х месяцев без снижения активности.
3. Для выявления бактерий *A. salmonicida* в концентрации не менее 10^3 КОЕ/мл рекомендуется использовать биопрепарат на основе бактериофага Asl25-УГСХА в реакции нарастания титра фага.
4. Материалы научных исследований рекомендуются для использования в учебном процессе при чтении лекций, для практических занятий студентов, работы аспирантов на кафедрах Ульяновской ГСХА имени П.А. Столыпина и УлГПУ имени И. Н. Ульянова.

Перспективы дальнейшей разработки темы

В перспективе дальнейшие исследования будут направлены на сохранение биологической активности бактериофагового препарата при стабильности его биологических свойств, разработка НИОКР в области бактериофаг-опосредованного биоконтроля.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Горшкова, Н.Г.** К вопросу о выделении и идентификации бактерии вида *Aeromonas salmonicida* / **Н.Г. Горшкова, Т.И. Канаева** // Актуальные вопросы микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и биотехнологии: материалы III-й Международной научно-практической конференции молодых ученых «Молодежь и наука XXI века». 23-26 ноября 2010. –Ульяновск, 2010. – Т. 3. – С.18-20.
2. **Горшкова, Н.Г.** Бактерия вида *Aeromonas salmonicida* / **Н.Г. Горшкова, Т.И. Канаева** // Актуальные вопросы микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и

биотехнологии: материалы III-й Международной научно-практической конференции молодых ученых «Молодежь и наука XXI века». 23-26 ноября 2010. – Ульяновск, 2010. – Т. 3. – С.16-18.

3. **Горшкова, Н.Г.** Конструирование схемы выделения и идентификации бактерий, вызывающих аэромоноз рыб / **Н.Г. Горшкова**, Д.А. Васильев, Т. И. Канаева, И.Г. Горшков, О.В. Коровенкова, И.Р. Насибуллин // Задачи ветеринарной науки в реализации доктрины продовольственной безопасности Российской Федерации (Текст): материалы Международной научно-практической конференции. 16-17 марта 2011. – Покров, 2011. – С.189-194.

4. **Горшкова, Н.Г.** Выделение и идентификация бактерий *Aeromonas salmonicida* из объектов внешней среды / **Н.Г. Горшкова**, И.Г. Горшков, Т.И. Канаева, Т.А. Гринева // Ветеринарная медицина XXI века: инновации, опыт, проблемы пути их решения: материалы Международной научно-практической конференции. 08-10 июня 2011. – Ульяновск, 2011. – Т. 1. – С. 77-79.

5. **Куклина, Н.Г.** Усовершенствование бактериологических методов диагностики фурункулеза лососевых рыб / Н.Г. Куклина, Д.А. Викторов // Молодые ученые в решении актуальных проблем науки: материалы Международной научно-практической конференции молодых ученых и специалистов. 14-15 ноября 2012. – Троицк, 2012. – С. 105-110.

6. **Куклина, Н.Г.** Разработка схемы выделения бактерии *Aeromonas salmonicida* / **Н.Г. Куклина**, И.Г. Горшков, Д.А. Викторов, Д.А. Васильев // Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения: материалы IV Международной научно-практической конференции. – Ульяновск, 2012. – Т. 1. – С. 286-291.

7. **Куклина, Н.Г.** Сравнительный анализ роста бактерий родов *Aeromonas* и *Pseudomonas* на средах с красителями / **Н.Г. Куклина**, И.Г. Горшков, Д.А. Викторов, Д.А. Васильев // Вестник ветеринарии. – Ставрополь: «Энтропос», 2012. – №63(4/2012). – С. 38-39.

8. **Куклина, Н.Г.** Исследование устойчивости бактерий рода *Aeromonas* к селективным компонентам / **Н.Г. Куклина**, И.Г. Горшков, Д.А. Викторов // Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения: материалы IV Международной научно-практической конференции. 22-24 ноября 2012. – Ульяновск, 2012. – Т. 1. – С. 245-248.

9. **Куклина, Н.Г.** Исследование селективных добавок питательных сред для бактерий рода *Aeromonas* / **Н.Г. Куклина**, И.Г. Горшков, Д.А. Викторов, Д. А. Васильев // Биотехнология: реальность и перспективы в сельском хозяйстве: материалы Международной научно-практической конференции. 28-29 января 2013. – Ульяновск, 2013. – С.175-177.

10. **Куклина, Н.Г.** Исследование особенностей азотного питания бактерий родов *Aeromonas* и *Pseudomonas* / **Н.Г. Куклина**, И.Г. Горшков, Т.А. Гринева,

А.П. Воротников, Д.А. Викторов, Д.А. Васильев// **Международный научно-исследовательский журнал = Research journal of international studies.** – Екатеринбург: «Индивидуальный предприниматель Соколова Марина Владимировна», 2013. – №1(8). – Ч. 1. – С. 75-76.

11. Куклина, Н.Г. Конструирование питательных сред для выделения и индикации бактерий рода *Aeromonas* / Н.Г. Куклина, И.Г. Горшков, Д.А. Викторов, Д.А. Васильев // Вестник ветеринарии. – Ставрополь: «Энтропос», 2013. – №1(64). – С. 75-77.

12. Куклина, Н.Г. Выделение бактериофагов *Aeromonas salmonicida* / Н.Г. Куклина, И.Г. Горшков, Д.А. Викторов, И.Р. Насибуллин, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин // Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности: материалы Международной научно-практической конференции. 23-25 апреля 2013. – Т. 2. – Ульяновск, 2013. – С. 3-4.

13. Куклина, Н.Г. Перспективы применения бактериофагов для индикации патогенных бактерий рода *Aeromonas* / Н.Г. Куклина, И.Г. Горшков, Д.А. Викторов, И.Р. Насибуллин, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин // Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности: материалы Международной научно-практической конференции. 23-25 апреля 2013. – Т. 2. – Ульяновск, 2013. – С. 5-7.

14. Куклина, Н.Г. Применение реакции нарастания титра фага для индикации аэромонад в рыбной продукции / Н.Г. Куклина, И.Р. Насибуллин, И.Г. Горшков, Д.А. Викторов, Д.А. Васильев, А.А. Нафеев // Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности: материалы Международной научно-практической конференции. 23-25 апреля 2013. – Ульяновск, 2013. – Т. 2. – С. 158-161.

15. Куклина, Н.Г. Разработка инновационных подходов решения проблем аэромоназов в рыбоводстве / Н.Г. Куклина, И.Г. Горшков, Д.А. Викторов, Д.А. Васильев, И. Р. Насибуллин // Стратегия инновационного развития агропромышленного комплекса: материалы Международной научно-практической конференции. 25-26 апреля 2013. – Курган, 2013. – С.243-247.

16. Куклина, Н.Г. Изучение культуральных свойств бактерии вида *Aeromonas salmonicida* / Н.Г. Куклина, И.Г. Горшков, Д.А. Викторов, Д.А. Васильев // Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения: Материалы V Международной научно-практической конференции. 11 июня 2013. – Ульяновск, 2013. – Т. 2. – С. 81-83.

17. Куклина, Н.Г. Мультиплексная ПЦР-система для индикации *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas veronii*, *Aeromonas sobria*, *Aeromonas salmonicida* / Н.Г. Куклина, Д.А. Викторов, А.В. Мاستиленко, Д.А. Васильев, И.Г. Горшков, И.Р. Насибуллин, Т.А. Гринева // Молекулярная диагностика: Сб. трудов VIII

Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. 18-20 марта 2014. – Москва, 2014. – Т. 2. – С. 506-507.

18. **Куклина, Н.Г.** Разработка биотехнологических параметров культивирования бактериофагов, активных в отношении *Aeromonas salmonicida* / **Н.Г. Куклина**, Д.А. Викторов, И.Г. Горшков, И.Р. Насибуллин, Д.А. Васильев // Аграрная наука в XXI веке: проблемы и перспективы: Материалы VIII Всероссийской научно-практической конференции. 01-31 марта 2014. – Саратов, 2014. – С. 227-230.

19. **Куклина, Н.Г.** Биопрепараты бактериофагов для лечения и профилактики бактериальных болезней рыб / **Н.Г. Куклина**, Т.А. Гринева, Д.А. Викторов, И.Г. Горшков, Е.Г. Логинова, Д.А. Васильев // Биотехнология. Взгляд в будущее: Материалы III Международной научной Интернет-конференции. 25-26 марта 2014. – Казань, 2014. – Т. 1. – С. 53-57.

20. **Куклина, Н.Г.** Бактериофаги, активные в отношении основных возбудителей бактериальных болезней рыб, и перспективы их применения в целях диагностики, лечения и профилактики / **Н.Г. Куклина**, Д.А. Викторов, Т.А. Гринева, Д.А. Васильев, И.Г. Горшков // Инфекция и иммунитет. – Санкт-Петербург, 2014. - №5. – С.71.

21. Куклина, Н.Г. Индикация бактерии *Aeromonas salmonicida* в водных объектах Ульяновской области методом реакции нарастания титра фага ASL25-УГСХА / **Н.Г. Куклина**, Д.А. Викторов, Д.А. Васильев // Современные проблемы ботаники, микробиологии и природопользования в Западной Сибири и на сопредельных территориях: материалы Всероссийской научной конференции с международным участием, посвященной 10-летию создания кафедры ботаники и экологии растений и кафедры микробиологии СурГУ. 28-29 мая 2015. – Сургут, 2015. – С. 113-115.

22. **Куклина, Н.Г.** Разработка бактериофагового препарата для индикации и идентификации бактерии *Aeromonas salmonicida* / **Н.Г. Куклина**, Д.А. Васильев, А.А. Щербина // Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности: материалы III научно-практической конференции с международным участием. 15-16 октября 2016. – Москва, 2016. – С. 76.

23. **Куклина, Н.Г.** Разработка бактериологической схемы выделения и идентификации бактерии *Aeromonas salmonicida* / **Н.Г. Куклина**, Д.А. Васильев, А.А. Нафеев // Международный научно-исследовательский журнал = *Research journal of international studies*. – Екатеринбург: «Индивидуальный предприниматель Соколова Марина Владимировна», 2017. – №4(58). – Ч. 1. – С. 27-30.

КУКЛИНА НАТАЛЬЯ ГРИГОРЬЕВНА

БАКТЕРИОФАГОВЫЙ ПРЕПАРАТ ДЛЯ
ИНДИКАЦИИ И ИДЕНТИФИКАЦИИ
AEROMONAS SALMONICIDA

06.02.02- ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология,
микология с микотоксикологией и иммунология

АВТОРЕФЕРАТ

Подписано в печать _____ г. Формат 60x84 1/16. Усл.печ. л. 1,0. Заказ № ____
Тираж 100 экз. Бумага офсетная. Гарнитура «Таймс». Печать трафаретная.