БАКИЕВ С.С.



АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ЭНДОЛИЗИНОВ БАКТЕРИОФАГОВ ПРОТИВ БАКТЕРИЙ С МНОЖЕСТВЕННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ

МОНОГРАФИЯ

Уральск, 2026 год

Министерство науки и высшего образования Республики Казахстан
Западно-Казахстанский университет имени М. Утемисова



Казахский Национальный университет им. аль-Фараби

Бакиев С.С.

АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ЭНДОЛИЗИНОВ БАКТЕРИОФАГОВ ПРОТИВ БАКТЕРИЙ С МНОЖЕСТВЕННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ

монография

Уральск, 2026 год

УДК 579.6
ББК 35.66
Б 19

Рекомендовано к изданию Ученым советом Западно-Казахстанского университета имени М.Утемисова (протокол №9 от 29 мая 2026 года)

Данная монография подготовлена в рамках реализации проекта Комитета науки Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан (грант № AP09259735)

Рецензенты:
Дарбаева Т.Е., доктор биологических наук, профессор, Западно-Казахстанский университет имени М.Утемисова, Республика Казахстан.
Жунусбаева Ж.К. - кандидат биологических наук, ассоциированный профессор, Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Республика Казахстан.
Гинаятов Н.С. - доктор философии (PhD), ассоциированный профессор, Западно-Казахстанский аграрно-технический университет имени Жангир хана, Республика Казахстан.

Б19 **Бакиев С.С.**
Антибактериальная эффективность эндолизинов бактериофагов против бактерий с множественной лекарственной устойчивостью: монография / С.С. Бакиев. – ЗКУ им. М.Утемисова, Уральск, 2026. – 220 с.

ISBN 978-601-266-829-2

В настоящей монографии представлены результаты исследований, направленных на изучение биологии патогенных бактерий осетровых рыб, выращиваемых в условиях регулируемых систем, определены морфологические, биохимические и молекулярно- генетические характеристики выделенных штаммов бактерий. Проведен анализ устойчивости бактерий к антибиотикам. Представлены результаты получения химерных эндолизинов включая создание их конструкций, трансформации и последующей очистки. Определена антибактериальная активность полученных эндолизинов в условиях *in vitro* и *in vivo*.

Монография представляет собой комплекс оригинальных исследовний и предназначена для бакалавров и магистрантов образовательных программ «Биология», преподавателей высшей школы, а также исследователей.



УДК 579.6
ББК 35.66

© Бакиев С.С., 2026
© НАО «Западно-Казахстанский университет имени М.Утемисова», 2026

СОДЕРЖАНИЕ

	ВВЕДЕНИЕ……..…….……..……..	5
ГЛАВА 1	БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ИНФЕКЦИИ…….....	7
1.1	Бактериальные инфекции при интенсивном культивировании осетровых……...	7
ГЛАВА 2	ИДЕНТИФИКАЦИЯ БАКТЕРИЙ……..……	15
2.1	Выделение и морфологическая характеристика изолятов бактерий……	16
2.2	Биохимическая идентификация…….	25
2.3	Молекулярно-генетическая идентификация…….	44
ГЛАВА 3	РЕЗИСТЕНТНОСТЬ БАКТЕРИЙ К АНТИБИОТИКАМ……	85
3.1	Устойчивость бактерий к антибиотикам в аквакультуре……	90
3.2	Анализ антибиотикорезистентности выделенных штаммов бактерий……	96
ГЛАВА 4	ПАТОГЕННОСТЬ БАКТЕРИЙ……..……	103
4.1	Анализ патогенности выделенных штаммов…….	115
4.2	Факторы вирулентности выделенных штаммов бактерий……	124
ГЛАВА 5	ЭНДОЛИЗИНЫ БАКТЕРИОФАГОВ – НОВЫЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЕ АГЕНТЫ……	130
5.1	Использование бактериофагов в инактивации бактерий…….	130
5.2	Бактериофагорезистентность бактерий…….	132
5.3	Эндолизины – пептидогликангидролазы клеточной стенки бактерий……	134
5.4	Получение родительских форм эндолизинов OBPgp279, Gp110 и LysPA26…..……	145
5.4.1	Клонирование генов OBPgp279, Gp110 и LysPA26 в вектор pET28c……...	145
5.4.2	Рестрикционный анализ вектора pET28c со вставкой генов OBPgp279, Gp110 и LysPA26…….…….	148
5.4.3	ПЦР идентификация вставок - генов OBPgp279, Gp110 и LysPA26 в векторной системе pET28c……	150
5.4.4	Индукция и очистка эндолизинов OBPgp279, Gp110 и LysPA26…….	152
5.5	Антибактериальная активность родительских форм эндолизинов *in vitro*…….……	154
5.5.1	Зимограмма анализ эдолизинов……..	154
5.5.2	Анализ антибактериальной активности эндолизинов против бактерий рода *Aeromonas*……	155
5.6	Антибактериальная активность родительских форм эндолизинов *in vivo*……..……	162
5.6.1	Анализ антибактериальной активности на модели тиляпии……..	163

5.6.2 Результаты лечения больных осетровых рыб……... 166
5.7 Конструирование и очистка химерных форм эндолизинов.… 168
5.7.1 Получение конструкций химерных форм эндолизинов…..…. 168
5.7.2 Очистка химерных эндолизинов и зимограмма анализ…….. 170
5.8 Антибактериальная активность химерных форм эндолизинов *in vitro* и *in vivo*……..……...…. 181
5.8.1 Определение активности химерных форм эндолизинов в условиях *in vitro*……..… 181
5.8.2 Определение активности химерных форм эндолизинов в условиях *in vivo*…….……..…….... 188
ЗАКЛЮЧЕНИЕ…….……..……. 191
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ…….…….. 193

ВВЕДЕНИЕ

В представленной монографии аккумулированы актуальные сведения о многолетних результатах изучения антимикробного потенциала фаговых эндолизинов, предназначенных для нейтрализации патогенной микрофлоры с множественной лекарственной резистентностью, провоцирующей заболевания у осетровых при интенсивном выращивании в установках замкнутого водоснабжения (УЗВ).

Разведение осетровых в искусственных условиях выступает стратегически значимым инструментом, направленным на сохранение биологического разнообразия и восстановление естественного воспроизводства этих видов. Параллельно с экологической составляющей, в последние годы фиксируется существенный рост объемов производства в аквакультуре, обусловленный повышенным мировым спросом на черную икру (Bronzi, 2014). Тем не менее интенсивное развитие отрасли омрачается массовыми вспышками бактериозов, возникающих вследствие стрессовых факторов и нарушения гигиены содержания, что ведет к высокой летальности и тяжелым финансовым потерям. К числу наиболее агрессивных этиологических агентов в осетроводстве относятся *Pseudomonas fluorescens* и *Aeromonas hydrophila* (Brunetti, 2006; Radosavljevic, 2019). Последняя признана ключевым патогеном, вызывающим практически стопроцентную гибель поголовья (Jiang, 2016). Клиническая картина при инвазии *Aeromonas hydrophila* включает развитие септических процессов с образованием мышечных язв, кишечных геморрагий, асцита и анальных кровотечений (Zhao, 2009). В свою очередь, один из старейших изученных патогенов рыб – *Aeromonas salmonicida* (Austin, 2011) – инициирует у осетровых специфическое поражение кожных покровов в форме фурункулеза (Kayis, 2017).

Представители видов *Pseudomonas fluorescens* и *Pseudomonas putida* классифицируются как первичные возбудители в высокоинтенсивных рыбных хозяйствах. Патологии, вызываемые данными бактериями, варьируются от хронических форм до острых геморрагических септицемий со смертностью выше 15%. Типичная симптоматика охватывает экзофтальм, деструкцию плавников, изъязвление кожи с очагами гиперемии и петехиальные высыпания (Kayis, 2017).

Критический рост штаммов, обладающих антибиотикорезистентностью, обусловлен повсеместным и зачастую бесконтрольным применением антимикробных препаратов, что сегодня является главной причиной падежа рыбы (Гинаятов, 2016; Kalatzis, 2018). Данная тенденция не только нивелирует эффективность стандартной терапии, но и ставит под сомнение биологическую безопасность продукции рыбоводства (Cabello, 2006). В связи с этим назрела острая необходимость в поиске альтернативных методов борьбы с полирезистентными патогенами.

В роли перспективной замены антибиотикам рассматривается применение бактериофагов, которое уже показало положительную динамику в элиминации ряда возбудителей в аквакультуре (Nakai, 2002; Almeida, 2019). Однако

результативность фаготерапии жестко лимитирована параметрами внешней среды, такими как температурный режим, уровень pH и соленость воды (Principi, 2019). Кроме того, высокая адаптивность бактерий позволяет им формировать механизмы защиты от заражения фагами, что вынуждает исследователей постоянно модифицировать фаговые коктейли.

Наиболее прогрессивным вектором сегодня признается использование эндолизинов – ферментов бактериофагов с пептидогликан-гидролазной активностью, способных разрушать бактериальную стенку для выхода вирионов из клетки-хозяина (Gerstmans, 2018). Экспериментальные данные *in vitro* и *in vivo* подтверждают исключительную способность эндолизинов лизировать клетки, включая штаммы с множетственной лекарственной устойчивостью. Важным отличием от фагов и антибиотиков является отсутствие формирования устойчивости у бактерий к воздействию данных ферментов. Более того, установлено, что специфические антитела не оказывают нейтрализующего действия на эндолизины, что допускает их многократное терапевтическое применение (Yang, 2014).

Классификация эндолизинов базируется на их ферментативной специфичности и включает три основные группы (Schmelcher, 2012): (i) гликозидазы, расщепляющие β-(1,4)-гликозидные связи сахарного скелета пептидогликана; (ii) амидазы, разрушающие связь между сахарами и пептидными цепями; (iii) эндопептидазы, воздействующие на аминокислотные связи. Тем не менее нативные эндолизины часто обладают низкой стабильностью, плохой растворимостью и зависимостью от присутствия вспомогательных агентов-пермеабилизаторов (Schmelcher, 2012; Yang, 2017). Решением данных проблем стало создание химерных ферментов путем перекомбинации доменов и укорочения молекул, что позволяет получать агенты с улучшенными характеристиками: повышенной активностью, растворимостью и расширенным спектром действия (Fernandes, 2012; Singh, 2014; Dong, 2015; Haddad, 2017).

За последнее десятилетие темпы изучения эндолизинов кратно возросли. Ряд препаратов, включая химерные формы, направленные на борьбу с грамотрицательными и грамположительными патогенами, уже проходят различные стадии доклинических и клинических испытаний в медицине и ветеринарии (Cassino, 2016; Rotolo, 2016; Jun, 2017; Jandourek, 2017a; Jandourek, 2017b; Ghahramani, 2017). Однако в сфере аквакультуры потенциал эндолизинов как высокоэффективных антимикробных средств остается практически нераскрытым, несмотря на постоянную угрозу эпизоотий.

ГЛАВА 1
БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ИНФЕКЦИИ

1.1 Бактериальные инфекции при интенсивном культивировании осетровых

Бактериальные патогены представляют собой уникальную категорию микроорганизмов, характеризующихся убиквитарностью – повсеместным распространением, что позволяет им интегрироваться практически во все сферы человеческой деятельности. От клинической медицины и агропромышленного комплекса до задач промышленной экологии и биотехнологии, микроскопические агенты оказывают определяющее влияние на стабильность биологических систем. Данный тезис находит прямое подтверждение в результатах представленных исследований, демонстрирующих высокую адаптивность патогенной микрофлоры к изменяющимся антропогенным условиям.

В современном мире состояние природных запасов осетровых видов рыб находится в фазе затяжной депрессии, характеризующейся ежегодным сокращением численности популяций. Ключевыми деструктивными факторами выступают прогрессирующая деградация экологических условий в естественных ареалах обитания, а также многолетний неконтролируемый промысел и широкомасштабное браконьерство. Длительное воздействие этих антропогенных нагрузок критически подорвало естественный репродуктивный потенциал осетровых, поставив многие виды на грань исчезновения (Luk’yanenko, 1999; Ruban, 2011).

В ответ на эти вызовы приоритетным вектором в мировой практике стали комплексные меры по сохранению реликтовых гидробионтов через их воспроизводство в контролируемых условиях. Использование установок замкнутого цикла водоснабжения (УЗВ) открывает новые возможности для аквакультуры, позволяя не только производить товарную продукцию, но и осуществлять искусственную генерацию молоди (Vasilyeva, 2019; Chandra, 2020). Такая стратегия способствует планомерной реставрации диких стад за счет систематического зарыбления водоемов сеголетками, выращенными в искусственной среде.

Однако интенсификация рыбоводства в УЗВ порождает новые риски. Несмотря на возможность прецизионного контроля гидрохимических параметров, искусственная среда остается уязвимой для биологических угроз. Бактериальные агенты выступают здесь главными инициаторами массовых эпизоотий, которые могут вспыхивать спонтанно и развиваться молниеносно. Согласно экспертным оценкам Продовольственной и сельскохозяйственной организации (ФАО) ООН, именно инфекционные патологии признаны фундаментальным лимитирующим фактором развития аквакультуры. Экономический эквивалент глобального ущерба от болезней рыб оценивается примерно в 6 млрд долл. США ежегодно, что делает вопросы биобезопасности первостепенными (World Bank, 2014; Бисенбаев, 2020).

Бактериозы доминируют в структуре нозологического профиля при интенсивном культивировании осетровых. Анализ данных, представленных Sergaliyev и др. (2017), показывает, что более половины всех патологических состояний (56,7%) имеют инфекционную природу. При детальном рассмотрении выясняется, что доля бактериальных инвазий составляет 55,2%, в то время как грибковые поражения занимают лишь 1,5%, а оставшиеся 43,3% приходятся на незаразные заболевания и нарушения обмена веществ.

Центральное место в патологии осетровых занимают представители родов *Aeromonas* и *Pseudomonas*. Эти микроорганизмы являются этиологическими агентами аэромоноза и псевдомоноза – системных инфекций, способных парализовать работу рыбоводного хозяйства (Бисенбаев, 2020; Исбеков, 2020; Bakiyev, 2021). Бактерии рода *Aeromonas* заслуживают особого внимания как прямые возбудители септицемии подвижных аэромонад и фурункулеза. Аэромоноз, инициируемый патогеном *Aeromonas hydrophila*, характеризуется широкой специфичностью и диагностируется у подавляющего большинства представителей семейства *Acipenseridae* (Meng, 2011; Di, 2018).

В свою очередь, *Aeromonas salmonicida* традиционно ассоциируется с фурункулезом лососевых (Lim, 2020), карповых (Ling, 2019) и окуневых рыб (Rupp, 2019). Однако в условиях УЗВ данный патоген также представляет серьезную угрозу для осетровых. Клиническая картина заболевания характеризуется глубокой деструкцией мышечных тканей с формированием множественных гнойных очагов (фурункулов), что ведет к тяжелой интоксикации организма (Bakiyev, 2021). Исследования подтверждают, что уровень летальности при вспышках, вызванных патогенными аэромонадами и псевдомонадами, в условиях высокой плотности посадки может достигать критической отметки в 100% (Jiang, 2016). Таким образом, постоянный прессинг патогенной микрофлоры является не просто ветеринарной проблемой, а стратегическим барьером, сдерживающим технологический и экономический прогресс современного осетроводства.

Согласно обобщенным данным, представленным в источнике (Fernández-Bravo, 2020), микроорганизмы, относящиеся к таксономическому роду *Aeromonas*, представляют собой одну из наиболее репрезентативных и экологически пластичных групп микрофлоры, колонизирующих как глобальную гидросферу, так и различные почвенные горизонты. На сегодняшний день систематика рода насчитывает порядка 36 верифицированных видов, каждый из которых обладает уникальным адаптационным потенциалом (Bakiyev, 2021). В фундаментальных работах (Хоулт, 1997) представители данной группы характеризуются как грамотрицательные палочковидные бактерии, лишенные способности к спорообразованию, что, однако, не снижает их выживаемость в неблагоприятных условиях среды. Подавляющее большинство идентифицированных видов, в числе которых *Aeromonas hydrophila, Aeromonas sobria, Aeromonas veronii, Aeromonas caviae* и *Aeromonas bestiarum*, обладают выраженной локомоторной активностью. Исторически сложившееся представление о виде *Aeromonas salmonicida* как о неподвижном объекте в

последние годы подверглось пересмотру: обнаружено существование атипичных штаммов, способных инициировать двигательную функцию при возникновении специфических метаболических триггеров или изменении физико-химических параметров среды. Будучи факультативными анаэробами и проявляя оксидазоположительную реакцию, эти бактерии демонстрируют температурный оптимум развития в интервале 22–28 °C. Тем не менее их экологическая толерантность значительно шире: зафиксированы терморезистентные штаммы, способные к активной вегетации при температуре 37 °C, что сближает их по физиологическим характеристикам с патогенами теплокровных (Bakiyev, 2021).

Глубокое изучение фенотипических признаков позволило количественно оценить распространенность ключевых факторов вирулентности. Установлено, что подвижность является стабильным признаком для 96% изолятов *Aeromonas hydrophila* и *Aeromonas sobria*, а также для 94% исследованных штаммов *Aeromonas caviae*. Эти данные подчеркивают значимость хемотаксиса в поиске субстрата и колонизации организма хозяина. Кроме того, важным дифференциально-диагностическим признаком является способность к газообразованию в ходе ферментации глюкозы. Исследование (Altwegg, 1990) показало резкую дивергенцию по этому признаку: если у *Aeromonas hydrophila* и *Aeromonas sobria* активное газообразование фиксируется в 80% случаев, то в популяции *Aeromonas caviae* этот биохимический маркер встречается лишь у 5% штаммов (Bakiyev, 2021). Механика движения бактериальных клеток жестко детерминирована их генотипом и варьирует в зависимости от принадлежности штамма к определенной экологической группе – психрофилам, мезофилам или термофилам. Интересными представляются данные о том, что даже в популяциях традиционно «неподвижной» *Aeromonas salmonicida* около 1% клеток сохраняют способность к активному перемещению. Эта функция напрямую коррелирует с температурным фактором: экспрессия генов, кодирующих синтез полярного жгутика, активизируется преимущественно в субоптимальном диапазоне (30–37 °C). В то же время у психротрофных форм, адаптированных к холодным водам, при снижении температуры до 25 °C и ниже наблюдается феномен ингибирования локомоции, что может рассматриваться как механизм энергосбережения клетки (McIntosh, 1991).

На молекулярном уровне регуляция подвижности обеспечивается работой специфических генных локусов. Исследования (Umelo, 1997) на эталонном штамме *Aeromonas salmonicida* A449 позволили локализовать гены *fla*A и *fla*B, выступающие основными архитекторами биосинтеза полярных жгутиков (Umelo, 1997). Изучение мутагенеза в этих локусах у *Aeromonas caviae* показало, что одиночные генетические поломки не всегда приводят к полной элиминации жгутикового аппарата. Однако такие изменения критически сказываются на патогенном потенциале: зафиксировано двукратное снижение общей метаболической энергии клеток и существенное ослабление их адгезивных свойств (Rabaan, 2001). Это указывает на прямую связь между генетикой подвижности и способностью патогена формировать резистентные

биопленки на поверхностях оборудования УЗВ или тканях рыб. Согласно системным обзорам (Batra, 2016), аэромонады являются типичными представителями убиквитарной микрофлоры, чьи ареалы охватывают почвенную среду, водные экосистемы и различные сегменты продовольственного рынка (Bakiyev, 2021). В работах (Brandi, 1996) обосновывается концепция почвы как первичного природного депо для накопления цитотоксических и инвазивных штаммов данного рода. Установлено, что виды *Aeromonas hydrophila, Aeromonas caviae* и *Aeromonas sobria* способны персистировать в почвенном субстрате, сохраняя полный набор факторов вирулентности в течение рекордных 150 суток. Данное обстоятельство формирует скрытые очаги инфекции, представляющие эпидемиологическую угрозу для сельскохозяйственных животных и персонала рыбоводных хозяйств (Bakiyev, 2021).

В то время как почвенный путь передачи часто носит транзиторный характер, контаминированные продукты питания представляют собой фактор прямого риска для здоровья человека. Бактерии рода *Aeromonas* прочно интегрировались в пищевую цепочку, успешно колонизируя сырое мясо, филе ценных видов рыб, а также молочную продукцию (Alhazmi, 2015). Масштабный микробиологический скрининг продовольственных товаров (Alhazmi, 2015) позволил определить долевое участие конкретных видов в обсеменении продуктов: доминирующее положение занимает *Aeromonas hydrophila* (56,8%), тогда как на долю *Aeromonas sobria* приходится 43,1% случаев (Bakiyev, 2021). Тем не менее основной и наиболее благоприятной нишей для жизнедеятельности и активной репродукции аэромонад остается водная среда. Исследования (Burke, 1984) подтвердили присутствие данных бактерий как в открытых природных водоемах, так и в системах питьевого водоснабжения. Полученные результаты свидетельствуют о том, что стандартная процедура хлорирования существенно снижает титр патогенов, однако не обеспечивает их полную инактивацию. Это подчеркивает высокую адаптивную пластичность аэромонад и их способность выживать в условиях воздействия агрессивных факторов внешней среды (Bakiyev, 2021). Таким образом, исключительная приспособленность бактерий рода *Aeromonas* к существованию в водном биоме делает их потенциально опасными агентами для большинства гидробионтов, требуя разработки инновационных стратегий контроля и профилактики в современном рыбоводстве.

Тем не менее, основной и наиболее благоприятной нишей для жизнедеятельности и активной репродукции аэромонад остается водная среда. Исследования (Burke, 1984) подтвердили присутствие данных бактерий как в открытых природных водоемах, так и в системах питьевого водоснабжения. Полученные результаты свидетельствуют о том, что стандартная процедура хлорирования, проводимая в соответствии с нормативами качества питьевой воды, существенно снижает титр патогенов, однако не обеспечивает их полную инактивацию. Это подчеркивает высокую адаптивную пластичность аэромонад и их способность выживать в условиях воздействия агрессивных факторов внешней среды (Bakiyev, 2021).

Бактериальные агенты рода *Aeromonas* демонстрируют высокую степень адаптации к существованию в водных экосистемах, что определяет их статус как серьезной угрозы для широкого спектра гидробионтов (Bakiyev, 2021). Биологические особенности данных микроорганизмов позволяют им эффективно колонизировать различные экологические ниши внутри водного биома, превращая их в постоянный источник инфекционной опасности.

В частности, видовой состав ихтиофауны, наиболее подверженной патогенному воздействию аэромонад, включает как промысловые, так и декоративные виды. Перечень основных групп рыб, у которых зафиксированы заболевания, инициированные данными патогенами, систематизирован в таблице 1.

Таблица 1 – Представители ихтиофауны в аквакультуре, восприимчивые к инфекциям, инициированным бактериями рода *Aeromonas* (Bakiyev, 2021).

Возбудитель болезни	Объект исследования	Авторы и ссылки
Aeromonas hydrophila	*Cyprinus carpio L.*	(Guz, 2004)
	Acipenser baerii	(Cao, 2010)
	Acipenser schrenckii	(Meng, 2011)
	Clarias gariepinus	(Laith, 2014)
	Acipenser gueldenstaedtii	(Kayis, 2017)
	Acipenser sinensis	(Di, 2018)
Aeromonas sobria	*Acipenser baeri*	(Kayis, 2017)
Aeromonas veronii	*Carassius gibelio*	(Sun, 2016; Chen, 2019)
	Acipenser stellatus, Huso huso	(Gholamhosseini, 2018)
Aeromonas salmonicida	*Oreochromis niloticus*	(Hassan, 2017)
	Oncorhynchus masou	(Fryer, 1988)
	Oncorhynchus kisutch	(Chapman,1991)
	Carassius auratus	(Nikapitiya, 2019)

С учетом вышеизложенного, ключевыми этиологическими агентами бактериальной природы, относящимися к роду *Aeromonas* и инициирующими развитие патологических процессов у объектов промышленного рыбоводства, выступают виды *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Aeromonas veronii*, *Aeromonas caviae* и *Aeromonas sobria*.

Каждый из указанных патогенов обладает специфическим набором факторов вирулентности, позволяющих им эффективно колонизировать организм хозяина в условиях интенсивного выращивания. Превалирование того или иного вида в структуре заболеваемости зачастую коррелирует с типом рыбоводного хозяйства и физиологическим состоянием культивируемых гидробионтов.

Согласно фундаментальным данным источника (Baron, 1996), таксономический род бактерий *Pseudomonas* представляет собой одну из самых многочисленных и экологически пластичных групп микроорганизмов, широко распространенных в биосфере и включающую в себя порядка 144

верифицированных представителей. Морфологически псевдомонады характеризуются как грамотрицательные палочковидные бактерии, обладающие выраженной подвижностью. Локомоторная активность данных агентов обеспечивается наличием специализированного жгутикового аппарата, состоящего из единственного или нескольких полярно расположенных жгутиков.

Исключительная адаптивность представителей рода *Pseudomonas* проявляется в их способности сохранять жизнеспособность в экстремально широком температурном диапазоне: от психрофильных форм, таких как *Pseudomonas fluorescens*, вегетирующих при 4 °C, до мезофильных и термотолерантных патогенов, в частности *Pseudomonas aeruginosa*, способных к активной репродукции при температуре 41 °C. В микробиологической практике наиболее значимыми признаны виды *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* и *Pseudomonas putida*. Эти бактерии объединены в специфическую группу флуоресцирующих псевдомонад благодаря их способности синтезировать диффундирующие в среду пигменты (Bakiyev, 2021). Автором (Meyer, 2000) подчеркивается, что ключевым диагностическим признаком для *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* и ряда других родственных видов является продукция желто-зеленого флуоресцентного сидерофора, известного как пиовердин. Данная биохимическая особенность широко используется в лабораторной дифференциации для оперативной идентификации патогенов рода *Pseudomonas* (Bakiyev, 2021).

Повсеместное присутствие бактерий рода *Pseudomonas* в почвенных горизонтах и гидросфере делает их глобальными обитателями планеты. Как отмечает автор (Noura, 2009), подобная убиквитарность в сочетании с высокой метаболической активностью превращает псевдомонад в опасных агентов для представителей как флоры, так и фауны. Вследствие этого они выступают этиологическими факторами разнообразных нозологий у растений, животных и человека, демонстрируя широкий спектр патогенности (Bakiyev, 2021).

Одним из наиболее агрессивных почвенных патогенов признан вид *Pseudomonas aeruginosa*. Исследования (Green, 1974), проведенные на 58 образцах почв в различных аграрных зонах Калифорнии, выявили присутствие данного микроорганизма в четверти проанализированных проб. Это позволяет рассматривать почву как стратегический природный резервуар, в котором псевдомонады способны персистировать как в состоянии метаболического покоя, так и переходить к активной жизнедеятельности при возникновении благоприятных условий (Bakiyev, 2021). Авторами (Tiwari, 2011; Sah, 2016) указывается на сложность и многогранность микробных сообществ в почве, где взаимоотношения псевдомонад с другими членами микробиоценоза остаются одной из наименее изученных областей современной микробиологии (Bakiyev, 2021).

Не менее значимым ареалом распространения рода *Pseudomonas* является водная среда. В источнике (Khan, 2007) приводятся данные об успешном выделении изолятов *Pseudomonas aeruginosa* из различных гидрологических объектов: от пресноводных рек и озер до проб воды, отобранных в открытом

океане (Bakiyev, 2021). Согласно источникам (Vaz-Moreira, 2012; Flores, 2014), помимо естественных акваторий, представители *Pseudomonas spp.* регулярно обнаруживаются в системах централизованного питьевого водоснабжения. Это формирует серьезный риск контаминации и последующего инфицирования человека через бытовые контакты.

Особую тревогу вызывает тот факт, что изоляты псевдомонад, выделенные из питьевой воды, зачастую обладают множественной антибиотикорезистентностью, что существенно осложняет терапию вызываемых ими клинических состояний (Bakiyev, 2021). В работе (Baron, 1996) подчеркивается доминирующая роль видов *Pseudomonas aeruginosa* и *Pseudomonas maltophilia* в патологии человека: на их долю приходится около 80% всех диагностируемых случаев псевдомонадных инфекций в клинической практике (Bakiyev, 2021).

Параллельно с угрозой для человека, псевдомонады, как типичные обитатели водной среды, представляют критическую опасность для большинства гидробионтов. Согласно данным источника (Gaffney, 2008), данные бактерии инициируют тяжелые патологии у различных видов рыб (детальный перечень которых представлен в таблице 2), а также зафиксированы как причина заболеваний у морских млекопитающих, в частности калифорнийских морских львов (*Zalophus californianus*) и обыкновенных тюленей (*Phoca vitulina*) (Bakiyev, 2021). Таким образом, бактерии рода *Pseudomonas* являются мощным инфекционным фактором, способным оказывать деструктивное влияние на биологическое разнообразие и экономическую эффективность аквакультуры.

Таблица 2 – Основные патогены рода *Pseudomonas*, вызывающие заболевания у различных объектов аквакультуры (Bakiyev, 2021)

Возбудитель болезни	Объект исследования	Характер патогенного воздействия	Авторы и ссылки
1	*2*	*3*	*4*
Pseudomonas aeruginosa	*Cyprinus carpio, Oreochromis niloticus, Clarias gariepinus*	Вызывает геморрагическую септицемию, некроз мышечной ткани и системную интоксикацию	(Magdy, 2014)
Pseudomonas fluorescens	*Acipenser baerii*	Провоцирует плавниковый некроз, язвенные поражения кожи и висцеральные кровоизлияния	(Brunetti, 2006; Kayis, 2017)
	Clarias gariepinus, Oreochromis niloticus, Liza ramada		(El-Barbary, 2016)

продолжение таблицы 2

1	*2*	*3*	*4*
Pseudomonas putida	*Oncorhynchus mykiss*	Часто выступает как вторичный патоген, усиливая деструктивные процессы в жабрах и кожных покровах	(Altinok, 2006)
	Liza ramada		(El-Barbary, 2016)
	Acipenser baerii		(Kayis, 2017)

Таким образом, проводя детальный анализ этиологической структуры бактериозов в аквакультуре, можно констатировать, что среди представителей ихтиофауны наиболее значимыми и эпидемиологически опасными патогенами из рода *Pseudomonas* являются три ключевых вида: *Pseudomonas fluorescens, Pseudomonas putida* и *Pseudomonas aeruginosa*.

Каждый из этих видов обладает специфическим набором адаптивных механизмов, позволяющих им доминировать в различных экологических нишах рыбоводных хозяйств: *Pseudomonas fluorescens* - является основным возбудителем псевдомоноза у холодноводных рыб (лососевых, осетровых в зимний период). Благодаря своей психрофильности, эта бактерия способна активно размножаться и вызывать плавниковый некроз и геморрагии даже при низких температурах воды, когда иммунная система рыб находится в состоянии физиологического угнетения; *Pseudomonas putida* - ранее считавшаяся преимущественно сапрофитной, в современных условиях интенсивного выращивания она все чаще идентифицируется как патоген, вызывающий системные поражения у радужной форели и окуневых. Её способность к деградации широкого спектра органических соединений позволяет ей успешно колонизировать биопленки в системах фильтрации УЗВ. *Pseudomonas aeruginosa* - обладает наиболее мощным арсеналом факторов вирулентности, включая экзотоксин А и сидерофоры. Этот вид вызывает наиболее тяжелые формы септицемии, характеризующиеся высокой летальностью и устойчивостью к большинству традиционных антибиотиков, что делает его критическим объектом для ветеринарного контроля.

Совокупное воздействие этих патогенов формирует постоянный инфекционный фон в рыбоводных емкостях. Учитывая их способность к быстрой передаче через водную среду и высокую резистентность, данные виды псевдомонад, наряду с аэромонадами, определяют необходимость поиска альтернативных антибактериальных средств, способных эффективно разрушать бактериальные клетки без риска развития лекарственной устойчивости.

ГЛАВА 2
ИДЕНТИФИКАЦИЯ БАКТЕРИЙ

Согласно фундаментальным положениям микробиологии (Pitt, 2012), одной из приоритетных задач исследования является точное определение таксономической принадлежности микроорганизмов, что служит базисом для их последующей межродовой и межвидовой систематизации. Без верификации конкретного возбудителя невозможна разработка эффективных протоколов лечения и профилактики. Как справедливо отмечают авторы (Sudheesh, 2012; Ruiz, 2020), практическая идентификация микроорганизмов представляет собой сложный процесс, первичным препятствием в котором выступают микроскопические размеры объектов исследования, требующие использования высокоточного оборудования и специфических методов визуализации (Bakiyev, 2021).

В современной аквакультуре микробиоценоз водной среды характеризуется значительным разнообразием. Часть микроорганизмов интегрирована в технологический процесс УЗВ для решения задач биологической очистки, минерализации органических соединений и обеззараживания воды (например, нитрифицирующие бактерии биофильтров). Однако наряду с полезной микрофлорой в системе всегда присутствуют патогенные и условно-патогенные формы, оказывающие деструктивное воздействие на здоровье рыб. Именно для раннего обнаружения и дифференциации этих опасных агентов необходима своевременная и точная идентификация (Bakiyev, 2021).

Согласно источнику (Franco-Duarte, 2019), современная диагностика базируется на трех основных аналитических методов: 1. Определение морфобиологических характеристик – первичный этап, включающий классические методы окрашивания (в частности, по Граму) с последующей световой и электронной микроскопией. Это позволяет оценить форму клеток, тип движения, наличие жгутиков и структуру клеточной стенки; 2. Изучение биохимических свойств – анализ ферментативной активности бактерий путем оценки их способности метаболизировать различные субстраты (ответные химические реакции). Определение способности к продукции протеаз, гемолизинов и расщеплению сахаров позволяет дифференцировать виды внутри родов *Aeromonas* и *Pseudomonas*; 3. Молекулярно-генетический анализ – наиболее точный метод, включающий полимеразную цепную реакцию (ПЦР) и секвенирование гена 16S рРНК. Использование ПЦР позволяет идентифицировать патоген даже при низкой концентрации в пробе, минуя длительный этап культивирования (Bakiyev, 2021).

Таким образом, комплексная идентификация патогенных бактерий является критическим звеном в системе биологической безопасности рыбных хозяйств. Она позволяет не только определить возбудителя текущей инфекции, но и прогнозировать динамику эпизоотической ситуации, что крайне необходимо для своевременного проведения адресных терапевтических

мероприятий и минимизации экономических рисков в индустриальном осетроводстве.

2.1 Выделение и морфологическая характеристика изолятов бактерий

Исследования по заболеваниям проводилось в ТОО «Учебно-научный комплекс опытно-промышленного производства аквакультуры» который является крупным аквакультурным комплексом по выращиванию осетровых рыб в Республике Казахстан. Научно-производственная база ТОО «УНКОППА» позволяет комплексу проводить такие научно-исследовательские работы как искусственное оплодотворение и воспроизводство, выращивание молоди и половозрелых особей осетровых рыб, а также аквакультурным центром проводятся работы по зарыблению водоемов рыбопосадочным материалом. В ТОО «УНКОППА» выращиваются такие виды осетровых рыб как русский осетр (*Acipenser gueldenstaedtii*), сибирский осетр (*Acipenser baerii*), белуга (*Huso huso*) и стерлядь (*Acipenser ruthenus*) (Бисенбаев, 2020).

Как было расмотренно ранее известно, что наиболее распространенными заболеваниями в условиях искусственного воспроизводства осетровых рыб являются аэромоноз и псевдомоноз, которые наносят значительный экономический ущерб хозяйствующим субъектам (Sergaliyev, 2019; Radosavljevic, 2019). При хроническом течении заболевания, у рыб наблюдается вялость, слабая реакция на внешние раздражители и нарушение координации движений. Клинические признаки выражаются в основном глубокими язвенными поражениями с обозначенными краями и ярко красным дном, в различных частях тела осетровых рыб (Sergaliyev, 2017; Bakiyev, 2022).

При проведении комплексного анализа клинических проявлений бактериозов (аэромоноза и псевдомоноза) были детально исследованы особи сибирского осетра (*Acipenser baerii*) в возрасте 4 лет и стерляди (*Acipenser ruthenus*) в возрасте 3 лет, содержащиеся в условиях установок с замкнутым циклом водоснабжения (УЗВ). Данный возрастной период является критическим, так как рыбы достигают значительной биомассы, что при высокой плотности посадки в индустриальных условиях усиливает риск травматизации и последующей бактериальной инвазии.

В ходе исследований были верифицированы основные участки локализации язвенных поражений и геморрагических проявлений (кровоподтеков) на кожных покровах (рисунок 1).

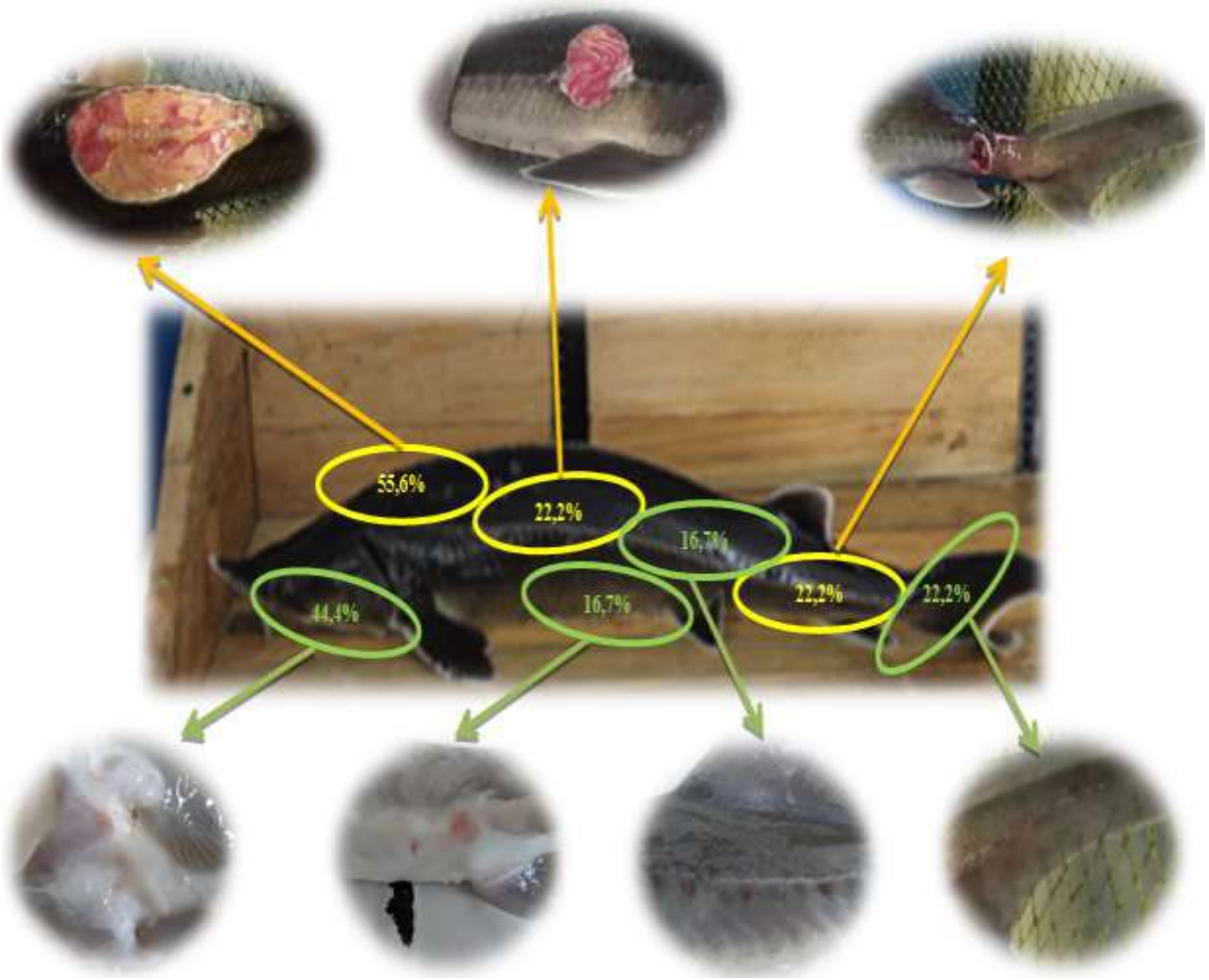


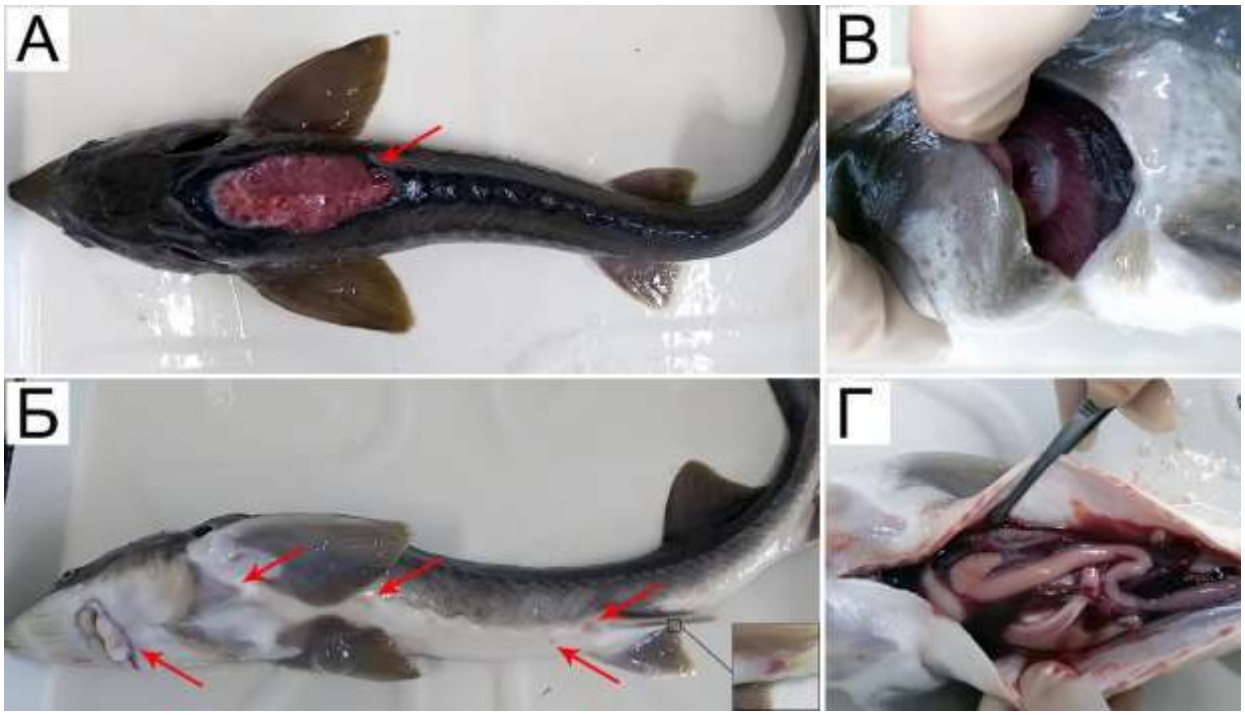
Рисунок 1 - Локализация язвенных проявлений и кровоподтеков на теле осетровых рыб при бактериологических заболеваниях

Анализ полученных данных показывает, что спинная область является наиболее уязвимой зоной для формирования язв (55,6%). Это может быть обусловлено особенностями гидродинамики в бассейнах УЗВ и более частым контактом спинной части рыб с элементами конструкций или сородичами, что приводит к микротравмам эпителия и облегчает внедрение *Aeromonas* spp. и *Pseudomonas* spp. (Bakiyev, 2021).

Локализация кровоподтеков преимущественно в области грудных плавников (44,4%) свидетельствует о высокой интенсивности сосудистых нарушений в зонах с активным кровоснабжением. Грудные плавники у осетровых выполняют важную роль в стабилизации положения тела, и их поражение бактериальными токсинами (гемолизинами, фосфолипазами) ведет к быстрой потере подвижности и общему угнетению организма.

Равномерное распределение язв в области боковых жучек и хвостового стебля (по 22,2%) подтверждает системный характер распространения инфекции. Деструкция тканей в области боковых жучек особенно опасна, так как разрушение костных щитков открывает прямой путь патогенам в глубокие слои дермы и мышечную ткань, инициируя необратимые некротические процессы, описанные ранее.

Для проведения достоверных бактериологических исследований ключевым этапом является прецизионный наружный осмотр и систематическое наблюдение за живыми объектами. В рамках данной работы осмотру подвергались особи сибирского осетра и стерляди, имеющие явные признаки угнетения или характерные кожные поражения. Процедура визуальной диагностики (рисунок 2) проводилась по стандартной ихтиопатологической методике, адаптированной для условий УЗВ.



А) глубокий проникающий некроз мышц в спинной области; Б) кровоизлияния в брюшной области и в области латеральных костных жучек, а также воспаление анального отверстия; В) жаберная ишемия; Г) наличие кровянистой жидкости в брюшной полости.

Рисунок 2 – Особь сибирского осетра *(Acipenser baerii)* с глубоким проникающим некрозом мышц в спинной области (Bakiyev, 2022)

При проведении патологоанатомического вскрытия больных особей сибирского осетра и стерляди была зафиксирована типичная картина генерализованного инфекционного процесса, характерная для тяжелых форм аэромоноза и псевдомоноза. Комплекс выявленных изменений свидетельствует

о глубокой интоксикации и нарушении гомеостаза внутренней среды организма.

В ходе вскрытия в брюшной полости пораженных рыб обнаруживалось значительное скопление экссудата. Количество жидкости варьировало в зависимости от стадии заболевания, а её характер изменялся от прозрачного и желтоватого (серозный экссудат) до выраженного кровянистого (геморрагический экссудат). Наличие жидкости в сочетании с явлениями перитонита указывает на высокую проницаемость сосудистого русла, вызванную воздействием бактериальных фосфолипаз и токсинов (Bakiyev, 2021).

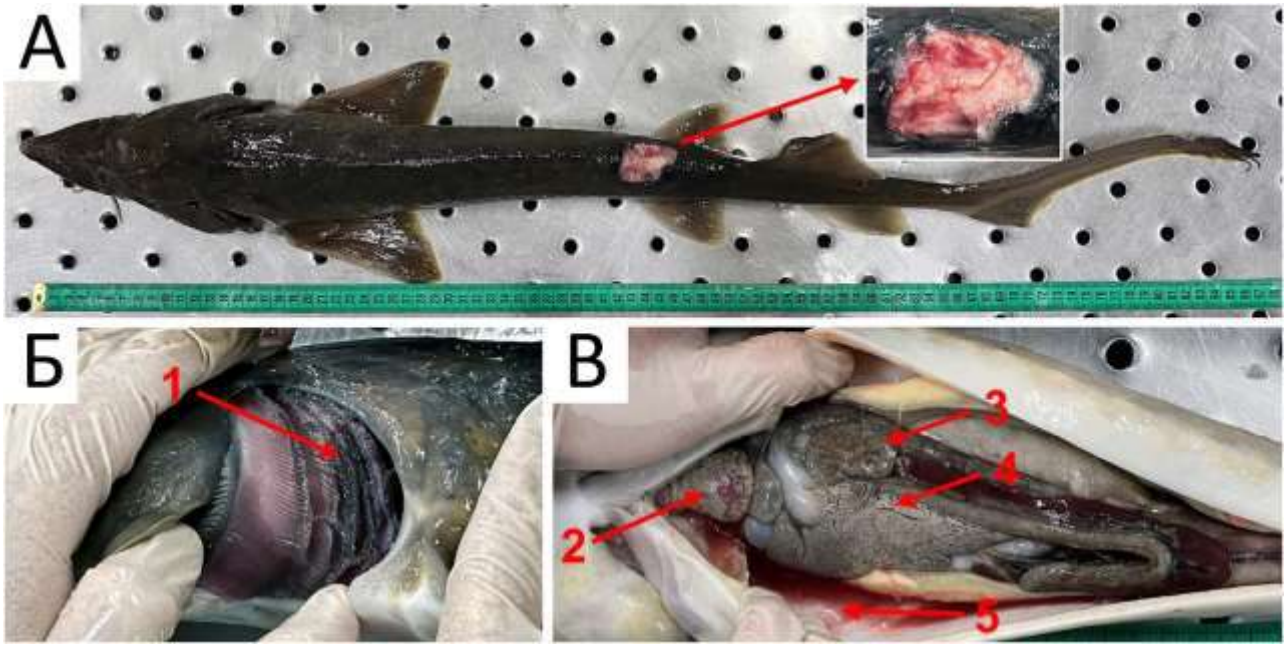
При детальном патоморфологическом анализе отдельных особей осетровых был выявлен ряд специфических признаков, свидетельствующих о глубоком поражении сердечно-сосудистой системы и системном характере инфекции. Одним из наиболее значимых диагностических маркеров стал перикардит, сопровождающийся множественными петехиальными кровоизлияниями (точечными гематомами) на эпикарде.

Такая клиническая картина обусловлена деструктивным воздействием внеклеточных продуктов жизнедеятельности бактерий, в частности сериновой протеазы и гемолизинов. Эти ферменты вызывают лизис эндотелия сосудов и нарушают целостность капиллярной сети сердечной сорочки, что ведет к выпоту экссудата и формированию очагов экстравазатов.

Параллельно с внутренними поражениями у больных рыб регистрировалось выраженное потемнение кожного покрова. Этот симптом часто связан с нарушением нейроэндокринной регуляции меланофоров на фоне общей интоксикации организма и поражения почек (органа, отвечающего в том числе за кроветворение и эндокринный баланс). Системные кровоизлияния во внутренних органах – печени, селезенке и почках – дополняют картину острого септического процесса.

Совокупность этих признаков – перикардит, точечные кровоизлияния на паренхиматозных органах и меланоз кожи – является патогномоничной для возбудителя *Aeromonas salmonicida*. Согласно данным фундаментальных исследований (Stratev, 2017; Lian, 2017; Wang, 2020; Bakiyev, 2023), именно этот патоген обладает наиболее агрессивным набором факторов вирулентности, инициирующих каскад сосудистых нарушений у осетровых в условиях интенсивной аквакультуры.

Выявление подобных признаков на рисунке 3 позволяет дифференцировать классический фурункулез от других форм бактериальных геморрагических септицемий на этапе патологоанатомического вскрытия, что критически важно для оперативного назначения специфической терапии, в том числе с применением бактериофагов и их производных.



А) некроз мышц (глубоко проникающий) в дорсальной области; Б) бледные жабры; некротизированные периферические части жаберных лепестков (1); В) клинические симптомы внутренних органов при патологоанатомическом исследовании. Перикардит с петехиальными кровоизлияниями (2). Селезенка (3) и печень серовато-белого цвета (4). Скопление кровянистого экссудата в брюшной полости (5).

Рисунок 3 – Патоморфологические изменения сердечно-сосудистой системы у особи сибирского осетра (*Acipenser baerii*) при генерализованной форме бактериоза (Bakiyev, 2023)

На основании данных первичного клинического осмотра и выявленных патологоанатомических изменений был реализован этап систематического отбора проб для верификации этиологического агента инфекции. В рамках исследования было отобрано и проанализировано 90 проб биологического материала, что обеспечивает высокую статистическую достоверность полученных результатов и позволяет составить полную картину бактериальной обсемененности объектов выращивания в УЗВ.

Основной массив биологических проб (смывов и соскобов) был получен непосредственно с язвенных поражений на кожных покровах спинной и боковой областей, а также хвостового стебля. Выбор данных участков обусловлен высокой локальной концентрацией возбудителей в зонах активного некроза тканей. Параллельно с наружным отбором проводилось взятие проб из внутренних органов павших и вынужденно забитых рыб (печени, почек, селезенки и сердца), что критически важно для подтверждения системного характера инфекции (бактериемии) и исключения поверхностной контаминации сапрофитной микрофлорой.

Для реализации задач по идентификации и изучению этиологической структуры бактериозов в условиях индустриального осетроводства был

проведен комплексный микробиологический скрининг. Экспериментальная работа базировалась на штаммах бактерий, выделенных непосредственно из патологических очагов больных особей сибирского осетра (*Acipenser baerii*), культивируемого в установках замкнутого цикла водоснабжения (УЗВ) ТОО «УНКОППА» (г. Уральск, Казахстан). Данный объект является репрезентативным для изучения динамики бактериальных сообществ в условиях высокой плотности посадки и замкнутого водооборота.

В качестве основных питательных сред для культивирования и накопления биомассы микроорганизмов применяли среду ЛБ (Luria-Bertani) и ЛБ-агар (Bertani, 1951), а также классические мясопептонный бульон (МПБ) и мясопептонный агар (МПА), обеспечивающие оптимальный нутриентный фон для роста грамотрицательных мезофильных патогенов. Посев проб биологического материала, включающий смывы с открытых язвенных ран и пункции внутренних паренхиматозных органов пораженных рыб, осуществляли в стерильных условиях с использованием пробирок и чашек Петри. Культивирование проводилось в течение 24 часов в стационарном термостате при температуре 30 °C, что соответствует физиологическому оптимуму для проявления метаболической активности и экспрессии факторов вирулентности аэромонад и псевдомонад (рисунок 4).

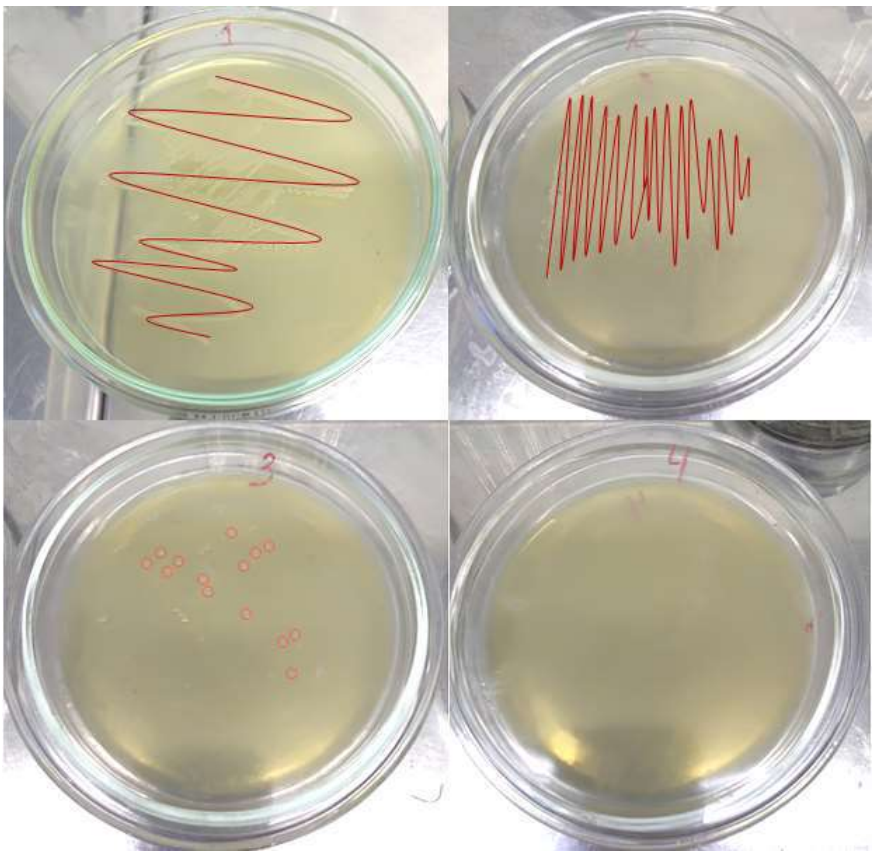
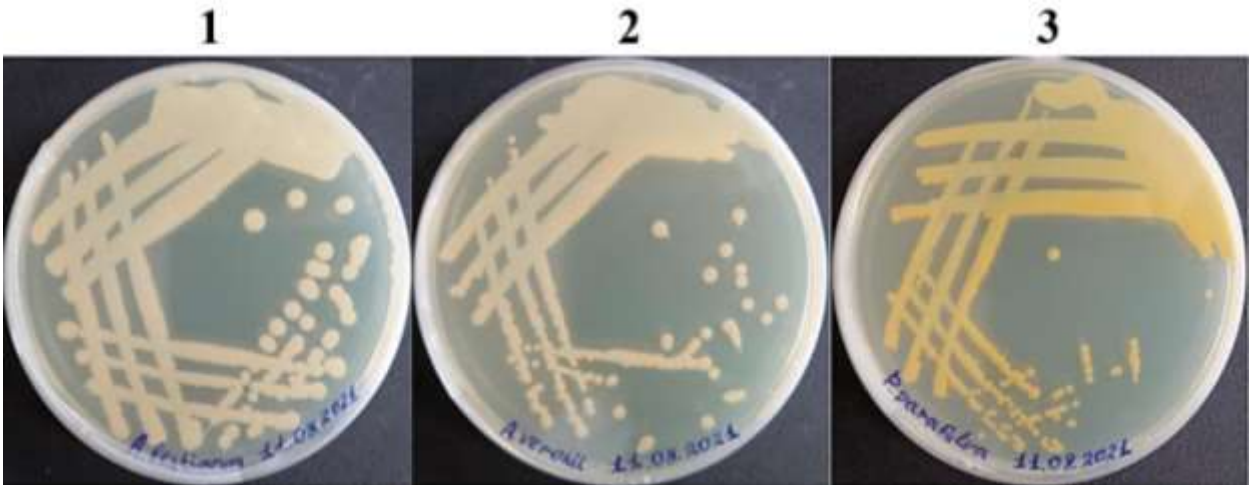


Рисунок 4 - Результаты пересевов культур бактерий на твердой питательной среде

В результате серии последовательных пассажей методом истощающего штриха была проведена селекция морфологически однотипных форм, что позволило изолировать чистые культуры от сопутствующей микрофлоры. Для каждого изолята определялся расширенный набор морфологических признаков, таких как форма, размер, характер поверхности, профиль, степень прозрачности, пигментация (цвет), структура краев и консистенция колоний.

С целью сохранения генетической стабильности полученные культуры с добавлением криопротектора (глицерола) были помещены в морозильные камеры для повседневного (–20 °С) и длительного эталонного (–80 °С) хранения. В процессе мониторинга на среде ЛБ было зафиксировано постепенное увеличение в популяции доли доминантных морфотипов, что позволило выделить 6 ключевых изолятов бактерий. По совокупности морфологических признаков данные изоляты были дифференцированы на 3 типа: к первому типу отнесены 3 изолята, ко второму – 2 изолята, и к третьему типу – 1 изолят (рисунок 5).

Изоляты первого типа характеризовались наиболее типичными для патогенов признаками: гладкой поверхностью и четкими краями колоний, что свидетельствует об их активном росте и потенциальной высокой инвазивности. Дальнейшее изучение данных 6 образцов является необходимым этапом для верификации их видовой принадлежности и определения роли в патогенезе заболеваний осетровых в исследуемом хозяйстве.



1-3) образцы изолированных бактерий.

Рисунок 5 – Морфологические типы культур бактерий на твердой питательной среде (ЛБ агар)

Детальный анализ культур, выросших на плотных питательных средах после 24-часовой инкубации, позволил составить подробный морфологический профиль выделенных микроорганизмов. Большинство колоний исследуемых бактерий характеризовались как мелкие, округлые, с четко выраженными ровными краями. Их структура определялась как полупрозрачная, с

характерным беловато-желтым оттенком, что является типичным признаком для первичных изолятов родов *Aeromonas* и *Pseudomonas*. Линейные размеры колоний варьировали в диапазоне 0,5–1,5 мм, что классифицирует их как мелкозернистые формы.

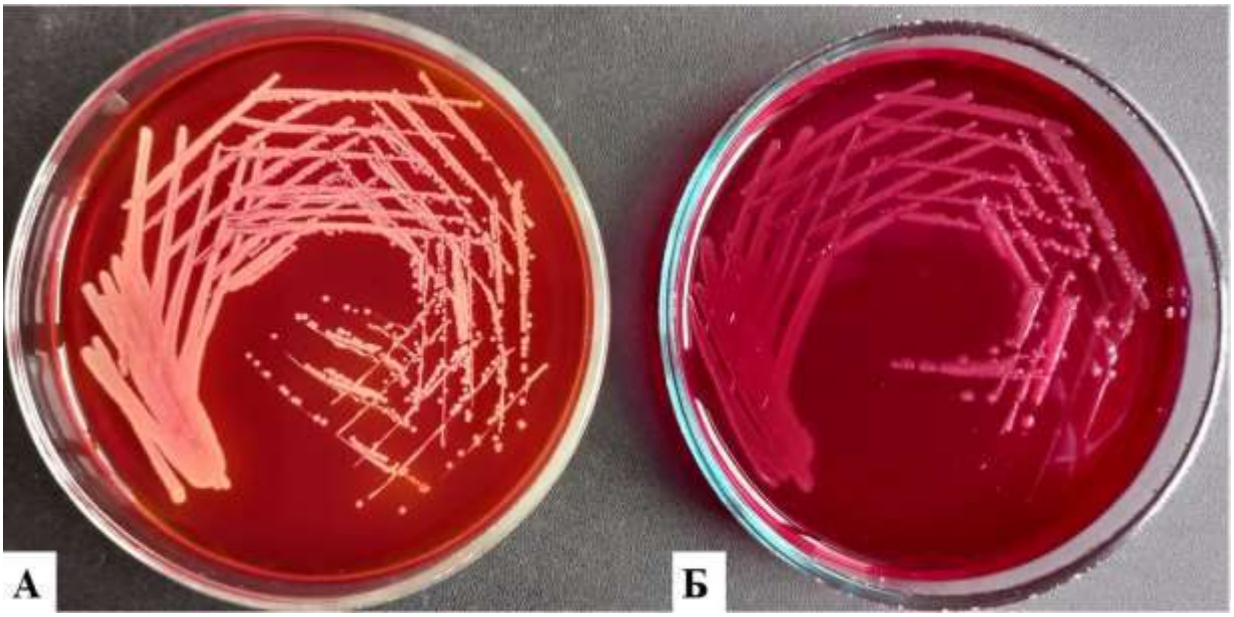
Поверхность колоний в большинстве случаев была гладкой, с выраженным блеском. При визуальном анализе профиля на поверхности плотной питательной среды бактерии имели вид выпуклых, куполообразных образований, что свидетельствует об активной пролиферации клеток и их способности к эффективному формированию биомассы в аэробных условиях. Отдельно следует отметить изолят, колонии которого обладали интенсивным желтым цветом и имели более компактный размер (до 1 мм). Такая пигментация часто служит специфическим маркером, позволяющим дифференцировать определенные виды бактерий по их метаболической активности и способности к синтезу пигментов. Систематизированные данные морфологического анализа всех типов выделенных бактерий представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Морфологические характеристики образцов выделенных колоний бактерий

№	Характеристика колоний бактерий	Тип колоний бактерий		
		1	2	3
1	Форма	округлая	округлая	округлая
2	Размер, мм	до 1,5 мм	до 1 мм	до 1 мм
3	Поверхность	гладкая	гладкая	гладкая
4	Профиль	выпуклый	выпуклый	выпуклый
5	Прозрачность	блестящая	блестящая	блестящая
6	Цвет	бежевый	бежевый	желтый
7	Края	ровные	ровные	ровные
8	Структура	однородная	однородная	однородная
9	Консистенция	мягкая, слегка слизистая	мягкая, слегка слизистая	мягкая, слегка слизистая

Необходимо подчеркнуть, что значительное морфологическое однообразие колоний большинства патогенных бактерий, выделяемых в условиях аквакультуры, существенно затрудняет их первичную идентификацию на универсальных питательных средах. Сходство визуальных характеристик, таких как форма, размер и цвет колоний у представителей различных таксонов, делает невозможным их достоверное разграничение без применения специализированных методов. Для решения задачи точного определения принадлежности выделенных нами изолятов к родам *Aeromonas* и *Pseudomonas* была использована специализированная селективная среда – GSP агар (*Pseudomonas Aeromonas* selective agar, Kielwein, glutamate starch phenol red agar). Данная среда является признанным стандартом в ихтиопатологии, так как

позволяет эффективно распределить образцы бактерий по их родовой принадлежности на основании различий в их биохимической активности (рисунок 6).



А) род *Aeromonas*; Б) род *Pseudomonas*.

Рисунок 6 – Рост колоний изолятов бактерий на селективной среде GSP агар

Принцип идентификации и первичной дифференциации выделенных микроорганизмов на специализированной среде GSP (глутамат-крахмал-феноловый красный агар) базируется на фундаментальных различиях в путях катаболизма углеводов и аминокислот у представителей изучаемых родов. Данная среда обладает высокой селективностью благодаря присутствию в её составе специфических ингибиторов, которые эффективно подавляют рост фоновой микрофлоры, включая большинство грамположительных бактерий и микроскопических грибов, обеспечивая тем самым направленное выделение целевых грамотрицательных патогенов (GSP, 2020).

Диагностическая ценность метода заключается в одновременном использовании двух специфических субстратов – крахмала и глутамата натрия – в сочетании с pH-чувствительным индикатором феноловым красным. В процессе инкубации бактерии рода *Aeromonas* активно вовлекают крахмал в метаболизм, подвергая его ферментативному расщеплению. В результате гликолитических процессов образуются органические кислоты и иные кислые продукты метаболизма, что вызывает резкий сдвиг pH среды в сторону закисления. Это приводит к характерной химической реакции индикатора, выражающейся в смене окраски среды и ореола вокруг колоний с исходного красного на насыщенный ярко-желтый цвет.

В противоположность им, представители рода *Pseudomonas*, характеризующиеся иным типом метаболической активности, демонстрируют на GSP-агаре интенсивный рост, однако оказываются неспособными к

ферментации крахмала в данных условиях. В качестве основного источника энергии и углерода они используют глутамат натрия. Окислительное дезаминирование глутамата сопровождается выделением аммиака и подщелачиванием окружающей среды, что способствует стабилизации или даже усилению исходной малиновой (красно-пурпурной) окраски зоны роста.

В результате проведенных нами исследований и интерпретации биохимических реакций на среде GSP, из общего числа проб были отобраны 6 ключевых изолятов бактерий, получивших внутреннюю маркировку: AB001, AB002, AB003, AB004, AB005 и AB006. Проведенный анализ позволил распределить их следующим образом: 4 изолята (AB001, AB002, AB003 и AB005) по совокупности признаков были отнесены к роду *Aeromonas*, тогда как 2 изолята (AB004 и AB006) были идентифицированы как представители рода *Pseudomonas*. Данная дифференциация на родовом уровне является критически важным этапом, позволяющим перейти к более глубокой видовой идентификации и изучению патогенного потенциала каждого конкретного штамма в условиях аквакультуры осетровых.

2.2 Биохимическая идентификация

Бактерий родов *Aeromonas* и *Pseudomonas* объединяет не только их экологическая пластичность и идентичный образ жизнедеятельности в единых водных биомах, но и выраженное сходство морфологических признаков. Данное обстоятельство обуславливает значительную затруднительность в их должной разграничительной систематизации на начальных этапах исследования. Как отмечает автор (Carter, 1990), идентификация этих микроорганизмов исключительно на уровне морфологии крайне сложна, поскольку патогенные представители обоих родов обладают почти идентичными визуальными характеристиками, что часто приводит к диагностическим ошибкам при использовании только классических методов микроскопии.

Согласно общепринятым микробиологическим критериям (Bakiyev, 2021), бактерии родов *Aeromonas* и *Pseudomonas* характеризуются как типичные грамотрицательные палочки. При окрашивании по методу Грама они приобретают цвет от светло-розового до интенсивно красного, что свидетельствует о специфическом строении их клеточной стенки с тонким слоем пептидогликана и наличием внешней мембраны. Кроме того, для большинства видов этих родов характерно наличие полярно расположенных жгутиков, обеспечивающих активную подвижность клеток в жидкой среде (рисунок 7).

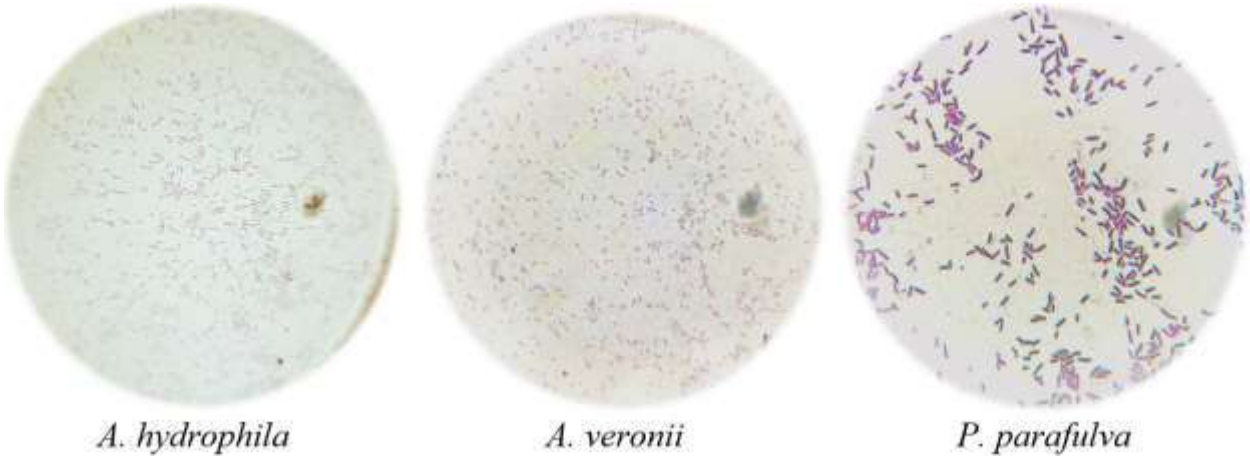


Рисунок 7 – Бактерии, окрашенные методом Грама

При помощи электронного микроскопа (KazNU NANOLAB) определены размеры бактерий, которые варьировали от 1,4 до 6,5 микрометров (рисунок 8).

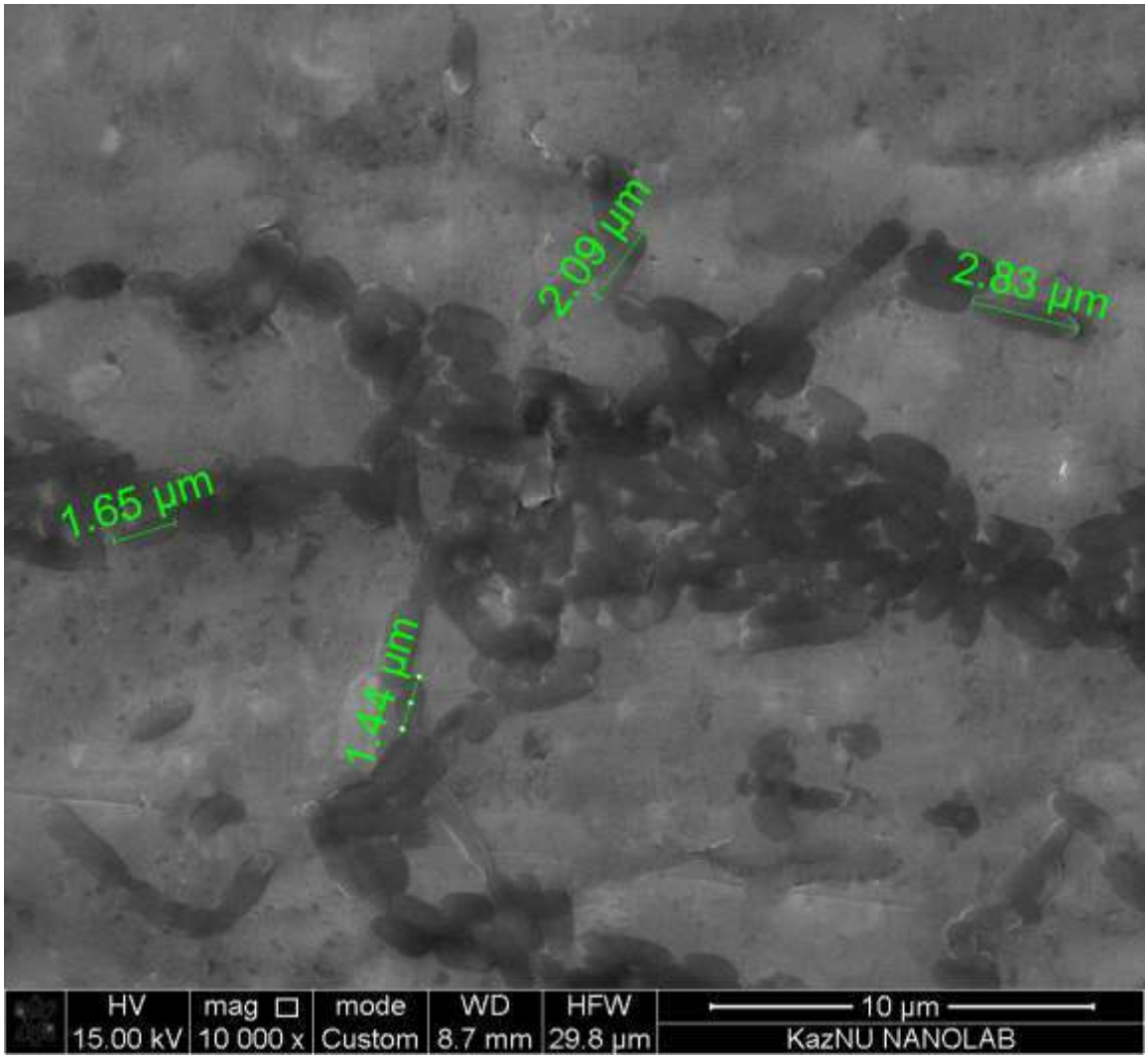


Рисунок 8 – Результаты анализа размеров бактерий

Такое морфологическое единство как палочковидная форма, грамотрицательный тип окраски и наличие аппарата движения – подтверждает их общую адаптацию к обитанию в условиях УЗВ, но одновременно диктует необходимость применения более глубоких биохимических и молекулярно-генетических методов для их достоверной дифференциации. Именно поэтому первичная микроскопия, представленная на рисунке 4, рассматривается как важный, но лишь предварительный этап диагностического алгоритма.

Для проведения всестороннего и детального изучения микробиологического профиля патогенных бактерий, циркулирующих в современных системах аквакультуры, наряду с изучением морфобиологических признаков, критически важным этапом является определение их полной биохимической характеристики. При диагностике таких заболеваний, как псевдомоноз и аэромоноз рыб, стандартных методов микроскопии часто оказывается недостаточно из-за высокой степени конвергентного сходства возбудителей. Как подчеркивается в ряде профильных исследований, в частности в источнике (Хоулт, 1997), для идентификации грамотрицательных палочковидных бактерий необходимо применять комплекс стандартизированных тестов и оценивать специфические ответные реакции микроорганизмов на различные субстраты. К ключевым диагностическим маркерам относятся оксидазный и индольный тесты, определение способности к ферментации широкого спектра углеводов, а также специализированный ONPG-тест, позволяющий выявить наличие фермента β-галактозидазы. Не менее значимыми для дифференциации являются тесты на декарбоксилирование и гидролиз специфических аминокислот, тест на разжижение желатина (определяющий протеолитическую активность), тест Фогес-Проскауэра и окислительно-ферментативный (ОФ) тест, который позволяет четко разграничить пути метаболизма глюкозы – окислительный, характерный для неферментирующих бактерий, или ферментативный, присущий факультативным анаэробам (Bakiyev, 2021). Параллельно с биохимическими тестами для уточнения таксономического положения изолятов широко используются дифференциально-селективные питательные среды. Принцип их работы основан на использовании уникальных метаболических потребностей бактерий и введении селективных агентов, подавляющих сопутствующую микрофлору. Так, для целенаправленной идентификации представителей рода *Aeromonas* применяют специализированный *Aeromonas* агар (Handfield, 1996; Liofilchem, 2020). Его сложный химический состав включает протеозный пептон, дрожжевой экстракт, лактозу, глюкозу ($C_6H_{12}O_6$), ксилозу, моногидрохлорид аргинина и хлорид натрия (NaCl). В качестве селективных и индикаторных компонентов выступают желчные соли, тиосульфат натрия ($Na_2S_2O_3$), цитрат аммонийного железа Fe $(NH_4)_3$ $(C_6H_5O_7)_2$, а также смесь индикаторов – бромтимолового синего и тимолового синего. Наличие в среде ампициллина эффективно блокирует рост чувствительной микрофлоры, позволяя аэромонадам проявлять свои типичные свойства. При росте на данной твердой среде патогенные штаммы, такие как *Aeromonas hydrophila*, формируют характерные зеленые колонии с выраженным темным

центром, что в сочетании с активной ферментацией трегалозы служит надежным диагностическим критерием (Bakiyev, 2021). Для дифференциации и выделения псевдомонад используются иные рецептуры, такие как *Pseudomonas* агар (King, 1954; Goto, 1970; Humeau, 2021; Sigmaaldrich, 2021). В его состав входят желатиновый пептон, гидролизат казеина, безводный сульфат калия (K_2S0_4) и хлорид магния ($MgCl_2$). Высокая селективность среды обеспечивается введением цетримида и антибиотика цефалоридина. Также широкое применение находит среда Кинга А, содержащая желатиновый пептон, магний и калий в специфических концентрациях. Основной диагностический принцип использования данных сред базируется на уникальной способности многих видов рода *Pseudomonas* продуцировать специфические сидерофоры, в частности пиовердин – флуоресцирующий сине-зеленый пигмент, который легко визуализируется в ультрафиолетовом свете. Продукция пигментов в сочетании с результатами тестов на оксидазу и способностью к росту при различных температурных режимах позволяет с высокой точностью идентифицировать возбудителей псевдомоноза. Подробная сравнительная биохимическая характеристика бактерий родов *Aeromonas* и *Pseudomonas*, выделенных из пораженных тканей рыб в ходе нашего исследования, систематизирована и представлена в таблице 4.

Таблица 4 – Биохимическая характеристика изолятов бактерий рода *Aeromonas* и *Pseudomonas* выделенных из больных рыб (El-Barbary, 2016)

№ п/п	Характеристики (тесты)	*Aeromonas*	*Pseudomonas*
1	Окраска по Граму	-	-
2	Форма клеток	бациллы	бациллы
3	Подвижность	+	+
4	Цвет колоний	темно-зеленый	желто-зеленый
5	Оксидазный тест	+	+
6	Продуцирование индола	+	-
7	Метиловый красный	-	+
8	Фогеса-Проскауэра	+	-
9	Гидролиз желатина	+	+/-
10	Утилизация глюкозы	+	-
11	Маннитол	+	+
12	Мальтоза	+	+
13	Каталаза	+	+
Примечание: +, положительный, -, отрицательный, +/-, изменчивый			

Как видно из данных таблицы 3, сравнительный анализ биохимических характеристик подтверждает значительное сходство бактерий родов *Aeromonas* и *Pseudomonas*. Высокая степень идентичности их метаболических профилей обуславливает сложность дифференциации: ключевые различия фиксируются лишь в ограниченном наборе тестов, таких как продукция индола, реакция Фогеса-Проскауэра, тест на продукцию желатиназы и характер утилизации глюкозы (окисление против ферментации). Таким образом, анализ стандартных

биохимических показателей позволяет с высокой достоверностью выявить родовую принадлежность бактерии, однако для точного определения биологического вида данных методов зачастую оказывается недостаточно, что требует привлечения дополнительных диагностических инструментов.

Для предварительной идентификации выделенных культур изолятов нами успешно использовалась селективная среда GSP агар (*Pseudomonas-Aeromonas* selective agar по Kielwein), состав которой (глутамат, крахмал, феноловый красный) позволяет четко распределить исследованные образцы по родам *Aeromonas* и *Pseudomonas* на основании их способности к ферментации крахмала. Параллельно с этим проводились углубленные тесты на определение биохимических свойств чистых культур согласно международному руководству Берджи - Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Хоулт, 1997), являющемуся золотым стандартом в бактериальной систематике. Исследования биохимических характеристик и последующей индентификации проводились согласно представленной схеме (рисунок 9).

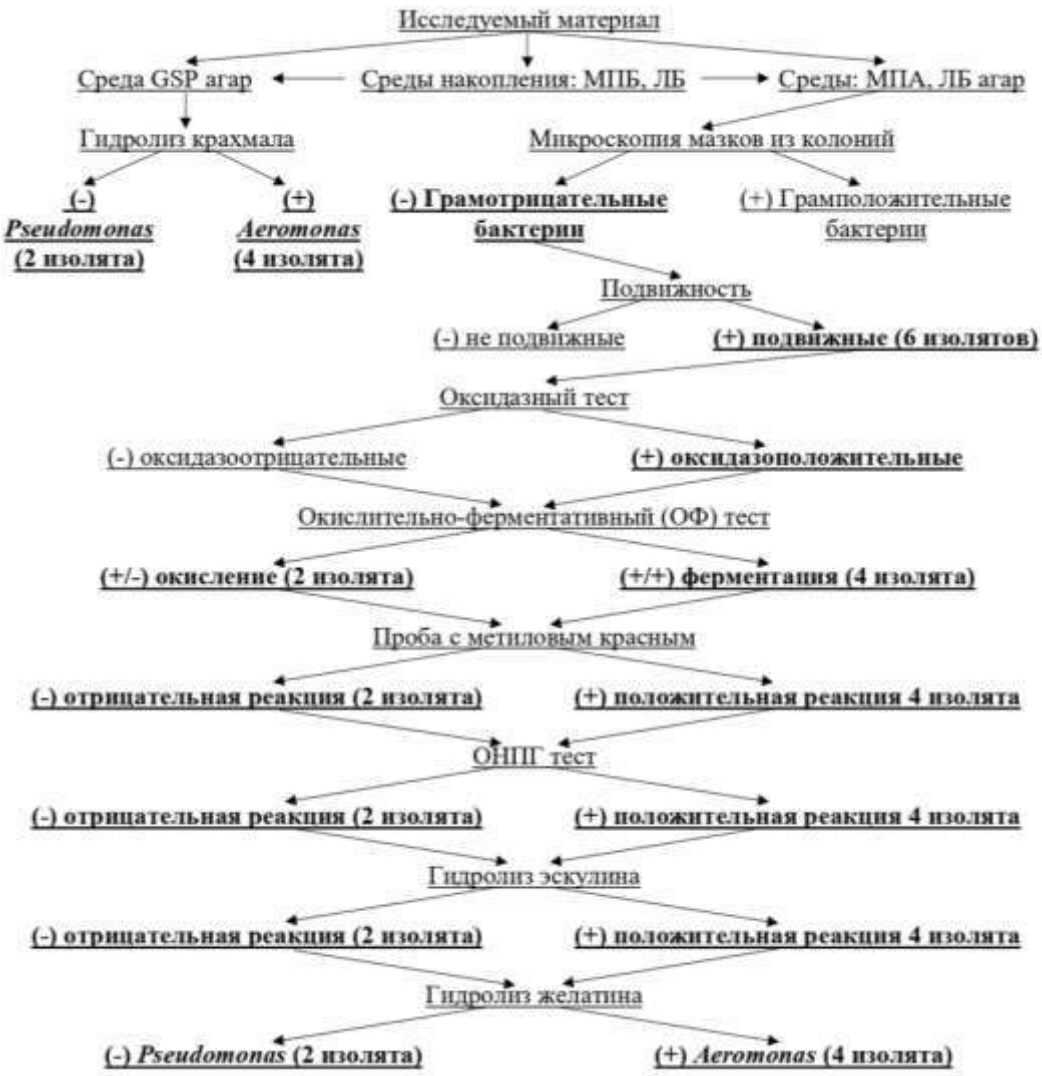


Рисунок 9 – Схема биохимической идентфкации

В процессе идентификации культур биохимический профиль определялся с использованием следующей диагностической панели: тест на оксидазу, тест с метиловым красным, окислительно-ферментативный (ОФ) тест, реакция Фогес-Проскауэра, а также тесты декарбоксилирования и гидролиза аминокислот. Дополнительно изучалась способность микроорганизмов к гидролизу желатина и эскулина, а также оценивался спектр образования кислот из различных углеводов (Хоулт, 1997; Влодавец, 1986; El-Barbary, 2016; Gufe, 2019). Весь процесс верификации осуществлялся строго в соответствии с разработанной методологической схемой, которая обеспечивает логическую последовательность этапов от первичного выделения до окончательного подтверждения таксономического статуса изолята.

В ходе проведенных исследовательских тестов биохимическая активность всех изолятов, отнесенных к роду *Pseudomonas*, продемонстрировала характерные для данной группы признаки. В частности, была зафиксирована стабильная положительная реакция на оксидазу, что подтверждает наличие цитохромоксидазы в дыхательной цепи бактерий. Все исследованные штаммы проявляли выраженную аргининдигидролазную активность, не продуцировали сероводород (H_2S) и, в отличие от ряда других представителей рода, показали неспособность к гидролизу желатина. Такие метаболические особенности свидетельствуют о специфическом ферментативном профиле данных микроорганизмов, выделенных из условий УЗВ. Особое внимание заслуживают физиологические адаптации изолятов АВ004 и АВ006. Установлено, что данные бактерии способны сохранять жизнеспособность и демонстрировать активный рост в широком диапазоне концентраций хлорида натрия (NaCl), а также при температурных колебаниях от 13 до 42 ºС. Столь высокая экологическая пластичность свидетельствует о том, что данные штаммы хорошо адаптированы к среде обитания и способны эффективно колонизировать биосистемы установок замкнутого водоснабжения, успешно конкурируя с другими видами микрофлоры. Высокий температурный оптимум (до 42 ºС) дополнительно указывает на их потенциальную патогенность для гидробионтов в условиях стрессовых температурных нагрузок.

Несмотря на детальное изучение ферментативного профиля, идентифицировать точную видовую принадлежность изолятов АВ004 и АВ006 исключительно на основании их биохимических и физиологических характеристик оказалось невозможным. Высокая степень фенотипического сходства между различными видами псевдомонад и вариабельность их признаков внутри рода создают существенные препятствия для классической систематики. Это диктует необходимость перехода к молекулярно-генетическим методам анализа для окончательной верификации таксономического статуса возбудителей. Подробные результаты биохимических и физиологических исследований выделенных бактерий систематизированы и представлены в таблице 5.

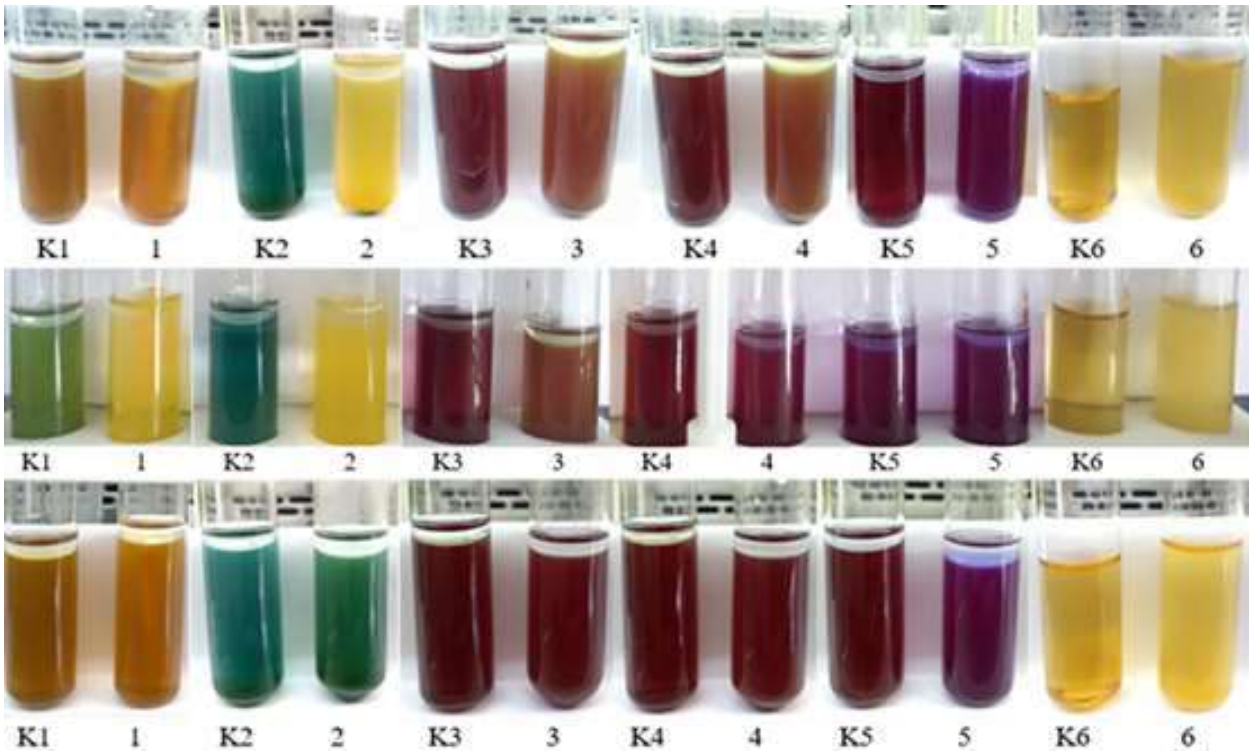
Таблица 5 - Сравнительная характеристика морфо-культуральных и физиолого-биохимических свойств выделенных представителей рода *Aeromonas* и *Pseudomonas*

№	Характеристики	АВ001	АВ002	АВ003	АВ004	АВ005	АВ006
1	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*	*7*	*8*
1	Окрашивание по Граму	-	-	-	-	-	-
2	Морфология	палочки	палочки	палочки	палочки	палочки	палочки
3	Подвижность	+	-	+	+	+	+
4	Оксидаза	+	+	+	+	+	+
5	Проба с метиловым красным	+	+	+	-	+	-
6	Тест Фогеса-Проскауэра	-	+	+	-	+	-
7	О/Ф тест	Ф	Ф	Ф	О	Ф	О
8	Гидролиз желатина	+	+	+	-	+	-
9	Гидролиз эскулин	+	+	+	-	+	-
10	Образование H_2S	-	+	-	-	+	-
11	Образование индола	-	+	+	+	-	+
12	Лизиндекарбоксилаза	-	-	+	-	+/-	-
13	Орнитиндекарбоксилаза	-	-	+	-	-	-
14	Аргининдигидролаза	+	+	-	+	+	+
15	ОНПГ	+	+	+	-	+	-
	Образование кислоты из:						
16	сахарозы	-	+	+	-	+	-
17	трегалозы	+	+	+	-	+	-
18	D-ксилозы	-	-	-	+	-	+
19	лактозы	-	-	-	-	+/-	-
	Рост при условиях:						
20	0% NaCl	+	+	+	+	+	+
21	1% NaCl	+	+	+	+	+	+
22	2% NaCl	+	+	+	+	+	+
23	3% NaCl	+	+	+	+	+	+
24	4% NaCl	+	+	-	+	+	+
25	5% NaCl	-	-	-	+	-	+
26	13ºС	+	+	+	+	+	+

продолжение таблицы 5

1	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*	*7*	*8*
27	27 ºС, 32 ºС, 37 ºС, 42 ºС	+	+	+	+	+	+
28	pH 3.0	-	-	-	-	-	-
29	pH 5.0	-	+	+	-	+	-
30	pH 7.0-9.0	+	+	+	+	+	+
Примечание: Ф – ферментация, О – окисление, «+» - положительная реакция, «-» - отрицательная реакция, «+/-» - изменчивый							

Все исследованные в ходе работы изоляты бактерий рода *Aeromonas* (AB001, AB002, AB003 и AB005) по морфологическим признакам классифицированы как грамотрицательные палочки, демонстрирующие стабильную положительную реакцию на оксидазу. Биохимический профиль данной группы характеризуется способностью к гидролизу эскулина и активной ферментацией углеводов (рисунок 10).



1 линия - *Aeromonas hydrophila*; 2 линия - *Aeromonas veronii*; 3 линия - *Pseudomonas parafulva*. К1-6 – контроли, 1- опыт Хью-Лейфсона, 2- опыт маннит, 3- опыт орнитин, 4- опыт лизин, 5-опыт аргинин, 6-опыт желатиназа

Рисунок 10 – Результаты биохимической характеристики бактерий

В частности, все изоляты продуцируют кислоту из трегалозы и сахарозы, а также в различной степени из лактозы, при этом, не проявляя активности в отношении D-ксилозы. Тест Фогеса-Проскауэра выявил положительную реакцию у большинства штаммов, за исключением изолята AB001. Анализ метаболизма аминокислот показал наличие аргинингидролазной активности и неспособность к декарбоксилированию орнитина, в то время как декарбоксилирование лизина было зафиксировано только у изолята AB005. Окислительно-ферментативный (ОФ) тест подтвердил ферментативный тип метаболизма у всех образцов, что в сочетании с положительной пробой с метиловым красным является диагностическим признаком рода. Примечательно, что изоляты AB001 и AB005, в отличие от остальных представителей группы, оказались неспособны к образованию индола.

В современной систематике бактерии рода *Aeromonas* традиционно разделяются на две основные группы: подвижные (мезофильные) и неподвижные (психрофильные или атипичные штаммы) (Larsen, 1977; Eurell, 1978; Sakazaki, 1984). Подвижные аэромонады включают такие виды, как *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas veronii*, *Aeromonas sobria* и другие, тогда как к неподвижным формам относится преимущественно *Aeromonas salmonicida* (Altwegg, 1990). В представленных исследованиях изоляты AB001, AB003 и AB005 проявили выраженную подвижность. Физиологический мониторинг показал, что выделенные бактерии адаптированы к широкому диапазону значений pH (7,0–9,0) и сохраняют активность при температуре до 42 ºC.

При этом при 13 ºC наблюдался крайне слабый рост, а повышение концентрации NaCl до 5% приводило к полному ингибированию развития культур, что подтверждает их принадлежность к пресноводному комплексу микроорганизмов.

Результаты проведенных исследований при выращивании выделенных штаммов бактерий в питательной среде Luria-Bertani (LB) с различными температурой, NaCl, pH представлены в таблицах 6-14 и рисунках 11-19. Все исследования проводились трижды.

Таблица 6 – Результаты роста *Aeromonas hydrophila* при различной температуре

Бактерия	Время, ч.	Абсорбция при $ОП_{600\ нм}$			
		t, ºC			
		27	32	37	42
Aeromonas hydrophila	1	0,04±0,01	0,07±0,01	0,07±0,01	0,08±0,01
	2	0,10±0,01	0,20±0,004	0,25±0,002	0,24±0,02
	3	0,27±0,01	0,51±0,01	0,68±0,02	0,55±0,04
	4	0,69±0,02	1,20±0,01	1,31±0,02	0,87±0,11
	5	1,21±0,03	1,38±0,005	1,49±0,01	1,08±0,16
	6	1,40±0,03	1,57±0,004	1,60±0,03	1,24±0,15
	7	1,53±0,04	1,62±0,01	1,66±0,01	1,47±0,12
	8	1,63±0,05	1,69±0,002	1,73±0,03	1,59±0,08
	9	1,71±0,04	1,78±0,02	1,80±0,02	1,67±0,06
	10	1,77±0,02	1,84±0,01	1,85±0,01	1,75±0,03

*среднее значение и стандартное отклонение (SD)

По результатам выращивания *Aeromonas hydrophila* при разных температурных условиях, рост бактерии наблюдался во всех исследованных температурных показателях. По истечению 10 часов наибольшее значение показателя $ОП_{600}$ составило 1,85 при выращивании в условиях 37ºC, наименьшее значение составило 1,75 при температуре 42ºC.

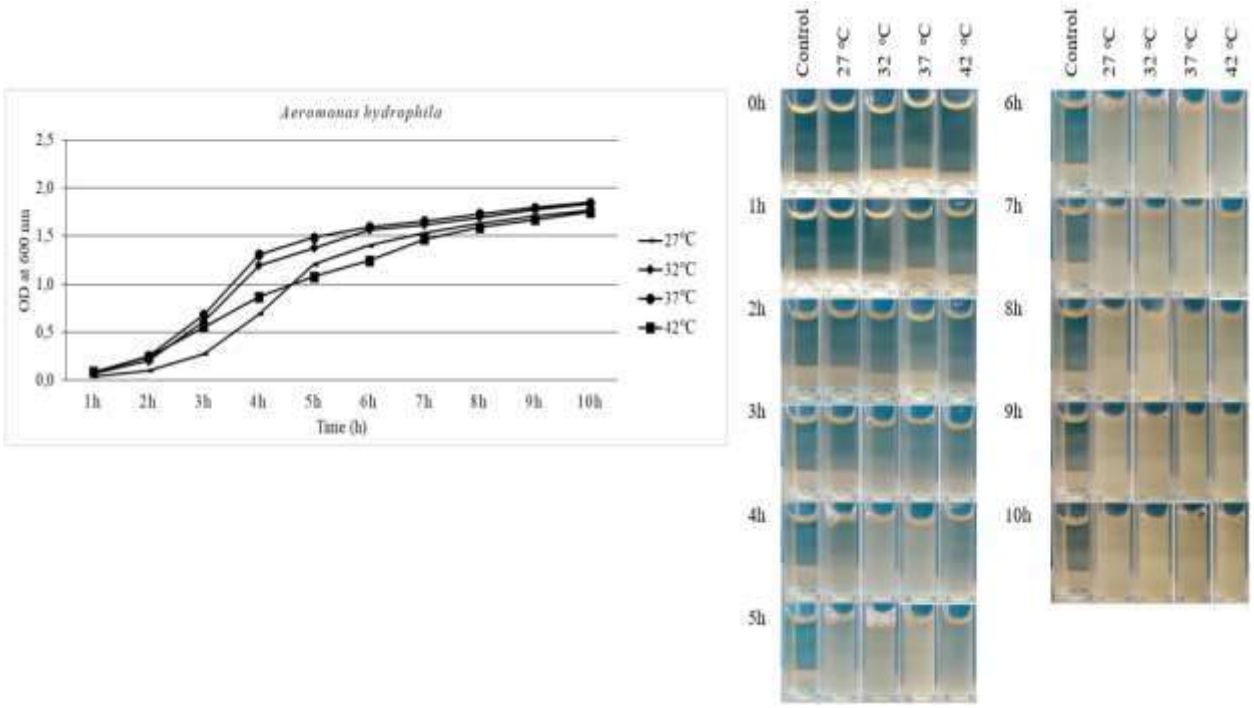


Рисунок 11 – Результаты роста *Aeromonas hydrophila* при различной температуре

По результатам представленного графика определено что лаг-фаза *Aeromonas hydrophila* наблюдается в течение часа после посева бактерий, логарифмическая фаза наблюдалась от 1 часа до 6 часов, далее рост заметно замедлялся (стационарная фаза) от 6 до 10 часов, за исследуемый период времени фаза отмерания не наблюдалась.

Таблица 7 – Результаты роста *Aeromonas veronii* при различной температуре

Бактерия	Время, ч.	Абсорбция при $ОП_{600\ нм}$			
		t, °C			
		27	32	37	42
Aeromonas veronii	1	0,07±0,03	0,06±0,01	0,09±0,004	0,14±0,03
	2	0,16±0,03	0,29±0,01	0,40±0,01	0,59±0,03
	3	0,40±0,03	0,85±0,01	1,14±0,03	1,34±0,01
	4	0,90±0,03	1,39±0,01	1,48±0,01	1,52±0,01
	5	1,34±0,01	1,56±0,01	1,58±0,003	1,61±0,01
	6	1,54±0,01	1,65±0,01	1,68±0,02	1,70±0,02
	7	1,66±0,01	1,74±0,02	1,77±0,02	1,78±0,01
	8	1,74±0,03	1,83±0,02	1,86±0,02	1,87±0,02
	9	1,85±0,02	1,89±0,01	1,89±0,01	1,90±0,02
	10	1,90±0,01	1,95±0,02	1,98±0,02	1,96±0,01

*среднее значение и стандартное отклонение (SD)

По результатам выращивания *Aeromonas veronii* при разных температурных условиях, рост бактерии наблюдался во всех исследованных

температурных показателях. По истечению 10 часов наибольшее значение показателя $ОП_{600}$ составило 1,98 при выращивании в условиях 37°С, наименьшее значение составило 1,90 при температуре 27°С.

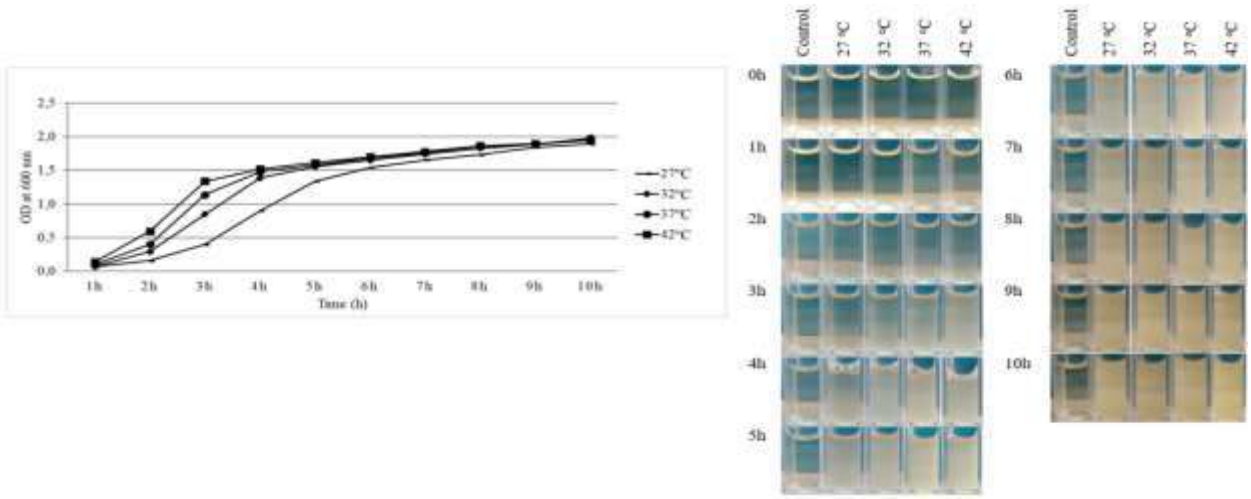


Рисунок 12 – Результаты роста *Aeromonas veronii* при различной температуре

По результатам представленного графика определено что лаг-фаза *Aeromonas veronii* наблюдается в течение часа после посева бактерий, логарифмическая фаза наблюдалась от 1 часа до 5 часов, далее рост заметно замедлялся (стационарная фаза) от 6 до 10 часов, за исследуемый период времени фаза отмерания не наблюдалась.

Таблица 8 – Результаты роста *Pseudomonas parafulva* при различной температуре

Бактерия	Время, ч.	Абсорбция при $ОП_{600\ нм}$			
		t, °С			
		27	32	37	42
Pseudomonas parafulva	1	0,01±0,004	0,02±0,004	0,04±0,01	0,04±0,01
	2	0,03±0,01	0,06±0,01	0,10±0,01	0,07±0,02
	3	0,09±0,01	0,21±0,01	0,26±0,01	0,17±0,02
	4	0,22±0,02	0,59±0,04	0,70±0,04	0,38±0,04
	5	0,45±0,02	1,02±0,03	1,15±0,03	0,81±0,05
	6	0,86±0,02	1,22±0,04	1,34±0,01	1,14±0,05
	7	1,20±0,03	1,30±0,01	1,42±0,02	1,28±0,03
	8	1,31±0,05	1,39±0,04	1,50±0,02	1,38±0,04
	9	1,43±0,04	1,44±0,03	1,59±0,04	1,48±0,05
	10	1,55±0,04	1,50±0,02	1,62±0,02	1,53±0,04

*среднее значение и стандартное отклонение (SD)

По результатам выращивания *Pseudomonas parafulva* при разных температурных условиях, рост бактерии наблюдался во всех исследованных температурных показателях. По истечению 10 часов наибольшее значение

показателя $ОП_{600}$ составило 1,62 при выращивании в условиях 37ºС, наименьшее значение составило 1,50 при температуре 32ºС.

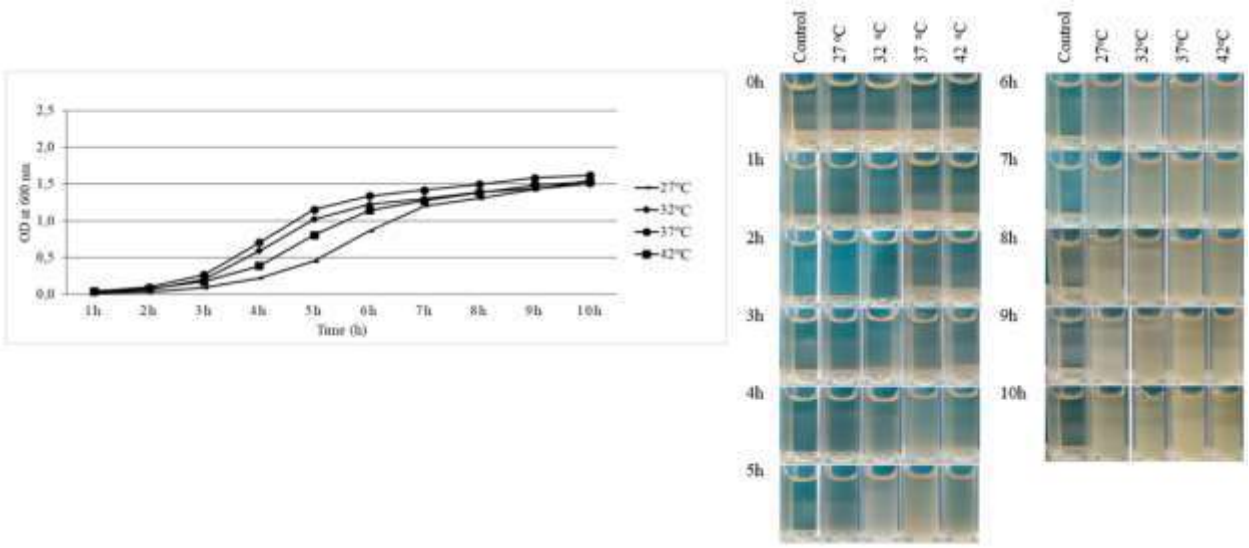


Рисунок 13 – Результаты роста *Pseudomonas parafulva* при различной температуре

По результатам представленного графика определено что лаг-фаза *Pseudomonas parafulva* наблюдается в течение часа после посева бактерий, логарифмическая фаза наблюдалась от 1 часа до 6 часов, далее рост заметно замедлялся (стационарная фаза) от 6 до 10 часов, за исследуемый период времени фаза отмерания не наблюдалась.

Таблица 9 – Результаты роста *Aeromonas hydrophila* в среде с различным содержанием NaCl

Бактерия	Время, ч.	Абсорбция при $ОП_{600\ нм}$					
		Концентрация NaCl (%)					
		0	1	2	3	4	5
Aeromonas hydrophila	1	0,05±0,02	0,08±0,01	0,06±0,03	0,04±0,01	0,05±0,02	0,03±0,015
	2	0,12±0,03	0,23±0,02	0,15±0,04	0,07±0,01	0,07±0,03	0,03±0,004
	3	0,31±0,05	0,66±0,04	0,43±0,09	0,18±0,05	0,07±0,01	0,03±0,007
	4	0,61±0,03	1,15±0,07	0,94±0,06	0,37±0,06	0,10±0,03	0,02±0,004
	5	1,00±0,01	1,51±0,01	1,40±0,02	0,67±0,06	0,16±0,04	0,03±0,004
	6	1,43±0,02	1,62±0,03	1,58±0,02	0,98±0,08	0,25±0,01	0,03±0,006
	7	1,65±0,02	1,71±0,03	1,68±0,01	1,32±0,13	0,35±0,02	0,02±0,002
	8	1,70±0,02	1,79±0,03	1,75±0,02	1,48±0,08	0,39±0,02	0,03±0,001
	9	1,74±0,01	1,86±0,03	1,83±0,01	1,57±0,09	0,36±0,07	0,03±0,01
	10	1,76±0,002	1,93±0,02	1,90±0,01	1,68±0,08	0,30±0,05	0,03±0,01

*среднее значение и стандартное отклонение (SD)

По результатам выращивания *Aeromonas hydrophila* при разных концентрациях NaCl, рост бактерии наблюдался при значениях концентрации

хлорида натрия 0-4%, в условиях 5% рост не наблюдался. По истечению 10 часов наибольшее значение показателя $ОП_{600}$ составило 1,93 при выращивании в условиях 1%, наименьшее значение составило 0,03 при 5%.

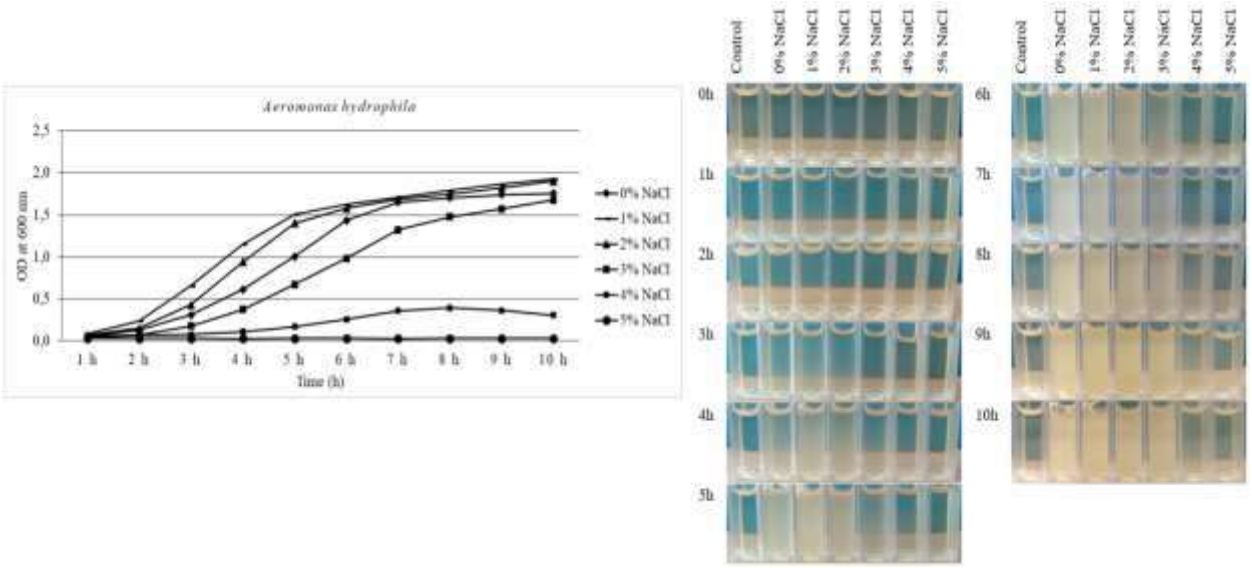


Рисунок 14 – Результаты роста *Aeromonas hydrophila* в среде с различным содержанием NaCl

По результатам представленного графика определено что лаг-фаза *Aeromonas hydrophila* наблюдается в течение часа после посева бактерий, логарифмическая фаза наблюдалась от 1 часа до 6 часов для условий 4% до 8 часов, далее рост заметно замедлялся (стационарная фаза) от 7 до 10 часов, в условиях 5% рост бактерий не наблюдался, за исследуемый период времени фаза отмерания не наблюдалась.

Таблица 10 – Результаты роста *Aeromonas veronii* в среде с различным содержанием NaCl

Бактерия	Время, ч.	Абсорбция при $ОП_{600\ нм}$					
		Концентрация NaCl (%)					
		0	1	2	3	4	5
Aeromonas veronii	1	0,07±0,03	0,05±0,01	0,04±0,04	0,02±0,01	0,02±0,01	0,02±0,01
	2	0,22±0,03	0,21±0,16	0,15±0,06	0,02±0,02	0,02±0,02	0,02±0,01
	3	0,68±0,04	0,90±0,04	0,59±0,14	0,03±0,02	0,03±0,01	0,02±0,002
	4	1,16±0,11	1,51±0,03	1,28±0,12	0,07±0,05	0,03±0,02	0,02±0,002
	5	1,52±0,06	1,66±0,03	1,59±0,03	0,23±0,11	0,03±0,01	0,02±0,003
	6	1,66±0,02	1,75±0,04	1,67±0,03	0,59±0,25	0,03±0,02	0,02±0,004
	7	1,75±0,04	1,84±0,02	1,76±0,04	1,07±0,27	0,03±0,02	0,02±0,004
	8	1,81±0,03	1,94±0,03	1,89±0,02	1,52±0,12	0,03±0,01	0,02±0,01
	9	1,84±0,02	1,99±0,04	1,94±0,02	1,67±0,11	0,03±0,02	0,02±0,01
	10	1,84±0,03	2,08±0,03	2,03±0,05	1,77±0,13	0,03±0,01	0,02±0,01

*среднее значение и стандартное отклонение (SD)

По результатам выращивания *Aeromonas veronii* при разных концентрациях NaCl, рост бактерии наблюдался при значениях концентрации хлорида натрия 0-3%, в условиях 4 и 5% рост не наблюдался. По истечению 10 часов наибольшее значение показателя $ОП_{600}$ составило 2,08 при выращивании в условиях 1%, наименьшее значение составило 0,02 и 0,03 при 5 и 4% соответственно.

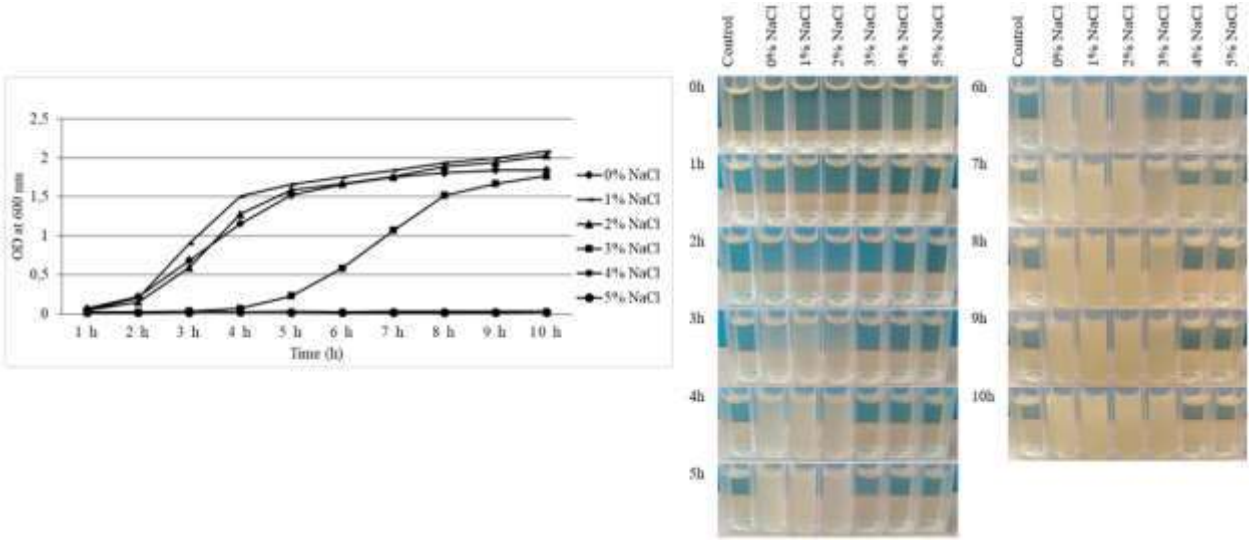


Рисунок 15 – Результаты роста *Aeromonas veronii* в среде с различным содержанием NaCl

По результатам представленного графика определено что лаг-фаза *Aeromonas veronii* наблюдается в течение часа после посева бактерий, логарифмическая фаза наблюдалась от 1 часа до 5 (8 при 0% NaCl) часов, далее рост заметно замедлялся (стационарная фаза) от 5 до 10 часов, в условиях 4 и 5% рост бактерий не наблюдался, за исследуемый период времени фаза отмерания не наблюдалась.

Таблица 11 – Результаты роста *Pseudomonas parafulva* в среде с различным содержанием NaCl

Бактерия	Время, ч.	Абсорбция при $ОП_{600\ нм}$					
		Концентрация NaCl (%)					
		0	1	2	3	4	5
Pseudomonas parafulva	1	0,06±0,02	0,06±0,03	0,04±0,03	0,04±0,01	0,04±0,02	0,02±0,01
	2	0,10±0,02	0,11±0,02	0,08±0,01	0,06±0,01	0,04±0,02	0,05±0,05
	3	0,19±0,04	0,25±0,05	0,20±0,04	0,14±0,02	0,08±0,03	0,04±0,004
	4	0,47±0,09	0,67±0,02	0,59±0,02	0,32±0,09	0,14±0,01	0,07±0,01
	5	0,92±0,14	1,18±0,08	1,10±0,03	0,66±0,3	0,21±0,02	0,11±0,001
	6	1,20±0,09	1,34±0,02	1,35±0,02	0,97±0,45	0,31±0,06	0,16±0,02
	7	1,32±0,1	1,45±0,02	1,48±0,04	1,19±0,49	0,51±0,22	0,26±0,06
	8	1,34±0,11	1,49±0,03	1,54±0,03	1,31±0,42	0,64±0,29	0,34±0,09
	9	1,40±0,15	1,55±0,04	1,59±0,02	1,43±0,31	0,78±0,35	0,43±0,13
	10	1,41±0,11	1,57±0,04	1,64±0,01	1,52±0,25	0,90±0,40	0,54±0,19

*среднее значение и стандартное отклонение (SD)

По результатам выращивания *Pseudomonas parafulva* при разных концентрациях NaCl, рост бактерии наблюдался при значениях концентрации хлорида натрия 0-5%. По истечению 10 часов наибольшее значение показателя $ОП_{600}$ составило 1,64 при выращивании в условиях 1%, наименьшее значение составило 0,54 при 5%.

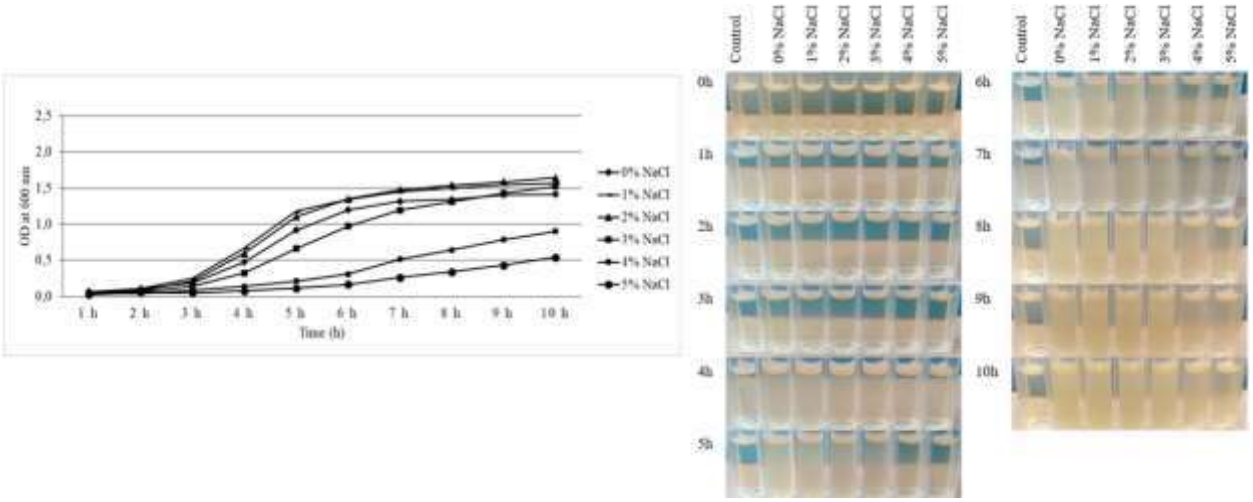


Рисунок 16 – Результаты роста *Pseudomonas parafulva* в среде с различным содержанием NaCl

По результатам представленного графика определено что лаг-фаза *Pseudomonas parafulva* наблюдается в течение часа после посева бактерий, логарифмическая фаза наблюдалась от 1 часа до 6 часов для условий 4, 5% до 7 часов, далее рост заметно замедлялся (стационарная фаза) от 7 до 10 часов, за исследуемый период времени фаза отмерания не наблюдалась.

Таблица 12 – Результаты роста *Aeromonas hydrophila* в среде с различным pH

Бактерия	Время, ч.	Абсорбция при $ОП_{600\ нм}$			
		pH			
		3	5	7	9
Aeromonas hydrophila	1	0,04±0,02	0,05±0,04	0,04±0,004	0,04±0,02
	2	0,04±0,02	0,04±0,04	0,10±0,01	0,04±0,01
	3	0,04±0,02	0,05±0,04	0,45±0,01	0,16±0,01
	4	0,04±0,02	0,04±0,03	1,05±0,03	0,45±0,01
	5	0,04±0,02	0,05±0,04	1,44±0,03	0,98±0,01
	6	0,04±0,02	0,04±0,03	1,58±0,02	1,38±0,02
	7	0,05±0,02	0,05±0,04	1,68±0,02	1,58±0,01
	8	0,05±0,02	0,06±0,04	1,77±0,02	1,68±0,01
	9	0,05±0,02	0,05±0,03	1,83±0,02	1,75±0,003
	10	0,05±0,02	0,06±0,03	1,87±0,03	1,79±0,01

*среднее значение и стандартное отклонение (SD)

По результатам выращивания *Aeromonas hydrophila* при разных значениях pH, рост бактерии наблюдался при pH 7, 9, в условиях pH 3, 5 рост не наблюдался. По истечению 10 часов наибольшее значение показателя $ОП_{600}$ составило 1,87 при выращивании в условиях pH 7, наименьшее значение составило 0,05 при pH 3.

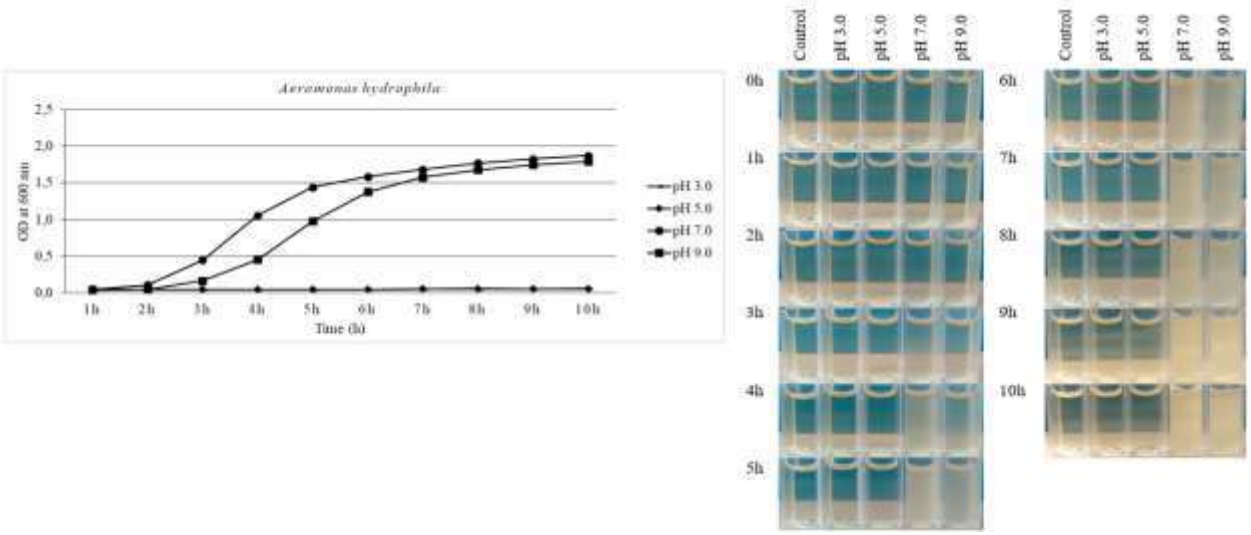


Рисунок 17 – Результаты роста *Aeromonas hydrophila* в среде с различным pH

По результатам представленного графика определено что лаг-фаза *Aeromonas hydrophila* наблюдается в течение часа после посева бактерий, логарифмическая фаза наблюдалась от 1 часа до 6 часов (pH 7, 9), далее рост заметно замедлялся (стационарная фаза) от 7 до 10 часов, в условиях pH 3, 5 рост бактерий не наблюдался, за исследуемый период времени фаза отмерания не наблюдалась.

Таблица 13 – Результаты роста *Aeromonas veronii* в среде с различным pH

Бактерия	Время, ч.	Абсорбция при $ОП_{600\ нм}$			
		pH			
		3	5	7	9
Aeromonas veronii	1	0,04±0,02	0,04±0,03	0,11±0,01	0,11±0,02
	2	0,05±0,02	0,05±0,04	0,70±0,02	0,59±0,04
	3	0,05±0,02	0,05±0,04	1,36±0,01	1,30±0,02
	4	0,05±0,02	0,05±0,04	1,55±0,01	1,51±0,005
	5	0,05±0,02	0,05±0,03	1,63±0,01	1,62±0,01
	6	0,05±0,02	0,05±0,04	1,74±0,01	1,76±0,02
	7	0,05±0,02	0,05±0,03	1,81±0,01	1,82±0,01
	8	0,06±0,02	0,05±0,04	1,88±0,01	1,91±0,01
	9	0,05±0,02	0,05±0,03	1,90±0,01	1,93±0,005
	10	0,06±0,02	0,05±0,03	1,96±0,02	2±0,01

*среднее значение и стандартное отклонение (SD)

По результатам выращивания *Aeromonas veronii* при разных значениях pH, рост бактерии наблюдался при pH 7, 9, в условиях pH 3, 5 рост не наблюдался. По истечению 10 часов наибольшее значение показателя $ОП_{600}$ составило 2 при выращивании в условиях pH 9, наименьшее значение составило 0,05 при pH 5.

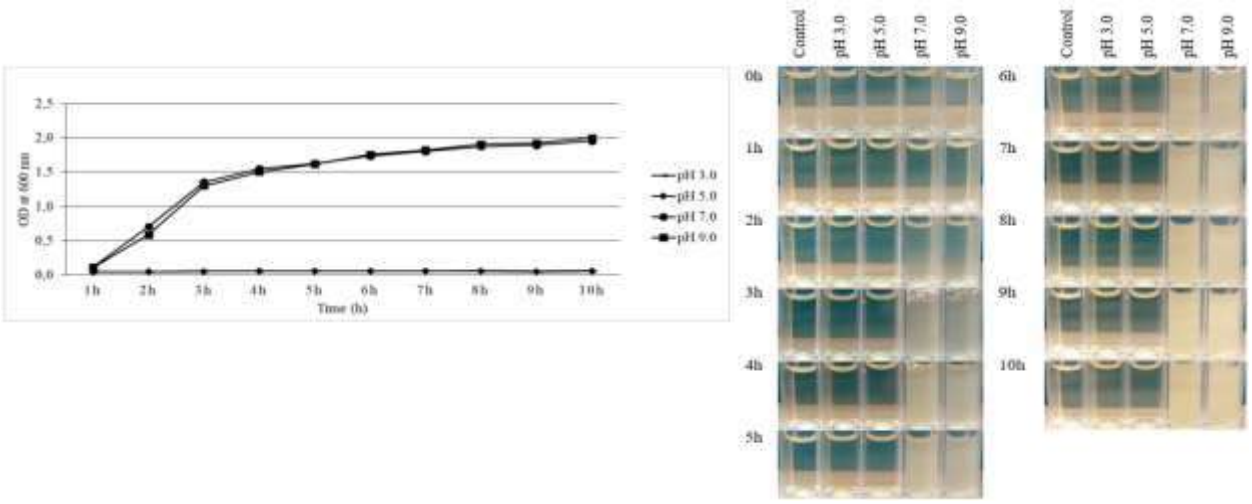


Рисунок 18 – Результаты роста *Aeromonas veronii* в среде с различным pH

По результатам представленного графика определено что лаг-фаза *Aeromonas veronii* наблюдается в течение часа после посева бактерий, логарифмическая фаза наблюдалась от 1 часа до 4 часов (pH 7, 9), далее рост заметно замедлялся (стационарная фаза) от 7 до 10 часов, в условиях pH 3, 5 рост бактерий не наблюдался, за исследуемый период времени фаза отмерания не наблюдалась.

Таблица 14 – Результаты роста *Pseudomonas parafulva* в среде с различным pH

Бактерия	Время, ч.	Абсорбция при $ОП_{600\ нм}$			
		pH			
		3	5	7	9
Pseudomonas parafulva	1	0,06±0,02	0,05±0,03	0,06±0,01	0,04±0,01
	2	0,06±0,02	0,05±0,04	0,13±0,01	0,05±0,01
	3	0,05±0,01	0,05±0,04	0,42±0,01	0,09±0,01
	4	0,06±0,01	0,05±0,03	0,93±0,01	0,18±0,04
	5	0,06±0,01	0,05±0,03	1,19±0,02	0,34±0,09
	6	0,06±0,02	0,05±0,04	1,34±0,02	0,70±0,15
	7	0,05±0,01	0,04±0,04	1,37±0,01	1,06±0,13
	8	0,06±0,02	0,05±0,03	1,45±0,01	1,37±0,08
	9	0,06±0,01	0,05±0,03	1,51±0,02	1,53±0,04
	10	0,06±0,01	0,05±0,03	1,57±0,02	1,68±0,03

*среднее значение и стандартное отклонение (SD)

По результатам выращивания *Pseudomonas parafulva* при разных значениях pH, рост бактерии наблюдался при pH 7, 9, в условиях pH 3, 5 рост

не наблюдался. По истечению 10 часов наибольшее значение показателя $ОП_{600}$ составило 1.68 при выращивании в условиях pH 9, наименьшее значение составило 0,05 при pH 5.

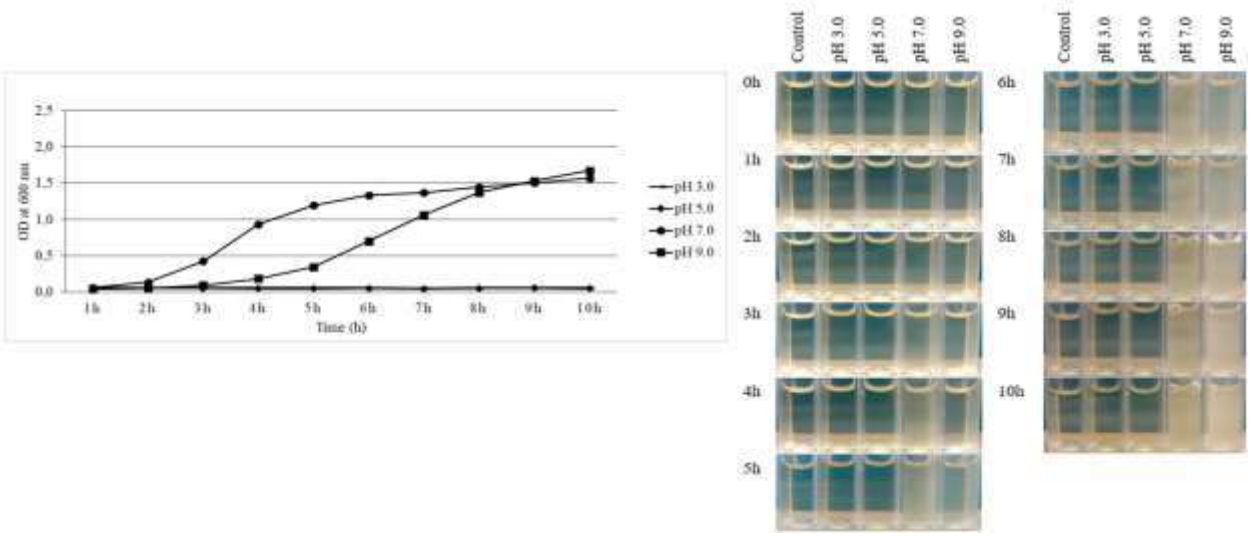


Рисунок 19 – Результаты роста *Pseudomonas parafulva* в среде с различным pH

По результатам представленного графика определено что лаг-фаза *Pseudomonas parafulva* наблюдается в течение часа после посева бактерий, логарифмическая фаза наблюдалась от 1 часа до 8 часов (pH 7, 9), далее рост заметно замедлялся (стационарная фаза) от 8 до 10 часов, в условиях pH 3, 5 рост бактерий не наблюдался, за исследуемый период времени фаза отмерания не наблюдалась.

Несмотря на многочисленные попытки прояснить филогенетические отношения внутри рода (Martínez-Murcia, 1992; Huys, 1996; Martínez-Murcia, 1999), систематизация *Aeromonas* на основе только биохимических и физиологических признаков остается крайне сложной задачей. Традиционные дифференцирующие тесты, такие как подвижность и продукция индола, используемые для отделения подвидов *Aeromonas salmonicida* (Popoff, 1984; Wiklund, 1998; Pavan, 2000), часто дают противоречивые результаты. Исследования (Martínez-Murcia, 2005) показали, что подвижность является стабильным признаком только для эталонных штаммов, в то время как у полевых изолятов она варьирует. Аналогичная изменчивость характерна и для продукции индола, что заставляет многих авторов классифицировать многочисленные изоляты как «атипичные» (Austin, 1989; Austin, 1998; Høie, 1999; Lund, 2002).

Обширный пересмотр классических тестов выявил массу противоречий в данных по образованию кислоты из сорбита, рамнозы, лактозы, уроковой кислоты и D-лактата внутри видов *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas bestiarum* и *Aeromonas salmonicida* (Abbott, 1992; Hänninen, 1994; Ali, 1996; Kaznowski, 1998). Ранее эти тесты считались надежными маркерами, однако высокая фенотипическая пластичность аэромонад нивелирует их диагностическую

ценность. В связи с вышеизложенным, окончательная идентификация данных изолятов внутри рода *Aeromonas*, как и в случае с бактериями рода *Pseudomonas*, исключительно на основании биохимических и физиологических характеристик оказалась невозможной. Это обуславливает необходимость применения методов молекулярно-генетического анализа для точного установления видовой принадлежности патогенов.

2.3 Молекулярно-генетическая идентификация

Как известно из фундаментальных источников (Altinok, 2006; Di, 2018; Chen, 2019; Yazdanpanah, 2020), наиболее эффективным методом дифференциации бактериальных патогенов в современной ихтиопатологии являются молекулярно-генетические исследования. Данный подход характеризуется беспрецедентно высокой точностью идентификации не только на уровне вида, но и на внутривидовом уровне, что критически важно для эпидемиологического мониторинга и разработки стратегий биобезопасности в промышленной аквакультуре. Поскольку на сегодняшний день сформированы обширные международные базы данных (такие как GenBank) с депонированными нуклеотидными последовательностями большинства известных микроорганизмов, использование метода амплификации определенных участков генома посредством полимеразной цепной реакции (ПЦР) стало одним из самых распространенных и оперативных способов определения таксономической принадлежности (Mashzhan, 2025).

Применение универсальных бактериальных праймеров на начальных этапах способствует четкой дифференциации бактерий от других групп микроорганизмов, таких как микроскопические грибы или простейшие. Фундаментальный принцип ПЦР-идентификации основан на использовании специально синтезированных олигонуклеотидов (родо- или видоспецифических праймеров), которые посредством комплементарного связывания с исследуемой ДНК-матрицей обеспечивают избирательную амплификацию целевого участка гена. В современной диагностике бактериальных болезней рыб наиболее часто задействуют праймеры к гену 16S рРНК, а также к специфическим генам вирулентности. К примеру, для верификации таких значимых патогенов, как *Aeromonas hydrophila, Aeromonas veronii, Pseudomonas aeruginosa* и *Pseudomonas putida*, применяют специфические праймеры для амплификации генов 16S рРНК и 16S рДНК (Bakiyev, 2021), что позволяет получить надежный диагностический результат даже при высокой фенотипической изменчивости штаммов, выделенных из различных гидробионтов.

Однако для более глубокого анализа и построения достоверного филогенетического древа исследуемых штаммов одного лишь ПЦР-скрининга часто оказывается недостаточно. В литературе (Nagar, 2013; Lamy, 2010) отмечается, что анализ последовательности гена 16S рРНК как филогенетического маркера между близкородственными видами *Aeromonas*

может быть малоэффективен из-за высокого уровня консервативности этого участка. В таких случаях проводится секвенирование альтернативных генетических маркеров, таких как ген субъединицы Б ДНК-гиразы (*gyrB*), сигма-фактор РНК-полимеразы (*rpoD*) или белок теплового шока (*dnaJ*). Использование гена *gyrB* зачастую обеспечивает более высокое разрешение при разграничении видов внутри родов *Aeromonas* и *Pseudomonas*, что позволяет восстановить точную эволюционную дистанцию между представленными изолятами и эталонными штаммами из мировых коллекций.

Скорость молекулярной эволюции гена *gyrB* значительно выше по сравнению с 16S рРНК, что способствует выявлению внутривидовых связей на уровне отдельных штаммов (Kasai, 1998; Yanez, 2003; Abu-Elala, 2015). Это особенно важно при работе с «атипичными» штаммами, чьи биохимические свойства могут быть изменчивы под воздействием условий среды в установках замкнутого водоснабжения (УЗВ). В связи с вышеизложенным, применение мультилокусного секвенирования (MLSA) в сочетании с полногеномным анализом в ряде случаев является единственным способом окончательной верификации этиологического агента, ответственного за возникновение бактериозов у сибирского осетра в условиях ТОО «УНКОППА».

Несмотря на широкое распространение метода, в современной литературе все чаще отмечается, что анализ последовательности гена 16S рРНК как филогенетического маркера для разграничения видов внутри рода *Aeromonas* зачастую оказывается малоэффективным. Данный ген более применим для идентификации бактерий на уровне рода, тогда как его разрешающая способность на межвидовом уровне ограничена (Nagar, 2013). Высокая степень консервативности 16S рРНК приводит к тому, что близкородственные виды могут иметь идентичные последовательности этого локуса. Так, в исследованиях (Lamy, 2010) не удалось четко дифференцировать штаммы *Aeromonas caviae* от *Aeromonas aquariorum* и *Aeromonas hydrophila* subsp. *dhakensis*, что существенно затрудняет процесс верификации патогенов и постановку точного диагноза. В связи с вышеуказанным, для более детального анализа генетической природы изолятов возникает необходимость использования дополнительных молекулярных маркеров, обеспечивающих более надежную систематическую дифференциацию.

Авторы (Yanez, 2003; Abu-Elala, 2015) подчеркивают, что использование последовательности гена *gyrB* (субъединица Б ДНК-гиразы) позволяет успешно дифференцировать не только виды, относящиеся к роду *Aeromonas*, но и прослеживать внутривидовые связи на уровне отдельных штаммов. Это обусловлено тем, что скорость молекулярной эволюции гена *gyrB* значительно выше по сравнению с 16S рРНК, при этом сам ген также распространен повсеместно среди бактериальных таксонов, что делает его универсальным и высокоинформативным инструментом (Kasai, 1998). Более высокая вариабельность нуклеотидной последовательности *gyrB* позволяет выявлять тонкие генетические различия, которые нивелируются при анализе рибосомальных генов.

В современных исследованиях, таких как работы (Di, 2018) и (Chen, 2019), для определения филогенетического родства и происхождения изолированных штаммов *Aeromonas hydrophila* и *Aeromonas veronii* применялся комплексный подход. Секвенирование определенных участков генов 16S рРНК, *gyrB* и сигма-фактора РНК-полимеразы (*rpoD*) позволило авторам с высокой точностью дифференцировать новые изоляты бактерий и уточнить их таксономический статус (Bakiyev, 2021). Использование мультилокусного анализа (MLSA) минимизирует риск диагностических ошибок и позволяет реконструировать достоверную филогению патогенов.

Для практической реализации молекулярно-генетической идентификации выделенных изолятов применяли метод ПЦР. Данный этап включал амплификацию специфических участков генома с использованием пар праймеров, подобранных с учетом необходимости как родовой верификации, так и видовой дифференциации. Характеристики использованных в работе олигонуклеотидов, включая их нуклеотидную последовательность и ожидаемый размер ампликонов, представлены в таблице 15.

Таблица 15 – Последовательности видо- и родоспецифических праймеров

Праймеры	Последовательность ДНК (5’-3’)	Ампликон (п.н.)	Источник (ссылка)
1	*2*	*3*	*4*
27f	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	1466	(Lane, 1991)
1492r	GGCTACCTTGTTACGACTT		
*gyr*B-F	TCCGGCGGTCTGCACGGCGT	1100	(Hu, 2012)
*gyr*B-R	TTGTCCGGGTTGTACTCGTC		
*rpo*D-F	ACGACTGACCCGGTACGCATGTAYATGM GNGARATGGGNACNGT	903	(Yamamoto, 2000)
*rpo*D-R	ATAGAAATAACCAGACGTAAGTTNGCYT CNACCATYTCYTTYTT		
*fla*A-F	CACCCCNTTGTTCCATCT	988	(Farfán, 2009)
*fla*A-R	GCTTAGGAGAATGGTTATG		
*vap*A -F	GGCTGATCTCTTCATCCTCACCC	421	(Kim, 2011)
*vap*A -R	CAGAGTGAAATCTACCAGCGGTGC		
RW01	AACTGGAGGAAGGTGGGGAT	370	(Greisen, 1994)
DG74	AGGAGGTGATCCAACCGCA		
A16SF	GGGAGTGCCTTCGGGAATCAGA	356	(Wang, 2003)
A16SR	TCACCGCAACATTCTGATTTG		
PA-GS-F	GACGGGTGAGTAATGCCTA	618	(Spilker, 2004)
PA-GS-R	CACTGGTGTTCCTTCCTATA		
AH-aerAF	CAAGAACAAGTTCAAGTGGCCA	309	(Wang, 2003)
AH-aerAR	ACGAAGGTGTGGTTCCAGT		

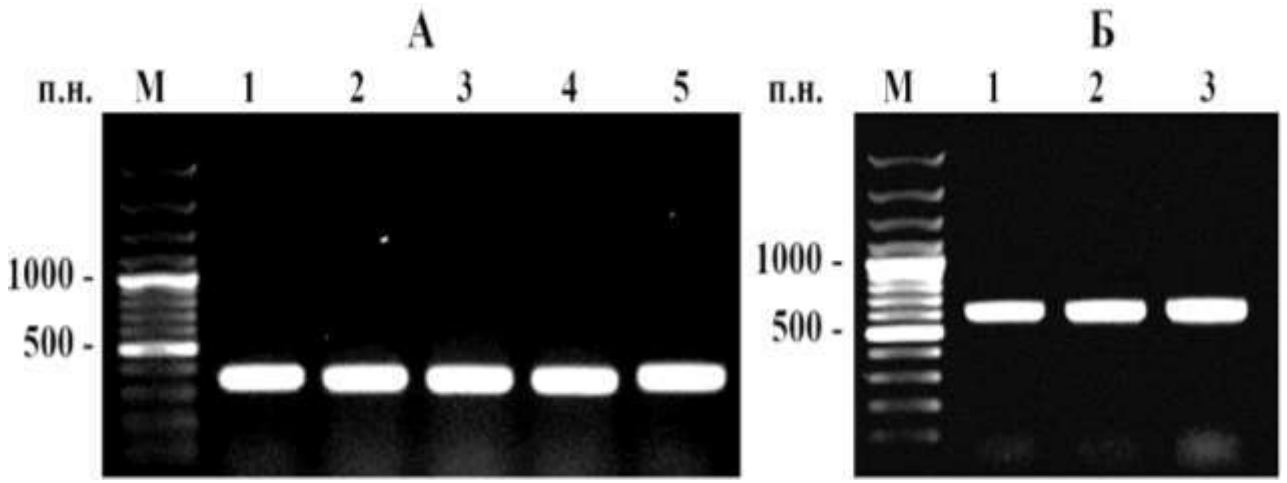
продолжение таблицы 15

1	*2*	*3*	*4*
ASA1-F	TAAAGGGAAATAATGACGGCG	249	(Wang, 2003)
ASA1-R	GGCTGTAGGTATCGGTTTTCG		
PAAS1-F	CGTTGGATATGGCTCTTCT	423	(Del Cerro, 2002)
PAAS2-R	CTCAAAACGGCTGCGTACCA		
16S_P_flu-F	TGCATTCAAAACTGACTG	850	(Scarpellini, 2004)
16S_P_flu-R	AATCACACCGTGGTAACCG		
P_putd -F	CAACTCGGGCGTTGGCATTCTGCT	747	(Yamamoto, 1995)
P_putd - R	CAAGATCGCCTGGGTACGACGGTT		

Биохимические особенности выделенных изолятов в основном соответствовали классическим характеристикам родов *Aeromonas* и *Pseudomonas*, описанным в современной литературе (Бакиев, 2020; Бакиев, 2021; Бисенбаев, 2021; Bakiyev, 2021; Бакиев, 2022; Тилвалдиева, 2022; Балтахожа, 2022; Bakiyev, 2022). Однако, как показал предварительный анализ, использование только фенотипических признаков является недостаточным для достоверного определения видовой принадлежности, что связано с высокой метаболической пластичностью патогенов. В связи с этим, для уточнения таксономического статуса была проведена молекулярная идентификация. Для изолятов рода *Aeromonas* анализ проводился по двум генетическим маркерам - 16S рРНК и *gyrB*, что позволило повысить разрешающую способность метода, в то время как для представителей рода *Pseudomonas* на данном этапе ограничились анализом гена 16S рРНК.

Бактериальная геномная ДНК была выделена из всех предварительно протестированных штаммов экспресс-методом кипячения, обеспечивающим достаточную чистоту матрицы для последующей амплификации. На первом этапе молекулярного анализа все изоляты были проверены на принадлежность к целевым родам с помощью ПЦР. Для этого использовались универсальные бактериальные праймеры 27f и 1492r, нацеленные на консервативные участки гена 16S рРНК. После завершения циклов амплификации продукты ПЦР подвергались фракционированию с помощью горизонтального электрофореза в 1% агарозном геле в присутствии интеркалирующего красителя для визуализации нуклеиновых кислот.

Применение специфических систем праймеров для обнаружения родов *Aeromonas* и *Pseudomonas* привело к образованию ампликонов ожидаемого размера. В частности, для изолятов, отнесенных к роду *Aeromonas*, размер фрагмента составил 356 п.н., а для рода *Pseudomonas* – 618 п.н. Полученные результаты электрофоретического анализа однозначно подтвердили родовую принадлежность всех шести исследованных изолятов, что послужило надежным фундаментом для перехода к этапу секвенирования и окончательной видовой идентификации патогенов, ответственных за развитие бактериозов у осетровых рыб в условиях УЗВ (рисунок 20).



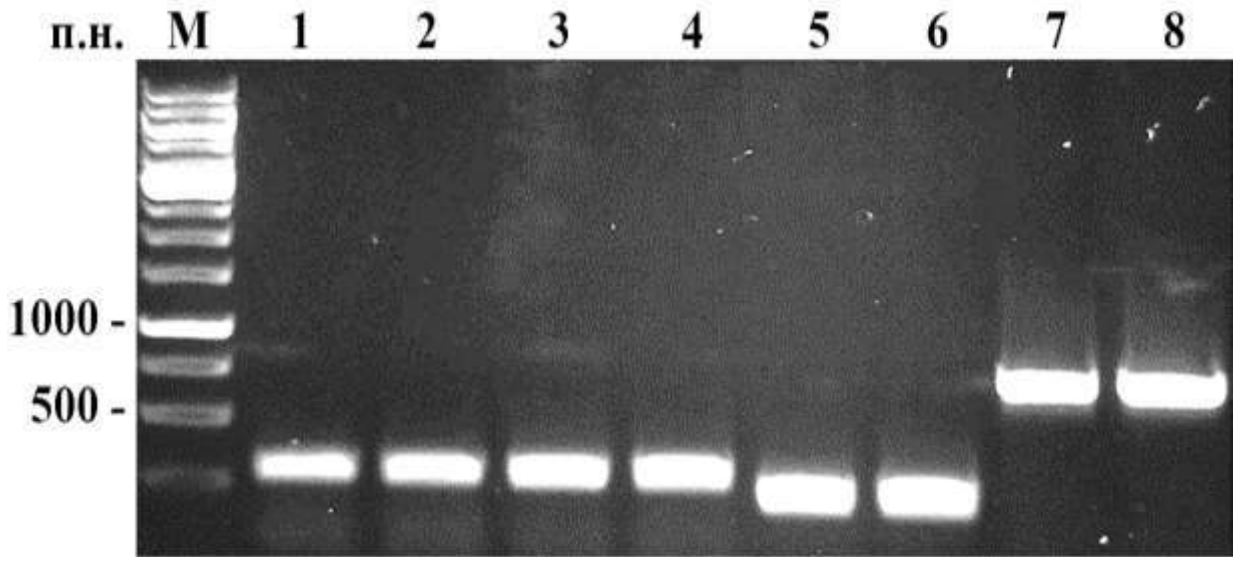
А) *Aeromonas* spp.16S рРНК ген, 356 п.н.; Б) 16S рРНК ген *Pseudomonas* spp., 618 п.н.; М) ДНК маркер молекулярного размера 100 п.н.; 1-5) изоляты бактерий рода *Aeromonas и Pseudomonas.*

Рисунок 20 – Электрофорез ПЦР (с использованием родоспецифических пар праймеров) продуктов в агарозном геле

В последующих экспериментах было решено идентифицировать видовую принадлежность исследуемых изолятов родов *Aeromonas* и *Pseudomonas* с помощью метода ПЦР с использованием высокоспецифичных праймеров. Данные праймеры были сконструированы на основе последовательностей генов и межгенных спейсеров рибосомальных и белоккодирующих локусов, что обеспечило высокую точность дифференциации. Окончательная верификация проводилась путем электрофоретического анализа продуктов реакции и сопоставления их фактической длины с ожидаемыми расчетными значениями.

В качестве матрицы для ПЦР-реакции использовалась очищенная геномная ДНК, выделенная из шести исследуемых штаммов. Для обеспечения достоверности полученных результатов и исключения ложноположительных реакций в качестве отрицательного контроля был использован типовой штамм *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Abony* (NCTC 6017). В ходе эксперимента ПЦР-продукты у контрольного штамма не обнаруживались ни с одной из используемых пар праймеров, что подтверждает высокую специфичность выбранных генетических систем.

Анализ электрофореграмм показал, что специфические продукты амплификации ожидаемой длины образовывались только при использовании праймеров, комплементарных соответствующим видам. Результаты молекулярно-генетического анализа позволили однозначно определить видовую принадлежность изолятов: штаммы AB004 и AB006 были идентифицированы как *Pseudomonas putida* и *Pseudomonas fluorescens* соответственно. ПЦР-анализ представителей рода *Aeromonas* продемонстрировал более широкое видовое разнообразие: изоляты AB001, AB002, AB003 и AB005 были отнесены к видам *Aeromonas salmonicida*, *Aeromonas sobria* и *Aeromonas hydrophila* (рисунок 21).



M) ДНК маркер молекулярного размера 1 т.п.н.; 1, 2) *Aeromonas hydrophila aerA* ген, 309 п.н.; 3, 4) *Aeromonas salmonicida* 16S рРНК ген, 423 п.н.; 5, 6) *Aeromonas sobria asa1* ген, 249 п.н.; 7) *Pseudomonas fluorescence* 16S рРНК ген, 850 п.н.; 8) *Pseudomonas putida gyr*B ген, 747 п.н.

Рисунок 21 – Электрофорез ПЦР (с использованием видоспецифических пар праймеров) продуктов в агарозном геле

Установление точного видового состава патогенов является ключевым этапом для понимания этиологии бактериозов в хозяйстве и последующей оценки вирулентности каждого выделенного штамма.

Несмотря на высокую специфичность используемых праймеров, следует учитывать, что генотипы многих видов, принадлежащих к родам *Aeromonas* и *Pseudomonas*, характеризуются чрезвычайно высокой степенью гомологии. В ряде случаев из-за недостаточной межвидовой изменчивости нуклеотидных последовательностей и выраженной гетерогенности анализируемых фрагментов генов-мишеней, классическая ПЦР-диагностика с помощью геноспецифических праймеров может оказаться малоэффективной для окончательной видовой дифференциации. Существующий риск получения ложноположительных или неспецифических результатов при работе с близкородственными таксонами диктует необходимость применения более прецизионных методов анализа.

В связи с этим, для обеспечения максимальной достоверности таксономического статуса выделенных штаммов, в последующих исследованиях было проведено прямое секвенирование генов 16S рРНК и *gyrB* для всех шести изолятов бактерий. Использование двух различных генетических локусов (рибосомального и белоккодирующего) позволило нивелировать ограничения, связанные с консервативностью отдельных участков генома. Секвенирование гена 16S рРНК обеспечило надежную родовую верификацию, в то время как анализ последовательности гена

субъединицы Б ДНК-гиразы (*gyrB*) позволил выявить тонкие межвидовые различия, недоступные для стандартных ПЦР-тестов.

Полученные в ходе высокоточного секвенирования нуклеотидные последовательности ключевых генетических маркеров были подвергнуты многоэтапному биоинформационному анализу. На первом этапе первичные данные («риды») проходили процедуру контроля качества и выравнивания, после чего сопоставлялись с валидированными референсными последовательностями из международной базы данных GenBank (NCBI).

Применение такого комплексного молекулярного подхода позволило не только провести верификацию видовой принадлежности изолятов *Aeromonas salmonicida*, *Aeromonas sobria*, *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas putida* и *Pseudomonas fluorescens*, но и, что более важно для эпизоотологического прогнозирования, определить степень их филогенетического родства с наиболее вирулентными и патогенными штаммами, зафиксированными в мировой аквакультуре. Полученные результаты стали фундаментом для формирования целостной этиологической картины бактериозов осетровых рыб в условиях конкретного индустриального хозяйства.

В современной систематике микроорганизмов секвенирование полноразмерных генов 16S рРНК признано «золотым стандартом» и характеризуется как один из наиболее надежных методов таксономического определения. Обладая чередующимися консервативными и гипервариабельными участками, этот ген позволяет проводить идентификацию с высокой степенью достоверности. В связи с этим, для глубокого сравнительного филогенетического анализа нами была получена полная последовательность гена 16S рРНК из наиболее репрезентативных изолятов рода *Pseudomonas* (штаммы AB004 и AB006).

Экспериментальная часть включала амплификацию полноразмерного локуса с использованием универсальных бактериальных праймеров, нацеленных на терминальные участки гена. Контроль качества амплификации проводился методом горизонтального электрофореза в 1% агарозном геле. Полученные результаты визуализации подтвердили высокую специфичность подобранных условий ПЦР: во всех опытных лунках наблюдалась единственная четкая полоса, локализованная на уровне 1466 п.н., что полностью соответствует теоретически ожидаемой длине фрагмента (рисунок 22).

Последующее определение первичной структуры ДНК (секвенирование) осуществлялось на базе специализированной контрактной лаборатории BIOFIDAL (Vaulx en Velin Cedex, Франция) с использованием капиллярных секвенаторов последнего поколения. Обработка полученных «сырых» данных проводилась с привлечением широкого спектра биоинформационных ресурсов и онлайн-сервисов. Для первичного поиска гомологов использовался алгоритм BLAST, интегрированный в специализированную базу данных leBIBI – облачный ресурс, ориентированный на прецизионную филогению патогенных микроорганизмов.

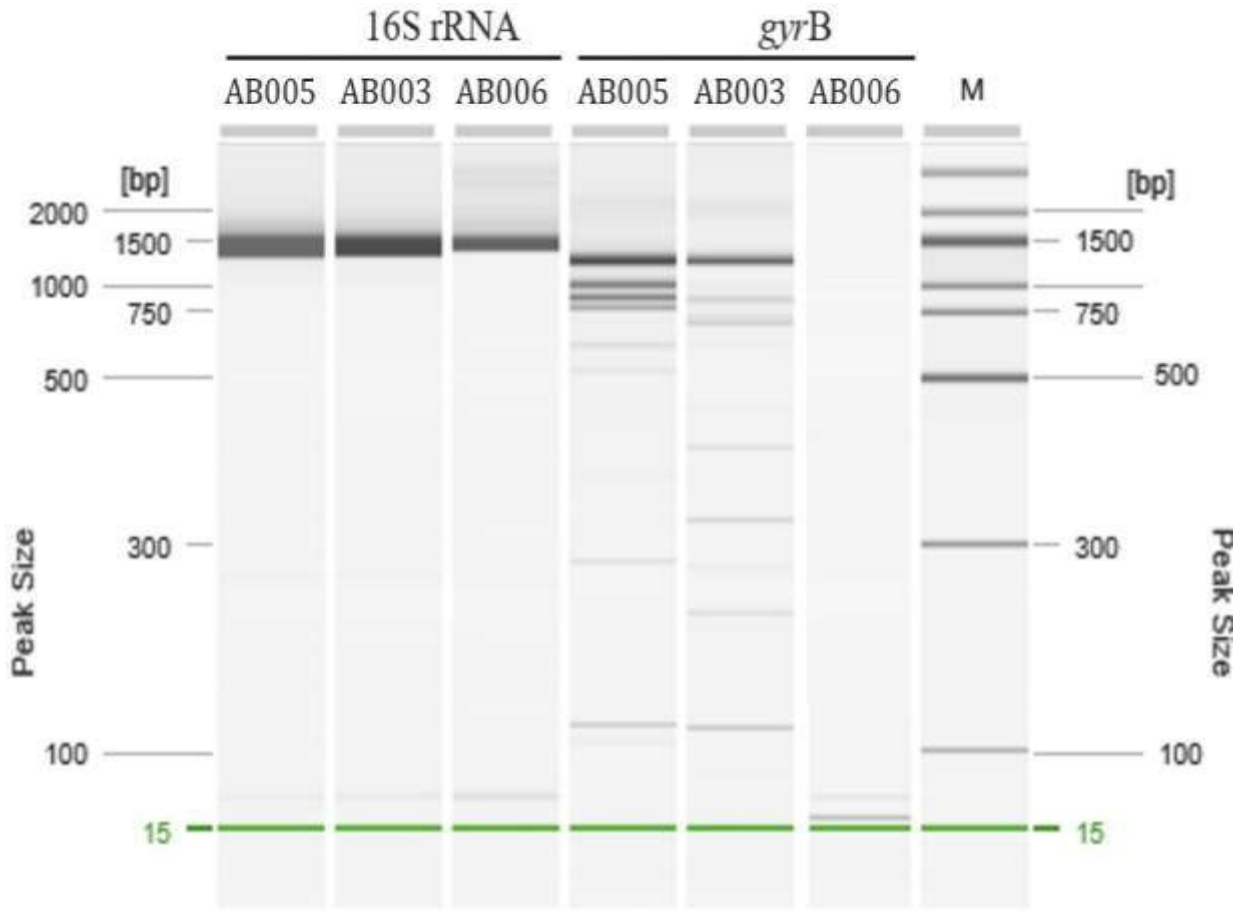


Рисунок 22 – Анализ ПЦР продуктов16S рРНК и *gyr*B генов штаммов AB003, AB005, AB006 с использованием ген-специфичных праймеров с помощью электрофореза на QIAxcel

Редактирование и ручная корректировка последовательностей выполнялись в среде BioEdit, а для пакетной обработки и статистической оценки данных применялся инструментарий BioStar. Процедура множественного выравнивания нуклеотидных последовательностей реализовывалась через алгоритм CLUSTALW, обеспечивающий оптимальное сопоставление делеций и инсерций. Финальное построение филогенетических деревьев осуществлялось по методу присоединения ближайших соседей (*Neighbor-Joining method*). Данный алгоритм, реализованный в пакете программ leBIBI, позволил математически обосновать дистанцию между исследуемыми изолятами и типовыми штаммами, наглядно продемонстрировав их эволюционное положение в структуре соответствующих семейств.

Важным завершающим этапом верификации молекулярно-генетических данных стала регистрация расшифрованных нуклеотидных последовательностей в международном информационном поле. Все аннотированные полноразмерные последовательности генов 16S рРНК, характеризующие уникальный генетический профиль выделенных нами штаммов, были официально депонированы в крупнейшую мировую базу данных генетических ресурсов – GenBank Национального центра биотехнологической информации (NCBI).

Процедура депонирования позволила закрепить научный приоритет проведенных исследований и обеспечила интеграцию полученных данных в глобальную систему мониторинга микробиологических объектов. По результатам многоступенчатой экспертизы, подтверждающей качество и достоверность прочтения последовательностей, администрацией GenBank каждому образцу были присвоены уникальные международные регистрационные номера (Accession Numbers). Эти буквенно-цифровые идентификаторы обеспечивают возможность оперативного поиска, сравнения и кросс-референсного анализа наших изолятов исследователями по всему миру через поисковые системы NCBI. Сводные данные по зарегистрированным последовательностям, включая их наименования и соответствующие номера для поиска в базе данных, систематизированы в таблице 16.

Таблица 16 – Нуклеотидная последовательность исследованых генов бактерий

№ п/п	Вид бактерии, ген	Ген	Регистрационный номер NCBI	Нуклеотидная последовательность 5’-3’
1	*Aeromonas hydrophila*	16S рРНК	OK634406	TCWWGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAG CGGCAGCGGGAAAGTAGCTTGCTACTTTTGCCGGCGAGCGGCGGACGGGT GAGTAATGCCTGGGAAATTGCCCAGTCGAGGGGGATAACAGTTGGAAAC GACTGCTAATACCGCATACGCCCTACGGGGGAAAGCAGGGGACCTTCGG GCCTTGCGCGATTGGATATGCCCAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTA ATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCC ACACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG GAATATTGCACAATGGGGGAAACCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGA AGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGAGGAGGAAAGGTTGATG CCTAATACGTATCAACTGTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACCGGCTAAC TCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAAT TACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTGGATAAGTTAGATGTGAAAG CCCCGGGCTCAACCTGGGAATTGCATTTAAAACTGTCCAGCTAGAGTCTT GTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCT GGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTC AGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA CGCCGTAAACGATGTCGATTTGGAGGCTGTGTCCTTGAGACGTGGCTTCC GGAGCTAACGCGTTAAATCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTA AAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGT TTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGTCTGGAA TCCTGCAGAGATGCGGGAGTGCCTTCGGGAATCAGAACACAGGTGCTGCA TGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGA GCGCAACCCCTGTCCTTTGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGAACTCAAGGG AGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATC ATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCGTACAGAG GGCTGCAAGCTAGCGATAGTGAGCGAATCCCAAAAAGCGCGTCGTAGTCC GGATCGGAGTCTGCAACTCGACTCCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCG CAAATCAGAATGTTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCC CGTCACACCATGGG
2	*Aeromonas*	*gyr*B	ON124027	ATCCGTCGCAACGGCCATGTCTACGAGCAGACCTATCACCTGGGTGAGCC

	hydrophila			GCAGGCACCGCTCAAGCAGATTGGCGACAGCACCGGCACCGGGACCGAA GTCCGCTTCTGGCCGAGCCCGACCATCTTCAGCGATACCCTGTTCCACTAC GAGATCCTGGCCAAGCGTCTGCGTGAGCTCTCCTTCCTCAACTCCGGCGTC TCCATCCGCCTGCTGGATGAGCGTGACGGTCGCGAGGCGCACTTCTGCTA CGAAGGCGGCATCAAGGCGTTCGTCGAATACCTGAACCAGAACAAAACC CCGATCCACCCGAAGGTGTTCCACTTCACCACCGAGCAGGACGGCATCGG TGTCGAAGTGGCGATGCAGTGGAACGACGCCTATCAGGAAGGGGTCTACT GCTTCACCAACAACATTCCGCAGCGTGATGGTGGTACCCACCTGGTGGGC TTCCGTACCGCGCTGACCCGTACTCTGAACTCCTACATGGACAAAGAGGA CTACAGCAAGAAGGCCAAGTCTGCCGCCAGTGGCGACGACGTGCGTGAA GGTCTGATTGCCGTTATCTCCGTCAAGGTGCCTGACCCTAAGTTCTCCTCC CAGACCAAGGACAAGCTGGTCTCTTCCGAAGTGAAGACCGCCGTCGAACA GGCGATGGGTGAGAAGCTGGCCGACTTCCTGCTGGAAAACCCGGGCGAT GCCAAGATCGTGGTCAACAAGATCATCGATGCGGCCCGTGCCCGCGAAGC GGCCCGCAAGGCCCGCGAACTGACTCGCCGTAAAGGCGCGCTGGATATTG CCGGTTTGCCCGGCAAGCTGGCCGACTGTCAGGAAAAAGACCCGGCGCTC TCCGAACTCTACATAGTGGAAGGGGACTCTGCTGGCGGTTCCGCCAAGCA GGGTCGCAACCGGAAGAACCAGGCCATCCTGCCGCTCAAGGGCAAGATC CTGAAAGTGGAGAAGGCCCGTTTCGACAAGATGATCTCTTCTCAGGAGGT GGGCACCCTGATCACGGCA
3	*Aeromonas salmonicida*	16S рРНК	OK634025	AGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGG CAGCGGGAAAGTAGCTTGCTACTTTTGCCGGCGAGCGGCGGACGGGTGAG TAATGCCTGGGGATCTGCCCAGTCGAGGGGGATAACAGTTGGAAACGACT GCTAATACCGCATACGCCCTACGGGGGAAAGGAGGGGACCTTCGGGCCTT TCGCGATTGGATGAACCCAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGC TCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACT GGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATA TTGCACAATGGGGGAAACCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAG GCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGAGGAGGAAAGGTTGGCGCCTAA TACGTGTCAACTGTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGT GCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTG GGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTGGATAAGTTAGATGTGAAAGCCCCG GGCTCAACCTGGGAATTGCATTTAAAACTGTCCAGCTAGAGTCTTGTAGA GGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGG

				AATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTG CGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCG TAAACGATGTCGATTTGGAGGCTGTGTCCTTGAGACGTGGCTTCCGGAGC TAACGCGTTAAATCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACTC AAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTC GATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGTCTGGAATCCTGYA GAGATRCGGGAGTGCCTTCGGGAATCAGAACACAGGTGCTGCATGGCTGT CGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAAC CCCTGTCCTTTGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGAACTCAAGGGAGACTGC CGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCC TTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCGTACAGAGGGCTGCA AGCTAGCGATAGTGAGCGAATCCCATAGAGCGCGTCGTAGTCCGGATCGG AGTCTGCAACTCGACTCCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCA AAATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACA CCATGGGGAGTGGGTTGCACCATAAATAGATAGCTTAACCTTCSGGAGGG GTTTACCACGGTGTGAT
5	*Aeromonas salmonicida*	*gyr*B	ON124026	GTCAACGCCCTCTCTGACAGGCTGGTGCTGACCATACGTCGCAATGGCCA TGTCTACGAGCAGACCTATCACCTGGGTGAGCCGCAGGCGCCGCTCAAGC AGATTGGTGACAGCAGCAGCGGCACGGGTACCGAAGTACGCTTCTGGCCG AGCCCGACCATCTTTACCGATACCCTGTATCACTACGAGATCCTGGCCAA GCGTCTGCGCGAGCTCTCCTTCCTCAACTCCGGTGTCTCCATCCGTCTGCA GGACGAGCGTGATGGCCGCGAGGTGCATTTCTGCTATGAGGGCGGTATCA AGGCGTTCGTTGAATACCTGAACCAGAACAAGACCCCGATCCACCCCAAG GTGTTCCACTTCTCCACAGAGCAGGACGGTATCGGTGTCGAAGTCGCCAT GCAGTGGAACGATGCCTATCAGGAAGGGGTTTACTGCTTCACCAACAACA TCCCGCAGCGGGATGGCGGTACTCACCTGGTGGGTTTCCGTACTGCGCTG ACCCGTACCCTCAACACCTATATGGACAAAGAGGATTACAGCAAGAAGG CCAAGTCGGCCGCCAGCGGCGACGACGTGCGTGAAGGTCTGATTGCGGTC ATCTCGGTCAAGGTACCGGATCCCAAGTTCTCCTCCCAGACCAAGGACAA ACTGGTCTCTTCCGAAGTGAAGACCGCCGTTGAACAGGCGATGGGTGAGA AGCTCGGCGAGTTCCTGCTGGAAAACCCGGGCGATGCCAAGATAGTGGTC AACAAGATCATTGATGCGGCCCGTGCCCGTGAAGCGGCCCGCAAGGCCCG CGAGCTGACTCGCCGCAAGGGTGCGCTGGATATCGCCGGTCTGCCCGGCA AGCTGGCAGACTGCCAGGAGAAAGACCCGGCTCTCTCCGAACTCTACATA

				GTGGAAGGGGACTCTGCTGGCGGTTCCGCCAAGCAGGGTCGCAACCGGA AGAACCAGGCCATACTGCCGCTCAAGGGCAAGATCCTGAACGTGGAGAA GGCCCGTTTCGACAAGATGATCTCCTCGCAAGATG
6	*Aeromonas salmonicida*	*rpo*D	OQ144653	GTCGAACTGCTGACCCGCGAAGGCGAAATCGACATCGCCAAGCGGATCG AAGACGGTATCAACCAGGTACAAAGCTCTGTGGCAGAGTACCCGGAAGC GATTACCTATCTGCTTGAGCAGTATGATAAATACGAAGCCGAACAGCTGC GTCTGTCCGATATCATCTCAGGTTTTATCGATCCTAACGAAGCCGATGATG TAGCACCGACTGCTACCCATATCGGTTCCGAACTCGGCGAAGACGATTTG GCCGACGAAGACGAAGACGAAGACGAAGATGAAGACGACGATGGTGAC AGCTCGGATGACGAAGGTGACGGTGGTCCTGATCCGGAAGTTGCTCGCGA GAAGTTTGGTGATCTGCGTGCCCAGTATGAGGTAACTCGCCTCTCCATTCA GAAGAATGGTCGTGCTCACGAAGATACCCAGGCTGCGATTGCCCAGCTGG CCGATGTGTTCCGTCAATTCCGCCTGATGCCCAAGCAGTTCGATCGCCTGG TCAACAACATGCGCGAAATGATGGAGCGCGTCCGCGTGCAGGAACGCAT CATCATGAAGCTCTGCGTTGAGCAGGCCAAAATGCCGAAGAAAACCTTCG TTGCGGCCTTCACCAACAACGAGTGTGAGACTGCCTGGTTTGAATACCAG AAACAGGCTGGCAAGGCTTGGTCTCCACGTCTGCTTGAGATGGACGAAGA AGTACTGCGTTCCATCGGCAAACTGCAGCAGATTGAAGAAGAGACGGGG CTGTCCATCGCCCAGATCAAGGACATCAACCGTCGCATGAGCATTGGTGA GGCCAAGGCCCGCCGTGCG
7	*Aeromonas salmonicida*	*flaA*	OQ144652	ATGGCACTTTATATCAATACGAACGTTTCATCGCTTAACGCCCAGCGTAAC CTGATGAACACCAACAAATCTCTGGATACTTCTTATACCCGTCTGGCATCT GGTCTGCGCATCAACAGCGCAAAAGACGATGCCGCAGGTCTGCAAATATC CAACCGTTTGACCTCCCAGATCAATGGACTGGACCAGGGTAACCGTAACG CCAACGATGGCATTTCCGTTGCCCAGACCGCAGAAGGTGCCATGGATGAA GTGACCTCCATGCTGCAACGGATGCGCACCCTTGCTCAGCAATCTGCCAA CGGTTCCAACAACACCGATGACCGTACCGCTTTGCAGCAAGAGTACACTC AGCTGATGACTGAAATCGACCGGGTGGCAAAAGACACCACCTTTGGTGGA CAGAACTTGCTCAGTGGTGGCTATGTAGGCTCCTTCCAGGTTGGCGCTGAT GCAGCTCAGACCATCACCTTCCGGATGACCACTGCCTTTACCATCTCGGGC ATGGCATCTGCCACCAGTGGCAGCGCAACGGTCACGACGACGGCATCCGG GGAGCCTTACCTGGTTACCAAAAACCCGGGAACTGCAGTCACCTCTGCCA GCATGTCGTCCATCCAGGCGGCCAGTTCAGCCCAGTCAGCCATGGCTAAC CTGGACTACATGATCAAGGTGGTGGACAGCAAGCGTGCGGAATTGGGTGC

				GGTACAAAACCGTTTTGACTCAACCATCCGCAACCAGGCGAACATCTCGG AGAACGTCAGTGCAGCTCGCTCACGTATTCGTGACGCAGACTTTGCGACC GAAACGGCCAACCTGACCAAGCAAAATATTTTGCAACAGGCGGCATCCAC TATACTGTCGCAGGCAAACCAGCGTCCCCAGTCTGCACTCTCGCTGCTGC AGGGCTAA
8	*Aeromonas veronii*	16S рРНК	OK634393	GGCATTAGAGTTTGAATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTA ACACATGCAAGTCGAGCGGCAGCGGGAAAGTAGCTTGCTACTTTTGCCGG CGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTGGGGATCTGCCCAGTCGAGGGG GATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATACGCCCTACGGGGGAA AGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCGATTGGATGAACCCAGGTGGGATTA GCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCT GAGAGGATGATCAGCCACACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTAC GGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGGAAACCCTGATGCAG CCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCG AGGAGGAAAGGTTGGTAGCTAATAACTGCCAGCTGTGACGTTACTCGCAG AAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGT GCAAGCGTTAATCGGAATTACTNGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTG GATAAGTTAGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAATTGCATTTAAA ACTGTCCAGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGG TGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCT GGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATT AGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGATTTGGAGGCTGTGT CCTTGAGACGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAATCGACCGCCTGGGGA GTACGGCCGCAAGGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAA GCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGG CCTTGACATGTCTGGAATCCTGYAGAGATRCGGGAGTGCCTTCGGGAATC AGAACACAGGTGCTGCRTGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGG GTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGTCCTTTGTTGCCAGCACGTAA TGGTGGGAACTCAAGGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGG GATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTA SAATGGCGCGTACAGAGGGCTGCAAGCTAGCGATAGTGAGCGAATCCCAT AGAGCGCGTCGTAGTCCGGATCGGAGTCTGCAACTCGACTCCGTGAAGTC GGAATCGCTAGTAATCGCAGATCACAATGTTGCGGTGAATACGTTCCCGG GCCTTGTACACACCGCCNGTCASACCATGGGAGTGGNTGCACCATAAATA

				AATAGCTAACCTTCGGGAGGGGTTTACNACGGTGTGATC
9	*Aeromonas veronii*	*gyr*B	-	GCGGTGATCAGGGTGCCACCTCTTGCGAGGAGATCATCTTGTCGAAACGG GCCTTCTCTACGTTCAGGATTTTACCCTTGAGCGGCAGGATGGCCTGGTTT TTACGGTTGCGACCCTGCTTGGCGGAACCGCCAGCAGAGTCCCCTTCCAC TATGTAGAGTTCGGAGAGAGCCGGGTCTTTTTCCTGACAGTCAGCCAGCT TGCCGGGCAGACCGGCGATATCCAGCGCGCCTTTGCGGCGGGTCAGTTCG CGGGCTTTGCGGGCCGCTTCACGGGCACGGGCCGCATCGATGATCTTGTT GACCACGATCTTGGCATCGCCCGGGTTTTCCAGCAGGAAGTCAGCCAGCT TCTCACCCATCGCCTGTTCAACGGCGGTCTTCACTTCGGAAGAGACCAGCT TGTCTTTGGTCTGGGATGAGAACTNGGGANCCGGCACCTTGACGGAGATA ACGGCAATCAAACCTTCACTTACGTCGTYGCCACTGGCGGCCGACCGGCC GAC
10	*Aeromonas bestiarum*	*gyr*B	-	AATTNNNNMGCCCTCAKCCTCAAANTNGCTSWNATGGCRTKKACCATAG NGTCRNNGAGTNWGATCAWNNTCTGCSAGCCCACCTATCASSGGGKYGA YCMKCAKCGCTSNMNCTTRASNNKNATTGGYYRWCTGTCACTCATTCSTC GCAKGNGTAMCTSAGNGCTACGCTTCTAGCCAAGCCMGACYATCWMCTC ACTSGATASSCNNGCTANNNACTAMNNNCANMCCGGCCAAKMGTCTGCG CRACCANMTCCTTCCWCAACTMMCGTBTCTCCTTCCATCTGCRGGACGAG CGTGATGGCCGCGAGGTGCATTTCTGCTATAAKGGCGGTRTYARKGCGTT CGTTGAATACCTKAACCAKAACAAGACCCCGATCCACCCCRAGGTGTTCC ACTTCTCCACAGAGCARGACGGTRTCGGTGTCGAACTCGCCATGCAYTGR AACGATSCCYATCATGAAGGGGTTTACTGCTTCACCAACAACATCCCGCA GCGGGATGGCGGTACTCACCTGGTGGGTTTCCGTACTGCGCTGACCCGTA CCCTCAACACCTATNTKGACCAASAGGATTACWGCAAGAAGGCCAAGTC CGCCGCCAGCGGCTACRACATGCSTGAAGGTCTGATTGCGGTCATCTCGTT CARGGTACCGGATCCCAAGTTCTCCTCCCMTACCAAGGACAAACTGGTCT CTTCCCAAGTGAACACCGCCCYNAAACAARCCATGCGTGAGAGACTCTGC GAATTCCTGCTGGAGGACCCGGGCGATNCCTMCATGATCGGKSAWCAAC ATCATTGATGCGGCCCNTGCCCGTCAAGCARACCGCACYGYCCGCGAGCT GACTCACNNNACGGGTGCGCTGGATATMACCCGTCTGCCTGCAAGGGACT TCTGCCAMGACAGGACNMGRWCTCTCTTATTCWNMTKGTCAAGGGAATG GGGTSBGGCTCGGSAAACCCGTAGNGGCTCCCCAGCCRGAHATCKYGCAH TMYGCTHATCKYGCAHTMYGCT
11	*Pseudomonas*	16S рРНК	OK634400	GCTAGATGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGATG

	parafulva			ACGGGAGCTTGCTTCCTTGATTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAG GAATCTGCCTGGTAGTGGGGGACAACGTTTCGAAAGGAACGCTAATACCG CATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCTATCAG ATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTTGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGC GACGATCCGTAACTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAACTGAGA CACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATG GGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGAT TGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGTTGTAGATTAATACTCTGCAA TTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCC GCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAG CGCGCGTAGGTGGTTTGTTAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCT GGGAACTGCATCCAAAACTGGCAAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGG AATTTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTG GCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTG GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTC AACTAGCCGTTGGAATCCTTGAGATTTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAA GTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACTCAAATGAATTGA CGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGC GAAGAACCTTACCAGGCCTTGACATGCAGAGAACTTTCCAGAGATGGATT GGTGCCTTCGGGAACTCTGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCG TGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTGTCCTTA GTTACCAGCACGTTATGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAAC CGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCTGGG CTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGT GGAGCTAATCTCACAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTC GACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTCGCGGT GAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCAMCCATGGGAGTGGG TTGCACCAGAAGTAGCTAGTCTACCTTCGGGAGGACGGTTACACGGTKTG ATCATGACTGGG
12	*Pseudomonas protegens*	16S рРНК		TTCATGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAG CGGCAGCACGGGTACTTGTACCTGGTGGCGAGCGGCGGACGGGTGAGTA ATGCCTAGGAATCTGCCTAGTAGTGGGGGATAACGTCCGGAAACGGGCGC TAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGTGGGGGATCTTCGGACCTCAC GCTATTAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTC

				ACCAAGGCGACGATCCGTAACTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGG AACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATT GGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGG TCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTTACCTAAT ACGTGATTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTG CCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGG GCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTTGTTAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGGG CTCAACCTGGGAACTGCATCCAAAACTGGCAAGCTAGAGTATGGTAGAGG GTGGTGGAATTTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAAC ACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGA AAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAA ACGATGTCAACTAGCCGKTGGGAGCCTTGAGCTCTTAGTGGCGCAGCTAA CGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACTCAAA TGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAA GCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCCTTGACATCCAATGAACTTTCTAGAG ATAGATTGGTGCCTTCGGGAACATTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGT CAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCT TGTCCTTAGTTACCAGCACGTTATGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGG TGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTAC GGCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAAAGGGTTGCCAAGC CGCGAGGTGGAGCTAATCCCATAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTC TGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAAT GTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCAT GGGA

Для установления точных эволюционных взаимосвязей между выделенными изолятами AB004 и AB006 и репрезентативными представителями рода *Pseudomonas* была проведена процедура реконструкции филогенетических деревьев (рисунок 23-33).

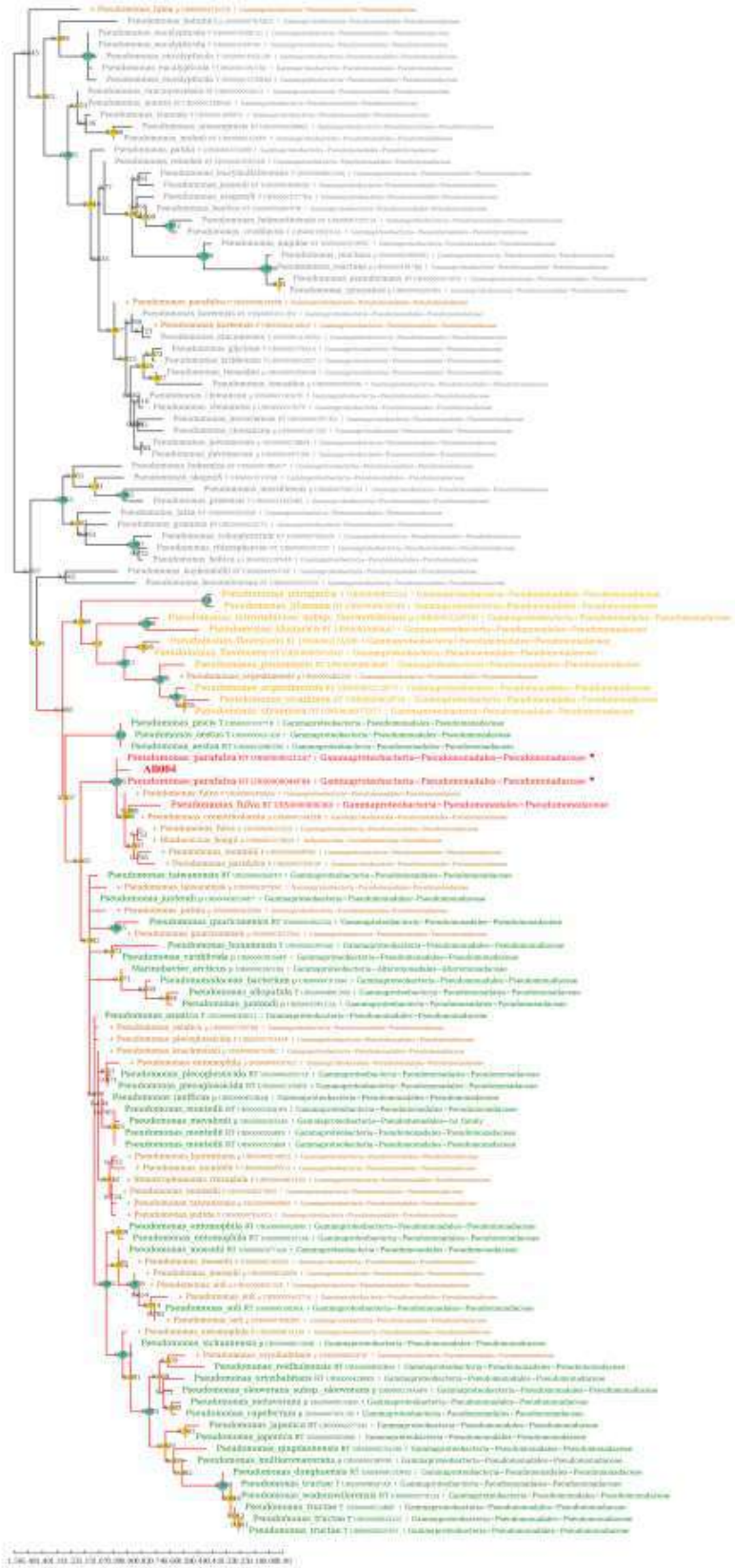


Рисунок 23 – Филогенетическое древо (16S рРНК), штамм AB004

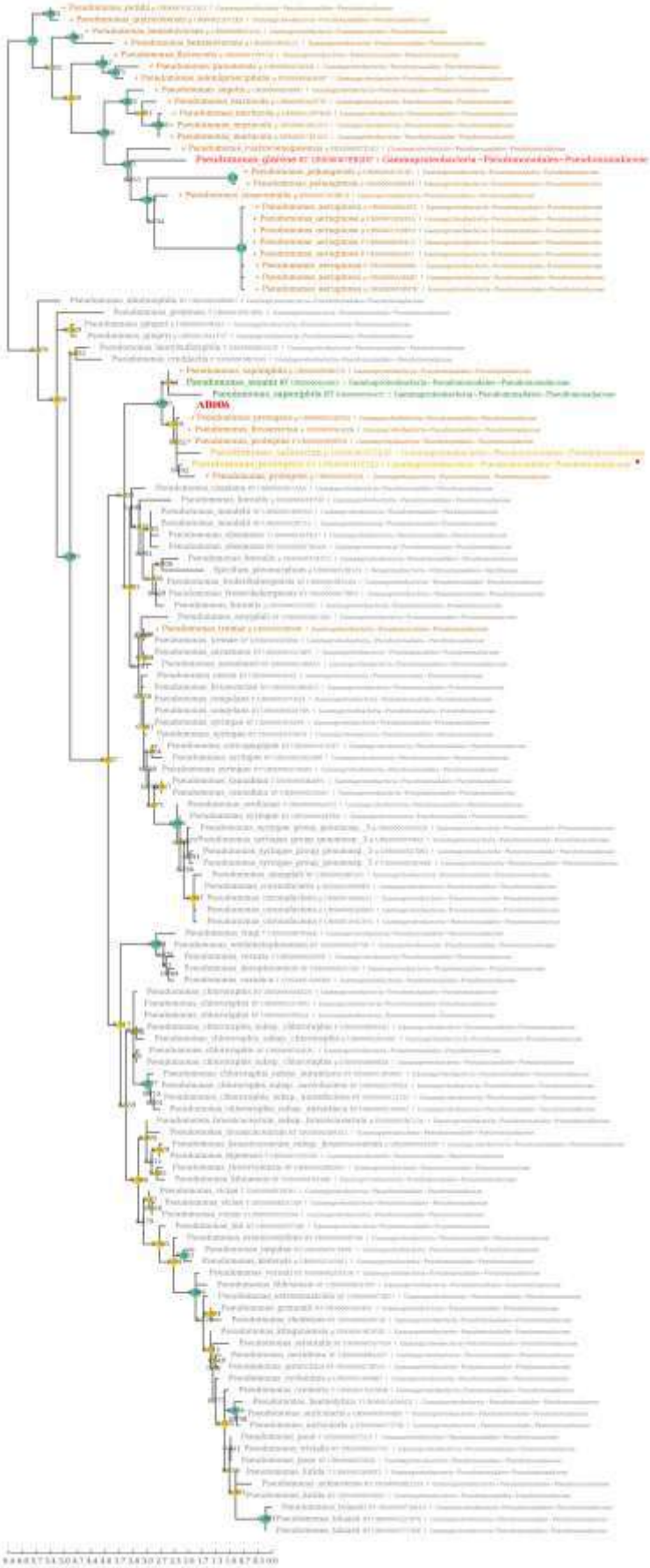


Рисунок 24 – Филогенетическое древо (16S рРНК), штамм АВ006

Использование современных алгоритмов кластеризации позволило визуализировать таксономическое положение штаммов в структуре семейства *Pseudomonadaceae*. Согласно топологии филогенетических деревьев, построенных на основе полных последовательностей гена 16S рРНК, изолят AB004 был четко детерминирован в составе единого кластера с валидированными видами *Pseudomonas parafulva*.

В свою очередь, штамм AB006 проявил высокую степень филогенетической близости к группе штаммов *Pseudomonas protegens*, сформировав с ними устойчивый монофилетический кластер.

Дополнительная верификация результатов проводилась путем анализа нуклеотидных последовательностей с использованием алгоритма BLASTN (Basic Local Alignment Search Tool Nucleotide). Математическое сопоставление данных подтвердило высокую степень гомологии: идентичность изолята AB004 со штаммами *Pseudomonas parafulva* составила 99,45%, а изолята AB006 со штаммами *Pseudomonas protegens* - 99,86%. Такие высокие показатели сходства в совокупности с топологией деревьев позволяют однозначно судить о видовой принадлежности указанных микроорганизмов.

Несмотря на то, что секвенирование гена 16S рРНК традиционно считается основополагающим и является одним из наиболее востребованных методов идентификации прокариот [275, 276], в отношении представителей рода *Aeromonas* данный маркер часто демонстрирует ограниченную дискриминационную способность [277]. Консервативность этого локуса у аэромонад затрудняет дифференциацию близкородственных видов, что делает использование только одного рибосомального гена недостаточно информативным для прецизионной систематики.

В качестве альтернативного высокоразрешающего маркера был выбран ген бета-субъединицы ДНК-гиразы (*gyr*B). Впервые предложенный для филогенетического анализа рода *Aeromonas* в работах Yanez и др. [125, с. 878], этот белоккодирующий ген продемонстрировал значительно более высокий уровень межузельного разрешения по сравнению с 16S рРНК. Для достижения максимальной достоверности видовой идентификации нами проводилось параллельное сопоставление филогенетических конструкций, полученных на основе как 16S рРНК, так и гена *gyrB*.



Рисунок 25 – Филогенетическое древо (16S рРНК), штамм АВ001

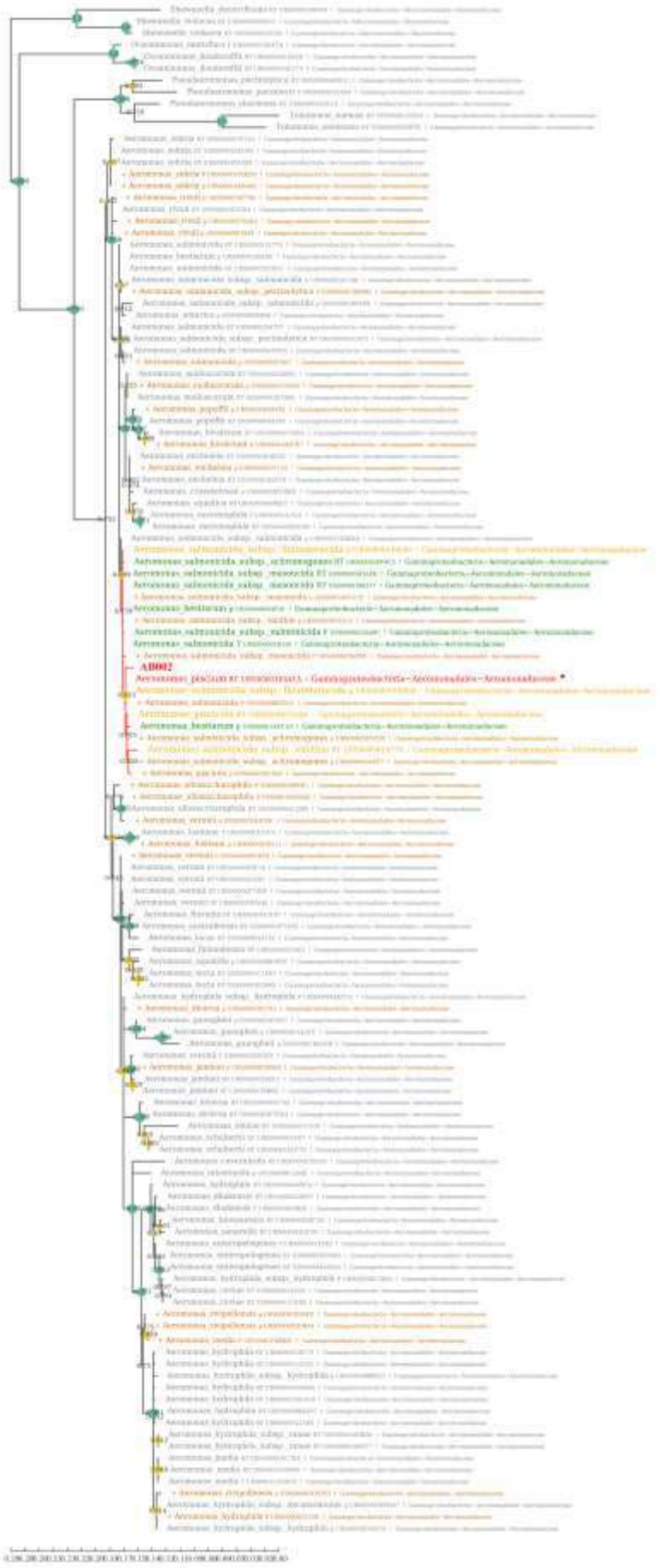


Рисунок 26 – Филогенетическое древо (16S рРНК), штамм AB002



Рисунок 27 – Филогенетическое древо (16S рРНК), штамм AB003

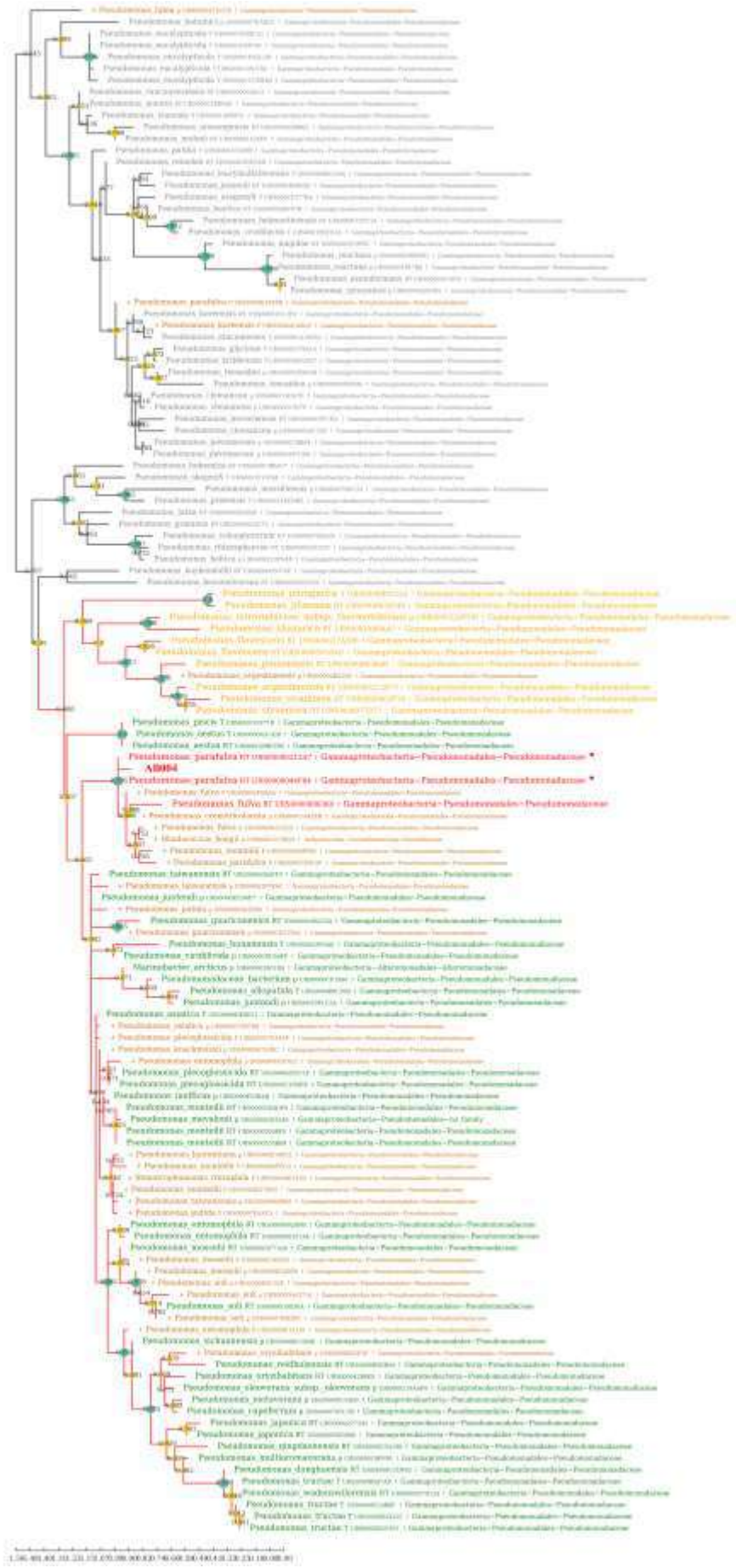


Рисунок 28 – Филогенетическое древо (16S рРНК), штамм AB004



Рисунок 29 – Филогенетическое древо (16S рРНК), штамм АВ005

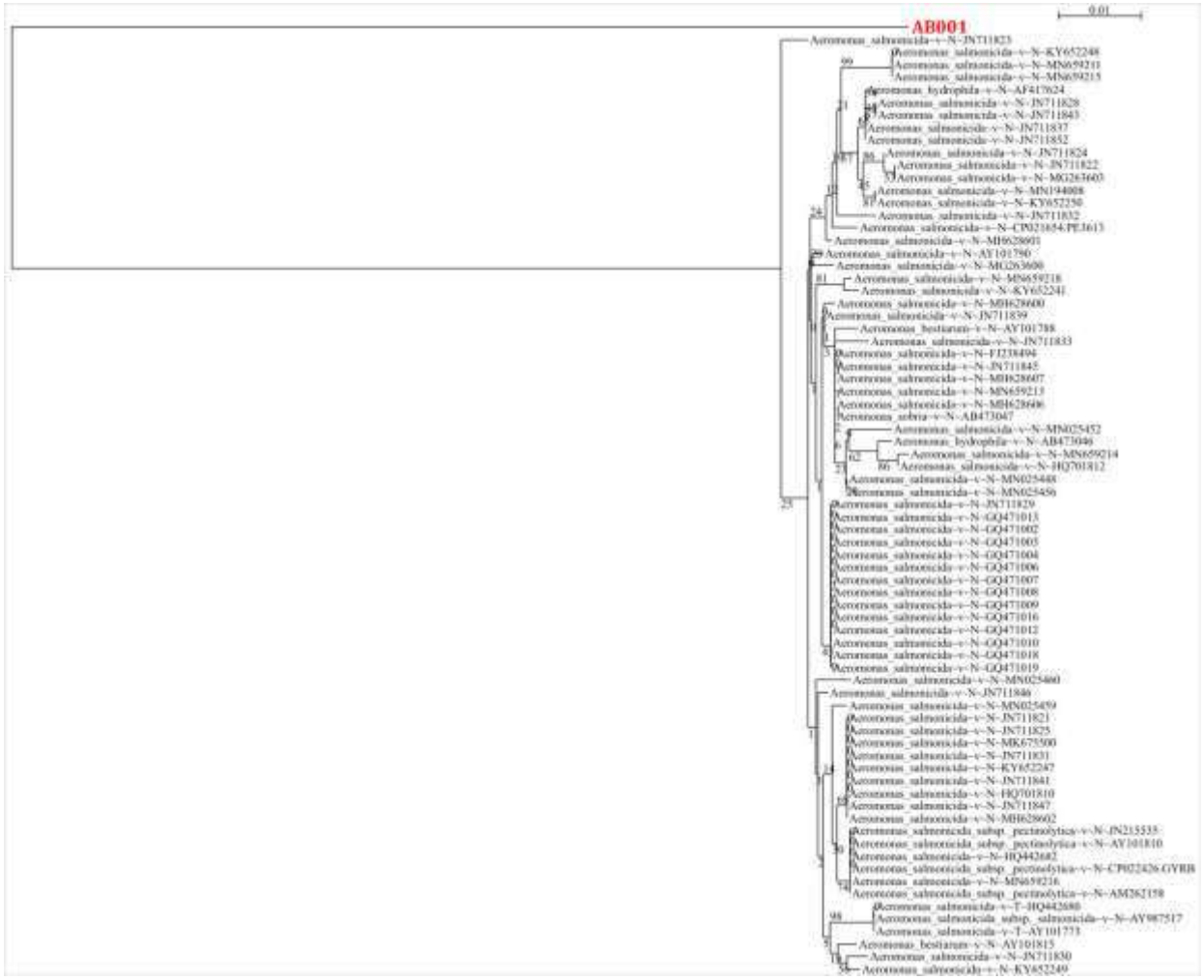


Рисунок 30 – Филогенетическое древо (*gyr*B), штамм AB001

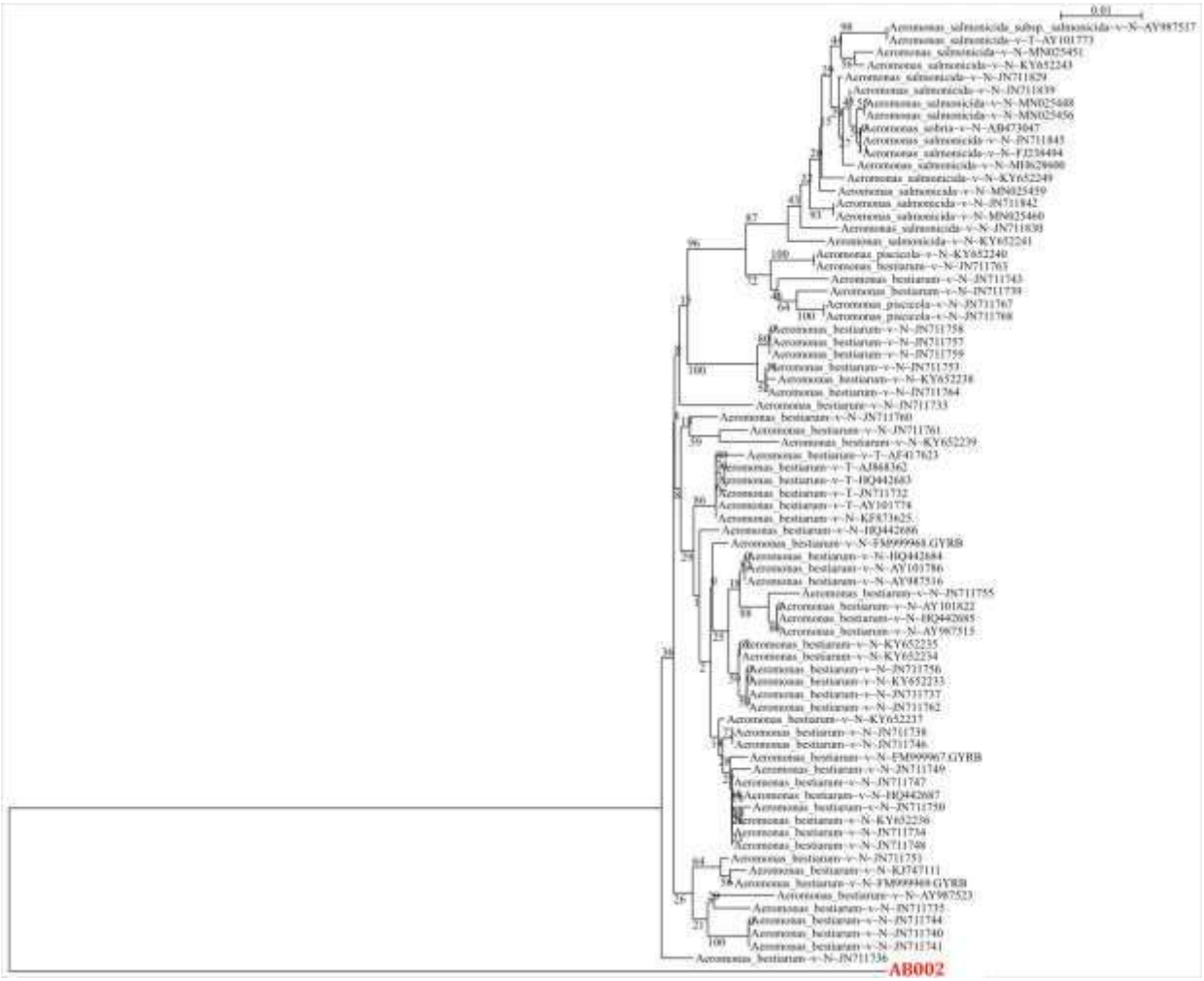


Рисунок 31 – Филогенетическое древо (*gyr*B), штамм AB002

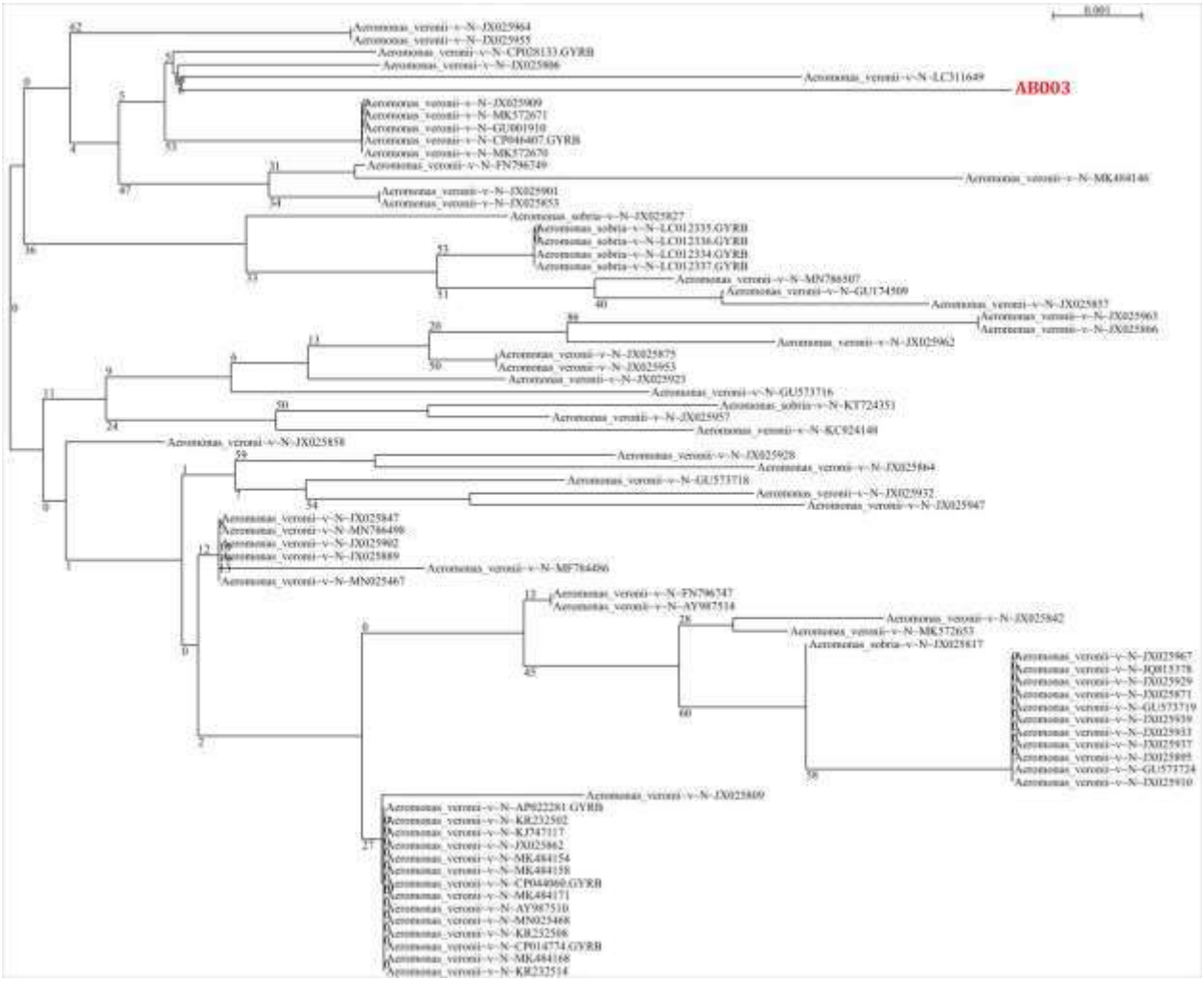


Рисунок 32 – Филогенетическое древо (*gyr*B), штамм AB003



Рисунок 33 – Филогенетическое древо (*gyr*B), штамм AB005

Детальный биоинформационный анализ фрагмента гена 16S рРНК штамма AB001 (регистрационный номер OK634025) выявил наибольшее сходство (99,32%) с референсными последовательностями *Aeromonas salmonicida*. Однако решающее значение имели данные по белоккодирующим локусам: гены *gyrB* (регистрационный номер ON124026) и *rpoD* (OQ144653) показали чрезвычайно высокую степень идентичности - 98,84% и 99,75% соответственно. При комплексной реконструкции филогенеза по мультилокусным последовательностям штамм AB001 стабильно локализовался в одном кластере с типовыми представителями вида *Aeromonas salmonicida*.

Таким образом, совокупность молекулярно-генетических данных позволила подтвердить таксономический статус изолята AB001 как штамма *Aeromonas salmonicida* (рисунки 34, 35).

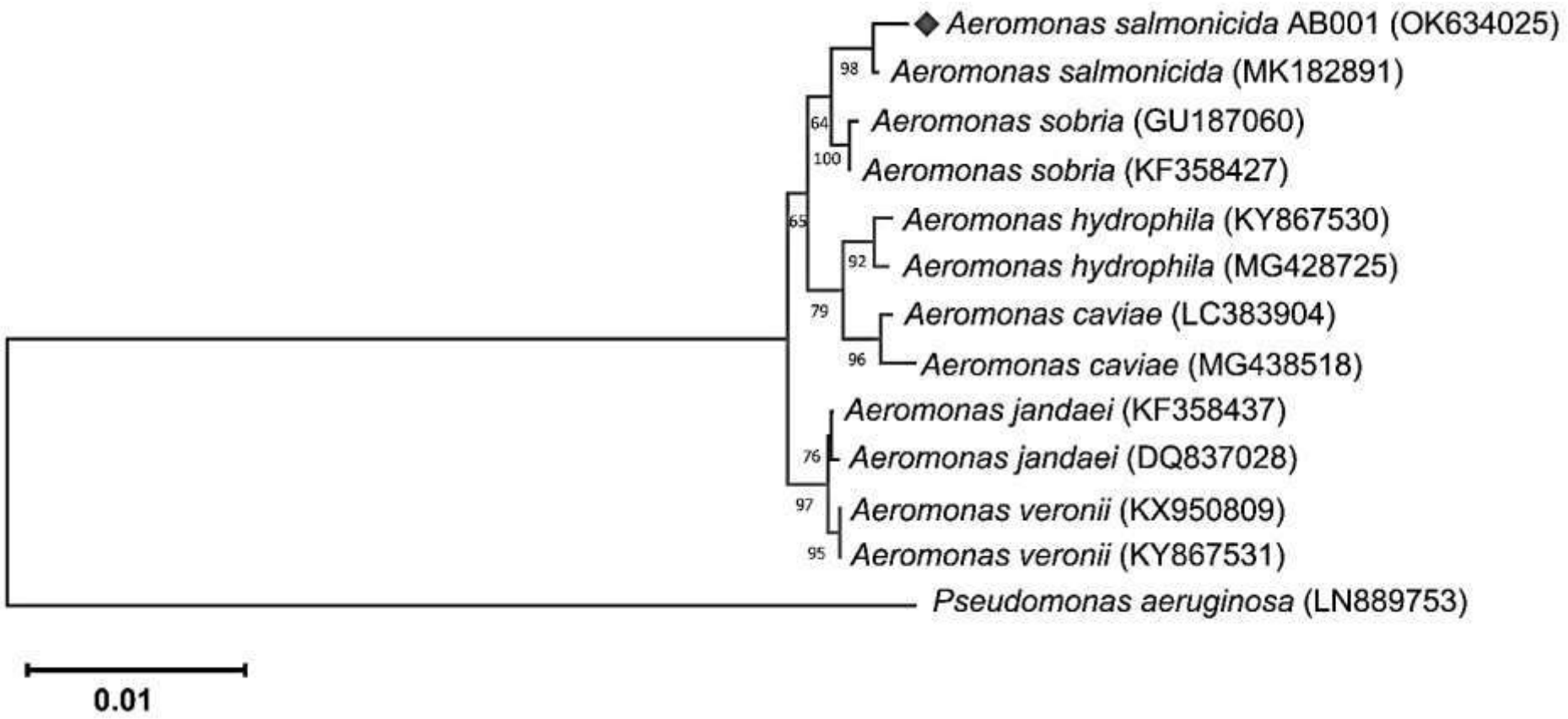
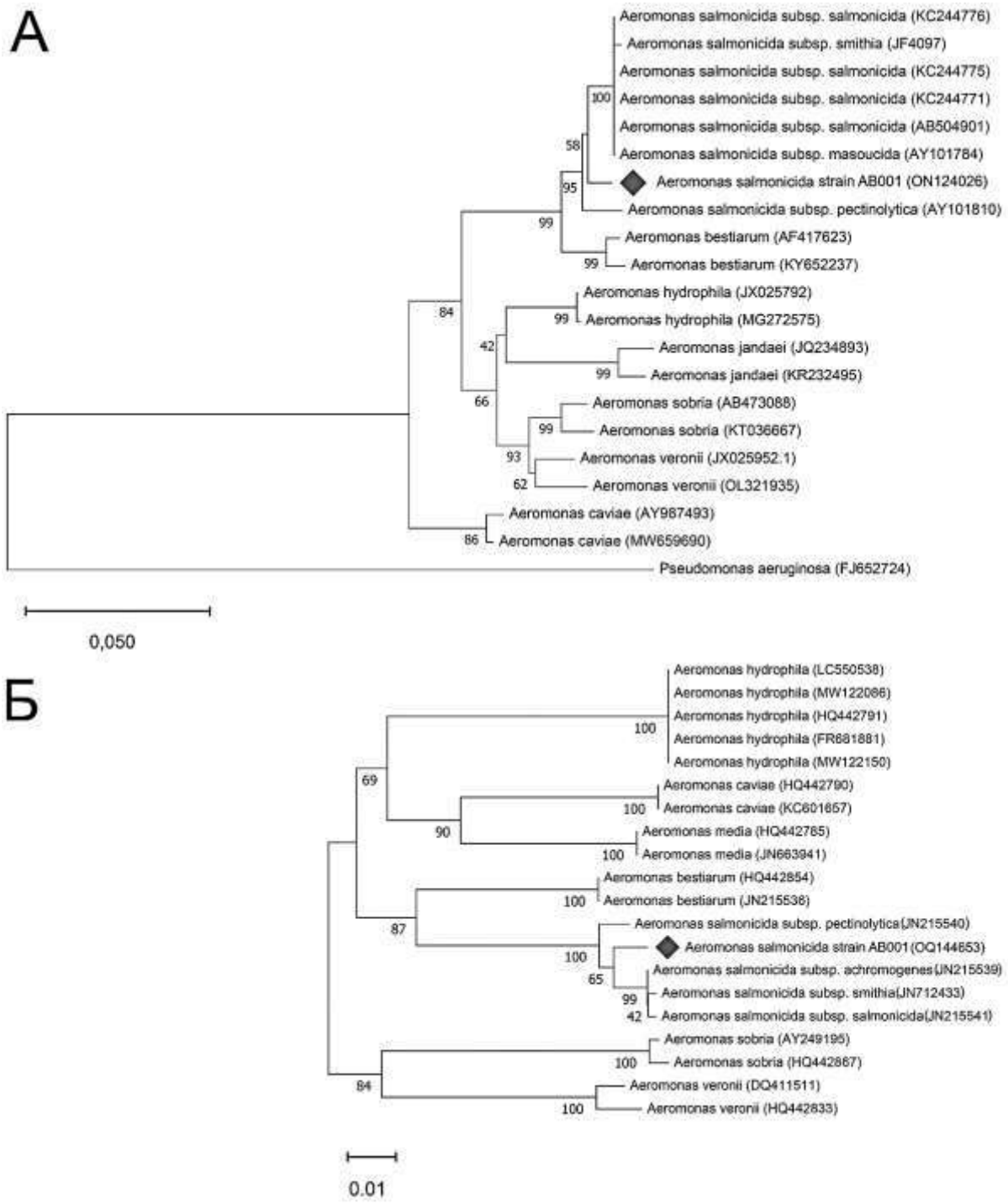


Рисунок 34 - Филогенетическое древо, основанное на нуклеотидных последовательностях гена 16S рРНК бактерий рода *Aeromonas* и штамма AB001 *Aeromonas salmonicida* (Bakiyev, 2023)

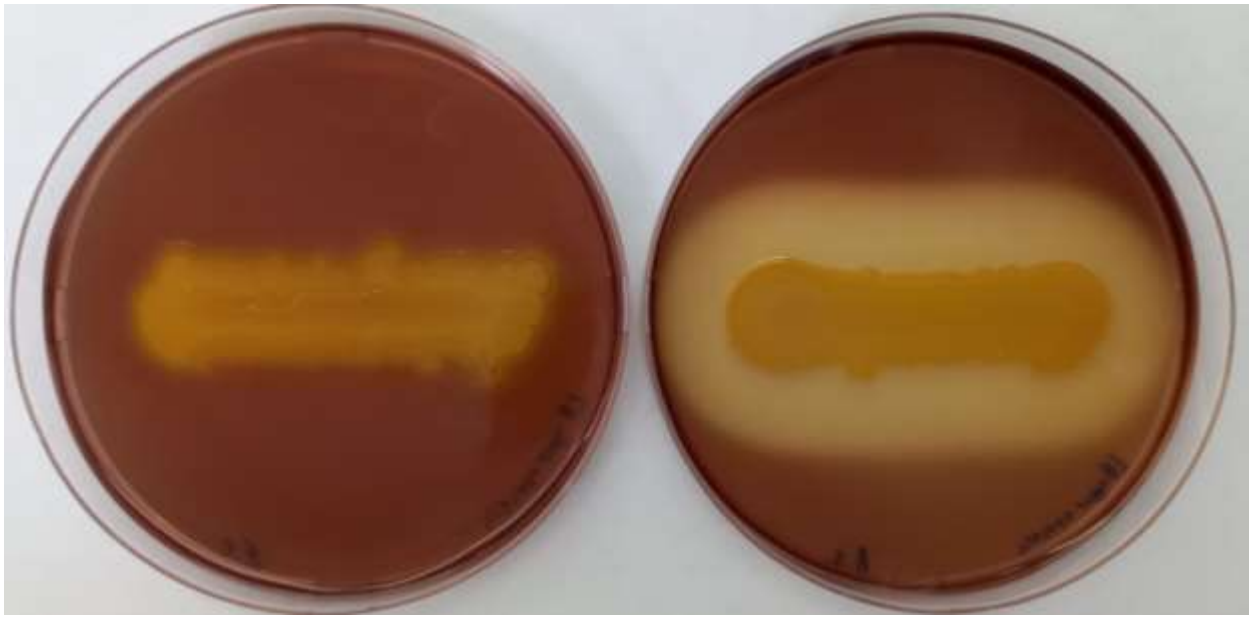


А) *gyr*B; Б) *rpo*D.

Рисунок 35 – Филогенетические древа, основанные на нуклеотидных последовательностях генов *gyr*B и *rpo*D бактерий рода *Aeromonas* и штамма *Aeromonas salmonicida* AB001 (Bakiyev, 2023)

Тем не менее, как показал дальнейший анализ, полученных результатов оказалось недостаточно для детерминации внутривидовой структуры. Сложность идентификации обусловлена тем, что вид *Aeromonas salmonicida* представлен пятью признанными подвидами: *salmonicida, achromogenes, masoucida, smithia* и *pectinolytica*.

Особый научный интерес вызвал тот факт, что наиболее близким к исследуемому штамму AB001 оказался подвид *Aeromonas salmonicida* subsp. *pectinolytica*. Для этого был проведен анализ на пектиназную активность, где данный штамм проявил активность (рисунок 36).



Контрольный штамм - *Escherichia coli* ATCC 8739 (слева), опытный штамм - *Aeromonas salmonicida* AB001

Рисунок 36 – Анализ пектиназной активности на твердой питательной среде

Отсутствие в доступной профильной литературе сведений о выделении данного таксона из представителей ихтиофауны, и в частности из осетровых рыб (*Acipenseridae*), позволяет говорить о существенном расширении существующих представлений об экологической пластичности и границах ареала данного патогена. Обнаружение *Aeromonas salmonicida subsp. pectinolytica* в нетипичной для него экологической нише актуализирует вопрос о пересмотре его адаптивного и патогенного потенциала в условиях аквакультуры.

Столь девиантный характер изоляции продиктовал необходимость проведения углубленной верификации штамма AB001. Для уточнения подвидовой принадлежности и исключения диагностических погрешностей был инициирован комплекс расширенных молекулярно-генетических исследований. Данный этап работы предполагал вовлечение дополнительных высокоспецифичных генных маркеров, обладающих повышенной

разрешающей способностью, что критически важно для прецизионной дифференциации внутривидовых структур рода *Aeromonas* (рисунок).

Для прецизионной дифференциации внутривидовых структур *Aeromonas salmonicida* необходимо привлечение маркеров, непосредственно связанных с факторами патогенности и морфофункциональными особенностями конкретных таксонов. В недавних релевантных исследованиях по определению подвидовой принадлежности данной бактерии подчеркивалась высокая диагностическая значимость гена *vap*A, кодирующего белок поверхностного массива вирулентности (А-слой) (Gulla, 2016). Считается, что наличие полнофункционального гена *vapA* является облигатным признаком типичного подвида *salmonicida*. Однако в ходе проведенного нами ПЦР-скрининга геномной ДНК изолята AB001 наличие гена *vapA* не подтвердилось. Отсутствие данного локуса не только исключает принадлежность штамма к типичному подвиду *salmonicida*, но и подтверждает его «атипичный» статус, что коррелирует с обнаруженной ранее высокой степенью филогенетического родства с подвидом *pectinolytica*.

Учитывая фенотипически установленную подвижность исследуемого изолята, что является девиантным признаком для классических штаммов *Aeromonas salmonicida*, в качестве дополнительного молекулярного маркера для идентификации был выбран ген *fla*A. В современной микробиологии жгутиковый аппарат рассматривается не только как органелла движения, но и как ключевой фактор колонизации и адгезии, выполняющий интегральную функцию в реализации патогенного потенциала микроорганизма (Farfán, 2009). Жгутики обеспечивают хемотаксис и начальное взаимодействие бактерии с тканями хозяина, что делает гены их биосинтеза ценными филогенетическими мишенями.

Для верификации наличия генетических детерминант жгутикового аппарата был проведен анализ полноразмерного гена *flaA*. Методология исследования включала использование специфических ПЦР-праймеров, нацеленных на консервативные фланкирующие области гена – локусы *yadS* и *flaB*. Успешная амплификация и последующее секвенирование данного участка позволили получить первичную нуклеотидную последовательность, которая легла в основу реконструкции филогенетических связей. Построенная филогения на базе гена *flaA* обеспечила уникальную возможность сопоставить механизмы подвижности штамма AB001 с известными референсными штаммами, окончательно подтвердив его уникальное положение в системе подвидов *Aeromonas salmonicida* (рисунок 37).

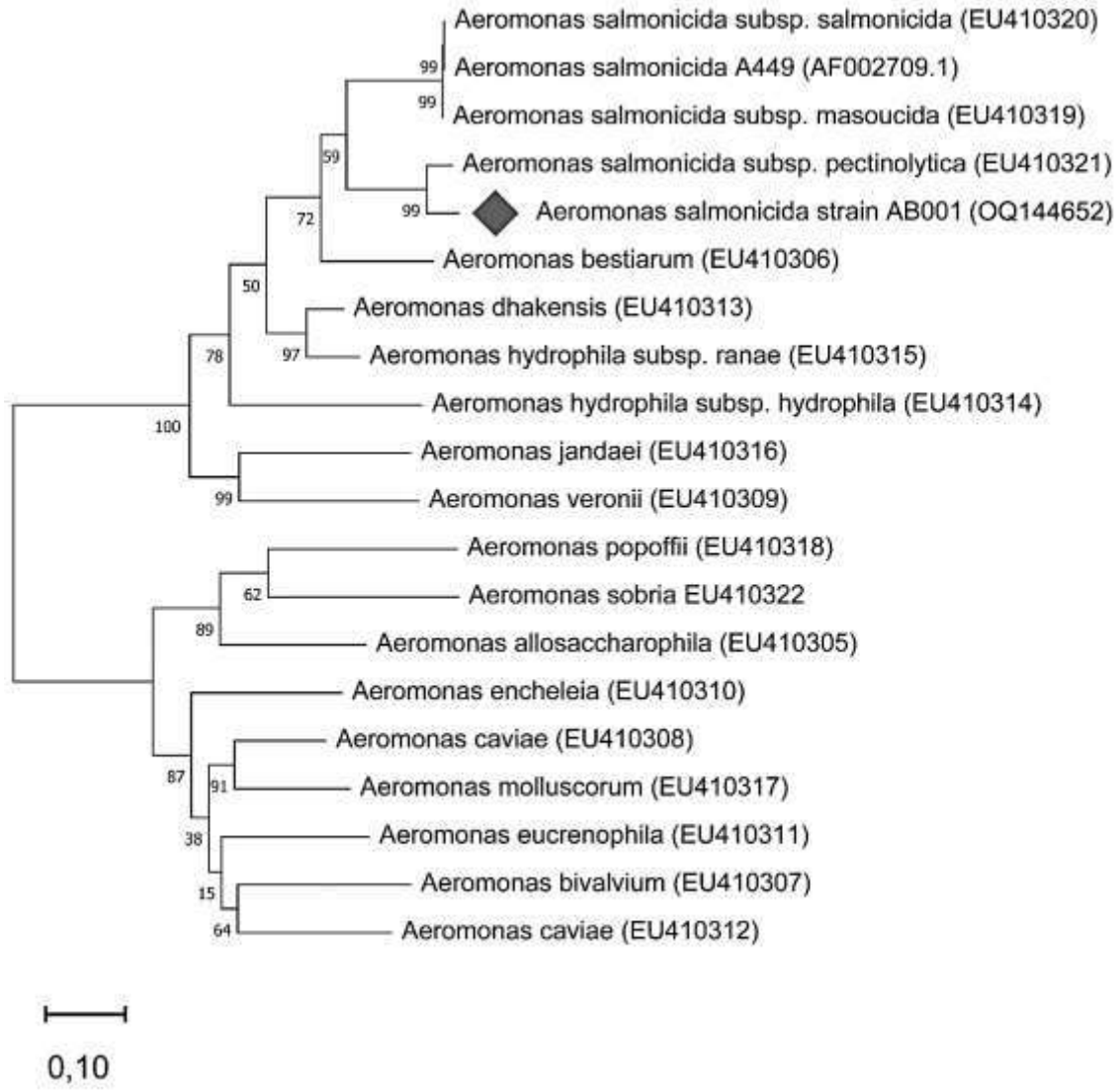


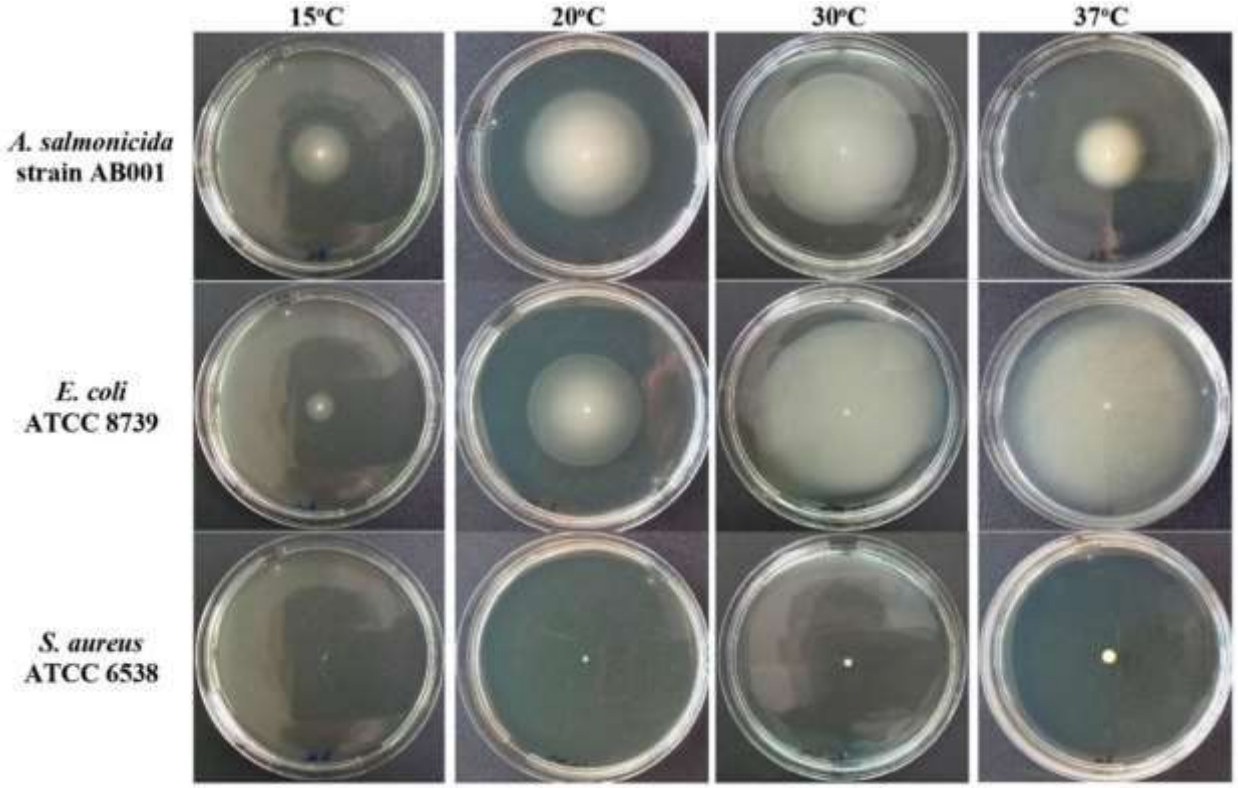
Рисунок 37 – Филогенетическое древо, основанное на нуклеотидных последовательностях гена *fla*A бактерий рода *Aeromonas* и штамма *Aeromonas salmonicida* AB001 (Bakiyev, 2023)

Результаты биоинформационного поиска нуклеотидной последовательности гена *fla*A (регистрационный номер в GenBank OQ144652) штамма AB001 с использованием алгоритма BLASTN подтвердили полную идентичность полученного фрагмента гену флагеллина *Aeromonas salmonicida*. В ходе сравнительного анализа была выявлена выраженная гомология с референсными последовательностями гена *flaA*, что свидетельствует о наличии генетически детерминированного аппарата подвижности у данного изолята.

Проведенный филогенетический анализ, базирующийся на первичной структуре гена *flaA*, позволил идентифицировать штамм AB001 как *Aeromonas salmonicida* subsp. *pectinolytica*. Однако детальное сопоставление генотипических данных с фенотипическими характеристиками выявило ряд существенных противоречий, представляющих особый научный интерес. Согласно классическим таксономическим описаниям, признак подвижности

считается нетипичным и практически не регистрируемым для представителей подвида *Aeromonas salmonicida subsp. pectinolytica*.

Наиболее примечательным аспектом настоящего исследования является обнаруженное мезофильное поведение идентифицированного штамма *Aeromonas salmonicida* AB001 (Bakiyev, 2023). В отличие от большинства известных изолятов данного подвида, штамм AB001 продемонстрировал способность к активному росту при температуре 37 ºС. Более того, нами была зафиксирована выраженная подвижность культуры при температурных режимах 20 и 30 ºС (рисунок 38).



A. salmonicida – исследованный штамм, *E. coli* – штамм положительного контроля, *S. aureus* штамм отрицательного контроля.

Рисунок 38 – Результаты влияния температуры на подвижность штамма AB001 (Bakiyev, 2023)

Такое сочетание признаков – мезофильность и сохранение подвижности при повышенных температурах – является уникальным и нехарактерным для типичных представителей подвида *pectinolytica*. Данное наблюдение может указывать на глубокую адаптивную эволюцию штамма AB001 в условиях тепловодных индустриальных хозяйств (УЗВ) или на наличие специфических регуляторных механизмов экспрессии генов жгутикового аппарата, что требует дальнейшего изучения его патогенного потенциала и механизмов вирулентности в контексте ихтиопатологии осетровых рыб.

Несмотря на использование мультилокусного подхода, включающего анализ нескольких молекулярно-генетических маркеров, окончательная детерминация подвидового статуса изолята AB001 остается предметом дальнейших изысканий. Предполагается, что наиболее эффективным инструментом для прецизионной идентификации данного штамма станет полногеномное секвенирование (WGS), проведение которого определено как приоритетная цель будущих этапов исследования.

В литературе широко обсуждается использование гена *vap*A, ответственного за синтез белка поверхностного S-слоя (массива вирулентности), в качестве надежного критерия для дифференциации подвидов *Aeromonas salmonicida* (Gulla, 2016). В рамках нашей работы детекция последовательности гена *vapA* у штамма AB001 дала отрицательный результат. Данный факт коррелирует с опубликованными сведениями о генетических особенностях *Aeromonas salmonicida* subsp. *pectinolytica*, однако следует отметить диссонанс: для подвида *pectinolytica* традиционно не характерна подвижность, выявленная у нашего изолята (Lund, 2003).

Исторически *Aeromonas salmonicida* классифицируется как психрофильный патоген с температурным оптимумом роста в диапазоне 22–25 ºC (Austin, 1989; Austin, 1998; Kaznowski, 1998), проявляя температурную реакцию, идентичную *Aeromonas bestiarum* (Ali, 1996). К классическим диагностическим тестам, предназначенным для разграничения подвидов *Aeromonas salmonicida*, относятся оценка подвижности и способность к продукции индола (Pavan, 2000; Wiklund, 1998). Тем не менее, в ходе настоящего исследования данные фенотипические признаки продемонстрировали низкую дискриминационную эффективность.

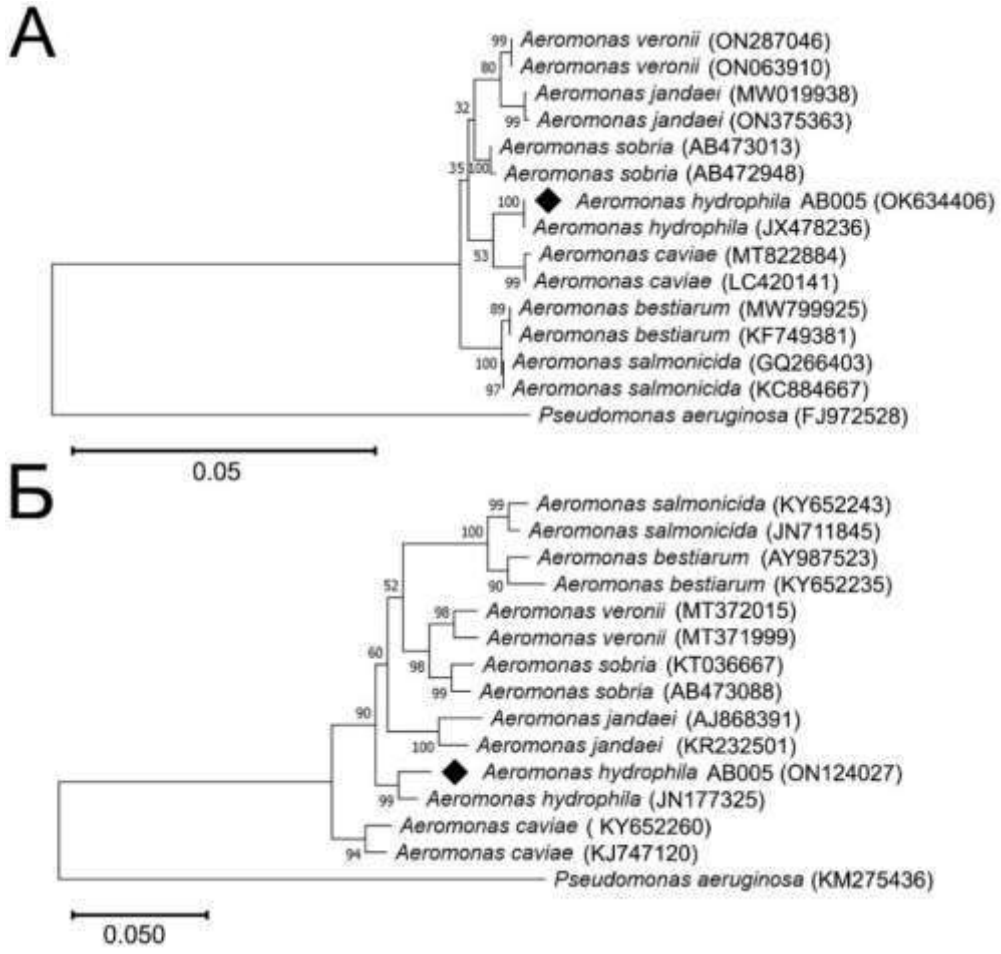
Особого внимания заслуживает таксономическая коллизия между *Aeromonas bestiarum* (ранее идентифицируемым как *Aeromonas hydrophila* HG2) и *Aeromonas. salmonicida*. В научном сообществе продолжаются дискуссии относительно правомерности разделения этих двух филогенетически близких таксонов (Martinez-Murcia, 2005). Установлено, что первичная структура гена 16S рРНК типового штамма *A. bestiarum* полностью идентична последовательностям *Aeromonas salmonicida* subsp. *achromogenes* и *Aeromonas salmonicida* subsp. *masoucida*, имея лишь два нуклеотидных отличия от типичного подвида *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* (Martinez-Murcia, 1999). В нашем случае анализ последовательности 16S рРНК также привел к идентификации изолята AB002 как *Aeromonas salmonicida* с высоким уровнем сходства (99,9%). Решающее значение для выявления филогенетической дивергенции между этими видами имело секвенирование гена *gyr*B.

Сравнительное выравнивание нуклеотидных последовательностей показало, что, несмотря на 99,9% идентичности по 16S рРНК с группой *Aeromonas salmonicida*, на филогенетическом древе, построенном по гену *gyr*B, штамм AB002 локализовался внутри кластера *Aeromonas bestiarum*. При этом уровень гомологии по *gyrB* в системе BLASTN составил 83,39%. Учитывая высокую консервативность рибосомальных генов и значительно большую вариабельность белоккодирующего локуса *gyrB*, последний был признан более

информативным маркером для систематики данного штамма. Таким образом, на основании данных *gyrB*-типирования таксономический статус изолята AB002 был определен как *Aeromonas bestiarum*.

Идентификация штамма AB003 не вызвала затруднений: результаты анализа в BLASTN продемонстрировали высокую идентичность как по гену 16S рРНК (99,71%), так и по гену *gyrB* (98,59%) с референтными штаммами *Aeromonas veronii*. На обоих филогенетических древах изолят AB003 стабильно кластеризовался с представителями вида *Aeromonas veronii*, что подтверждается высокими индексами гомологии.

Аналогичная ситуация наблюдалась при анализе изолята AB005. По результатам секвенирования и биоинформационной обработки данных в BLASTN было установлено, что исследуемый штамм принадлежит к кластеру *Aeromonas hydrophila* со 100% уровнем сходства по гену 16S рРНК. Анализ локуса *gyrB* подтвердил данное положение, показав 99% идентичности с типовыми штаммами *Aeromonas hydrophila*, что окончательно верифицирует классификацию AB005 как представителя данного вида (рисунок 39 А, Б).



А) 16S рРНК; Б) *gyr*B.

Рисунок 39 - Филогенетические древа, основанные на нуклеотидных последовательностях генов 16S рРНК и *gyr*B бактерий рода *Aeromonas* и штамма *Aeromonas hydrophila* AB005 (Bakiyev, 2022)

При проведении углубленного генотипического анализа необходимо акцентировать внимание на том факте, что уровень генетической дистанции нуклеотидных последовательностей генов *gyr*B для большинства представителей рода *Aeromonas* существенно превышает аналогичный показатель, определенный на основании сравнения более консервативных генов 16S рРНК. Несмотря на то, что общая топология соответствующих филогенетических деревьев в значительной степени коррелирует с архитектурой 16S рРНК-филогении, она характеризуется более выраженной дифференциацией узлов и сложностью ветвления. Это позволяет с высокой степенью достоверности идентифицировать отдельные филогенетические линии, которые более точно отражают сложную видовую и внутривидовую организацию рода *Aeromonas*, обеспечивая разрешение таксономических конфликтов, возникающих при использовании только рибосомальных маркеров.

Особый научный интерес вызывают результаты реконструкции филогенетического древа по гену *gyrB*, выполненной методом присоединения ближайших соседей (*Neighbor-Joining*) с использованием программного комплекса leBIBI. Установлено, что изоляты AB001, AB002 и AB005, несмотря на их тесную генетическую связь с эталонными представителями видов *Aeromonas salmonicida*, *Aeromonas bestiarum* и *Aeromonas hydrophila* соответственно, формируют уникальные и независимые кластеры. Данное явление указывает на наличие специфических филогенетических дистанций и позволяет предположить, что исследуемые штаммы представляют собой обособленные эволюционные линии в структуре рода *Aeromonas,* адаптированные к условиям функционирования конкретных аквакультурных систем.

Вся совокупность полученных молекулярно-генетических данных была верифицирована путем официальной регистрации нуклеотидных последовательностей в международной базе данных NCBI GenBank, что подтверждает приоритет и достоверность проведенных исследований. Каждой последовательности был присвоен уникальный Accession Number. Так, для гена 16S рРНК штамма *Aeromonas salmonicida* AB001 зарегистрирован номер OK634025, для штамма *Aeromonas hydrophila* AB005 - OK634406, для штамма *Aeromonas veronii* AB003 - OK634393, для штамма *Pseudomonas parafulva* AB004 - OK634400 и для штамма *Pseudomonas protegens* AB006 - OK635331. Кроме того, были депонированы высокоинформативные последовательности гена *gyrB* для штамма *Aeromonas hydrophila* AB005 под номером ON124027 и для штамма *Aeromonas salmonicida* AB001 под номером ON124026.

Итоговая визуализация эволюционных взаимоотношений всех выделенных бактериальных штаммов представлена на обобщающих филогенетических древах (рисунки 40 и 41), построенных на основе сопоставления генов 16S рРНК и *gyrB*.

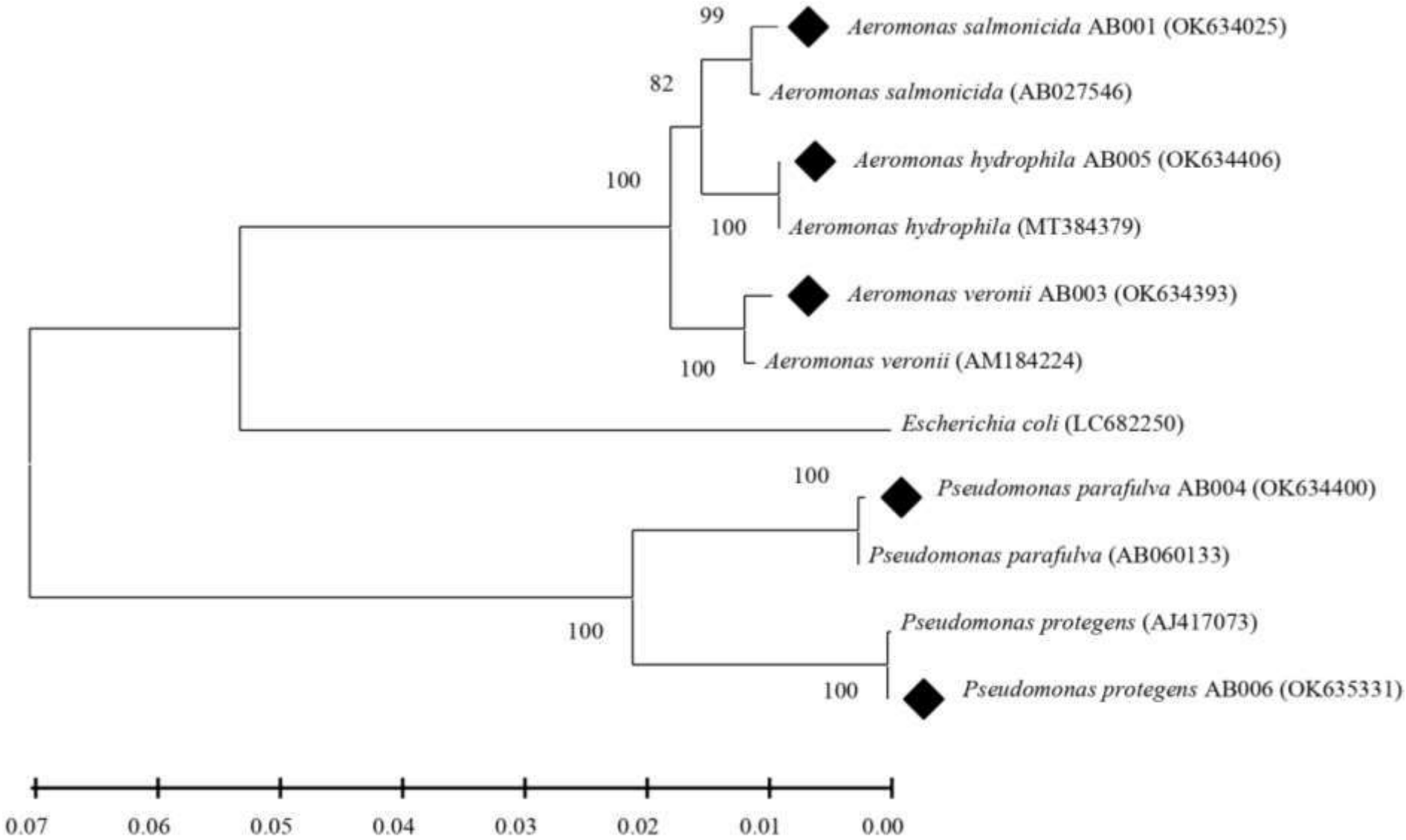


Рисунок 40 - Филогенетическое древо (16S рРНК) выделенных штаммов бактерий *Aeromonas* и *Pseudomonas*

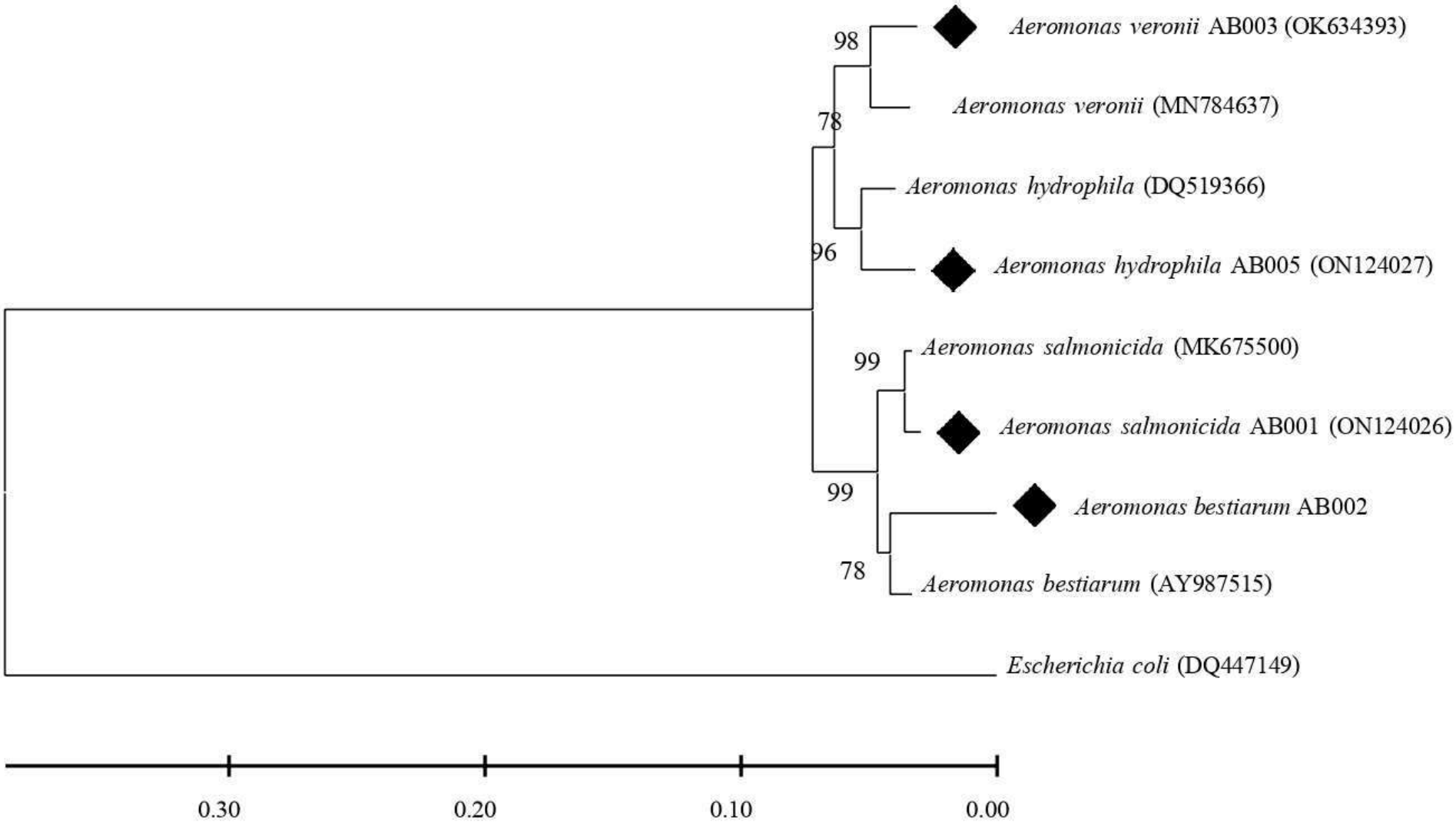


Рисунок 41 - Филогенетическое древо (*gyr*B) выделенных штаммов бактерий рода *Aeromonas*

В ходе комплексного микробиологического и молекулярно-генетического мониторинга ихтиофауны было успешно изолировано и охарактеризовано шесть бактериальных штаммов, представляющих два ключевых таксономических рода – *Aeromonas* и *Pseudomonas*. Проведенная прецизионная идентификация позволила верифицировать выделенные изоляты как *Aeromonas hydrophila, Aeromonas salmonicida, Aeromonas bestiarum, Aeromonas veronii, Pseudomonas parafulva* и *Pseudomonas protegens*. Установление столь широкого видового спектра свидетельствует о сложном этиологическом составе бактериозов в исследуемом хозяйстве и указывает на необходимость дифференцированного подхода к диагностике и терапии заболеваний осетровых рыб.

Особое внимание в рамках исследования было уделено штаммам *Aeromonas hydrophila* AB005 и *Aeromonas salmonicida* AB001, которые проявили наиболее выраженный патогенный потенциал в ходе экспериментального заражения и оценки факторов вирулентности. Учитывая высокую эпизоотологическую значимость данных патогенов, а также их уникальные генетические характеристики, выделенные штаммы были официально депонированы в Республиканскую коллекцию микроорганизмов Министерства здравоохранения Республики Казахстан.

Процедура депонирования, подтвержденная соответствующими сертификатами, обеспечивает долгосрочное сохранение генетической чистоты штаммов и их доступность для дальнейших сравнительных исследований в области ветеринарной микробиологии и разработки средств специфической профилактики. Регистрация данных изолятов в государственном депозитарии подчеркивает их статус эталонных региональных штаммов, ассоциированных с инфекционной патологией осетровых рыб в условиях аквакультуры Казахстана.

ГЛАВА 3
РЕЗИСТЕНТНОСТЬ БАКТЕРИЙ К АНТИБИОТИКАМ

Формирование и распространение резистентности патогенных и условно-патогенных микроорганизмов к антибактериальным препаратам представляет собой сложный, многофакторный биологический процесс, ставший одной из наиболее критических угроз для глобальной системы здравоохранения и продовольственной безопасности в XXI веке. Исторически внедрение антибиотиков в клиническую практику в начале XX столетия ознаменовало революционный сдвиг в медицине: эффективный контроль над бактериальными инфекциями позволил увеличить среднюю продолжительность жизни человека более чем на 20 лет (Hutchings, 2019). Однако бесконтрольная эксплуатация антимикробных агентов в качестве универсального средства борьбы с инфекциями привела к массированной селекции устойчивых генотипов, радикально изменив структуру микробных сообществ (Ventola, 2015; Salam, 2023).

Развитие устойчивости является фундаментальным адаптивным процессом, реализуемым через сложную систему молекулярно-биологических механизмов. К ним относятся спонтанные генетические мутации в хромосомной ДНК (Martinez, 2000), активный горизонтальный перенос генов (HGT) (Sun, 2019) и специфические эпигенетические модификации, регулирующие экспрессию защитных факторов (Ghosh, 2020). Феномен резистентности актуализируется при необоснованном или нерациональном применении антибиотиков (что остается частой проблемой в клинической и ветеринарной практике), поскольку терапевтические концентрации препарата создают мощное избирательное давление. Микроорганизмы, сохранившие жизнеспособность в условиях антибактериального стресса, транслируют детерминанты устойчивости последующим поколениям, а через механизмы конъюгации, трансформации и трансдукции способны обмениваться плазмидами резистентности с филогенетически удаленными таксонами в пределах общей экологической ниши (Michaelis, 2023).

Критическим фактором, катализирующим глобальный кризис антибиотикорезистентности, является масштабное использование противомикробных средств в аграрном секторе и промышленном животноводстве (Manyi-Loh, 2018). Традиционная практика применения антибиотиков в качестве стимуляторов роста (Graham, 2007) и средств метафилактики (Ghimpețeanu, 2022) привела к формированию обширных резервуаров резистентных штаммов в сельском хозяйстве. Существует доказанная прямая корреляция между состоянием агроценозов и здоровьем человека: патогены передаются по трофическим цепям через контаминированную пищевую продукцию (Almansour, 2023) либо посредством прямого контакта с инфицированным поголовьем (Xu, 2022). Показательным является факт выявления идентичных профилей резистентности у штаммов *Escherichia coli*, выделенных от человека и из продукции птицеводства (свыше

60% совпадений), что подтверждает единство эпидемиологического пространства (Boudjerda, 2022).

Параллельно с ростом устойчивости наблюдается опасная стагнация в сфере разработки инновационных антибактериальных субстанций. Фармацевтическая отрасль существенно снизила темпы создания новых молекул, мотивируя это высокими нормативными барьерами и низкой рентабельностью препаратов с коротким курсом приема (Dutescu, 2021). Большинство современных разработок, таких как телаванцин, омадациклин и делафлоксацин (Damodaran, 2011; Durães, 2019; Marisa, 2020), ориентированы на борьбу с конкретными грамположительными патогенами (в частности, *Staphylococcus aureus*), в то время как дефицит антибиотиков широкого спектра действия, эффективных против грамотрицательных мультирезистентных штаммов, продолжает нарастать.

Экологические и социально-экономические последствия персистенции устойчивых форм в биосфере носят угрожающий характер. В отсутствие жесткого регламентированного контроля за оборотом антимикробных препаратов даже рутинные инфекционные заболевания могут трансформироваться в летальные патологии. Согласно прогностическим моделям Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), при сохранении текущих темпов экспансии резистентности, к 2050 году смертность от антибиотикоустойчивых инфекций может достичь 10 миллионов случаев ежегодно, что превысит суммарные показатели смертности от онкологических заболеваний и сахарного диабета, став ведущей причиной глобальной депопуляции (WHO, 2019).

На сегодняшний день Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) квалифицирует антибиотикорезистентность как одну из фундаментальных угроз глобальной безопасности в сфере здравоохранения. Масштабы проблемы подтверждаются актуальными эпидемиологическими данными: ежегодно смертность от инфекционных патологий, ассоциированных с микроорганизмами, обладающими выраженной полирезистентностью к антимикробным агентам, достигает порядка 5 миллионов случаев (WHO, 2023). География распространения антибиотикоустойчивых штаммов охватывает все страны мира, при этом корреляция между уровнем экономического развития государства и частотой регистрации резистентных форм практически нивелируется вследствие глобализации и трансграничного перемещения патогенов.

В качестве репрезентативного примера можно привести данные Центров по контролю и профилактике заболеваний США, согласно которым на территории Соединенных Штатов ежегодно фиксируется около 2,8 миллионов случаев инфекций, вызванных устойчивыми к антибиотикам микроорганизмами, что приводит к 35 000 летальных исходов (CDC, 2024). Эти показатели подчеркивают, что даже в условиях высокотехнологичной медицины контроль над резистентными штаммами остается крайне затруднительным.

В Республике Казахстан проблеме мониторинга и сдерживания антибиотикорезистентности среди бактериальных патогенов также уделяется приоритетное государственное внимание. В 2024 году наша страна, выступая в качестве активного государства-члена ВОЗ, приняла участие в работе 77-й сессии Всемирной ассамблеи здравоохранения. Итогом данного участия стало одобрение стратегической резолюции, направленной на интенсификацию национальных и глобальных мер по борьбе с устойчивостью к противомикробным препаратам (WHA, 2024).

Тем не менее, несмотря на политическую поддержку инициатив ВОЗ, в отечественной научно-практической сфере сохраняется ряд дефицитов. К сожалению, верифицированные статистические сведения о смертности от инфекций, вызванных критически значимыми патогенами, такими как *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus pneumoniae*, в Казахстане практически не представлены в открытом доступе либо характеризуются фрагментарностью. Проведенные аналитические обзоры подтверждают, что Центрально-Азиатский регион в целом остается одним из наименее изученных сегментов мировой карты антибиотикорезистентности (ARC, 2019; Andrade, 2020).

Данный информационный вакуум затрудняет разработку эффективных региональных протоколов антибактериальной терапии и подчеркивает острую необходимость проведения локальных исследований, направленных на изучение профилей чувствительности патогенов, циркулирующих в различных экосистемах, включая объекты промышленной аквакультуры.

Оценка распространенности антибиотикорезистентных условно-патогенных микроорганизмов в экосистемах поверхностных и подземных вод представляет собой критически важную задачу, решение которой необходимо для обеспечения биобезопасности населения и поддержания экологического равновесия. В современных условиях антибиотикорезистентность следует рассматривать как фундаментальный эпидемиологический фактор, провоцирующий летальные исходы не только в человеческой популяции, но и среди гидробионтов и сельскохозяйственных животных, что создает прямую угрозу аграрному сектору и глобальной пищевой безопасности.

Анализ актуальной научной литературы свидетельствует о том, что присутствие антибиотикоустойчивых бактерий в гидросфере приобрело повсеместный характер. Исследования подтверждают, что подавляющее большинство микроорганизмов, персистирующих в поверхностных и подземных водных источниках, демонстрируют детерминированную устойчивость к одному или нескольким классам антибактериальных препаратов (Zainab, 2020; Zeng, 2022).

Широкое распространение резистентных штаммов зафиксировано в различных гидрологических объектах, включая реки, озера, акватории океанов и глубокие горизонты грунтовых вод. В качестве репрезентативного примера можно привести данные исследований, проведенных в США, где до 95% изолятов *Escherichia coli*, выделенных из поверхностных вод, проявляли

устойчивость как минимум к одному противомикробному агенту (Mukherjee, 2021). Особого внимания заслуживает опыт ученых из Китая, осуществивших масштабный скрининг в 18 провинциях страны. Результатом этой работы стало создание иерархической базы данных, включающей 290 генов резистентности, классифицированных по четырем рангам опасности. К высшему, первому рангу, были отнесены гены бактерий группы ESKAPE (*Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa* и виды *Enterobacter*), представляющих максимальную угрозу для клинической практики и здоровья человека (Xu, 2024).

Резистентность микробиома подземных вод также вызывает серьезную озабоченность, учитывая роль этих источников в водоснабжении. В частности, у штаммов *Escherichia coli*, изолированных из артезианских скважин в Японии, с высокой частотой идентифицируются гены *sul1* (94%), *intI1* (83%) и *tet* (60%), обеспечивающие устойчивость к сульфаниламидам и тетрациклинам (Amarasiri, 2022). Аналогичные тенденции прослеживаются и в регионах с высокой экологической чистотой, таких как Исландия, где у 16,7% изолятов *Escherichia coli*, полученных из 132 глубоких скважин, была верифицирована устойчивость к одному и более антимикробным препаратам (Andrade, 2023).

Несмотря на глобальный масштаб проблемы, системный анализ мировой научной периодики показывает, что Центрально-Азиатский регион, и, в частности, Республика Казахстан, остается в неисследованном статусе на карте мирового мониторинга резистентности. На текущий момент комплексные исследования, посвященные картированию распространенности генов антибиотикоустойчивости в естественных водных объектах региона, практически отсутствуют (рисунок 42). Данный дефицит информации создает существенные риски для национального здравоохранения.

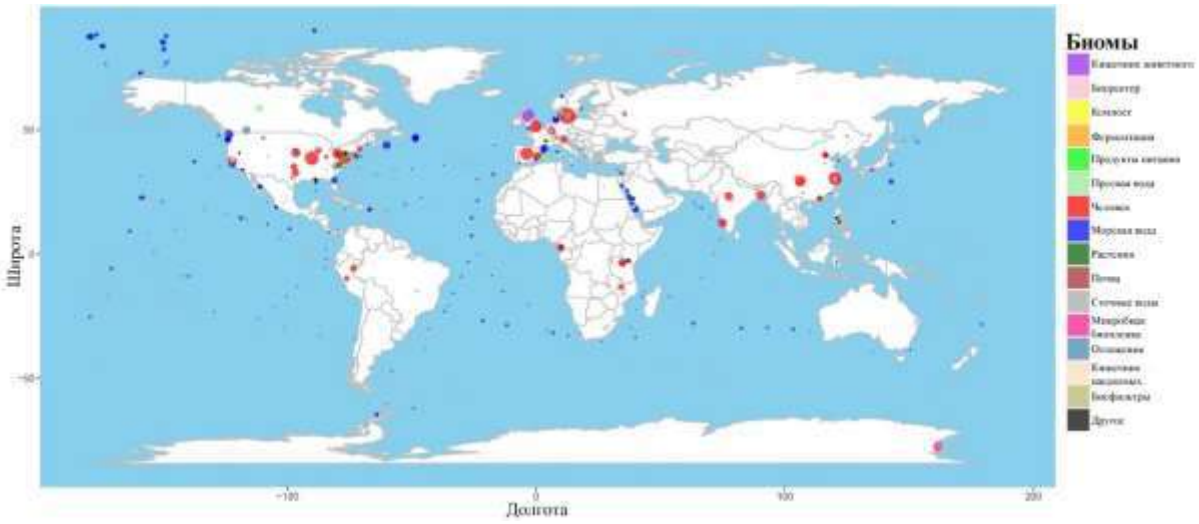


Рисунок 42 - Исследования распространения генов устойчивости к антимикробным препаратам, проводимых в мире (Lin, 2022)

Реализация исследований в Казахстане позволила бы впервые провести масштабную оценку состояния антибиотикоустойчивого и условно-патогенного

микробиома природных водных источников. Это обеспечит научную базу для разработки мер по минимизации антропогенного давления на водные экосистемы и формирования стратегий защиты здоровья населения в условиях нарастающего кризиса антибиотикорезистентности.

Последствия персистенции и диссеминации антибиотикоустойчивых бактерий в гидросфере носят комплексный характер, поскольку такие микроорганизмы зачастую обладают расширенным арсеналом факторов вирулентности. Наличие детерминант резистентности в сочетании с высокой патогенностью представляет прямую угрозу для здоровья человека и экологического благополучия территорий. Инфекционные процессы, инициированные такими агентами, характеризуются крайне сложным клиническим течением, низкой эффективностью стандартных протоколов антибактериальной терапии, что неизбежно ведет к росту показателей заболеваемости и летальности. К числу наиболее значимых и широко распространенных в водной среде патогенов, демонстрирующих высокий уровень устойчивости, относятся *Pseudomonas aeruginosa* (Elfadadny, 2024), *Escherichia coli* (Poirel, 2018) и *Staphylococcus aureus* (Chambers, 2009).

Помимо прямых рисков для человека, водные экосистемы выступают в роли транзитных путей передачи резистентных штаммов от диких и сельскохозяйственных животных к людям. Контакт с контаминированной водой или использование продукции аквакультуры, выращенной в загрязненных источниках, замыкает эпидемиологическую цепь. Кроме того, инвазия вирулентных бактерий способна трансформировать микробиологический ландшафт водоемов, вызывая существенные изменения биомассы. Это, в свою очередь, негативно сказывается на кормовой базе рыб и других гидробионтов. Продуцируемые бактериями экзо- и эндотоксины могут провоцировать массовую гибель рыбы либо вызывать хроническую интоксикацию, ведущую к истощению организма и снижению репродуктивного потенциала (Bakiyev, 2022; Bakiyev, 2022; Bakiyev, 2023). Подобные деструктивные процессы неизбежно приводят к нежелательным сукцессиям, нарушению трофических цепей и деградации экосистемной устойчивости водоемов.

Изучение динамики вирулентности бактерий в естественных водоемах является многогранным процессом, требующим непрерывного мониторинга для обеспечения экологической безопасности и защиты общественного здоровья. Учитывая, что вода является фундаментальным компонентом жизнеобеспечения, сохранение ее микробиологической чистоты признается приоритетной задачей национального масштаба. Прецизионная оценка распространенности антибиотикорезистентных условно-патогенных микроорганизмов в поверхностных и подземных водах позволяет не только прогнозировать эпидемическую ситуацию, но и разрабатывать таргетные стратегии по предотвращению распространения резистентности. Систематизация данных о резистентном микробиоме способствует оптимизации использования антибактериальных препаратов в

агропромышленном секторе и минимизирует риски межвидовой передачи инфекций в системе «окружающая среда - животные - человек».

В заключение следует подчеркнуть, что экспансия антибиотикоустойчивых условно-патогенных бактерий в водных экосистемах приобрела масштаб системного кризиса, требующего немедленной консолидации усилий ученых и практиков. Проникновение данных патогенов в организм человека и животных реализуется через различные входные ворота: алиментарным путем (через ротовое отверстие), аэрогенно (через дыхательные пути) или посредством контаминации раневых поверхностей. Пероральное инфицирование при употреблении загрязненной пищи или воды остается наиболее распространенным сценарием, особенно в регионах, где водоисточники подвержены влиянию неочищенных коммунальных и сельскохозяйственных стоков. После колонизации организма условно-патогенные бактерии инициируют каскад патологических процессов, тяжесть которых детерминирована типом возбудителя и иммунореактивностью хозяина.

3.1 Устойчивость бактерий к антибиотикам в аквакультуре

При культивировании в условиях установок замкнутого водообеспечения (УЗВ) осетровые рыбы подвергаются интенсивному воздействию патогенной и условно-патогенной микрофлоры. Несмотря на наличие многоступенчатых систем механической фильтрации и биологической очистки, в УЗВ сохраняется стабильно высокий риск контаминации водной среды и колонизации гидробионтов агрессивными штаммами бактерий. Специфика замкнутого цикла, характеризующаяся высокой плотностью посадки рыбы и постоянством температурного режима, способствует быстрой аккумуляции микроорганизмов, вследствие чего заболевания бактериальной этиологии зачастую принимают характер остро протекающих массовых эпизоотий. В современной аквакультуре основным и наиболее радикальным методом купирования подобных вспышек остается применение широкого спектра антибактериальных препаратов.

Исторический генезис антибиотикотерапии берет свое начало с открытия пенициллина в первой половине XX века, что стало поворотным моментом в борьбе с инфекционными патологиями. Антибиотики зарекомендовали себя как высокоэффективные антимикробные агенты, способные в кратчайшие сроки обеспечивать выраженный бактериостатический эффект путем замедления метаболических процессов патогена или оказывать прямое бактерицидное действие, ведущее к деструкции микробной клетки.

Благодаря уникальным функциональным характеристикам и высокой терапевтической эффективности, антибиотики в течение короткого периода времени получили повсеместное распространение в различных сферах человеческой деятельности. На сегодняшний день их применение носит системный характер в клинической медицине (Hutchings, 2019), ветеринарии (Teuber, 2001), а также в различных секторах агропромышленного комплекса, включая промышленное рыбоводство и растениеводство (Kümmerer, 2009;

Chang, 2015; Tasho, 2016) (рисунок 43). Такая широкая эксплуатация антимикробных ресурсов, с одной стороны, обеспечивает стабильность производства продовольствия, но с другой - формирует предпосылки для глобальной циркуляции резистентных генотипов в объектах окружающей среды.

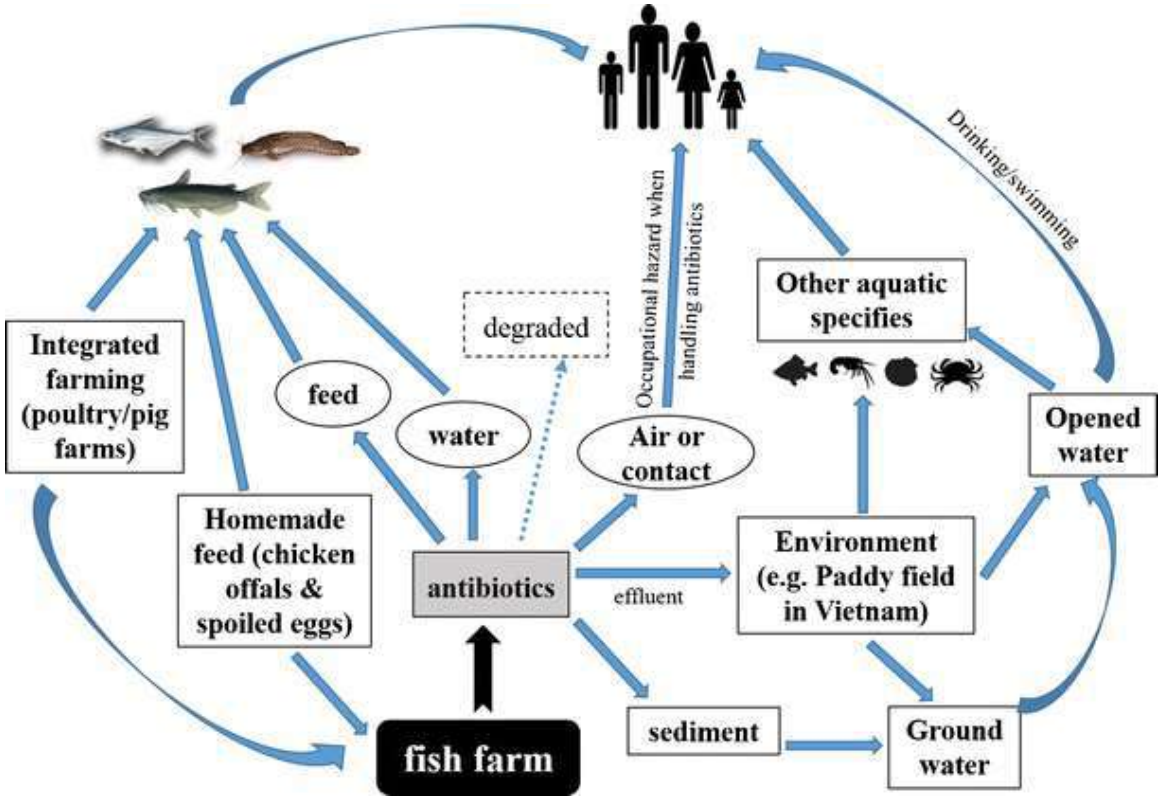


Рисунок 43 – Пути распространения антибиотиков в аквакультуре (Chuah, 2016)

Современная аквакультура не является исключением в контексте глобального использования противомикробных средств; применение антибиотиков на определенных этапах технологического цикла было и остается наиболее распространенным и безальтернативным методом борьбы с агрессивными бактериальными патогенами. В частности, для купирования вспышек аэромоноза и псевдомоноза рыб традиционно применяются препараты из групп фениколов (флорфеникол), аминогликозидов (канамицин) и тетрациклинов (окситетрациклин) (Meyer, 1964; Harikrishnan, 2010).

Интенсификация химиотерапевтического воздействия в рыбоводстве привела к закономерному биологическому эффекту: большинство антибактериальных субстанций, демонстрировавших высокую эффективность в прошлом против ключевых патогенов родов *Aeromonas* и *Pseudomonas*, в кратчайшие сроки утратили терапевтическую ценность. Данные препараты перешли в категорию слабоэффективных или полностью инертных в отношении современных полевых изолятов.

Масштаб проблемы подтверждается исследованиями (Ervik, 1994), в которых указывается, что в результате мониторинга проб у 74–100% особей

рыб, обитающих в естественных водоемах вблизи рыбоводных хозяйств, фиксируется наличие антибиотиков или их метаболитов в мышечных тканях. Подобные результаты позволяют констатировать, что антибактериальные агенты инициировали контаминацию не только объектов аквакультуры, но и диких популяций гидробионтов, что свидетельствует о глобальном экологическом дрейфе лекарственных веществ. В связи с нарастанием данных рисков на международном уровне принимаются жесткие меры по урегулированию и ограничению бесконтрольного использования антибиотиков в рыбоводстве.

В большинстве развитых стран разработаны и внедрены строгие регламенты применения противомикробных средств в медицине и ветеринарии. Например, в Великобритании с 1994 года действует Положение о лекарственных средствах, которое устанавливает исчерпывающий перечень правил использования антибиотиков для животных; даже вынужденное применение антимикробных агентов осуществляется под строгим ветеринарным контролем и в регламентированном режиме (The medicines, 1994).

Аналогичная жесткая политика проводится в Соединенных Штатах Америки (США), где использование антибиотиков в аквакультуре лимитировано федеральным законодательством. По имеющимся данным, в США разрешены к применению в рыбоводстве лишь три антибактериальные субстанции: окситетрациклин, сульфамеразин и комбинированный препарат сульфадиметоксин-орметоприм. В частности, регламентированная дозировка окситетрациклина при лечении бактериозов, вызванных представителями родов *Aeromonas* и *Pseudomonas*, составляет от 2,5 до 3,75 г на 100 фунтов биомассы рыбы при экспозиции в течение 10 дней (Benbrook, 2021).

Таким образом, современная парадигма использования антибиотиков в мировом агропромышленном комплексе характеризуется переходом к строгому государственному регулированию. Фундаментальной причиной введения жестких ограничений и запретов является феномен приобретения патогенными микроорганизмами специфической генетической устойчивости. Данное явление обусловлено формированием и накоплением в бактериальных популяциях так называемых генов резистентности к антибиотикам (ARGs - antibiotic resistance genes), которые трансформируют привычные инфекции в трудноизлечимые патологии, представляющие глобальную угрозу для биосферы.

Согласно актуальным научным данным (WHO, 2006), приобретение бактериальными патогенами генетической устойчивости к антибиотикам и производным терапевтическим средствам признано одной из доминирующих проблем не только в промышленной аквакультуре, но и в клинической медицине, а также в структуре пищевой индустрии. Прогрессирующая экспансия резистентных фенотипов формирует серьезные риски прямого и опосредованного негативного воздействия на здоровье человека, продуктивность животноводства и фитосанитарную стабильность агроценозов (Bakiyev, 2021).

Как указывают исследователи (Zhang, 2020), фундаментальной причиной развития высокого уровня лекарственной устойчивости является наличие в геноме микроорганизмов специфических детерминант - генов резистентности к антибиотикам (ARGs). Данные гены кодируют молекулярные механизмы защиты, нейтрализующие действие известных антибактериальных агентов. Механизмы диссеминации этих генов в микробных популяциях представляют собой сложный процесс, обеспечивающий выживаемость патогенов в условиях антропогенного прессинга.

Ключевым генетическим инструментом распространения ARGs выступают мобильные генетические элементы (MGEs), обладающие способностью интегрировать в геном реципиентных бактерий функциональные нуклеотидные последовательности, отвечающие за инактивацию антибиотиков или модификацию их мишеней. Эффективная трансмиссия этих генетических кассет реализуется посредством трансмиссивных плазмид, а также через активные участки бактериальной ДНК (транспозоны и интегразы) (Bakiyev, 2021).

В современной практике интенсивного рыбоводства феномен антибиотикорезистентности все чаще регистрируется у патогенов рыб, культивируемых в условиях установок замкнутого водообеспечения (УЗВ). Первопричиной этой тенденции является избыточное и зачастую не регламентированное применение химиотерапевтических средств в профилактических и лечебных целях, что создает идеальную среду для селекции и закрепления генов устойчивости в микробиоме водных систем (рисунок 44).

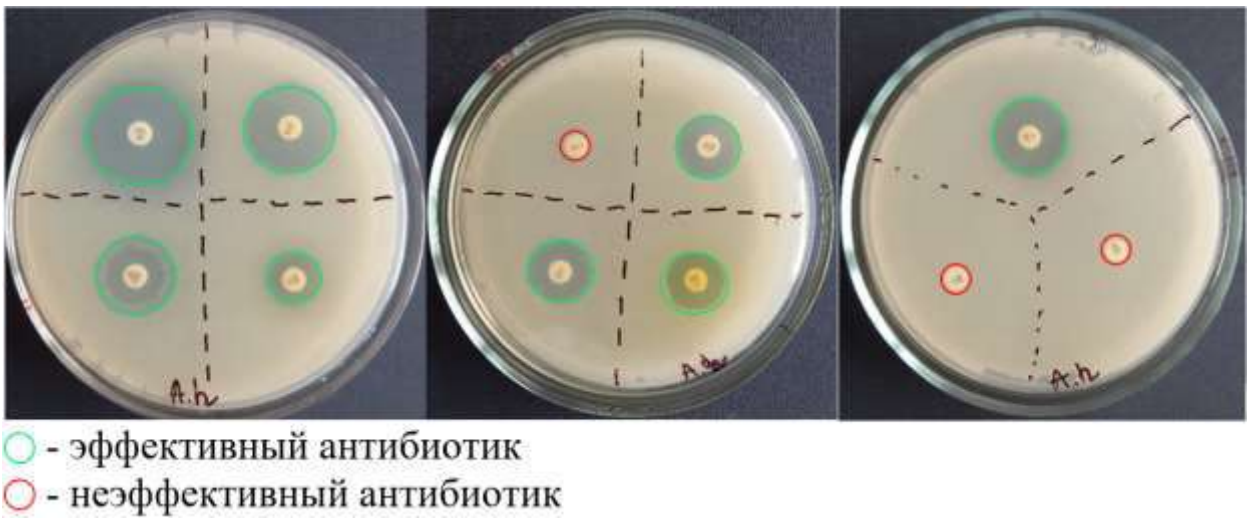


Рисунок 44 – Антибиотикорезистентность штамма бактерии *Aeromonas hydrophila* AB005

Феномен приобретенной генетической устойчивости у бактериальных патогенов рыб был верифицирован еще в конце XX века, что стало следствием начала интенсивного использования химиотерапевтических средств в

рыбоводстве. К числу первых микроорганизмов, продемонстрировавших резистентность к сульфаниламидам и тетрациклинам, относятся изоляты *Aeromonas liquefaciens* (синонимы: *Aeromonas punctata, Aeromonas hydrophila*), выделенные в Японии из различных объектов аквакультуры, включая угря (*Anguilla japonica*), карпа (*Cyprinus carpio*), айю (*Plecoglossus altivelis*) и золотую рыбку (*Carassius auratus*) (Aoki, 1971). Эти ранние находки заложили основу для понимания того, что водная среда является активным пространством для селекции устойчивых генотипов.

Дальнейший мониторинг, проведенный в конце 1990-х - начале 2000-х годов в прудовых хозяйствах Дании, показал стремительную эволюцию лекарственной устойчивости. Подвижные аэромонады (*Aeromonas spp.*) уже в тот период проявляли значительную толерантность к широкому спектру антимикробных агентов: резистентность к оксолиновой кислоте варьировала от 19 до 22%, к комбинации сульфадиазин-триметоприм - от 25 до 61%, к окситетрациклину - от 65 до 75%, в то время как чувствительность к амоксициллину была полностью утрачена (100% резистентных изолятов) (Schmidt, 2000). Относительно низкий уровень устойчивости тогда фиксировался лишь к флорфениколу (до 0,3%), что объяснялось более поздним внедрением препаратов группы фениколов в ветеринарную практику.

В современных условиях резистентность представителей рода *Aeromonas* к бета-лактамным антибиотикам, включая пенициллины, цефалоспорины и карбапенемы, приобрела повсеместный характер (Bakken, 1988; Lupiola-Gómez, 2003; Ramadan, 2018). Согласно аналитическому обзору (Lulijwa, 2019), в десятилетие с 2008 по 2018 годы в странах с доминирующим удельным весом рыбной индустрии (Китай, Индонезия, Норвегия, Япония, Чили и др.) для профилактики и терапии бактериозов использовалось более шестидесяти наименований антибактериальных субстанций. При этом порядка 73% общего объема потребления пришлось на тетрациклины (преимущественно окситетрациклин), сульфаниламиды и фениколы (Lulijwa, 2019; Bakiyev, 2021). Столь массированная экспозиция привела к тому, что роды *Aeromonas* и *Pseudomonas* на сегодняшний день классифицируются как мультирезистентные организмы (MDR), обладающие способностью к одновременному противостоянию нескольким классам антибиотиков (Hossain, 2019; Algammal, 2020; Bakiyev, 2021).

Исследования (Matyar, 2010) подтвердили высокий уровень полирезистентности у водных патогенов: 66,6% изолятов *Aeromonas* были нечувствительны к цефазолину и триметоприм-сульфаметоксазолу. В то же время у представителей рода *Pseudomonas* уровень устойчивости превысил 71,7% в отношении нитрофурантоина, цефазолина и цефуроксима (Bakiyev, 2021). По данным последнего глобального мета-анализа, проведенного (Preena, 2020), в общей структуре резистентных патогенов аквакультуры доминируют бактерии рода *Vibrio* (23%) и *Aeromonas* (20%), за которыми следуют *Enterobacteriaceae* (10%) и *Pseudomonas* (5%), что подтверждает критическую значимость аэромонад и псевдомонад как основных биологических угроз для индустриального рыбоводства (рисунок 45) (Bakiyev, 2021).

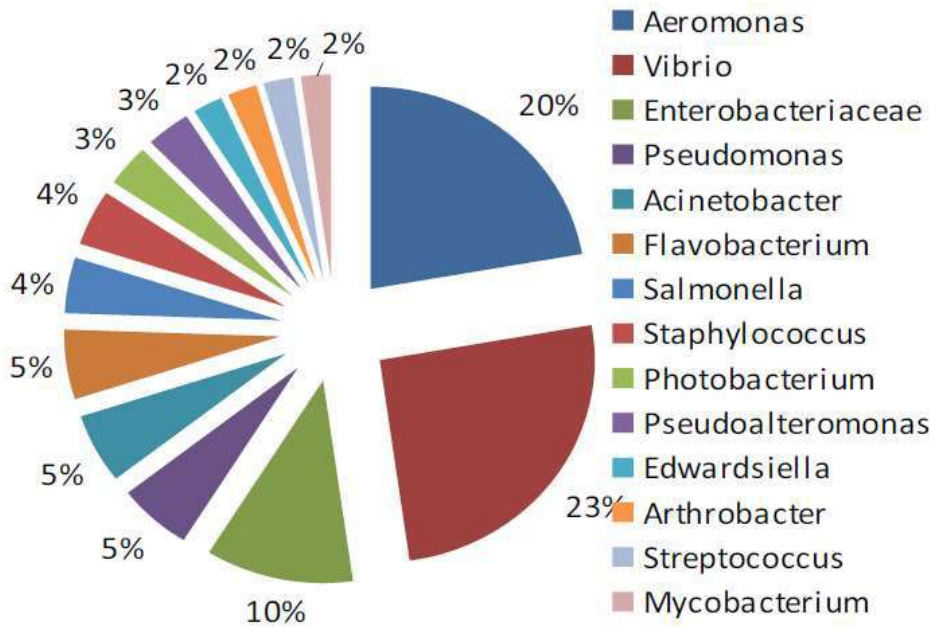


Рисунок 45 – Процент устойчивости к антибиотикам, проявляемый различными патогенами рыб (Preena, 2020)

Резюмируя вышеизложенное, необходимо констатировать, что традиционная практика применения антибактериальных препаратов в промышленной аквакультуре сталкивается с критическим барьером в виде прогрессирующей адаптации патогенов. Накопление и активная диссеминация генов резистентности (ARGs) в популяциях водных микроорганизмов детерминирует неэффективность классических схем химиотерапии, трансформируя ранее контролируемые бактериозы в устойчивые очаги инфекции (Bakiyev, 2021). Данный процесс не только ставит под угрозу экономическую рентабельность рыбоводных хозяйств, но и создает предпосылки для формирования резервуаров мультирезистентности в гидросфере.

Более того, экспансия устойчивых форм бактерий в объектах аквакультуры представляет собой прямую угрозу национальной безопасности в сфере здравоохранения. Существует верифицированный риск трансмиссии резистентных штаммов и мобильных генетических элементов от гидробионтов к человеку через трофические цепи при употреблении рыбы и продуктов ее переработки. Подобный перенос генетических детерминант устойчивости в микробиоту человека существенно лимитирует возможности клинической медицины при лечении антропонозных инфекций, многократно увеличивая риски возникновения и неконтролируемого распространения эпидемических вспышек, вызванных патогенами с экстремальной лекарственной устойчивостью.

3.2 Анализ антибиотикорезистентности выделенных штаммов бактерий

Интенсивное использование антибактериальных препаратов в современной аквакультуре выступает ключевым детерминирующим фактором формирования резистентности у патогенных бактерий. Мультирезистентные штаммы *Aeromonas hydrophila*, изолированные в различных географических регионах, традиционно характеризуются устойчивостью к пенициллину и ампициллину, однако в литературе ранее широко освещалась их чувствительность к аминогликозидам, тетрациклинам, хлорамфениколу, триметоприм-сульфаметоксазолу, хинолонам и цефалоспоринам второго и третьего поколений (Stratev, 2017). Тем не менее прогрессирующая динамика роста устойчивости представителей рода *Aeromonas* вызывает серьезную озабоченность в сфере глобального здравоохранения, что диктует необходимость проведения системного мониторинга антибиотикорезистентности данных патогенов. Проведенное в рамках настоящей работы тестирование на лекарственную чувствительность позволило не только оценить текущую эпизоотическую ситуацию, но и определить перечень противомикробных средств, обладающих максимальным терапевтическим потенциалом для купирования заболеваний, вызванных представителями родов *Aeromonas* и *Pseudomonas*.

Для детерминации профилей резистентности выделенных штаммов был применен диско-диффузионный метод с использованием стандартизированных дисков производства Condalab. Спектр исследуемых антибактериальных агентов включал препараты различных химических групп в терапевтических концентрациях, в том числе пенициллины, представленные ампициллином (10 мкг), амоксициллином (25 мкг), оксациллином (1 мкг) и пенициллином G (6 мкг), а также хинолоны, такие как энрофлоксацин (5 мкг) и норфлоксацин (10 мкг). В панель исследования также вошли цефалоспорины в виде цефазолина (30 мкг), аминогликозиды, представленные гентамицином (10 мкг) и стрептомицином (10 мкг), нитрофураны в концентрации нитрофурантоина (300 мкг) и тетрациклины, включая тетрациклин (30 мкг) и окситетрациклин (30 мкг). Дополнительно оценивалась чувствительность к макролидам через эритромицин (15 мкг), линкомицинам посредством линкомицина (2 мкг), рифамицинам через рифампицин (5 мкг), кумаринам в виде новобиоцина (30 мкг), а также к амфениколам, включая хлорамфеникол (15 мкг) и флорфеникол (30 мкг), и ингибиторам синтеза фолиевой кислоты в комбинации триметоприма с сульфаметоксазолом (25 мкг) (рисунок 46, 47).

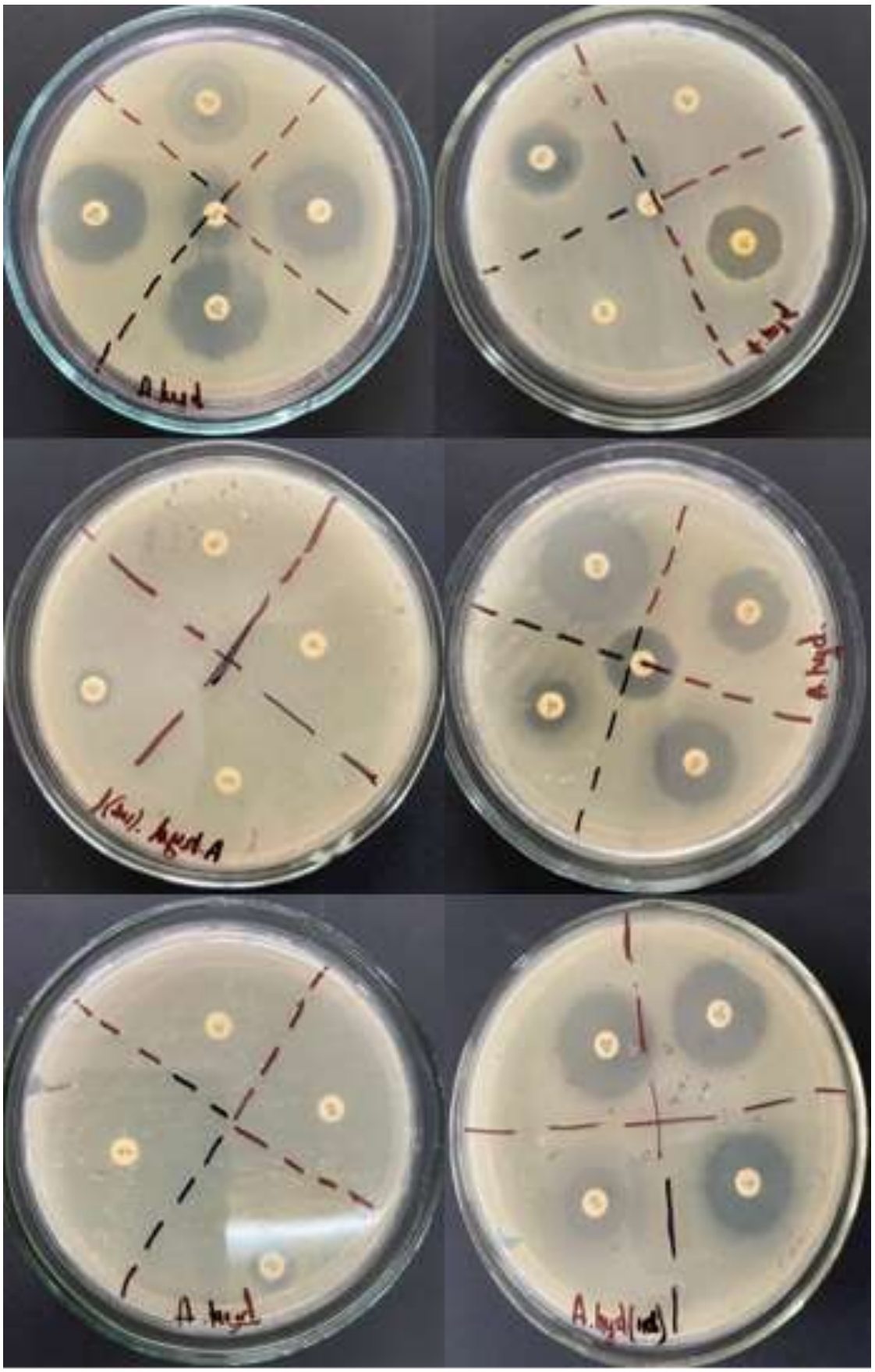


Рисунок 46 – Результаты устойчивости *Aeromonas hydrophila* AB005

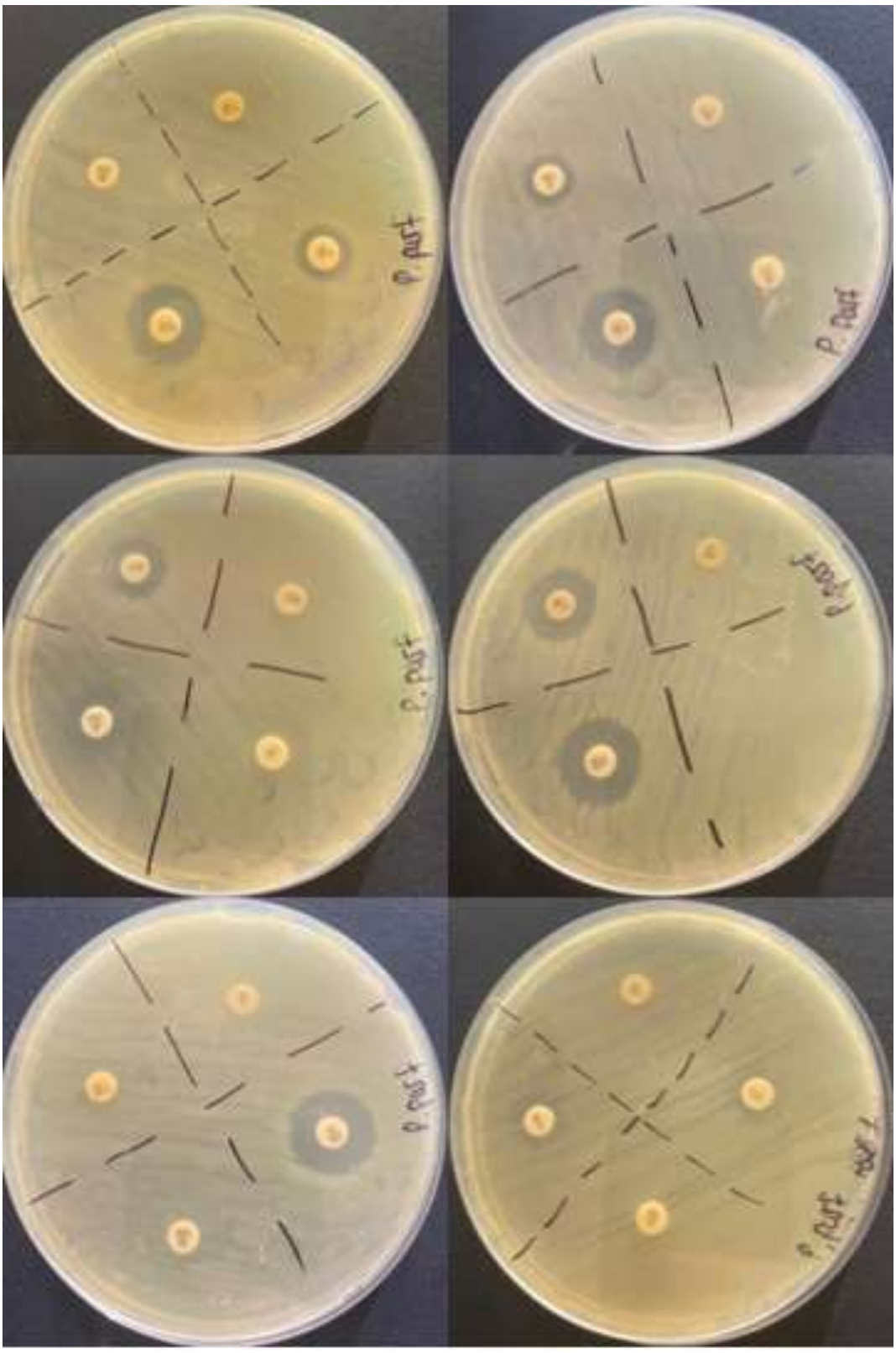


Рисунок 47 – Результаты устойчивости *Pseudomonas parafulva* AB004

Интерпретация результатов проводилась в строгом соответствии с общепринятыми международными и отраслевыми рекомендациями (Hudzicki. 2009; CLSI, 2022), а систематизированные данные представлены в таблице 17.

Таблица 17 – Результаты изучения устойчивости выделенных штаммов бактерий к антибиотикам

№	Антибиотики	Диаметр ингибированной зоны (мм)					
		Aeromonas hydrophila	*Aeromonas salmonicida*	*Aeromonas veronii*	*Aeromonas bestiarum*	*Pseudomonas parafulva*	*Pseudomonas protegens*
1	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*	*7*	*8*
Пенициллины							
1	Оксациллин (OX, 1 мкг)	У (0)	У (0)	У (0)	У (0)	У (0)	У (0)
2	Ампициллин (AM, 10 мкг)	У (0)	У (0)	У (0)	У (0)	У (0)	У (0)
3	Амоксициллин (AX, 10 мкг)	У (0)	У (0)	У (0)	У (0)	У (0)	У (0)
4	Пенициллин G (P, 10 мкг)	У (0)	У (0)	У (0)	У (0)	У (0)	У (0)
Хинолоны							
5	Энрофлоксацин (ENR,5 мкг)	Ч (27±1,32)	Ч (20,7±1,2)	Ч (21,3±0,3)	Ч (27)	У (15,5±0,3)	Ч (22,7±2,5)
6	Норфлоксацин (NOR, 10 мкг)	Ч (25±0,87)	Ч (22,7±1,5)	Ч (18)	Ч (28±1)	Ч (25±0,7)	Ч (28±1)
Цефалоспорины							
7	Цефазолин (CZ, 30 мкг)	У (0)	У (0)	У (11)	У (0)	У (0)	У (0)
Аминогликозиды							
8	Гентамицин (CN, 10 мкг)	Ч (17,8 ±0,29)	Ч (18±1)	Ч (16,7±0,3)	Ч (20,3±1,5)	Ч (16,3±0,4)	Ч (21±3)
9	Стрептомицин (S, 10 мкг)	Ч (17,3±1,25)	Ч (16,7±0,6)	Ч (14,8±0,3)	Ч (17,7±0,6)	С (13,2±0,2)	Ч (17,7±2,5)
Нитрофураны							
10	Нитрофурантоин (F, 300 мкг)	Ч (17,7±0,29)	Ч (19±1)	С (15,3±0,3)	Ч (18±1)	У (0)	У (0)
Тетрациклины							
11	Тетрациклин (TE, 30 мкг)	Ч (23,5±0,5)	Ч (23,3±0,6)	У (9,7±0,6)	Ч (23,3±0,6)	С (15,5±0,3)	У (12,7±0,6)
12	Окситетрациклин (T, 30 мкг)	С (22,5±0,87)	С (20,7±1,5)	У (0)	С (21,7±0,6)	У (14,5±0,3)	У (13±1)
Макролиды							
13	Эритромицин (E, 15 мкг)	У (12,2±0,76)	С (14,3±1,5)	С (17)	У (13,2±0,3)	У (7,6±0,4)	У (7,7±0,6)

продолжение таблицы 17

1	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*	*7*	*8*
	Линкомицины						
14	Линкомицин (L, 10 мкг)	У (0)	У (0)	У (0)	У (7,7±1,2)	У (0)	У (0)
	Рифамицины						
15	Рифампицин (RA, 5 мкг)	У (11,7±0,58)	У (10±1)	У (11)	У (9,3±0,6)	У (10,7±0,4)	У (9,7±2,1)
	Кумарины						
16	Новобиоцин (NV, 30 мкг)	У (0)	У (9,7±1,2)	У (0)	У (9,2±0,3)	У (0)	У (0)
	Амфениколы						
17	Хлорамфеникол (C, 10 мкг)	Ч (22,7±0,76)	Ч (24,3±0,6)	Ч (24±1)	Ч (24,3±0,6)	У (8±0,7)	У (0)
18	Флорфеникол (FFC, 30 мкг)	Ч (28,3±0,28)	Ч (26,3±0,6)	Ч (28,3±0,6)	Ч (25,3±1,5)	У (11,3±1,6)	У (0)
	Ингибиторы синтеза фолиевой кислоты						
19	Триметоприм + сульфаметоксазол (SXT, 25 мкг)	Ч (21,8±0,76)	Ч (18±1)	У (0)	Ч (16,5±0,9)	У (0)	У (0)
Примечание: У - устойчивый, С - среднеустойчивый, Ч – чувствительный, $\bar{X} \pm s$ - среднее значение и стандартное отклонение							

Анализ полученных результатов показал, что абсолютно все изученные изоляты проявляют тотальную устойчивость к ряду фармакологических групп, включая пенициллины (оксациллин, ампициллин, амоксициллин, пенициллин), цефалоспорины первого поколения (цефазолин), линкомицины (линкомицин), рифамицины (рифампицин) и кумарины (новобиоцин). Столь широкий спектр резистентности свидетельствует о глубокой адаптации патогенной микрофлоры к антропогенному воздействию в условиях замкнутых систем, где постоянная циркуляция воды способствует накоплению метаболитов лекарственных средств. В то же время все исследованные штаммы продемонстрировали 100% чувствительность к группе аминогликозидов, в частности к гентамицину, что позволяет рассматривать данный препарат в качестве основного резервного средства при возникновении острых эпизоотий, хотя его длительное применение может быть ограничено вопросами нефротоксичности для гидробионтов. Особого внимания заслуживает профиль штамма *Aeromonas veronii* AB003, у которого была зафиксирована сочетанная резистентность к широкому перечню препаратов, различающихся по химической структуре и молекулярному механизму действия. Данный изолят проявил выраженный характер множественной лекарственной устойчивости, что полностью коррелирует с результатами, полученными для других выделенных представителей рода *Aeromonas* в различных регионах мира. Наличие таких полирезистентных штаммов в индустриальных системах выращивания осетровых рыб существенно осложняет проведение лечебно-профилактических мероприятий, так как традиционные схемы терапии оказываются неэффективными, что требует незамедлительного внедрения новых стратегий антибактериального контроля, основанных на применении фаговых лизинов или других альтернативных биопрепаратов, способных разрушать клеточную стенку бактерий независимо от наличия в ней плазмид устойчивости. Феномен множественной устойчивости в условиях аквакультуры зачастую обусловлен активным горизонтальным переносом генов через мобильные генетические элементы, такие как интегразо-зависимые системы, что способствует лавинообразному распространению детерминант резистентности внутри всего микробного сообщества УЗВ.

Резистентность к β-лактамным антибиотикам, включающим пенициллины, цефалоспорины и карбапенемы, является широко распространенным и эволюционно закрепленным феноменом среди представителей рода *Aeromonas,* что подтверждается многочисленными современными исследованиями отечественных и зарубежных авторов (Bakken, 1988; Lupiola-Gómez, 2003; Janda, 2010; Bakiyev, 2021; Bakiyev, 2022). В ходе проведенного детального анализа антибиотикочувствительности было установлено, что штамм *Aeromonas hydrophila* AB005 обладает выраженной устойчивостью не только к пенициллинам и цефалоспоринам, но и к макролидам, линкомицинам, рифамицинам и кумаринам, что указывает на наличие мультифункциональных систем эффлюкса, способных активно выкачивать токсичные соединения из клетки.

Обобщая и систематизируя полученные экспериментальные данные, необходимо отметить, что единственным препаратом, проявившим универсальные бактерицидные свойства в отношении абсолютно всех выделенных изолятов, является гентамицин, представляющий группу аминогликозидов второго поколения. Столь высокая эффективность данного агента может быть напрямую связана с его уникальной способностью необратимо связываться с 30S-субъединицей бактериальной рибосомы, вызывая критические ошибки при трансляции и блокируя синтез жизненно важных белков, к чему изученные штаммы аэромонад и псевдомонад пока не выработали эффективных компенсаторных механизмов. Устойчивость же бактериальных культур к ампициллину, цефазолину, линкомицину и рифампицину, вероятнее всего, жестко детерминирована наличием специфических хромосомных или плазмидных генов резистентности, селекция и закрепление которых в геноме были обусловлены повсеместным и зачастую биологически необоснованным использованием данных терапевтических агентов в отечественной рыбоводной практике прошлых лет.

Сравнительный анализ антибиотикограмм показал, что наиболее выраженным и опасным адаптационным потенциалом характеризуются штаммы *Pseudomonas parafulva* AB004 и *Pseudomonas protegens* AB006, которые проявили устойчивость к 15 из 19 протестированных антибиотиков различных классов, что позволяет однозначно классифицировать их как экстремально-резистентные формы (XDR). Уникальная метаболическая пластичность псевдомонад, их способность к формированию плотных бактериальных биопленок на стенках бассейнов и трубах, а также наличие высокоэффективных молекулярных помп делают их одними из самых трудноискоренимых патогенов в современных замкнутых системах водоснабжения. В то же время наименее широким спектром устойчивости характеризовались штаммы *Aeromonas hydrophila* AB005, *Aeromonas salmonicida* AB001 и *Aeromonas bestiarum* AB002, для которых 9 из 19 антибактериальных препаратов все еще сохранили свою терапевтическую эффективность. Выявленная значительная вариабельность профилей чувствительности даже внутри одного рода подчеркивает критическую необходимость индивидуального подхода к подбору химиотерапевтических средств при лечении сочетанных бактериозов в условиях УЗВ, исключая использование препаратов «широкого спектра» без предварительной постановки подтитровки. Дальнейшее углубленное изучение молекулярно-генетических основ этой устойчивости и поиск генов-маркеров позволит разработать более совершенные методы экспресс-диагностики и биоконтроля патогенов, включая инновационное использование рекомбинантных эндолизинов бактериофагов, механизм действия которых основан на прямом физическом разрушении пептидогликана, что делает невозможным развитие резистентности по классическим сценариям.

ГЛАВА 4
ПАТОГЕННОСТЬ БАКТЕРИЙ

Патогенность бактериальных агентов выступает в качестве одного из ключевых детерминант биологической опасности для животных, в том числе для представителей семейства осетровых. Данный показатель комплексно характеризует генетически детерминированную способность инфекционного агента преодолевать защитные барьеры организма, колонизировать внутренние среды и инициировать развитие патологических процессов различной степени тяжести. В условиях интенсивного индустриального рыбоводства, где плотность посадки гидробионтов значительно превышает естественную, патогенность микроорганизмов становится решающим фактором, определяющим выживаемость поголовья. Согласно положениям, выдвинутым автором (Zhou, 2019), патогенный потенциал представителей рода *Aeromonas* определяется специфическим набором генов вирулентности. Эти гены контролируют синтез и секрецию множества структур внеклеточного матрикса и эффекторных белков, каждый из которых выполняет определенную роль в подавлении иммунного ответа хозяина и деструкции его тканей (Bakiyev, 2021).

В арсенал факторов вирулентности аэромонад входят следующие компоненты, требующие детального рассмотрения их функциональной активности: аэролизин (*aerA*) – мощный порообразующий цитотоксин. Механизм его действия заключается в связывании с рецепторами мембраны клетки-мишени, последующей олигомеризации и формировании трансмембранных каналов (пор), что ведет к неконтролируемому току ионов, осмотическому лизису и гибели клетки; гемолизин (*hlyA*) – экзотоксин, обладающий выраженной способностью разрушать эритроциты. Его активность вызывает массовый гемолиз, что клинически проявляется в виде геморрагической септицемии, анемии и гиперемии кожных покровов у рыб; цитотонический термолабильный энтеротоксин (*alt*) – белок, стимулирующий избыточную секрецию жидкости и электролитов в просвет кишечника без деструкции самих клеток эпителия, что ведет к тяжелому диарейному синдрому и обезвоживанию; цитотонический термостойкий токсин (*ast*) - Энтеротоксин, сохраняющий свою функциональность даже при воздействии высоких температур, усиливающий патологическое нарушение водно-солевого баланса в организме рыбы; цитотоксический термолабильный энтеротоксин (*act*) – обладает комплексным деструктивным действием - не только стимулирует выход жидкости, но и напрямую разрушает клетки кишечного эпителия, вызывая некротические изменения слизистых оболочек; липаза (*lip*) - фермент, гидролизующий липидные компоненты клеточных мембран, что способствует быстрому разрушению защитных барьеров тканей и облегчает бактериальную инвазию в глубокие слои; эластаза (*ela*) - протеаза, целенаправленно деградирующая эластин и другие белки соединительной ткани, что приводит к формированию характерных глубоких язв и серьезному повреждению сосудистого русла; сериновая протеаза (*ser*) - фермент, расщепляющий широкое количество белковых субстратов и участвующий в

посттрансляционной активации про-аэролизина, переводя его в функционально активную патогенную форму непосредственно в тканях; ДНК-азы (*exu*) - нуклеазы, расщепляющие внеклеточную ДНК хозяина, что позволяет бактериям эффективно нейтрализовать «нейтрофильные ловушки» (NETs) иммунной системы рыб, предназначенные для захвата микробов; полярный жгутик (*fla*) и боковые жгутики (*laf*) - обеспечивают высокую подвижность патогена в водной среде (хемотаксис) для поиска хозяина, а также последующую адгезию (прикрепление) к эпителию и формирование устойчивых бактериальных биопленок.

В источниках (Pollard, 1990; Wang, 2003) подчеркивается, что наиболее критическими факторами риска среди представителей рода *Aeromonas* признаны порообразующий аэролизин и экзотоксин гемолизин (Bakiyev, 2021). Научные данные (Chacón, 2003; Abdel-Latif, 2020) подтверждают, что формирование биологического синергизма из этих двух токсинов значительно потенцирует общую агрессивность бактерий против организма хозяина, позволяя им обходить механизмы врожденного иммунитета. Экспериментально это было подтверждено в исследованиях (El-Bahar, 2019), где смертность *Oreochromis niloticus* возрастала прямо пропорционально комбинации факторов вирулентности: 40% - при наличии только гемолизина, 57% - при экспрессии только аэролизина, и критические 73,3% - при их совместном патогенном воздействии.

Для подавляющего большинства объектов аквакультуры, включая ценные виды осетровых, изоляты рода *Aeromonas* являются крайне опасными. Исследования (Lim, 2020) зафиксировали экстремальную вирулентность штаммов *Aeromonas salmonicida* DH170821019 и CH1708228, где показатель LD_{50} (доза, вызывающая 50% летальность) составила всего 6,4 х 10^3 КОЕ на особь. Патогенность данных штаммов была обусловлена явлением мультивирулентности, включая компоненты сложной системы секреции третьего типа (T3SS): внешнее (*ascV*) и внутреннее (*ascC*) кольца, а также защитный А-слой (*vapA*), который механически препятствует фагоцитозу и действию системы комплемента крови. Примечательно, что даже при отсутствии некоторых «классических» факторов, таких как *exu, ser, aerA* и *ast,* изоляты *Aeromonas salmonicida* могут проявлять высокий уровень агрессивности за счет сохранения локусов *ascV, fla, ahyB, gcaT, lip, alt* и *act* (Nikapitiya, 2019).

Патогенный статус бактерий проявляется стабильно, вне зависимости от среды обитания рыб и типа водной системы. Изоляты *Aeromonas hydrophila*, выделенные из естественных открытых водоемов, в 100% случаев несли гены липазы, аэролизина, эластазы и сериновой протеазы, что свидетельствует о высоком базовом уровне их вооруженности. У 95% был выявлен ген *act*, у 76% - *hly*, а 30% штаммов обладали комплексом *exu* и *ast* (Milud, 2015). Выделенный штамм *Aeromonas veronii* (CFJY-623) (Chen, 2019) из инфицированных особей карася также подтвердил свою высокую патогенность наличием шести ключевых генов вирулентности (*aer, alt, ahyB, ela, gcaT, lip* и *ser*) (Bakiyev, 2021).

Реализация этого мощного патогенного потенциала во многом обеспечивается способностью бактерий эффективно секретировать токсины (например, аэролизины *aer* и ДНК-азы *gcaT*) непосредственно во внешнюю среду через специализированную систему секреции второго типа (T2SS), которая пронизывает клеточную стенку грамотрицательной бактерии (Milud. 2015; Rasmussen-Ivey, 2016). Таким образом, патогенные аэромонады представляют собой эволюционно совершенную систему, способную вызывать внезапную и массовую гибель объектов выращивания в условиях интенсивного индустриального рыбоводства, что требует разработки инновационных методов терапии, таких как использование эндолизинов.

Аэромоноз, также классифицируемый в научной литературе как бактериальная геморрагическая септицемия, наряду с фурункулезом, представляет собой группу наиболее деструктивных инфекционных заболеваний ихтиофауны. Данные патологии широко распространены как в естественных водных экосистемах, так и в высокотехнологичных индустриальных условиях аквакультуры. Согласно работам (Dallaire-Dufresne, 2014; Stratev, 2017), этиологическими агентами аэромоноза, известного также под названиями «краснуха плавников» или «хвостовая гниль», выступает ряд специфических видов рода *Aeromonas*, среди которых доминирующее значение имеют *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sobria* и *Aeromonas caviae*. В свою очередь, вид *Aeromonas salmonicida* традиционно идентифицируется как основной возбудитель фурункулеза рыб (Bakiyev, 2021). Поскольку водная среда является естественным биотопом для данных микроорганизмов, рыбы находятся в состоянии перманентного риска инфицирования. Как указывают авторы (Dallaire-Dufresne, 2014; Stratev, 2017), проникновение бактериальных агентов в организм гидробионтов осуществляется несколькими путями: через микротравмы и открытые повреждения кожных покровов, эпителий жаберного аппарата, а также алиментарным путем – в процессе потребления контаминированного корма (Bakiyev, 2021). Постоянный контакт слизистых оболочек с патогенами в замкнутых системах (УЗВ) делает барьерную функцию эпителия критическим фактором выживаемости. Клиническая картина при поражении *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, описанная в исследованиях на золотых рыбках (*Carassius auratus*), характеризуется полиморфными изменениями. К ним относятся глубокая экссудативно-некротическая деструкция кожи с образованием язв, гнилостный распад плавников и хвостового стебля, обширные кровоизлияния в глазное яблоко и развитие асцита (водянки брюшной полости), что свидетельствует о генерализованном характере инфекции (Lian, 2020). Высокая агрессивность данных патогенов подтверждается экспериментальными данными: искусственное заражение *Carassius auratus* суспензией *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* в концентрации 6,2 х 10^8 КОЕ/мл приводило к 100% летальности популяции уже на 7-е сутки после инкуляции. Однако особую опасность представляют штаммы, обладающие экстремально высокой патогенностью при низких титрах возбудителя. Например, для высокопатогенного штамма *Aeromonas salmonicida* показатель 50% летальной

дозы (LD_{50}) для радужной форели (*Oncorhynchus mykiss*) и кижуча (*Oncorhynchus kisutch*) составил всего 6,4 х 10^3 КОЕ на одну особь (Lim, 2020). Это указывает на совершенство молекулярных механизмов подавления иммунитета у данных бактерий. Аналогичные закономерности наблюдаются и у морских видов рыб. В исследованиях на тюрбо или большом ромбе (*Scophthalmus maximus*) значение LD_{50} для подвида *Aeromonas salmonicida* subsp. *masoucida* было определено на уровне 10^4 КОЕ/мл. Данная концентрация является относительно невысокой в сравнении с порогами инфицирования для других представителей рода *Aeromonas*, что классифицирует данный подвид как высокорисковый патоген для морской аквакультуры (Wang, 2020). Столь низкие дозы заражения, приводящие к массовой гибели, подчеркивают необходимость разработки прецизионных методов контроля и профилактики бактериальных септицемий в условиях интенсивного рыбоводства.

Безусловно, одним из наиболее значимых и агрессивных патогенов в структуре рода *Aeromonas* является вид *Aeromonas hydrophila*. Данный микроорганизм обладает исключительной вирулентностью по отношению к ценным видам ихтиофауны. В частности, результаты многочисленных исследований подтверждают, что при инфицировании осетровых рыб штаммами *Aeromonas hydrophila* показатели смертности могут достигать критической отметки в 100%. Столь высокая летальность в условиях индустриального рыбоводства неизбежно влечет за собой колоссальные экономические потери, ставя под угрозу рентабельность предприятий рыбной промышленности (Jiang, 2016; Bakiyev, 2021). Количественные показатели патогенности варьируют в зависимости от вида хозяина и конкретного изолята. Так, автором (Meng, 2011) было установлено, что для амурского осетра (*Acipenser schrenckii*) расчетная летальная доза *Aeromonas hydrophila* составляет 1,17 х 10^7 КОЕ/мл (Bakiyev, 2021). Сопоставимые данные по вирулентности были получены и для других представителей рода: средняя летальная доза изолята *Aeromonas veronii* (штамм CFJY-623) (Chen, 2019) при инфицировании серебряного карася была определена на уровне 1,31 х 10^7 КОЕ/мл (Bakiyev, 2021). Эти цифры подчеркивают высокую степень адаптации аэромонад к паразитированию на различных группах костистых и хрящевых ганоидных рыб.

Согласно систематизированным данным из источника (Dallaire-Dufresne, 2014), аэромоноз, или бактериальная геморрагическая септицемия, характеризуется полиморфной клинической картиной, отражающей системный характер поражения организма. Типичными признаками заболевания являются обширные кровотечения (геморрагии) и абсцессы, локализованные в различных участках тела, однако чаще всего поражения концентрируются в области плавников и хвостового стебля. По мере прогрессирования инфекции наблюдается патологическое накопление экссудата в брюшной полости (асцит), развитие выраженной анемии вследствие разрушения эритроцитов токсинами бактерий, а также экзофтальм (пучеглазие). В наиболее тяжелых и запущенных случаях заражения на теле рыб формируются многочисленные язвы, глубоко

проникающие в мышечные ткани и вызывающие их некроз (Bakiyev, 2021). Характер данных поражений наглядно представлен на рисунке 48.



Рисунок 48 – Патоморфологические изменения и наличие глубоких язвенных поражений у осетровых рыб при системных инфекциях, вызванных бактериями рода *Aeromonas*

В свою очередь, формирование глубоких язвенных поражений на теле рыб является прямым следствием прогрессирующего некроза мышечных тканей. Данный деструктивный процесс инициируется наличием у представителей рода *Aeromonas* специфического фактора вирулентности – экзотоксина А, который обладает выраженной цитотоксичностью и способствует ферментативному разложению клеток мышечной ткани, превращая их в некротизированный детрит (Masuyer, 2020).

Аэромоноз характеризуется выраженной способностью к массовому охвату популяции в условиях аквакультуры. Так, в источнике (Hossain, 2014) приводятся данные по Соединенным Штатам Америки, где масштабные вспышки бактериальной геморрагической септицемии у культивируемых сомов привели к экономическим потерям, оцениваемым в 12 млн долл. США (Bakiyev, 2021). Осетровые рыбы, обладая высокой физиологической чувствительностью, не являются исключением и подвержены массированным атакам бактерий рода *Aeromonas*. Исследования автора (Santi, 2019) демонстрируют структуру бактериоценоза при инфекциях осетровых: наибольший удельный вес среди изолятов (38,71%) приходится на *Aeromonas hydrophila*, в то время как доля *Aeromonas sobria* и представителей рода *Pseudomonas* составляет по 13,98% для каждой группы (Bakiyev, 2021).

Клиническая картина при инфицировании осетровых рыб *Aeromonas hydrophila* включает характерный симптомокомплекс: выраженное потемнение кожных покровов, множественные петехиальные и разлитые кровоизлияния в области головы, брюшной стенки и на основаниях плавников (Jiang, 2016). Высокая летальность подтверждается данными автора (Zhang, 2016), согласно которым при заражении канального сома (*Ictalurus punctatus*) бактерией

Aeromonas hydrophila 50% смертность наступает уже в течение первых 12 часов, а по истечении трех суток показатель общей гибели достигает 95%, что классифицирует данный патоген как сверхострый (Bakiyev, 2021).

Если аэромоноз является универсальной патологией для большинства карповых, осетровых и сомовых, то фурункулез представляет собой специфическое заболевание, поражающее преимущественно представителей семейства лососевых (*Salmonidae*). Возбудителем данной инфекции является *Aeromonas salmonicida*. Как и в случае с *Aeromonas hydrophila*, этот патоген выступает основным триггером значительного экономического ущерба в индустриальном лососеводстве, особенно при выращивании атлантического лосося (*Salmo salar*) в морских прибрежных фермах и садковых хозяйствах на открытых акваториях (O'Brien, 2016; Bakiyev, 2021).

Фурункулез, аналогично бактериальной геморрагической септицемии, способен вызывать тотальную гибель культивируемой рыбы. В период активной фазы инфекции, вызванной *Aeromonas salmonicida*, у рыб формируются характерные «фурункулы» - патологические образования некротического типа, содержащие внутри сборный гнойный экссудат, состоящий из разрушенных лейкоцитов, бактериальных клеток и продуктов распада тканей (Stratev, 2017; Lian, 2020; Wang, 2020). Помимо этого, у больных особей фиксируется потемнение кожи, кровоизлияния во внутренних органах и на лучах плавников. На поведенческом уровне отмечается резкое снижение двигательной активности и отказ от потребления комбикормов, что ведет к быстрому истощению и гибели (Bakiyev, 2021).

Формирование фурункулов выступает в качестве одного из наиболее специфических, диагностически значимых и визуально различимых клинических признаков фурункулеза. Согласно данным источника (Coleman, 1993), ключевым этиологическим фактором образования подобных деструктивных очагов является наличие у патогена *Aeromonas salmonicida* специфической сериновой протеазы, кодируемой генетической последовательностью локуса *Asp*A. Данный фермент обладает мощной протеолитической активностью, вызывая разжижение (гидролиз) белков мышечной ткани инфицированных особей. Этот процесс приводит к формированию характерных опухолевидных образований и полостей, заполненных некротическим детритом, что визуально манифестирует как фурункулы на поверхности тела рыб (Bakiyev, 2021).

Экспериментальные подтверждения высокой летальности данного заболевания были получены в работе (Lin, 2019). В ходе исследований смерть китайского окуня (*Siniperca chuatsi*) наступала в течение 14 суток после экспозиции патогена в дозе 1,2 х 10^6 КОЕ на одну особь, при этом общий уровень смертности достигал 70%. Дальнейшее повышение концентрации возбудителя до уровня 1,2 х 10^7 КОЕ приводило к катастрофическим последствиям – показатель гибели возрастал до 90% (Bakiyev, 2021). Такая динамика свидетельствует о дозозависимом характере инфекции и высокой агрессивности штаммов *Aeromonas salmonicida* в условиях аквакультуры.

Различия в показателях смертности определяются не только видовой спецификой и резистентностью конкретных популяций рыб, но и критическим влиянием абиотических факторов окружающей среды. Температура водной среды, концентрация растворенного кислорода, общее физиологическое состояние гидробионтов и соблюдение норм кормления формируют сложный экзогенный фон. Нарушение любого из этих технологических параметров, особенно при интенсивном выращивании в искусственных условиях (УЗВ), неизбежно инициирует развитие стресс-реакций у рыб. Стресс в данном контексте выступает как мощный отрицательный кофактор, подавляющий иммунокомпетентные системы и открывающий «ворота» для бактериальной инвазии.

Особую опасность представляет стресс, вызванный несоблюдением регламентов плотности посадки и недобросовестным ведением хозяйства. Wedemeyer, 1970 и Mateus, 2017 аргументированно доказывают, что в периоды физиологического стресса риск манифестации бактериальных инфекций увеличивается многократно. Именно в таких условиях возникают спонтанные вспышки массовых эпизоотий, которые в кратчайшие сроки способны парализовать деятельность рыбных хозяйств и нанести невосполнимый экономический ущерб (Bakiyev, 2021).

Молекулярные механизмы этой взаимосвязи были детально изучены (Gao, 2019). Было обнаружено, что основной гормон стресса – норэпинефрин (норадреналин) – оказывает прямое модулирующее влияние на вирулентность бактерий *Aeromonas hydrophila*. Установлено, что повышение уровня норэпинефрина в организме стрессированной рыбы выступает сигналом для патогена, активируя экспрессию целого каскада генов вирулентности, таких как: *ahyR* - ген кодирует ключевой белок-рецептор системы «чувства кворума» (Quorum Sensing). *ahyR* отвечает за межклеточную коммуникацию бактерий. Активация *ahy*R позволяет популяции патогена синхронно запускать экспрессию генов вирулентности только тогда, когда плотность бактерий достигает критической массы, необходимой для преодоления иммунного ответа рыбы; *ompW* – ген кодирующий специфический белок внешней мембраны. Он играет важную роль в адаптации бактерии к изменениям солености и осмотического давления водной среды. В контексте патогенеза ompW участвует в транспорте малых гидрофобных молекул и способствует выживанию патогена внутри организма хозяина; *ahp* - группа генов, тесно связанных с продукцией адгезинов и факторов, родственных аэролизину. Они обеспечивают первичное прикрепление бактериальной клетки к эпителию жабр или кишечника рыбы. Без эффективной работы ahp колонизация тканей становится невозможной; *aha* - специализированный ген, отвечающий за синтез поверхностных белков-адгезинов. Эти белки распознают специфические рецепторы на клетках осетровых рыб, обеспечивая прочную фиксацию патогена и предотвращая его механическое вымывание током воды или слизи; *ele* – ген, кодирующий фермент эластазу. Этот мощный протеолитический фермент разрушает эластин и коллаген – структурные белки соединительной ткани. Именно активность *ele* приводит к «расплавлению» дермы и

подлежащих мышц, что визуально проявляется в виде глубоких язв на теле рыбы; *ompA* - один из наиболее значимых белков внешней мембраны грамотрицательных бактерий. *omp*A выполняет роль «якоря», поддерживающего структурную целостность клеточной стенки. Кроме того, он участвует в процессе адгезии к клеткам хозяина и помогает бактерии противостоять литическому действию сыворотки крови рыбы; *fur* - ген-регулятор поглощения железа. Железо является критически важным ресурсом для роста бактерий, но в организме рыбы оно прочно связано белками (ферритином, трансферрином). Белок *fur* управляет системой захвата железа (сидерофорами), позволяя патогену буквально «красть» железо у хозяина, что необходимо для бурного размножения бактерий в период вспышки инфекции. Данная генетическая активация способствует резкому увеличению уровня общей патогенности бактерий, превращая условно-патогенную микрофлору в агрессивного возбудителя (Bakiyev, 2021).

Таким образом, патогенные бактерии рода *Aeromonas* представляют собой эволюционно отточенную систему биологической угрозы, обладающую уникальными механизмами адаптации и агрессии. Являясь возбудителями таких фатальных заболеваний, как аэромоноз и фурункулез, они способны использовать физиологическую нестабильность хозяина для реализации своего патогенного потенциала. Ключевым фактором этой реализации является молекулярный «переключатель» вирулентности, активируемый гормонами стресса (норэпинефрином), который запускает экспрессию целого каскада критических генов: *ahy*R, *omp*W и *omp*A, *ahp* и *aha*, *ele*, *fur*.

Наличие такого скоординированного генетического аппарата делает аэромонад критическим фактором риска в современном индустриальном осетроводстве. В условиях высокой плотности посадки и неизбежных технологических стрессов в УЗВ, эти микроорганизмы трансформируются в агрессивных убийц, способных обходить традиционные системы иммунной защиты. Это диктует острую необходимость внедрения инновационных стратегий контроля, таких как применение эндолизинов бактериофагов, способных точечно и эффективно нейтрализовать патоген, вне зависимости от его генетической вооруженности и стрессового статуса рыбы.

Согласно фундаментальным данным источника (Baron, 1996), бактерии рода *Pseudomonas*, являясь опасными патогенными микроорганизмами для широкого круга животных и человека, обладают сложным и многоуровневым арсеналом факторов вирулентности. В их генетический профиль включены эндотоксины, термостабильные гемолизины, комплекс протеаз (эластаза и алкалин-протеаза), экзофермент S и токсин A. Установлено, что порядка 90% всех идентифицированных видов этого рода обладают способностью продуцировать токсин A – наиболее агрессивный и распространенный эффекторный белок, определяющий тяжесть течения инфекции (Bakiyev, 2021).

Для более глубокого понимания патогенеза необходимо рассмотреть функциональную роль ключевых факторов вирулентности, кодируемых специфическими генами: *tox*A (экзотоксин A) - является мощным ингибитором биосинтеза белка в клетках хозяина. Механизм действия заключается в АДФ-

рибозилировании фактора элонгации 2 (EF-2), что приводит к необратимой гибели клетки и обширным некрозам тканей; *plc*H (гемолитическая фосфолипаза С) - этот фермент атакует фосфолипиды клеточных мембран и сурфактант. Его активность вызывает лизис эритроцитов и повреждение паренхиматозных тканей, обеспечивая бактерию питательными веществами; *phz*I (феназиновый оперон) – отвечает за синтез пиоцианина и других феназинов. Эти пигменты генерируют активные формы кислорода, вызывая окислительный стресс в клетках рыбы и подавляя работу её иммунной системы; *exo*Y (Аденилатциклаза) - компонент системы секреции третьего типа (T3SS), который нарушает внутриклеточную сигнализацию, вызывая отек тканей и нарушение барьерных функций; exoT (экзотоксин Т) – обладает АДФ-рибозилтрансферазной активностью, разрушает цитоскелет клеток хозяина, препятствуя фагоцитозу и заживлению раневых поверхностей.

В исследованиях (Haghi, 2018) при анализе изолятов *Pseudomonas aeruginosa* была выявлена высокая частота встречаемости данных маркеров: ген *tox*A присутствовал у 97,8% штаммов, а гены *plc*H и *phz*I – у 96,7%. Гены *exo*Y и *exo*T были обнаружены у 93,1% и 20,4% образцов соответственно, что подтверждает статус этих бактерий как высокопатогенных агентов (Bakiyev, 2021).

Патогенный потенциал псевдомонад проявляется не только у госпитальных или природных штаммов, но и у изолятов, контаминирующих продукты питания. Это свидетельствует о высокой выживаемости и адаптивности данных микроорганизмов в различных экологических нишах. Исследования (Benie, 2017) демонстрируют активную мультивирулентность бактерий, выделенных из сырья. Так, 96,7% изолятов из сырого мяса содержали следующие гены: *las*B (эластаза) - протеаза, ответственная за разрушение структурных белков тканей (эластина, коллагена), что ведет к глубокой деструкции сосудов и мышц; *exo*S (экзофермент S) – базовая основа системы секреции, ингибирующая синтез белка и вызывающая апоптоз клеток мишеней; *alg*D (альгинат) – ключевой ген биосинтеза альгината – основного компонента бактериальных биопленок, защищающего колонию от антибиотиков и иммунных клеток хозяина.

Аналогичная картина мультивирулентности наблюдается у штаммов, выделенных из образцов свежей рыбы. Генетический скрининг в ходе проведенного анализа выявил наличие гена *las*B у 71,4% образцов. Около 77,5% и 75,5% штаммов несли в своем геноме последовательности генов *alg*D и *plc*H соответственно. Ген exoS был идентифицирован у 67,3% изолированных бактерий (Bakiyev, 2021).

Таким образом, бактерии рода *Pseudomonas*, подобно представителям рода *Aeromonas*, характеризуются экстремально высокой патогенностью, обусловленной синергетическим действием множества факторов вирулентности. Их широкое распространение в окружающей среде - от почвенных резервуаров до водных систем УЗВ и пищевых продуктов - делает их одной из наиболее серьезных угроз для стабильности индустриального рыбоводства. Способность этих патогенов одновременно использовать

ферментативную деструкцию тканей и блокирование белкового синтеза требует разработки инновационных методов ветеринарного контроля.

Согласно экспертным данным источников (El-Hady, 2011; Zhang, 2014), псевдомоноз, в специальной литературе также идентифицируемый как «плавниковая гниль» или бактериальная геморрагическая септицемия, представляет собой тяжелое инфекционное заболевание. Данная патология поражает как гидробионтов в естественных биоценозах, так и рыб, культивируемых в высокотехнологичных регулируемых системах (УЗВ, садковые хозяйства). Этиологический спектр псевдомоноза представлен группой таксономически близких видов: *Pseudomonas fluorescens, Pseudomonas putida, Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas plecoglossicida* и *Pseudomonas anguilliseptica* (Bakiyev, 2021).

Важной биологической особенностью является то, что представители рода *Pseudomonas* входят в состав нормальной кишечной микрофлоры многих видов рыб. В работе (Sivakami, 1996) показано, что у основных видов карповых (*Catla catla, Labeo rohita, Cirrhinus mrigala, Cyprinus carpio*) более 50% микробного пейзажа кишечника составляют *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa* (Bakiyev, 2021).

Такое тесное сосуществование патогена и хозяина создает условия для перехода латентной инфекции в острую фазу. Как отмечает автор (Raman, 2013), риск возникновения массовых эпизоотий резко возрастает при воздействии стресс-факторов окружающей среды. К ним относятся резкие колебания температурного режима, дефицит растворенного кислорода (гипоксия) и нарушения гидрохимических параметров (повышение уровня аммиака и нитритов), что ведет к подавлению иммунного статуса рыбы и активации условно-патогенных псевдомонад кишечника (Bakiyev, 2021).

Из источника (Algammal, 2020) известно, что геморрагическая септицемия является одной из ведущих причин высокой смертности в современной аквакультуре. Высокая агрессивность большинства бактерий рода *Pseudomonas* обусловлена наличием мощного комплекса факторов вирулентности:

Протеазы и эластаза - ферменты, осуществляющие деградацию белков внеклеточного матрикса, что ведет к разрушению структурной целостности тканей. Фосфолипаза С - атакует фосфолипиды клеточных мембран, вызывая лизис клеток и способствуя проникновению бактерий в сосудистое русло. Экзотоксин А - блокирует синтез белка в клетках хозяина, вызывая их гибель и обширные некрозы.

Эти агенты являются ключевыми деструкторами мышечной ткани и инициаторами системных кровотечений, что визуально проявляется в характерной клинической картине псевдомоноза (Bakiyev, 2021).

Клинические проявления варьируют в зависимости от вида возбудителя и хозяина. Например, автором (Altinok, 2006) установлено, что при инфицировании радужной форели (*Oncorhynchus mykiss*) бактерией *Pseudomonas putida* наблюдается депигментация и потемнение кожных покровов, двусторонняя или односторонняя экзофтальмия (пучеглазие), а также глубокие язвы в дорсальной области (спине). Примечательно, что при остром

течении болезни, вызванной *Pseudomonas putida*, значительных патологоанатомических изменений во внутренних органах может не наблюдаться, что затрудняет диагностику на ранних стадиях. Экспериментальное заражение радужной форели в воде с концентрацией P. putida 5 х 10^6 КОЕ/мл$^{-1}$ приводило к гибели 35% подопытных особей, что подтверждает статус данного вида как серьезного патогена (Bakiyev, 2021) (рисунок 49).



Рисунок 49 – Патоморфологическая картина очагового некроза мышечной ткани и деструкции кожных покровов у осетровых рыб при системном псевдомонозе

Заболевания, вызываемые бактериями родов *Aeromonas* и *Pseudomonas*, по-прежнему занимают лидирующие позиции в структуре патологий при индустриальном выращивании осетровых рыб в установках с замкнутым циклом водоснабжения (УЗВ). Парадокс заключается в том, что даже наличие современных многоступенчатых систем очистки не гарантирует полную стерильность среды. Регулируемые системы УЗВ спроектированы для поддержания оптимальных гидрохимических параметров, однако именно стабильность условий и высокая концентрация органических веществ в оборотной воде могут способствовать формированию устойчивых бактериальных биопленок на элементах фильтров.

Типовая система УЗВ, применяемая для искусственного содержания сибирского осетра и стерляди, представляет собой сложный инженерно-биологический комплекс, состоящий из следующих взаимосвязанных элементов (рисунок 50): рыбоводные бассейны – основная зона обитания гидробионтов, где происходит накопление продуктов метаболизма и первичная контаминация воды патогенами; блок механической очистки (барабанные или сетчатые фильтры) – предназначен для оперативного удаления взвешенных частиц (остатков корма, фекалий). Эффективность этого узла критически важна, так как органическая взвесь служит питательным субстратом для *Aeromonas hydrophila*; биологический фильтр (биофильтр) - основа системы,

где за счет жизнедеятельности нитрифицирующих бактерий происходит окисление токсичного аммиака до нитритов и нитратов. Однако при нарушении регламента промывки биофильтр может превратиться в резервуар для псевдомонад; система аэрации и оксигенации – включает кислородные концентраторы и конусы для насыщения воды кислородом. Поддержание высокого уровня O_2 необходимо для иммунного статуса рыб, так как гипоксия является мощным стресс-фактором, активирующим гены вирулентности *Pseudomonas*; накопительные емкости и отстойники - служат для депонирования технологической воды и осаждения мелкодисперсных фракций. Несмотря на наличие этих компонентов, бактерии родов *Pseudomonas* и *Aeromonas* способны успешно персистировать в системе. Изоляты часто локализуются в зонах «застойных токов» внутри бассейнов или на загрузке биофильтра, где они защищены внеклеточным матриксом биопленок от стандартных методов дезинфекции (Сергалиев, 2018 Габдуллина, 2019).



Рисунок 50 – Установка с замкнутым циклом водоснабжения

Согласно результатам комплексных мониторинговых исследований (Sergaliyev, 2017), охватывающих широкий спектр ценных видов осетровых (*Huso huso, Acipenser gueldenstaedtii, Acipenser ruthenus, Acipenser baerii, Acipenser nudiventris*, а также их межвидовые гибриды), структура инфекционной патологии в современных хозяйствах характеризуется доминированием бактериозов. Установлено, что на долю аэромоноза и псевдомоноза в совокупности приходится 43,7% от всех регистрируемых случаев заболеваний. Такая высокая частота встречаемости подтверждает статус этих патогенов как основных биологических угроз для индустриального осетроводства.

При этом клиническая картина псевдомоноза у осетровых рыб обладает выраженной спецификой и тяжестью течения. У исследованных объектов выращивания патологический процесс манифестирует через формирование массивных кровяных сгустков на различных участках тела и характерное сужение зрачков, что может указывать на глубокую нейротоксическую

интоксикацию организма. Переход заболевания в тяжелую форму сопровождается катастрофической деструкцией мягких тканей: у рыб обнаруживаются обширные очаги некроза мускулатуры и глубокие проникающие язвы, достигающие костных структур (Sergaliyev, 2017).

Бактериемия, инициируемая патогенами рода *Pseudomonas*, классифицируется как смертельно опасное состояние для всех возрастных групп осетровых. Высокая летальность подтверждается практическими данными: автором (Brunetti, 2006) зафиксировано, что в условиях промышленной рыбной фермы смертность сибирского осетра (*Acipenser baerii*), вызванная инвазией *Pseudomonas fluorescens*, составила 40% от общего поголовья.

4.1 Анализ патогеноости выделенных штаммов

В ходе проведения биологических проб по оценке патогенного потенциала изолированных бактериальных культур были установлены критические показатели вирулентности для наиболее агрессивных штаммов. В результате экспериментального заражения выявлено, что абсолютная (100%) летальность подопытных особей тиляпии наступала в краткосрочном периоде – через 8 часов после интраперитонеального (внутрибрюшинного) введения бактериальных суспензий. Данный эффект был зафиксирован при использовании инокулята штаммов *Aeromonas hydrophila* AB005 и *Aeromonas salmonicida* AB001 в концентрациях 10^8 и 10^{10} КОЕ/мл соответственно (рисунок 51).

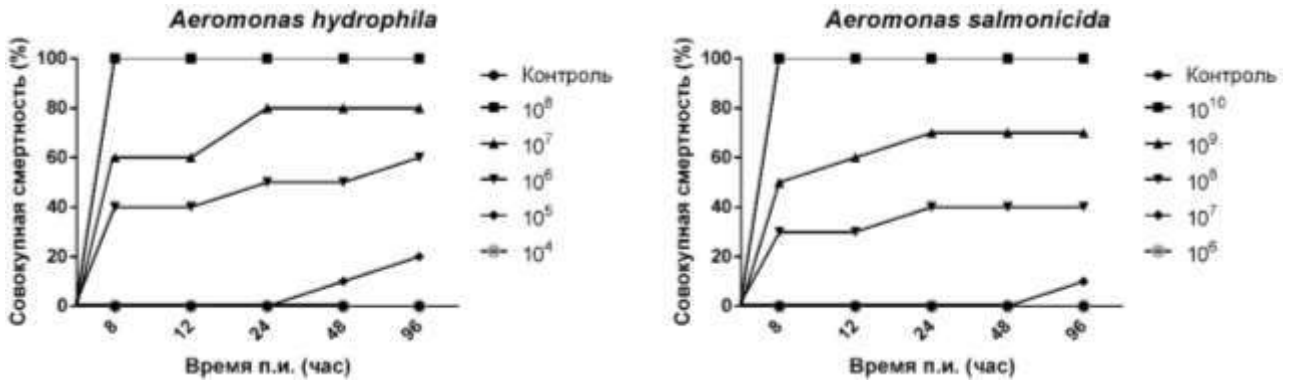


Рисунок 51 - Результаты исследования патогенности штаммов на модели тиляпии (Bakiyev, 2022; Bakiyev, 2023)

Столь высокая скорость наступления летального исхода свидетельствует об экстремальной вирулентности исследуемых изолятов и их способности к стремительной генерализации инфекционного процесса в организме чувствительных гидробионтов, что подтверждает их ведущую этиологическую роль в развитии массовых бактериозов.

Дифференцированная оценка патогенности показала, что штамм *Aeromonas bestiarum* AB002 в концентрации 10^{10} КОЕ/мл также индуцировал абсолютную (100%) летальность подопытных особей в течение 12 часов, однако при снижении дозировки до 10^8 КОЕ/мл уровень смертности составил лишь 40% по истечении 96 часов наблюдения. Штамм *Aeromonas veronii* AB003 продемонстрировал умеренный патогенный потенциал, вызывая гибель 30% исследуемых рыб при максимальной концентрации 10^{10} КОЕ/мл. В то же время представители рода *Pseudomonas* – штаммы *Pseudomonas parafulva* AB004 и *Pseudomonas protegens* AB006 – в аналогичной дозировке (10^{10} КОЕ/мл) не оказали летального воздействия, что позволяет классифицировать их как условно-патогенные компоненты микробиоценоза.

После верификации патогенности на модельных объектах (тиляпиях) были проведены таргетные исследования на молоди осетровых рыб. Для этого этапа были отобраны наиболее вирулентные изоляты – *Aeromonas hydrophila* AB005 и *Aeromonas salmonicida* AB001. В ходе эксперимента было установлено, что 100% гибель осетровых наступала через 24 часа при инфицировании *Aeromonas salmonicida* и через 48 часов при инокуляции *Aeromonas hydrophila* в концентрациях 10^{10} и 10^8 КОЕ/мл соответственно (рисунок 52).

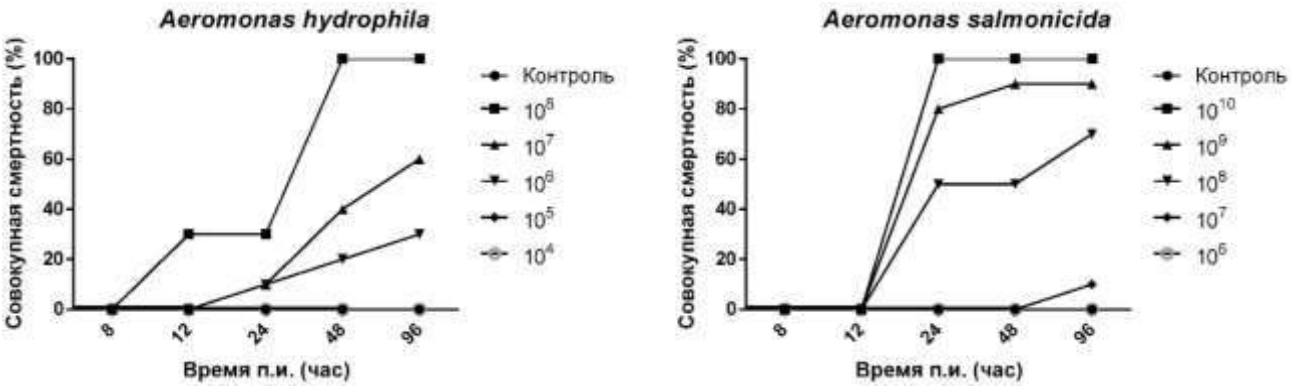


Рисунок 52 - Результаты исследования патогенности штаммов на модели осетровых (Bakiyev, 2022; Bakiyev, 2023)

Примечательно, что штамм *Aeromonas hydrophila* AB005 проявлял более выраженное негативное воздействие на тиляпий; вероятно, это обусловлено формированием специфической иммунологической резистентности к данному патогену у его естественного хозяина – осетровых рыб (Bakiyev, 2022; Bakiyev, 2023).

Напротив, в отношении штамма *Aeromonas salmonicida* AB001 в концентрации 10^8 КОЕ/мл именно осетровые продемонстрировали повышенную уязвимость, что представляет особый научный интерес. Известно, что для осетровых характерно позднее созревание систем организма и замедленный темп развития лимфоидных тканей, что выступает критическим фактором восприимчивости молоди к инфекционным агентам на ранних этапах онтогенеза. Окончательное функциональное формирование иммунной системы у молоди осетровых завершается лишь к 1,5–3-месячному возрасту, при этом

данные сроки могут существенно варьировать под воздействием абиотических факторов среды, таких как температурный режим, гидрохимический состав воды и уровень оксигенации (Gradil, 2014; Gradil, 2014; Chesneau, 2017).

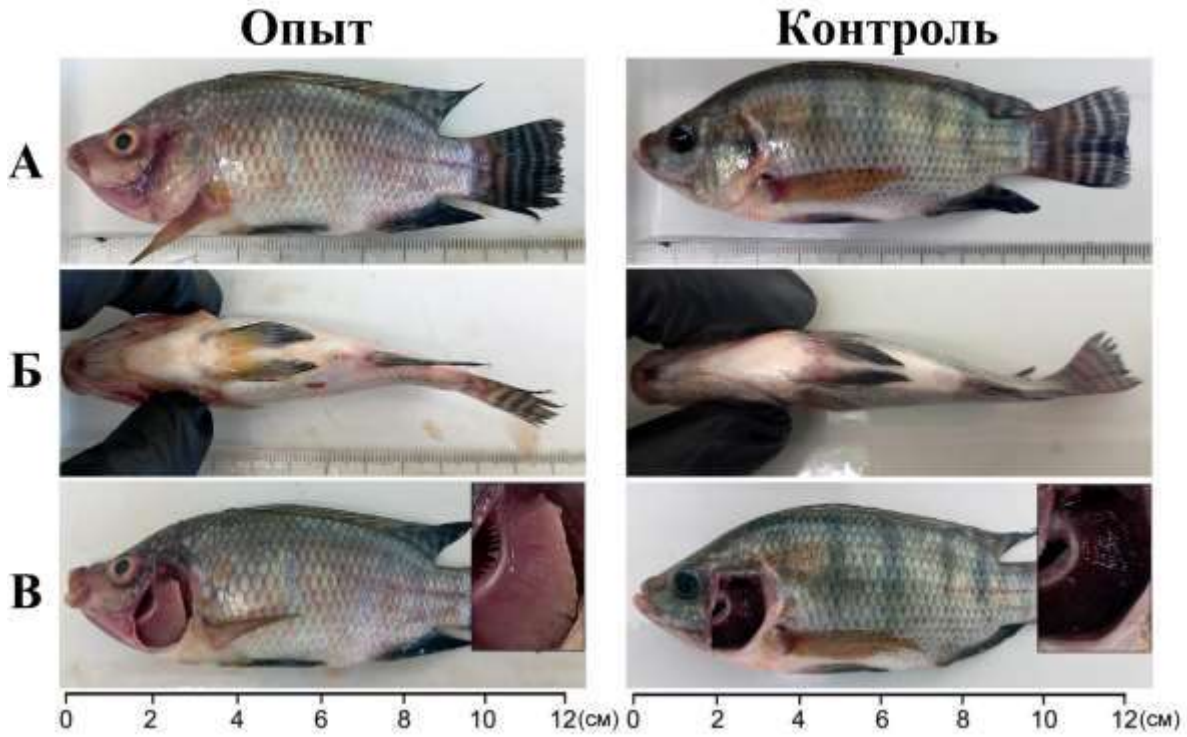
Необходимо отметить, что в ходе проведения исследований обнаружено что, после введения суспензии бактерий, у опытных рыб заметно снижается активность по сравнению с контрольной группой. У контрольной группы заметно-хаотичное движение (во все стороны) по сравнению с опытной группой, у которой однонаправленное движение (рисунок 53).



1 - Контроль, повышенная активность (синие стрелки – хаотичное движение), 2 - Опыт, сниженная активность (красные стрелки однонаправленное движение)

Рисунок – 53 Активность рыб после инъекций

Снижение двигательной активности и угнетение общего состояния рыб после введения бактериальных культур служат объективными индикаторами патогенности исследуемых микроорганизмов и их деструктивного влияния на физиологический статус хозяина. В ходе эксперимента у подопытных особей фиксировались выраженные клинические признаки инфекционного процесса, проявляющиеся в форме анорексии и критического нарушения координации движений, сопровождавшегося периодами беспорядочной локомоторной активности. На терминальных стадиях патогенеза отмечалась выраженная депрессия дыхательной функции, характеризующаяся значительным сокращением частоты и амплитуды движений жаберных крышек (рисунок 54).

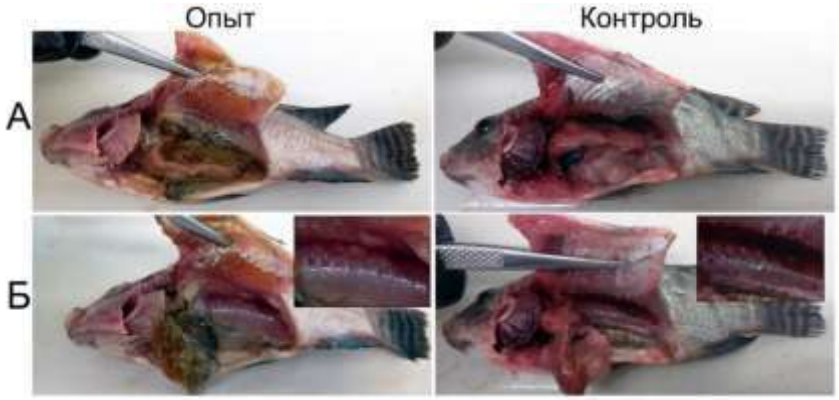


А) вид контрольной и опытной рыбы (инъекции *Aeromonas hydrophila* и физиологического раствора); Б) вид с брюшной стороны; В) внешний вид жабр (у опытной рыбы отмечается жаберная ишемия).

Рисунок 54 – Клинические признаки у тиляпии, зараженной *Aeromonas hydrophila* (Bakiyev, 2022)

Экспериментально инфицированные особи, подвергшиеся воздействию высоковирулентных штаммов *Aeromonas hydrophila* AB005, *Aeromonas salmonicida* AB001 и *Aeromonas bestiarum* AB002, демонстрировали идентичную клиническую картину, характерную для острого течения аэромоноза. Патологический процесс сопровождался выраженной депигментацией и аномальной окраской кожных покровов с формированием множественных геморрагических очагов. На теле рыб фиксировались эрозийные поражения спинного плавника и нерегулярные экзогенные нарушения в виде изъязвлений с гиперемированными краями. Отмечено, что данные поражения варьировали по морфологической форме, протяженности и глубине инвазии, что отражает индивидуальную реакцию организма хозяина на бактериальную экспансию. Подобный симптомокомплекс, развивающийся в результате парентерального введения культур бактерий рода *Aeromonas*, детально описан в ряде фундаментальных работ по ихтиопатологии (Cao, 2010; Laith, 2014; Korni, 2015; Alghabshi, 2018; Chen, 2019).

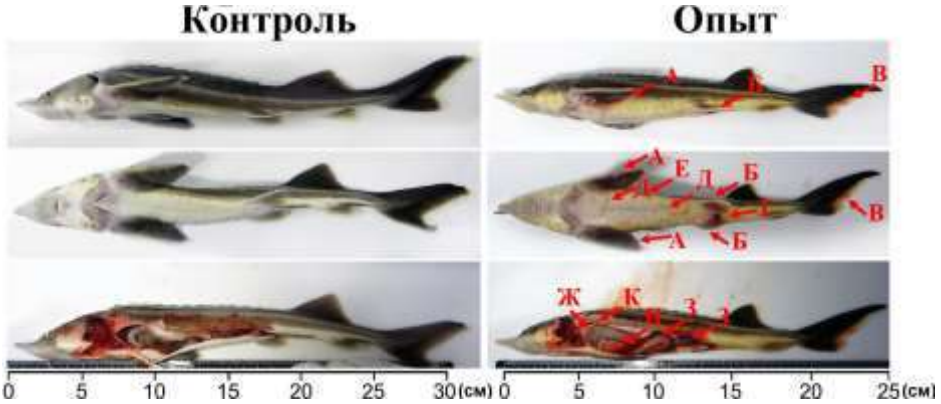
Особое диагностическое значение имеет развитие септического процесса, визуально проявляющегося в форме обширных кровоизлияний. Признаки геморрагической септицемии были локализованы преимущественно в области жаберных крышек, а также в основании парных и непарных плавников (рисунки 55, 56).



А) состояние внутренних органов зараженной *Aeromonas hydrophila* и контрольной рыбы; Б) нарушение кровообращения, некроз внутренних органов у опытной рыбы.

Рисунок 55 – Клинические признаки у тиляпии, зараженной *Aeromonas hydrophila* (Bakiyev, 2022)

Данная локализация поражений свидетельствует о нарушении целостности сосудистого русла и глубоких гемодинамических расстройствах, вызванных действием бактериальных токсинов и ферментов агрессии, что является патогномоничным признаком системного бактериоза у осетровых рыб.

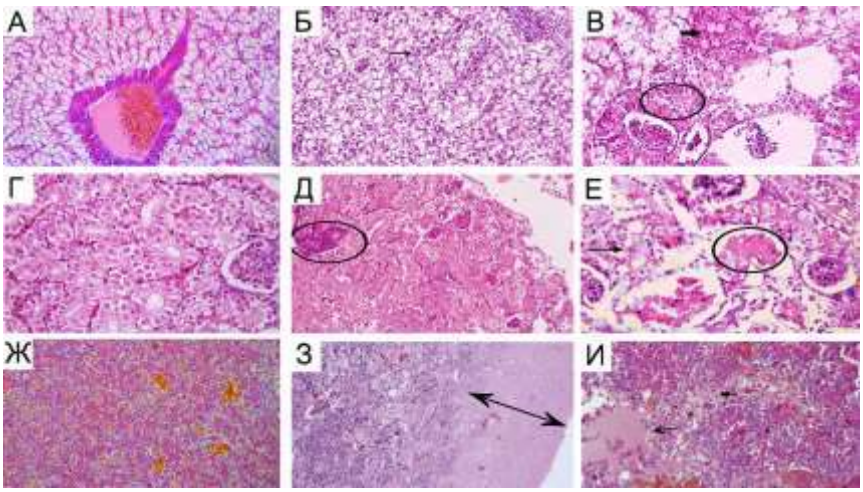


Контроль - здоровая рыба без клинических признаков и аномалий; опыт - клинические признаки *Aeromonas ruthenus*, инфицированной *Aeromonas hydrophila*; А, Б, В) кровоизлияния в грудных, брюшных и хвостовом плавниках; Г) септицемия и воспаление анального отверстия; Д) многочисленные точечные кровоизлияния на теле рыбы; Е) желтушный вид вентральной стороны; Ж) печень бледного цвета, дряблой консистенции с признаками токсической дистрофии; З) геморрагическое воспаление кишечника; И) увеличение и отек селезенки, дряблой консистенции; К) мышцы пропитаны отечной жидкостью.

Рисунок 56 – Клинические признаки у стерляди, зараженной *Aeromonas hydrophila* (Bakiyev, 2022)

Результаты секционного вскрытия павших особей позволили выявить глубокие деструктивные изменения, вызванные системным воздействием бактериальных агентов. После внутрибрюшинной инокуляции у рыб фиксировались ишемия жаберного аппарата, тотальный некроз паренхиматозных органов и мышечной ткани, а также прижизненный разрыв капсулы селезенки. Данный комплекс патоморфологических признаков, предшествующий летальному исходу, был характерен исключительно для групп, инфицированных штаммами *Aeromonas hydrophila* AB005, *Aeromonas salmonicida* AB001 и *Aeromonas bestiarum* AB002. Напротив, при воздействии штаммов *Pseudomonas parafulva* AB004 и *Pseudomonas protegens* AB006 подобные критические изменения во внутренних органах не регистрировались, что подтверждает их низкий вирулентный потенциал.

Проведенные гистопатологические исследования полностью верифицировали характер и степень поражения жизненно важных органов (печени, почек и селезенки), индуцированных экспансией штамма *Aeromonas hydrophila* AB005 (рисунок 57).



А) печень контрольной рыбы (×200); Б) стаз мононуклеарных лейкоцитов в расширенных синусоидах (указано стрелкой) и очаговый некроз гепатоцитов (×200); В) некроз эпителия поджелудочной железы (отмечено кругом), некроз гепатоцитов и очаги воспалительной инфильтрации с наличием эозинофилов (указано стрелкой) (×200); Г) почка контрольной рыбы (×400); Д) воспалительная инфильтрация паренхимы почки (отмечено кругом), некроз эпителия почечных клубочков и канальцев (×100); Е) отек паренхимы почки, некроз почечного гломерулярного (отмечено кругом) и канальцевого (указано стрелкой) эпителия (×200); Ж) селезенка контрольной рыбы (×100); З) тяжелый некроз поверхности селезенки (указано двунаправленной стрелкой) (×40); И) отек паренхимы селезенки (указано длинной стрелкой), гемолиз эритроцитов, деструкция лимфоцитов и очаги отложения гемосидерина (указано короткой стрелкой) (×200).

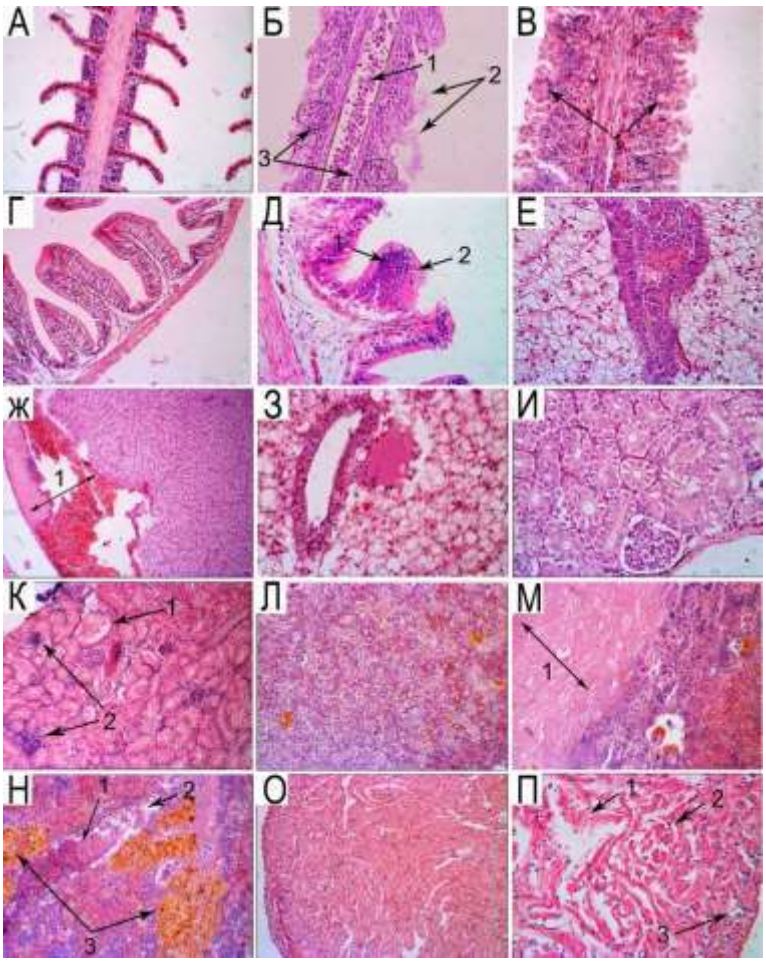
Рисунок 57 – Результаты гистопатологических исследований органов рыб инфицированных *Aeromonas hydrophila* (Bakiyev, 2022)

В тканях печени отмечался выраженный стаз мононуклеарных лейкоцитов в просветах расширенных синусоидов, сопровождавшийся очаговым некрозом гепатоцитов. Кроме того, зафиксирована деструкция панкреатического железистого эпителия и формирование множественных очагов воспалительной инфильтрации с преобладанием эозинофильных гранулоцитов (рисунок 57Б) (Bakiyev, 2022).

Микроморфологическая картина почек характеризовалась интенсивным развитием отеков и воспалительно-клеточной инфильтрацией паренхимы. Деструктивные процессы затрагивали критические структуры органа, проявляясь в некрозе эпителиальных клеток почечных клубочков и канальцев (рисунок 57Д, Е). Патологические изменения в селезенке включали поверхностный некроз и выраженный отек паренхимы, а также признаки массивного гемолиза эритроцитов и деструкции лимфоцитов. На гистологических препаратах были четко визуализированы очаги отложения гемосидерина, что свидетельствует о хроническом распаде форменных элементов крови и глубоких нарушениях пигментного обмена. Суммарно выявленные гистологические изменения подтверждают диагноз острой бактериальной септицемии и объясняют высокую скорость наступления летальных исходов у инфицированных рыб.

Патоморфологические изменения, индуцированные штаммом *Aeromonas salmonicida* AB001, характеризовались глубокой деструкцией респираторного аппарата и висцеральных органов. В жаберной ткани инфицированных особей регистрировался выраженный застой крови в центральном венозном синусе, сопровождавшийся интенсивной инфильтрацией эпителия первичных жаберных ламелл мононуклеарными лейкоцитами. Дальнейшее развитие инфекционного процесса приводило к тотальной деструкции и некрозу вторичных жаберных филаментов (рисунок 58Б). Кроме того, защитная реакция организма проявлялась в форме гиперплазии первичного жаберного эпителия и существенного увеличения численности палочковидных клеток (рисунок 58В), что в конечном итоге завершалось полной утратой структуры вторичных жаберных лепестков (Bakiyev, 2023).

Деструктивные процессы затрагивали также пищеварительную систему, где фиксировалась массивная инфильтрация слизистой оболочки кишечника мононуклеарными лейкоцитами и формирование локальных очагов некроза кишечного эпителия (рисунок 58Д). Патология печени при воздействии данного штамма характеризовалась возникновением обширных кровоизлияний и некротических изменений в субкапсулярной зоне (рисунок 58Ж). Параллельно отмечалось развитие отека паренхимы печени, локализованного преимущественно в участках, прилегающих к тканям экзокринной части поджелудочной железы (рисунок 58З). Выявленный комплекс гистологических нарушений свидетельствует о системном характере патогенеза, вызываемого *Aeromonas salmonicida* AB001, и объясняет высокую тяжесть течения заболевания у осетровых рыб.



А) жабры контрольной рыбы (× 400); Б) жабры зараженной рыбы (× 400), 1 - застой крови в центральном венозном синусе, 2 - некроз апикального эпителия вторичных жаберных лепестков и их разрушение, 3 - инфильтрация мононуклеарными лейкоцитами; В) гиперплазия первичного жаберного эпителия (×400), 1 – rodlet (палочковидные) клетки; Г) кишечник контрольной рыбы (×400); Д) кишечник зараженной рыбы (×400), 1 - инфильтрация мононуклеарными лейкоцитами, 2 - некроз энтероцитов; Е) печень контрольной рыбы (×200); Ж) печень зараженной рыбы (×100), 1 - кровоизлияние и некроз субкапсулярной зоны; З) печень зараженной рыбы (×400), отек и некроз паренхимы, прилегающей к области поджелудочной железы (×400); И) почка контрольной рыбы (×400); К) почка зараженной рыбы (×400), 1 - некроз почечных канальцев, 2 - воспалительная инфильтрация; Л) селезенка контрольной рыбы (×200); М) селезенка зараженной рыбы (×200), 1 - некроз краевой зоны селезенки; Н) селезенка зараженной рыбы (×200), 1 - гемолиз эритроцитов красной пульпы, 2 - некроз паренхимы, 3 - отложения гемосидерина в агрегатах меланомакрофагов; О) сердце контрольной рыбы (×100); П) сердце зараженной рыбы (×200), 1 - лизис миокарда, 2 - фрагментация миокарда, 3 - мононуклеарная лейкоцитарная инфильтрация перикарда.

Рисунок 58 – Результаты гистопатологических исследований органов рыб инфицированных *Aeromonas salmonicida* (Bakiyev, 2023)

Патологические изменения в почках при инфицировании штаммом *Aeromonas salmonicida* AB001 во многом идентичны таковым при заражении *Aeromonas hydrophila* AB005 и характеризуются формированием выраженных очагов лейкоцитарной инфильтрации паренхимы в сочетании с некрозом канальцевого эпителия (рисунок 58К). В селезенке фиксировался обширный некроз маргинальной зоны органа (рисунок 58М), а также существенное увеличение площади меланомакрофагальных центров. Данная агрегация пигментных клеток обусловлена накоплением избыточного количества гемосидерина на фоне интенсивного гемолиза эритроцитов красной пульпы и прогрессирующей деструкции паренхимы (рисунок 58Н). Деструктивные процессы затронули и миокард, где при гистологическом исследовании были верифицированы фрагментация, искривление и лизис сердечных мышечных волокон, сопровождавшиеся мононуклеарной лейкоцитарной инфильтрацией (рисунок 58П) (Bakiyev, 2023).

Обобщая результаты исследований биологических свойств выделенных изолятов, необходимо констатировать, что экстремально высоким уровнем патогенности со 100% летальностью характеризуются штаммы *Aeromonas hydrophila* AB005, *Aeromonas salmonicida* AB001 и *Aeromonas bestiarum* AB002. Изолят *Aeromonas veronii* AB003 проявил умеренную опасность со смертностью на уровне 30%, в то время как штаммы *Pseudomonas parafulva* AB004 и *Pseudomonas protegens* AB006 в исследованных дозировках не индуцировали развитие острых клинических форм, ограничиваясь лишь незначительными изменениями этологических реакций рыб. Интегральным показателем патогенности послужил расчет средней летальной дозы (LD_{50}), которая для наиболее опасных штаммов составила для *Aeromonas hydrophila* AB005 8,37 х 10^5 КОЕ/мл на модели *Oreochromis niloticus* и 2,89 х 10^6 КОЕ/мл на модели *Acipenser ruthenus*, а для штамма *Aeromonas salmonicida* AB001 - 1,7 х 10^8 КОЕ/мл на модели *Oreochromis mossambicus* и 7,2 х 10^7 КОЕ/мл на модели *Acipenser baerii* (Bakiyev, 2022; Bakiyev, 2023).

Данные значения коррелируют с показателями вирулентности, полученными ранее другими исследователями на моделях *Channa striata* (4,1 х 10^8 КОЕ/мл) (Samayanpaulraj, 2019), *Oreochromis niloticus* (3,44 х 10^6 КОЕ/мл) (Pachanawan, 2008), *Cyprinus carpio* (1,5 х 10^7 КОЕ/мл) (Hussain, 2021) и *Oncorhynchus mykiss* (6,4 х 10^3 КОЕ/мл) (Lim, 2020), что подтверждает высокую биологическую опасность аэромонад. Клинико-морфологическая картина и высокие показатели летальности позволяют классифицировать *Aeromonas hydrophila* и *Aeromonas salmonicida* как наиболее критические патогены, способные инициировать катастрофические экономические потери в индустриальном рыбоводстве при отсутствии системного мониторинга.

4.2 Факторы вирулентности выделенных штаммов бактерий

Факторы вирулентности выступают фундаментальными критериями для объективной оценки патогенного потенциала и степени токсичности болезнетворных бактерий (Gao, 2018). Для определения факторов вирулентности у выделенных штаммов бактерий использовали следующие пары праймеров представленных в таблице 18.

Таблица 18 – Последовательности праймеров использованных для определения наличия генов вирулентности

Праймеры	Последовательность ДНК (5’-3’)	Ампликон (п.н.)	Источник
AH-aerAF	CAAGAACAAGTTCAAGTGGCCA	309	Wang, 2003
AH-aerAR	ACGAAGGTGTGGTTCCAGT		
hlyA-F	GGCCGGTGGCCCGAAGATACGGG	595	Zhu, 2007
hlyA-R	GGCGGCGCCGGACGAGACGGG		
Aer-F	CCGGAAGATGAACCAGAATAAGAG	451	Falcón, 2006
Aer-R	CTTGTCGCCACATACCTCCTGGCC		
Ast-F	TCTCCATGCTTCCCTTCCACT	331	Sen, 2004
Ast-R	GTGTAGGGATTGAAGAAGCCG		
Pla-F	ATCTTCTCCGACTGGTTCGG	382	Sen, 2004
Pla-R	CCGTGCCAGGACTGGGTCTT		
AhpB-F	ACACGGTCAAGGAGATCAAC	513	Sen, 2004
AhpB-R	CGCTGGTGTTGGCCAGCAGG		
Alt-F	TGACCCAGTCCTGG	442	Li, 2011
Alt-R	GGTGATCGATCACC		
Ahe2-F	ACGGGGTGCGTTCTTCCTACTCCAG	211	Nam, 2007
Ahe2-R	CCGTTCATCACGCCGTTATAGTCG		
ExN-F	CAGGATCTGAACCGCCTCTATCAGG	504	Nam, 2007
ExN-R	GTCCCAAGCTTCGAACAGTTTACGC		
gcaT-F	CTCCTGGAATCCCAAGTATCAG	237	Thornton, 1988
gcaT-R	GGCAGGTTGAACAGCAGTATCT		

Несмотря на то, что механизмы патогенеза, инициируемые представителями рода *Aeromonas*, характеризуются исключительной сложностью и остаются недостаточно изученными, общепризнано, что вирулентность данных микроорганизмов носит мультифакторный характер. Молекулярный арсенал аэромонад включает широкий спектр детерминант, среди которых ключевую роль играют гемолизин (*hlyA*), аэролизин (*aerB* и *aerA*), цитотонические энтеротоксины (*alt* и *ast*), эластаза (*ahpB*), холестерин-ацилтрансфераза (*gcaT*), липаза (*pla*), ДНКазы (*nucl*) и сериновая протеаза (*ahe2*). Экспрессия и комбинация данных факторов могут существенно

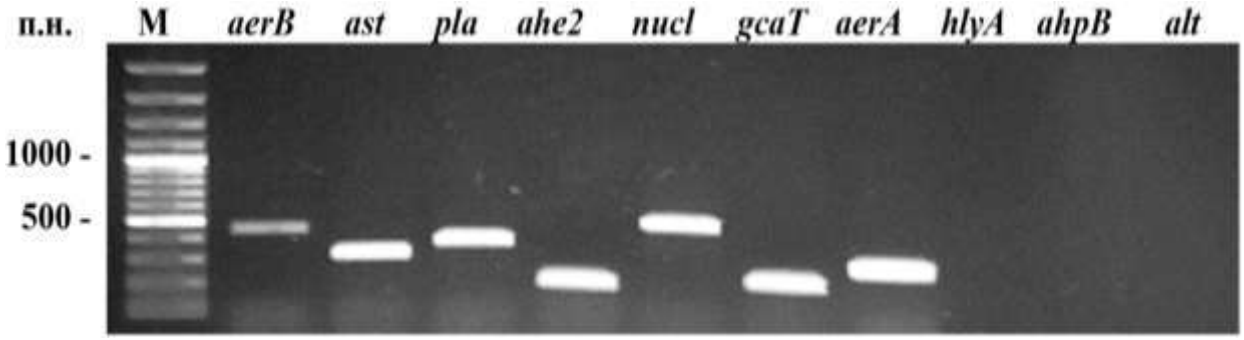
варьировать в зависимости от видовой принадлежности и экологических особенностей жизнедеятельности конкретных штаммов. Системное изучение наличия этих генетических маркеров в изолированных культурах имеет критическое значение для понимания молекулярных основ патогенеза и прогнозирования тяжести течения инфекции.

Принимая во внимание выраженность клинических признаков и высокую летальность инфекций, вызванных штаммами *Aeromonas hydrophila* AB005 и *Aeromonas salmonicida* AB001, на следующем этапе работы был проведен таргетный анализ наличия десяти ключевых генов вирулентности. Данные гены рассматривались как основные молекулярные индикаторы уровня патогенности, определяющие способность микроорганизмов к инвазии, колонизации тканей и разрушению клеточных структур хозяина. Распределение выбранных детерминант вирулентности в исследуемых штаммах бактерий рода *Aeromonas* детально систематизировано и представлено в таблице 19.

Таблица 19 – Результаты наличия генов вирулентности у бактерий рода *Aeromonas*

Бактерия	Гены вирулентности									
	hlyA	*aerB*	*ast*	*pla*	*ahpB*	*alt*	*ahe2*	*nucl*	*gcaT*	*aerA*
A. salmonicida	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+
A. hydrophila	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+
A. bestiarum	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+
A. veronii	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-
Примечание: «+» - наличие гена, «-» - отсутствие гена										

На рисунках 59-62 представлен генетический профиль патогенов с их фенотипическим проявлением вирулентности.

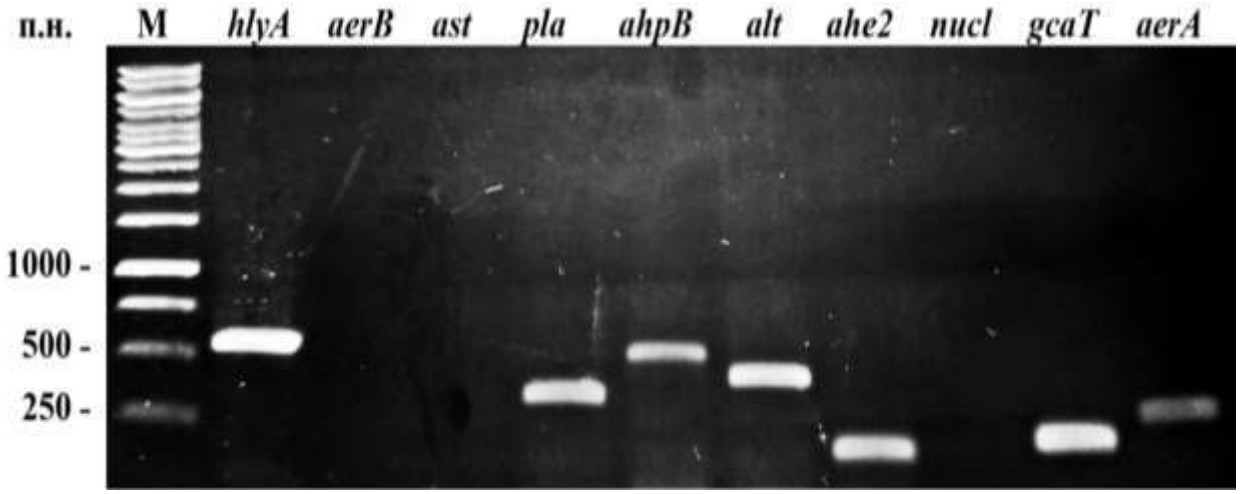


M) ДНК маркер молекулярного размера 100 п.н.; *aerB, ast, pla, ahe2, nucl, gcaT, aerA, hlyA, ahpB* и *alt* – гены вирулентности.

Рисунок 59 – Электрофорез продуктов амплификации вирулентных генов *Aeromonas hydrophila* AB005 в агарозном геле (Bakiyev, 2022)

На основании проведенного ПЦР-анализа, направленного на скрининг ключевых факторов патогенности, было установлено, что геном штамма *A. hydrophila* AB005 характеризуется наличием семи из десяти исследованных генов вирулентности, а именно: *aerA, aerB, ast, pla, ahe2, nucl* и *gcaT* (Bakiyev, 2022). В молекулярном профиле данного изолята идентифицированы гены аэролизинов, холестерин-ацилтрансферазы, фосфолипазы А, сериновой протеазы, термостабильного цитотонического энтеротоксина и нуклеазы.

Выявленная комбинация генетических маркеров обуславливает высокую агрессивность штамма, так как данные факторы играют доминирующую роль в инициации и развитии инфекционного процесса при аэромонозе рыб (Sha, 2002; Soler, 2002). Аэролизины и фосфолипазы обеспечивают глубокую деструкцию клеточных мембран и лизис эритроцитов, что в сочетании с активностью протеаз и нуклеаз приводит к стремительному некрозу тканей и системной интоксикации организма хозяина. Наличие гена термостабильного энтеротоксина (*ast*) дополнительно усиливает патогенный потенциал штамма, способствуя нарушению водно-электролитного баланса и развитию септических явлений, что подтверждается полученными ранее данными о 100% летальности этого изолята для модельных объектов.



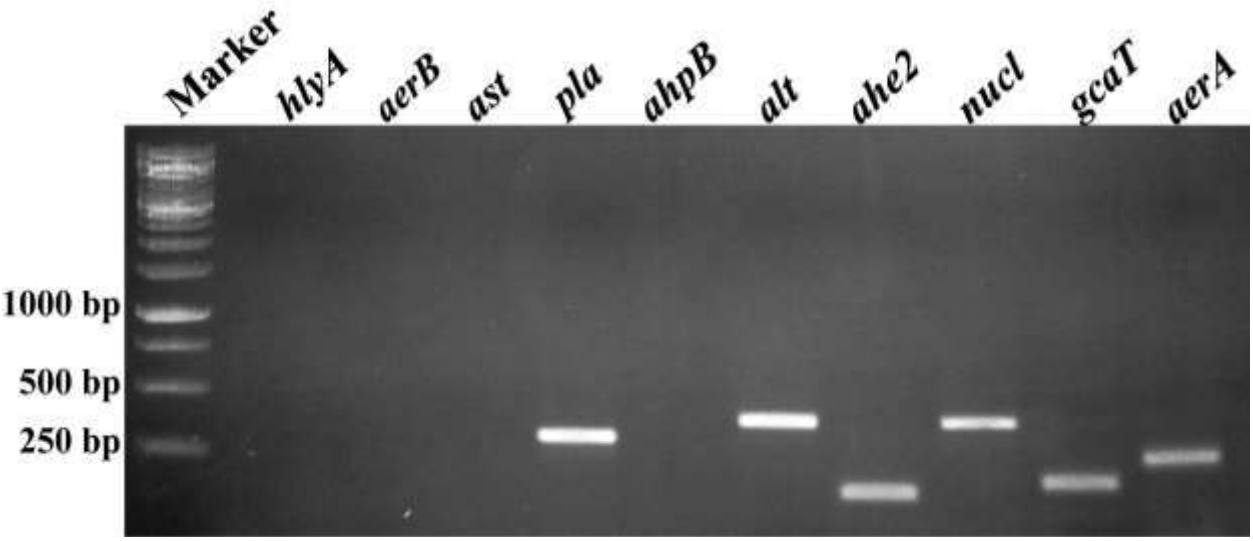
М) ДНК маркер молекулярного размера 1 т.п.н.; *hlyA, aerB, ast, pla, ahpB, alt, ahe2, nucl, gcaT, aerA* – гены вирулентности.

Рисунок 60 – Электрофорез продуктов амплификации вирулентных генов *Aeromonas salmonicida* AB001 в агарозном геле (Bakiyev, 2023)

Генетический профиль штамма *Aeromonas salmonicida* AB001 характеризуется специфическим набором детерминант вирулентности: из десяти исследованных маркеров у данного изолята отсутствовали гены *aerB, ast* и *nucl*. При этом гены *pla, ahe2, gcaT* и *aerA* оказались общими для обоих наиболее опасных штаммов (*AB001* и *AB005*), что подчеркивает их фундаментальную роль в обеспечении адгезии, инвазии через эпителиальные барьеры и реализации патогенного потенциала (Bakiyev, 2022; Bakiyev, 2023).

Тем не менее вариативность генного состава указывает на возможность реализации различных молекулярных механизмов патогенеза у разных видов аэромонад, что обуславливает специфику клинических проявлений инфекции.

Особое значение в патогенезе, индуцируемом *Aeromonas salmonicida* AB001, имеет сочетанное присутствие генов *hlyA* и *aerA*. Согласно накопленным научным данным, наличие комплекса детерминант гемолизина (*hlyA*) и аэролизина (*aerA*) у бактерий рода *Aeromonas* значительно повышает их агрессивность при инвазии за счет синергетического эффекта. Взаимодействие этих порообразующих токсинов приводит к более интенсивному разрушению клеточных мембран гидробионтов, что объясняет высокую вирулентность штамма AB001 и его способность вызывать стремительную гибель рыб даже при отсутствии некоторых энтеротоксинов (Chacón, 2003; Aguilera-Arreola, 2007; Abdel-Latif, 2020). Таким образом, выявленный комплекс генов служит надежным молекулярным маркером для прогнозирования высокой летальности штаммов в условиях индустриальных хозяйств.

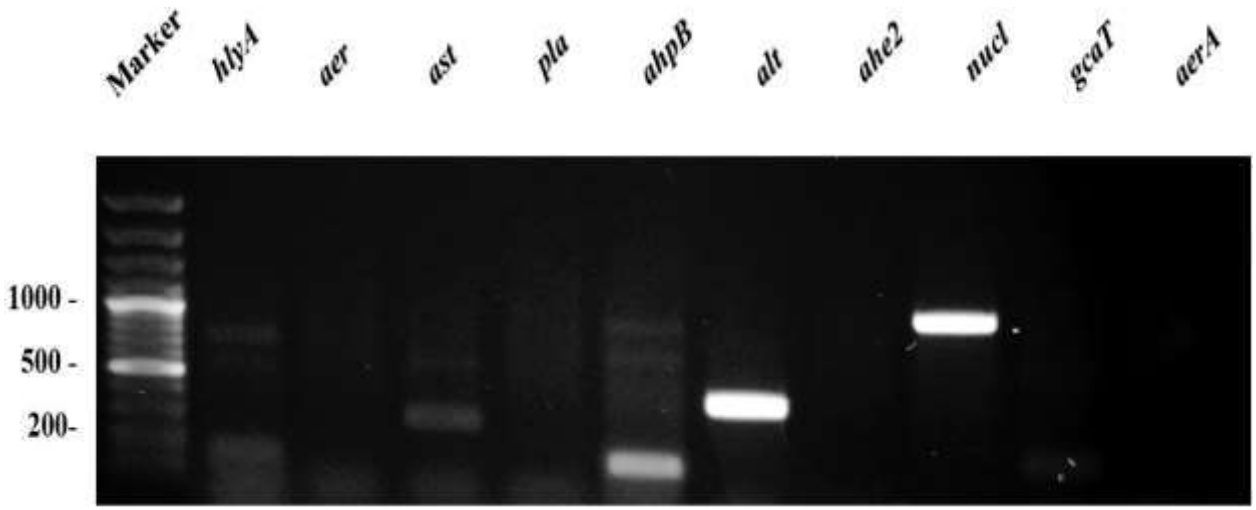


M) ДНК маркер молекулярного размера 1 т.п.н.: *hlyA, aerB, ast, pla, ahpB, alt, ahe2, nucl, gcaT, aerA* – гены вирулентности.

Рисунок 61 – Электрофорез продуктов амплификации вирулентных генов *Aeromonas bestiarum* AB002 в агарозном геле (Utegenova, 2024)

Анализ штамма *Aeromonas bestiarum* AB002 выявил наличие широкого спектра детерминант вирулентности, включающего шесть из десяти исследованных генов: *pla, alt, ahe2, nucl, gcaT* и *aerA*. В генетическом профиле данного изолята зафиксировано сочетание генов фосфолипазы А и аэролизина в совокупности с термолабильным цитотоническим энтеротоксином (*alt*), что объясняет его высокую патогенность, сопоставимую по скорости наступления летального исхода со штаммом *Aeromonas salmonicida*. Наличие сериновой протезы (*ahe2*), нуклеазы (*nucl*) и холестерин-ацилтрансферы (*gcaT*)

дополнительно расширяет деструктивный потенциал штамма, обеспечивая эффективный лизис тканей хозяина и способствуя генерализации инфекции. Отсутствие в геноме гемолизина (*hlyA*) и специфического аэролизина типа *aerB* компенсируется присутствием гена *aerA*, что подтверждает мультифакторную природу патогенности данного вида.



М) ДНК маркер молекулярного размера 100 п.н.; *hlyA, aer, ast, pla, ahpB, alt, ahe2, nucl, gcaT, aerA* – гены вирулентности.

Рисунок 62 – Электрофорез продуктов амплификации вирулентных генов *Aeromonas veronii* AB003 в агарозном геле

В свою очередь, штамм *Aeromonas veronii* AB003 характеризуется более ограниченным набором факторов вирулентности, представленным генами *ast, alt* и *gcaT*. В молекулярном профиле этого изолята доминируют гены цитотонических энтеротоксинов обоих типов – термостабильного (*ast*) и термолабильного (*alt*), что в сочетании с холестерин-ацилтрансферазой определяет его патогенный профиль. Отсутствие в геноме порообразующих токсинов (аэролизинов и гемолизинов), а также протеаз и нуклеаз, коррелирует с результатами биологических проб, в которых данный штамм проявил умеренную патогенность с уровнем смертности не более 30%. Полученные данные указывают на то, что патогенез, вызываемый *Aeromonas veronii* AB003, в большей степени связан с нарушениями водно-электролитного обмена и цитотоническими эффектами, нежели с прямой массивной деструкцией тканей, характерной для более вирулентных штаммов группы *Aeromonas*.

Выявленные различия в распределении детерминант вирулентности среди изолятов *Aeromonas* являются ключевым фактором, определяющим степень их патогенности и специфику воздействия на организм хозяина (Albert, 2000). Особое значение имеет синергетическое взаимодействие отдельных факторов: так, согласно данным (Abrami, 1998), совместное присутствие генов сериновой протеазы (*ser/ahe2*) и аэролизина (*aer*) многократно усиливает вирулентный потенциал штамма, поскольку протеаза выступает необходимым агентом для

активации проаэролизина. Кроме того, факторы *gcaT, lip* и *ser* играют согласованную интегрированную роль в патогенезе аэромонадных инфекций, обеспечивая бактериям возможность эффективной колонизации и последующей деструкции тканей (Lee, 1990; Pemberton, 2006).

Результаты молекулярно-генетического скрининга полностью коррелируют с данными, полученными в ходе *in vivo* экспериментов на живых моделях. Наиболее высокий уровень биологической опасности для рыб продемонстрировали штаммы *Aeromonas hydrophila* AB005 и *Aeromonas salmonicida* AB001, обладающие наиболее полным набором эффекторных генов, включая критические сочетания аэролизинов и протеаз. В то же время меньшая степень патогенности штаммов *Aeromonas bestiarum* AB002 и *Aeromonas veronii* AB003 находит прямое подтверждение в их генетическом профиле, где было идентифицировано 6 и 3 гена вирулентности соответственно.

Таким образом, установленная прямая зависимость между количеством факторов вирулентности, их качественным составом и показателями летальности (LD_{50}) позволяет использовать данные ПЦР-скрининга в качестве прогностического инструмента при оценке эпизоотических рисков в индустриальных рыбоводных хозяйствах. Выделенные мультирезистентные и высокопатогенные штаммы родов *Aeromonas* и *Pseudomonas* представляют серьезную угрозу для аквакультуры осетровых, что диктует необходимость разработки специфических мер контроля и профилактики, базирующихся на выявленных биологических особенностях данных возбудителей.

ГЛАВА 5
ЭНДОЛИЗИНЫ БАКТЕРИОФАГОВ – НОВЫЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЕ АГЕНТЫ

5.1 Использование бактериофагов в инактивации бактерий

Фундаментальные основы фаготерапии были заложены в начале XX века после открытия бактериофагов Ф. Туортом и Ф. д'Эреллем. Являясь специфическими вирусами бактерий, фаги представляют собой уникальные микроорганизмы, жизненный цикл которых неразрывно связан с клеткой хозяина (Taylor, 2014). В современной микробиологии принято классифицировать два основных пути развития бактериофагов: литический и лизогенный. Именно литический цикл, завершающийся полной деструкцией бактериальной клетки, получил приоритетное развитие в рамках бактериофаговой терапии, направленной на селективную инактивацию патогенных микроорганизмов (Sulakvelidze, 2001; Schulz, 2018).

Бактериофаготерапия находит широкое применение в медицине, ветеринарии, пищевой индустрии и сельском хозяйстве в качестве экологически безопасной альтернативы антибиотикам (Almeida, 2021). Механизм действия литических фагов обусловлен способностью вирионов разрушать пептидогликановый слой клеточной стенки бактерий, что приводит к осмотическому лизису и высвобождению нового поколения фагового потомства из цитоплазматического пространства. Эта высокая специфичность и способность к саморепродукции в очаге инфекции обуславливают растущую популярность фагов в аквакультуре.

Впечатляющие результаты были получены в исследованиях (Duarte, 2018), где для борьбы с возбудителем фурункулеза *Aeromonas salmonicida* применялись как отдельные изоляты бактериофагов (AS-A, AS-D, AS-E), так и их мультикомпонентные коктейли. Было установлено, что при исходной концентрации патогена в контроле на уровне $1{,}75 \pm 0{,}2 \times 10^9$ КОЕ/мл применение фаговых препаратов привело к резкому снижению бактериальной обсемененности до средних значений $2{,}55 \pm 0{,}22 \times 10^5$ КОЕ/мл. Подобная динамика (снижение на 4 порядка) характеризует бактериофаги как высокоэффективные бактерицидные агенты, способные контролировать численность популяций наиболее опасных патогенов.

Спектр применения фаготерапии в аквакультуре не ограничивается защитой рыбы, но охватывает и другие объекты выращивания, включая беспозвоночных и ракообразных. Например, использование бактериофага vB_VhaS-tm в концентрации 10^2 БОЕ/мл против граммотрицательного патогена *Vibrio harveyi* позволило снизить общую смертность брюхоногих моллюсков (*Haliotis laevigata*) до 30% (Wang, 2017). Аналогичные положительные результаты были зафиксированы при использовании бактериофагов для защиты лобстеров (*Panulirus ornatus*) от вибриозов (Crothers-Stomps, 2010).

Эффективность применения бактериофагов в аквакультуре находится в прямой зависимости от выбранного метода терапевтической доставки. В

исследованиях, проведенных на радужной форели (*Oncorhynchus mykiss*), инфицированной вирулентным штаммом *Aeromonas hydrophila* в дозе 1 х 10^8 КОЕ на особь, применение бактериофага MJG продемонстрировало исключительные результаты: при парентеральном введении была зафиксирована 100% выживаемость популяции, в то время как в контрольной группе по истечении 7 дней наблюдалась полная гибель поголовья.

Тем не менее, альтернативные методы экспозиции показали существенно меньшую эффективность. Так, погружение инфицированных особей в водную среду с концентрацией фагов 10^5–10^6 БОЕ/мл, а также пероральное введение через контаминированный комбикорм (3,2 х 10^6–3,2 х 10^7 БОЕ/г) не обеспечили аналогичного уровня протекции (Cao, 2020). Это указывает на важность преодоления биологических барьеров организма рыбы и необходимость поддержания высокой терапевтической концентрации вирионов непосредственно в системном кровотоке или органах-мишенях.

Ключевым преимуществом бактериофагов является их способность инактивировать штаммы с экстремально широким профилем антибиотикорезистентности (XDR). Механизм инфицирования фаговой ДНК принципиально отличается от действия химиотерапевтических агентов, что позволяет купировать инфекции, вызванные патогенами, устойчивыми к большинству классов антибиотиков. Например, в работах (Nahed, 2022) исследуемый штамм *Aeromonas hydrophila* проявлял резистентность к 18 антибиотикам, однако сочетанное применение фагов Ah01 и Ah02 при внутрибрюшинном введении особям нильской тиляпии (*Oreochromis niloticus*) позволило полностью исключить летальность в течение двухнедельного периода, тогда как смертность в контроле составила 83,34%.

Несмотря на выраженный терапевтический потенциал, использование единичных (моновалентных) фагов все чаще сталкивается с проблемой ограниченного литического спектра. Современная стратегия повышения антибактериального эффекта базируется на создании фаговых «коктейлей» - композиций из нескольких таксономически различных вирусов. Такие поливалентные препараты оказывают массированное воздействие на бактериальную клетку, атакуя различные рецепторы на ее поверхности, что значительно снижает вероятность выживания патогена по сравнению с применением одиночных изолятов (Duarte, 2018; Yu, 2021).

Однако широкое коммерческое внедрение фаготерапии в индустриальную аквакультуру на данный момент лимитировано рядом критических факторов. Во-первых, отсутствует универсальный биологический агент или стандартизированный коктейль, обладающий эффективностью против всего разнообразия серотипов бактериальных патогенов (Ninawe, 2020). Во-вторых, наблюдается эволюционная адаптация бактерий, проявляющаяся в формировании фагорезистентности - механизмов блокировки адсорбции вирусов, мутаций рецепторов или использования систем типа CRISPR-Cas для деградации фаговой ДНК (Egido, 2022).

В связи с этим в научной среде отмечается тенденция к некоторому снижению абсолютной эффективности классической фаготерапии, что диктует

необходимость поиска новых подходов. К ним относятся постоянная ротация фагов в составе препаратов, использование генетически модифицированных вирионов и комбинация фаготерапии с другими экологически безопасными методами контроля микробиоценоза, что позволит создать надежный барьер на пути распространения инфекций в современных рыбоводных установках.

5.2 Бактериофагорезистентность бактерий

В последние годы в научной литературе всё чаще фиксируются случаи проявления резистентности к бактериофагам, что обусловлено их повсеместной распространенностью в антропогенно измененных средах и естественных экосистемах. В результате длительного коэволюционного процесса по типу «паразит – хозяин» бактерии выработали многоуровневые стратегии защиты, направленные на блокирование инфекционного цикла вируса на различных этапах его реализации. Эти эволюционно закрепленные механизмы включают в себя несколько эшелонов обороны, начиная от предотвращения адсорбции вирионов на поверхности клетки и заканчивая сложными внутриклеточными системами деградации нуклеиновых кислот.

Первичный уровень защиты заключается в предотвращении фагового соединения с рецепторами клеточной стенки, что достигается либо за счет мутационной модификации самих рецепторов, либо путем их экранирования капсулярными полисахаридами и внеклеточным матриксом. В случае успешного прикрепления вируса в действие вступают системы препятствования инъекции наследственной информации, которые блокируют проникновение фаговой ДНК через цитоплазматическую мембрану. Если же генетический материал вируса все же попадает внутрь клетки, он подвергается атаке специализированных ферментативных комплексов, таких как системы рестрикции-модификации или системы адаптивного иммунитета CRISPR-Cas, обеспечивающие направленное разрушение внешней ДНК.

Кроме того, существуют механизмы абортивной инфекции, которые вызывают программируемую гибель инфицированной клетки до завершения репликации вируса, тем самым ограничивая распространение инфекции внутри бактериальной популяции. Каждая из этих систем защиты уникальна, а их наличие и комбинаторный состав напрямую зависят от экологической ниши, специфики обмена веществ и условий жизнедеятельности конкретного штамма бактерий (рисунок 63) (Бисенбаев, 2020). В условиях интенсивной аквакультуры, характеризующейся высокой плотностью микробных популяций и постоянным присутствием патогенов, давление отбора способствует быстрому накоплению таких защитных стратегий.

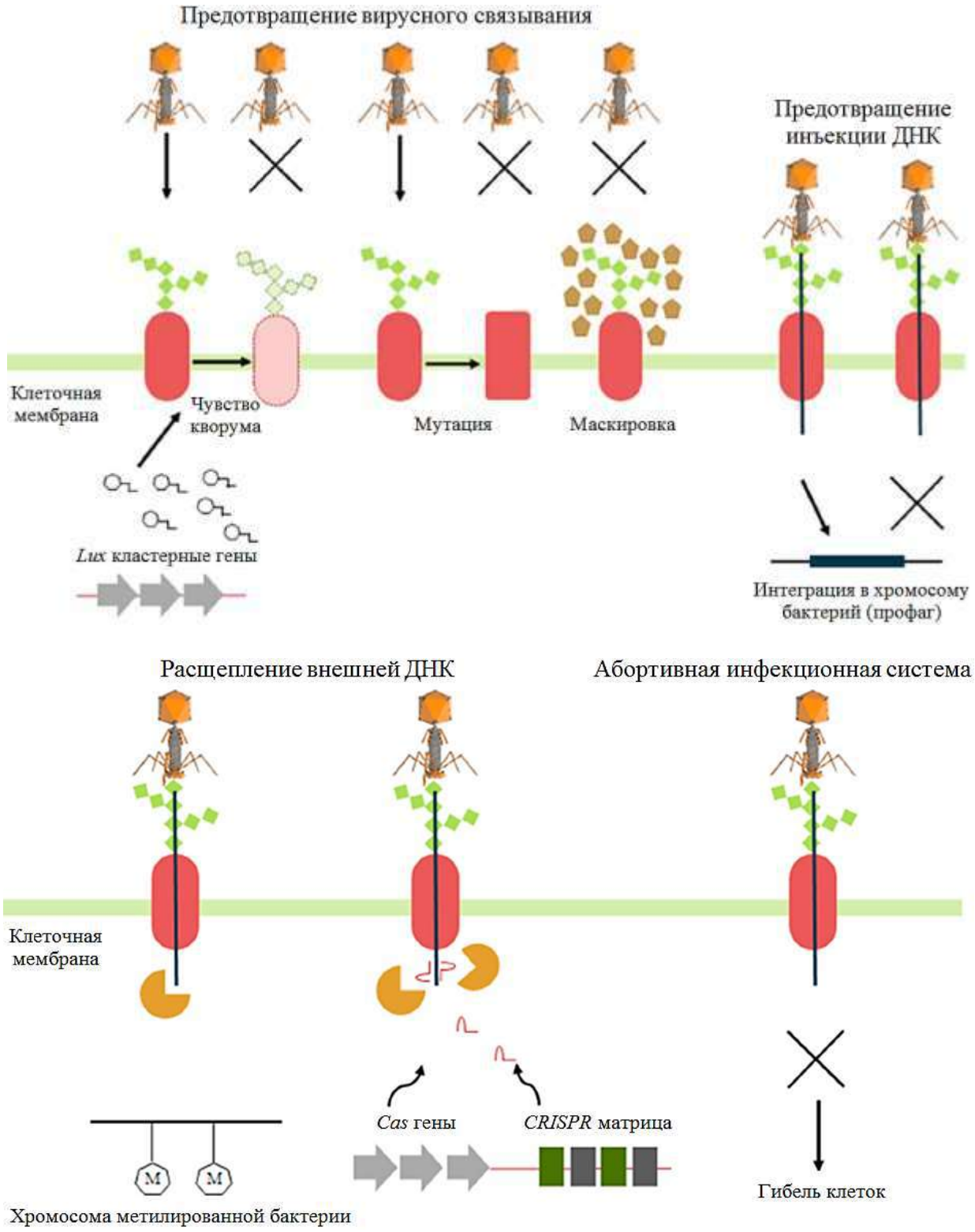


Рисунок 63 - Основные механизмы защиты бактерий от фагов (Kalatzis, 2018)

Широкое внедрение бактериофагов в качестве антибактериальных агентов системного действия существенно ограничивается феноменом бактериофагорезистентности, который всё чаще регистрируется у широкого спектра патогенных микроорганизмов. Проблема устойчивости бактерий к фагам представляет серьезную угрозу не только для ветеринарной медицины и аквакультуры, но и для здравоохранения в целом, поскольку механизмы

адаптации патогенов носят универсальный характер. Так, в экспериментальных исследованиях (Oechslin, 2018) бактериофагорезистентные штаммы были обнаружены в 80% проб, полученных из кишечной среды, и в 50% образцов, отобранных при септических состояниях. Выделенные изоляты характеризовались глубокой резистентностью к терапевтическим дозам применяемых против них фаговых препаратов, что ставит под сомнение эффективность монотерапии в критических случаях.

В контексте индустриального рыбоводства детальные исследования (Castillo, 2014) по определению механизмов устойчивости *Flavobacterium psychrophilum* наглядно продемонстрировали сложность данной проблемы. При воздействии различных бактериофагов на изоляты дикого типа было установлено, что селективное давление вирусов приводит к быстрому формированию фагорезистентных популяций. При тестировании выделенных культур на чувствительность к 32 различным фагам уровень устойчивости варьировал в диапазоне от 31% до 100%, что свидетельствует об исключительной адаптивной пластичности патогена и его способности нивелировать воздействие широкого спектра антибактериальных агентов вирусной природы.

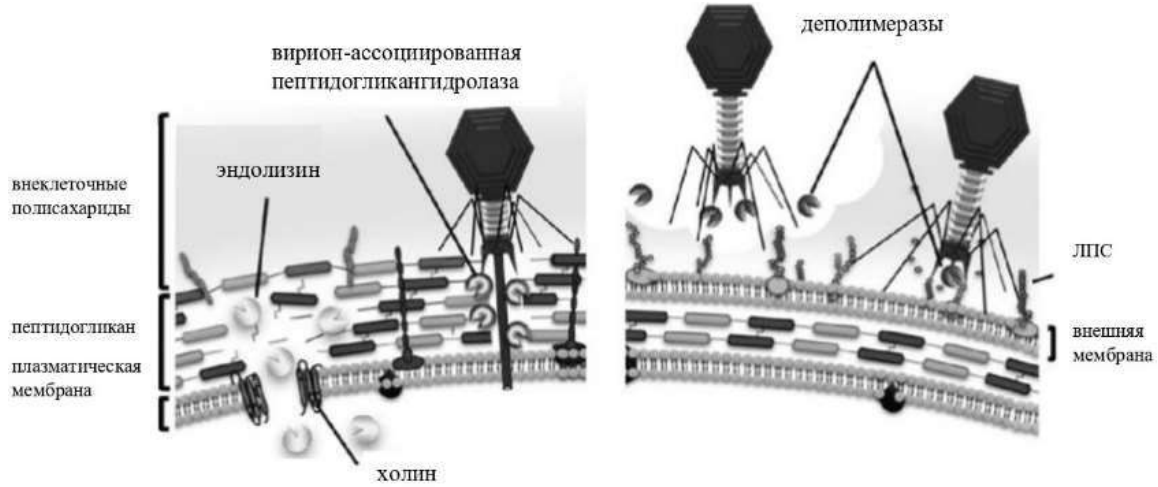
Таким образом, глобальная тенденция к росту числа бактериофагорезистентных видов бактерий создает критический барьер для масштабирования фаготерапии в аквакультуре. Постоянная эволюция защитных систем патогенов делает традиционные методы использования бактериофагов менее надежными и требует поиска принципиально новых решений. В этой связи актуализируется необходимость разработки комплексных схем профилактики и терапии бактериальных заболеваний рыб, основанных на использовании альтернативных антимикробных соединений, фитобиотиков или синергетических комбинаций, способных эффективно подавлять мультирезистентную микрофлору без риска быстрой адаптации возбудителей.

5.3 Эндолизины – пептидогликангидролазы клеточной стенки бактерий

Одним из наиболее перспективных направлений в разработке альтернативных антимикробных стратегий является использование эндолизинов – специализированных пептидогликангидролаз, кодируемых геномом бактериофагов. Данные ферменты обладают уникальной способностью селективно расщеплять структурные компоненты клеточной стенки бактерий, вызывая стремительный осмотический лизис и гибель патогена. В естественном цикле развития вируса эндолизины экспрессируются на завершающих стадиях литической инфекции. Их транспорт к мишени осуществляется посредством сложной холин-эндолизиновой системы, которая обеспечивает своевременное разрушение пептидогликанового слоя и последующую деструкцию всей клеточной стенки. Этот процесс является критическим этапом репродукции, так как именно он способствует высвобождению новообразованного потомства

вирионов из цитоплазматического пространства во внешнюю среду (Rodríguez-Rubio, 2013; Li, 2021).

Особый интерес представляет применение эндолизинов в качестве экзогенных антибактериальных агентов. В отличие от целых бактериофагов, очищенные ферменты действуют непосредственно при контакте с клеточной стенкой, что значительно снижает риск развития резистентности. Однако при работе с грамотрицательными бактериями, к которым относятся патогены родов *Aeromonas* и *Pseudomonas*, эффективность эндолизинов лимитирована наличием внешней мембраны, препятствующей доступу фермента к пептидогликану. В естественных условиях за преодоление этих защитных барьеров, первичную адсорбцию и инфицирование грамотрицательных клеток отвечают фаговые деполимеразы (рисунок 64).



Грамположительная бактерия (левая часть), грамотрицательная бактерия (правая часть).

Рисунок 64 – Схема лизиса грам+/- бактерий под действием эндолизинов бактериофагов (Roach, 2015)

Эти ферменты, часто локализованные в хвостовых отростках вириона, способны специфически расщеплять капсулярные полисахариды и липополисахариды внешней мембраны, подготавливая путь для последующего действия гидролаз.

Процесс инфицирования бактериальной клетки инициируется после плотной адсорбции бактериофага на клеточной стенке, что обеспечивается специфическим взаимодействием рецепторов хозяина и активностью фаговых деполимераз. В случае с грамотрицательными бактериями деполимеразы играют критическую роль в преодолении поверхностных структур, подготавливая условия для инъекции генетического материала и запуска репликативного цикла нового поколения вирионов (Aslam, 2021). В ходе естественного лизиса эндолизины достигают пептидогликанового слоя изнутри через поры, сформированные белками-холинами в цитоплазматической мембране. Последующий гидролиз

связей в полимерной цепи пептидогликана осуществляется специфически, в зависимости от ферментативного класса эндолизина (мурамидазы, глюкозаминидазы, эндопептидазы или амидазы).

Несмотря на то, что эндолизины обладают фундаментальной способностью разрушать клеточные стенки как грамположительных, так и грамотрицательных микроорганизмов, их практическое применение в качестве экзогенных терапевтических агентов сталкивается со значительными трудностями (Dong, 2015; Wang, 2020). Основным лимитирующим фактором служит морфологическая специфика грамотрицательных бактерий, к которым относятся возбудители аэромоноза и псевдомоноза. В отличие от грамположительных форм, их пептидогликановый слой защищен дополнительным барьером – наружной мембраной (Briers, 2015). Эта сложная структура, состоящая из асимметричного бислоя липополисахаридов, фосфолипидов, липопротеинов и интегральных пориновых белков, эффективно блокирует диффузию крупных белковых молекул эндолизинов из внешней среды в периплазматическое пространство (Bos, 2007).

В искусственных условиях использование нативных эндолизинов против грамотрицательных патогенов ограничено их неспособностью к самостоятельному проникновению через липополисахаридный слой. Для реализации антибактериального потенциала ферментов необходимо использование дополнительных агентов-дестабилизаторов (пермеабилизаторов), таких как хелатирующие соединения (EDTA) или органические кислоты, которые вызывают дезорганизацию наружной мембраны путем вытеснения катионов двухвалентных металлов. Такое сочетанное воздействие открывает доступ эндолизина к пептидогликану, обеспечивая его последующую деструкцию и быстрый лизис клетки (рисунок 65) (Blasco, 2020). Таким образом, разработка комплексных препаратов на основе модифицированных эндолизинов или их комбинаций с мембранно-активными веществами является одним из наиболее перспективных направлений в создании «инновационных» антимикробных средств для современной аквакультуры.

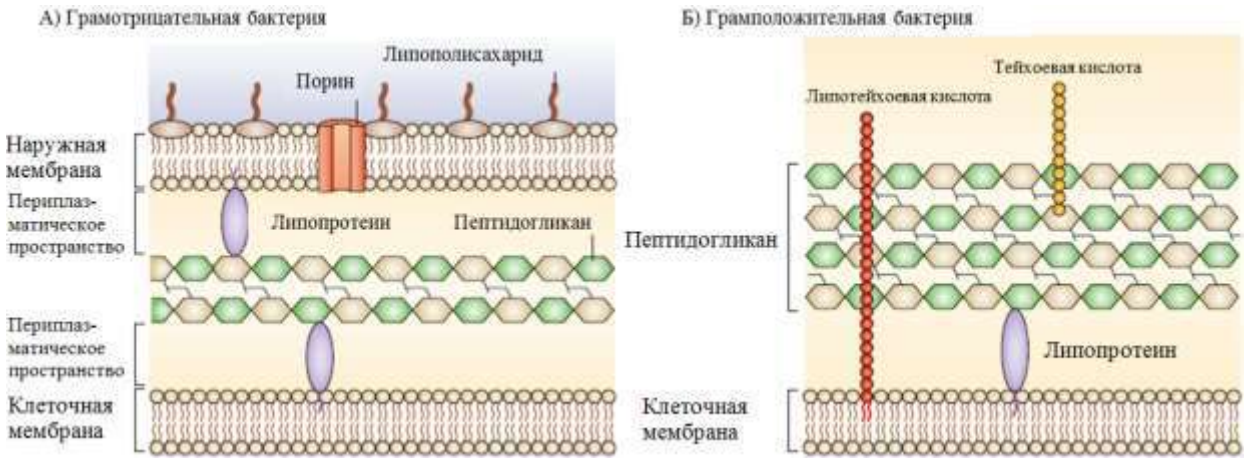


Рисунок 65 – Сравнительный анализ строения клеточной стенки грамотрицательных и грамположительных бактерий (Brown, 2015)

Для преодоления барьерной функции наружной клеточной стенки грамотрицательных бактерий и обеспечения доступа эндолизинов к пептидогликану эффективно применение различных поликатионных агентов, способствующих дезорганизации липополисахаридного слоя (Vaara, 1981). Экспериментальные данные на модели *Salmonella typhimurium* при использовании протамина салмина, полимера лизина, полимиксина В и нанопептида полимиксина В показали, что, несмотря на отсутствие самостоятельного бактерицидного эффекта у данных соединений, нанопептид полимиксина В существенно повышает проницаемость внешней мембраны для гидрофобных зондов. Это создает благоприятные условия для транслокации эндолизинов в периплазматическое пространство (Vaara, 1983). Аналогичным образом для повышения проницаемости клеточной стенки целесообразно использование этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА). В частности, при изучении антибактериальной активности эндолизина LysPA26 был выявлен выраженный синергетический эффект при его совместном использовании с такими внешними пермеабилизаторами, как ЭДТА, Тритон X-100 и трихлорметан (Guo, 2017). Хелатирующие агенты, такие как ЭДТА, связывают ионы двухвалентных металлов (Mg^{2+}, Ca^{2+}), стабилизирующие липополисахаридный слой, что ведет к локальной дестабилизации мембраны и открывает путь для каталитического воздействия фермента.

Таким образом, эндолизины бактериофагов обладают универсальной способностью разрушать пептидогликановый матрикс как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий. Однако для реализации их потенциала в отношении грамотрицательных патогенов в искусственных условиях требуется искусственное повышение проницаемости наружной мембраны за счет синергизма с поликатионными агентами, полимерами или хелаторами. С точки зрения молекулярной организации, эндолизины представляют собой модульные белки, имеющие преимущественно двухдоменную, реже однодоменную структуру.

Типичный двухдоменный эндолизин грамотрицательных бактерий включает в себя N-концевой домен, ответственный за специфическое связывание с рецепторами клеточной стенки бактерий (Cell Wall Binding Domain, CBD), и С-концевой каталитический домен (Enzymatically Active Domain, EAD), осуществляющий непосредственный гидролиз пептидогликана. Данные модули соединены между собой гибким белковым линкером, обеспечивающим необходимую пространственную ориентацию доменов для эффективного взаимодействия с субстратом (рисунок 66). Такая модульная архитектура открывает широкие возможности для белковой инженерии, позволяя конструировать химерные эндолизины («артилизины») с заданными свойствами специфичности и повышенной способностью к проникновению через мембранные барьеры, что крайне актуально для борьбы с мультирезистентными штаммами в аквакультуре.

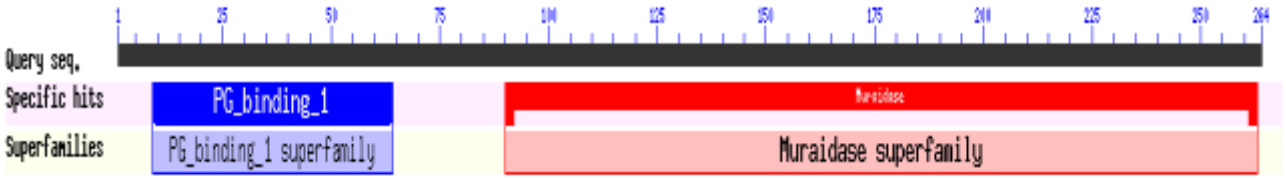
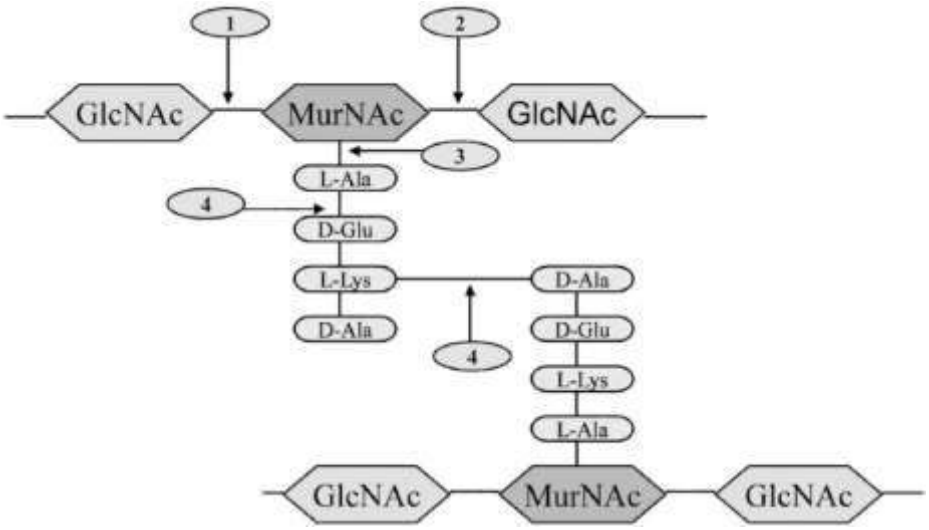


Рисунок 66 - Двухдоменная организация эндолизина Gp110 (NCBI, 2019)

Функциональная специфичность эндолизинов определяется их модульной организацией, где N-концевой домен обеспечивает высокоселективное связывание фермента с рецепторными структурами клеточной стенки, а C-концевой, или каталитический, домен осуществляет непосредственную деструкцию пептидогликанового матрикса. В зависимости от типа расщепляемых химических связей в полимерной структуре пептидогликана, эндолизины классифицируются на несколько основных групп: гликозидазы (N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы), мурамидазы (N-ацетилмурамидазы), амидазы (N-ацетилмурамоил-L-аланинамидазы) и эндопептидазы (L-аланоил-D-глутамат-эндопептидазы). Каждая из этих групп атакует строго определенные сайты в молекуле муреина, обеспечивая быструю потерю механической прочности клеточной оболочки.

В частности, N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы и мурамидазы специализируются на гидролизе β-1,4-гликозидных связей, соединяющих остатки N-ацетилглюкозамина и N-ацетилмурамовой кислоты, что приводит к деполимеризации гликановых цепей. N-ацетилмурамоил-L-аланинамидазы воздействуют на амидные связи, локализованные между лактильным остатком N-ацетилмурамовой кислоты и первым аминокислотным остатком пептидного фрагмента (L-аланином), тем самым отделяя пептидные мостики от гликанового остова. Эндопептидазы, в свою очередь, гидролизуют связи внутри самих пептидных фрагментов или межпептидные сшивки, которые обеспечивают поперечное связывание цепей пептидогликана (Fenton, 2010).

Такое разнообразие механизмов воздействия позволяет бактериофагам эффективно лизировать клетки-мишени, а исследователям – подбирать наиболее активные ферментативные комплексы для деструкции конкретных патогенов. Наглядная схема строения пептидогликана с указанием специфических сайтов атаки для каждого класса гидролаз представлена на рисунке 67, что позволяет детально проследить молекулярную динамику процесса бактериолиза.



1 - глюкозаминидаза; 2 - мурамидаза; 3 - амидаза; 4 – эндопептидаза.

Рисунок 67 - Структура пептидогликана бактерий с указанными сайтами расщепления эндолизинами (Fenton, 2010)

Высокая селективность эндолизинов, определяемая видом исходного бактериофага и спецификой хозяина, позволяет им прицельно разрушать пептидогликановый матрикс конкретных патогенов. Однако эта же особенность ограничивает их применение в качестве антибактериальных агентов широкого спектра действия. В связи с этим в современной биотехнологии активно разрабатываются методы улучшения бактерицидных характеристик пептидогликангидролаз. Актуальные исследования сфокусированы на создании химерных конструкций путем замены связывающих доменов (Mao, 2013; Lee, 2021), рекомбинации каталитических доменов различных групп ферментов (Swift, 2015; Eichenseher, 2022), а также их дополнении вспомогательными функциональными модулями (Eniyan, 2020; Zampara, 2020) или создании устойчивых форм посредством конъюгации с природными холинами (Briers, 2011). Основным вектором развития «эндолизинового дизайна» является преодоление мультирезистентности патогенов и повышение биодоступности белков в сложных водных средах аквакультуры.

Антибактериальная активность лизинов рассматривается как одна из наиболее жизнеспособных альтернатив традиционной антибиотикотерапии. Впервые эффективность эндолизинов в экспериментах *in vivo* была убедительно продемонстрирована (Nelson, 2001). Было установлено, что крайне малые дозы фермента (10 нг) способны инактивировать стрептококки группы А в концентрации 10^7 КОЕ/мл всего за 5 секунд. В опытах на мышах применение лизина позволило снизить риск развития инфекции на 42% по сравнению с контрольной группой. Эти результаты инициировали бурное развитие эндолизиновой терапии во всех сферах ветеринарии и медицины.

Согласно систематическому анализу экспериментальных данных, наиболее выраженной активностью в отношении грамотрицательных патогенов обладают эндолизины OBPgp279, Gp110 и LysPA26. Фермент OBPgp279, выделенный из

бактериофага OBP, поражающего *Pseudomonas fluorescens*, зарегистрирован в базе данных NCBI под номером YP_004958186. Эндолизин Gp110 (KU705467) получен из сальмонеллезного фага *Salmonella phage 10*, а LysPA26 (ARB16052.1) идентифицирован в геноме фага JD010.

Молекулярные параметры данных белков варьируют: нуклеотидная последовательность гена OBPgp279 составляет 987 п.н., Gp110 – 795 п.н., а LysPA26 – 438 п.н. Особый интерес представляет структурная организация OBPgp279, который является типичным модульным эндолизином с уникальной архитектурой: он содержит два N-концевых домена связывания с клеточной стенкой (CBD) и один С-концевой каталитический домен (CD) (рисунки 68-70).

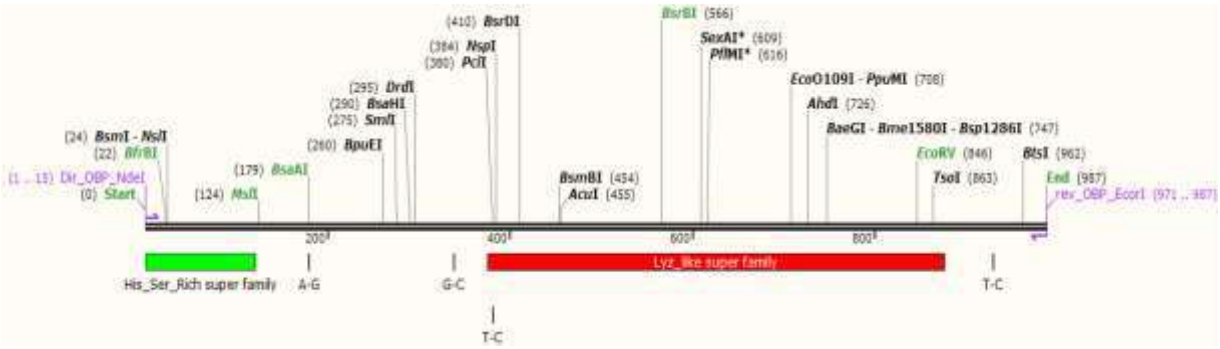


Рисунок 68 – Строение эндолизина OBPgp279 (SnapGene)

Наличие дублированных связывающих модулей обеспечивает повышенную аффинность белка к клеточной оболочке псевдомонад, что делает его крайне перспективным кандидатом для разработки систем биоконтроля в рыбоводных хозяйствах, где *Pseudomonas fluorescens* является распространенным возбудителем.

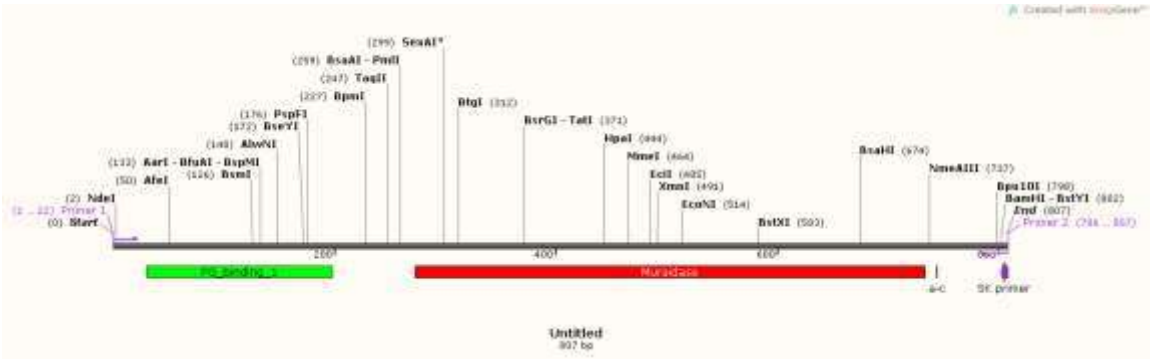


Рисунок 69 – Строение эндолизина Gp110 (SnapGene)

Детальный анализ первичной структуры и доменной организации эндолизинов позволяет прогнозировать их каталитическую активность и специфичность в отношении конкретных патогенов. На основании наличия консервативного мотива в каталитическом домене предполагается, что эндолизин OBPgp279 относится к семейству гликозидгидролаз 19 (GH19) (Walmagh, 2012).

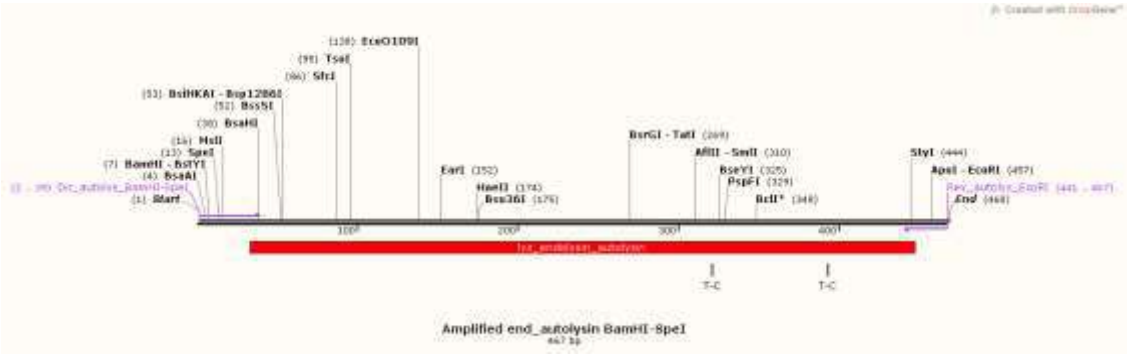


Рисунок 70 – Строение эндолизина LysPA26 (SnapGene)

В свою очередь, Gp110 характеризуется выраженной модульной структурой, включающей N-концевой домен связывания с клеточной стенкой (CBD) и С-концевой каталитический домен (CD), классифицируемый как DUF3380 (pfam11860). Установлено, что Gp110 проявляет N-ацетилмурамидазную активность, специфически расщепляя β-(1,4)-гликозидные связи в сахарном остове пептидогликана (Rodríguez-Rubio, 2016). В отличие от вышеупомянутых многодоменных белков, LysPA26 представляет собой компактный однодоменный эндолизин, идентифицированный как представитель суперсемейства лизоцимоподобных доменов cd00442 (Guo, 2017).

Эффективность применения данных ферментов в качестве антимикробных агентов существенно возрастает при использовании стратегий синергизма. В исследованиях (Walmagh, 2012) была зафиксирована высокая антибактериальная активность OBPgp279 против изолятов *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1 и Br667), составившая около 1,1 log-единиц. Однако предварительная пермеабилизация наружной мембраны с помощью этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) позволила многократно усилить этот эффект: активность возросла до 4,36 и 3,14 log-единиц соответственно. Это подтверждает необходимость комплексного подхода при инактивации грамотрицательных патогенов в водных средах.

Важным аспектом внедрения эндолизинов в практику аквакультуры является их устойчивость к колебаниям факторов внешней среды, таких как температура, pH и ионная сила раствора. Эндолизин Gp110 сохраняет наивысшую активность в широком диапазоне pH (от 6,0 до 9,0) и демонстрирует впечатляющую термостабильность: более 80% остаточной активности сохраняется даже после 10-минутной инкубации при температуре до 60 °C (Rodríguez-Rubio, 2016). Для сравнения, LysPA26 проявляет 100% активность при pH 7,0–8,0, а его температурный оптимум смещен в диапазон 37–50 °C (Guo, 2017). Столь высокая термо- и pH-толерантность данных белков делает их пригодными для использования в различных технологических узлах рыбоводных хозяйств. Обобщенные данные по антибактериальной активности ключевых эндолизинов против представителей родов *Aeromonas* и *Pseudomonas* систематизированы в таблице 20.

Таблица 20 – Антибактериальная эффективность эндолизинов бактериофагов, использованных против бактерий рода *Aeromonas* и *Pseudomonas*

№	Название эндолизина	Название бактериофага	Бактерия	Антибактериальная эффективность, *, **/минут инкубации	Авторы, год и ссылки
1	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*
1	PaP1	PaP1	*P. aeruginosa*	33,3*/30	Sun, 2010
2	EL188	φKZ	*P. aeruginosa*	3-4**/30	Briers, 2011
3	OBPgp279	*P. fluorescens* OBP	*P. aeruginosa*	4,36**/30	Walmagh, 2012
4	LoGT-001	phiKZ	*P. aeruginosa*	2,61**/30	Briers, 2014
5	Art-175	phiKZ	*P. aeruginosa*	5**/60	Briers, 2014
6	Lys68	phi68	*P. aeruginosa*	2,4**/30	Oliveira, 2012
7	SPN9CC	P1, P22	*P. aeruginosa*, *P. putida*	12*/5, 65*/5	Lim, 2014
8	ABgp46	vb_AbaP_CEB1	*P. aeruginosa*	4**/120	Oliveira, 2016
9	LysPA26	JD010	*P. aeruginosa*	4**/30	Guo, 2017
10	Gp110	*Salmonella* phage 10	*P. aeruginosa*	99,9*/30	Rodríguez-Rubio, 2016
11	Ply17	phiYY	*P. aeruginosa*	2**/30	Yang, 2018
12	PlyE146	P146	*P. aeruginosa*	3,8**/120	Larpin, 2018
13	Ts2631	vB_Tsc2631	*P. aeruginosa*	2,22**/90	Plotka, 2019
14	LysMK34	PMK34	*P. aeruginosa*	2,4**/120	Abdelkader, 2020
15	LysP108	P108	*P. aeruginosa*	1**/30	Lu, 2019
16	LysPVN02	PVN02	*A. hydrophila*	100*/60	Loc, 2021
17	LysPN09	PN09	*P. syringae*	51,5-68,1*/30	Ni, 2021
18	LysAB54	p54	*P. aeruginosa*	2**/60	Khan, 2021
19	Abtn-4	vB_AbaP_D2	*P. aeruginosa*	2**/120	Yuan, 2021
20	AL-3AA	JD010	*P. aeruginosa*	5,4**/60	Wang, 2021
21	RL_HLys	RL	*P. aeruginosa*	50*/30	Basit, 2021
22	LysE	LysE	*A. hydrophila*	>50*/30	Baliga, 2022
23	LysSTG2	STG2	*P. aeruginosa*, *P. putida*	99,9*/120	Zhang, 2022

продолжение таблицы 20

1	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*
24	PlyD4	phAhD4	*A. hydrophila*	20-80*/120	Wang, 2022
25	LysJN0	JN01	*P. aeruginosa*	71-100*/60	Shen, 2022
26	ZCPS1	*Pseudomonas* phage ZCPS1	*P. aeruginosa*, *B. cereus*	2**/60	Abdelrahman, 2023
27	*ASG01*	*Phage ASG01*	*A. salmonicida*	99,9*/210	Li, 2024
28	L0779, L0782, and L0799	*P. aeruginosa* phage ϕ6	*P. aeruginosa*	99,9*/120	Oberbauer, 2025
29	P19_358	*A. dhakensis* Bacteriophage P19	*A. dhakensis*, *P. aeruginosa*	93,3*/60 90,6*/60	Ansari, 2026
Примечание: * - процент (%) инактивации бактериальных клеток, ** - логарифмическая единица снижения бактериальных клеток					

При анализе эндолизинов использованных против бактерий рода *Pseudomonas* и *Aeromonas* наибольшее внимание за последние два десятилетия уделялось роду *Pseudomonas*, а именно бактерии *Pseudomonas aeruginosa.* И только в недавнем времени обнародованы результаты исследований эндолизина PlyD4, который использовался в качестве антибактериального агента при заражении рыб бактерией *Aeromonas hydrophila*. В результате исследований было определено, что эндолизин PlyD4 способен значительно сократить уровень смертности опытных рыб, зараженных бактерией *Aeromonas hydrophila*. Так по истечении опыта в контрольной группе без эндолизина смертность составила 90%, в опыте с эндолизином 25% (Wang, 2022).

В ходе проведенного анализа имеющейся литературы препаратов на основе эндолизинов бактериофагов, используемых в условиях аквакультуры выделен только один эндолизин PlyD4 который использовался для лечения аэромоноза *in vivo* у аквариумной рыбы (*Danio rerio*) (Wang, 2022). Что касается известных препаратов, используемых в клинической медицине то можно выделить следующие антибактериальные препараты: SAL200 (iNtRON Biotechnology) (Jun, 2014; Jun, 2016; Jun, 2017), Staphefekt SA.100 (Micreos Pharmaceuticals AG) (Totté, 2017), XZ.700 (Kuiper, 2021), Exebacase (ContraFect Corporation) (Fowler, 2020) все они ориентированы на лечение заболеваний человека, вызванные бактерией *Staphylococcus aureus*. Если в клинической медицине уже существует начальные результаты промышленного использования эндолизиновых препаратов, то в области аквакультуры их до сих пор нет. В связи с чем существует необходимость развития эндолизиновой терапии в области ветеринарии, которая на данный момент времени полностью отсутствует.

Таким образом использование эндолизинов имеет ряд преимуществ по сравнению с другими бактерицидными агентами используемых в аквакультуре, среди которых можно отметить следующее, что многие эндолизины эффективны против известных антибиотикоустойчивых патогенов (Oliveira, 2014; Rodríguez-Rubio, 2016; Larpin, 2018; Plotka, 2019; Abdelkader , 2020; Shen, 2022), в отличии от антибиотиков и бактериофагов, к эндолизинам не формируется устойчивость за счет коэволюции клетки-хозяина и бактериофагов (Nelson, 2012; Briers, 2014; Wang, 2022; Shen, 2022), специфичны по отношению к определенному патогену (Nelson, 2001; Schmelcher, 2012), при этом не затрагивают полезную микрофлору, а также возможно создание различных конструкций эндолизинов с помощью генно - инженерных методов для улучшения антибактериальной активности (Briers, 2014), существует возможность использования эндолизинов и основанных на них антибактериальных препаратов не только для рыб в аквакультуре, но и для других сельскохозяйственных животных, что увеличивает конкурентоспособность эндолизинов как антибактериальных агентов.

5.4 Получение родительских форм эндолизинов OBPgp279, Gp110 и LysPA26

5.4.1 Клонирование генов OBPgp279, Gp110 и LysPA26 в вектор pET28c

В рамках реализации стратегии по созданию новых антимикробных агентов был проведен направленный отбор генов эндолизинов, обладающих подтвержденной литической активностью в отношении грамотрицательных патогенов. Для последующей экспрессии и биохимической характеристики были выбраны гены OBPgp279, Gp110 и LysPA26. В качестве базовой генетической платформы была использована векторная система pET28c, которая обеспечивает высокий уровень индуцибельной экспрессии целевых белков в клетках *Escherichia coli* под контролем промотора T7, а также позволяет проводить очистку рекомбинантных продуктов методом металлохелатной хроматографии благодаря наличию гексагистидиновой последовательности (His-tag).

Процесс молекулярного клонирования включал в себя прецизионную встройку целевых последовательностей в полилинкер вектора с использованием специфических эндонуклеаз рестрикции. Для анализа конструкций рекомбинантных плазмид методом ПЦР использовали следующие праймеры представленные в таблице 21.

Таблица 21 – Последовательности праймеров использованных при анализе рекомбинантных плазмид

Праймеры	Последовательность ДНК (5’-3’)	Ампликон (п.н.)
Dir_Gp110_*Nde*I	CATATGATGGCCATTCTAAAAC	807
Rev_Gp110_*BamH*I	GGATCCTTAGCAGAAACTCTTG	
Dir_OBPgp279_*Nde*I	GACATCGGCACATATGAAAAATAGCGAG	1012
Rev_OBPgp279_*Eco*RI	CCGCAGAATTCTTAAACTATTCCGAGTG	
Dir_LysPA26_*BamH*I	TACGTGGATCCACTAGTATGCGAACGAA TAATATCGAC	467
Rev_LysPA26_*Eco*RI	CCGACGAATTCTCATTCTCCAAGGAAT	

Ген OBPgp279 был интегрирован в плазмиду pET28c по сайтам рестрикции *Nde*I и *Eco*RI. Для клонирования гена Gp110 была выбрана комбинация сайтов *Nde*I и *BamH*I, в то время как ген LysPA26 встраивался по сайтам *BamH*I и *Eco*RI.

Предварительное моделирование и оптимизация процесса клонирования осуществлялись в специализированной программной среде SnapGene, что

позволило верифицировать открытые рамки считывания и исключить возникновение нежелательных мутаций на стыках фрагментов. Итогом данного этапа работы стало создание серии рекомбинантных конструкций: pET28c/OBPgp279, pET28c/Gp110 и pET28c/LysPA26. Детальные карты клонирования, отражающие взаимное расположение регуляторных элементов и целевых вставок, представлены на рисунках 71–73. Созданные генетические конструкции послужили основой для дальнейшей трансформации компетентных клеток и наработки высокоочищенных препаратов эндолизинов для оценки их эффективности против мультирезистентных штаммов аэромонад и псевдомонад.

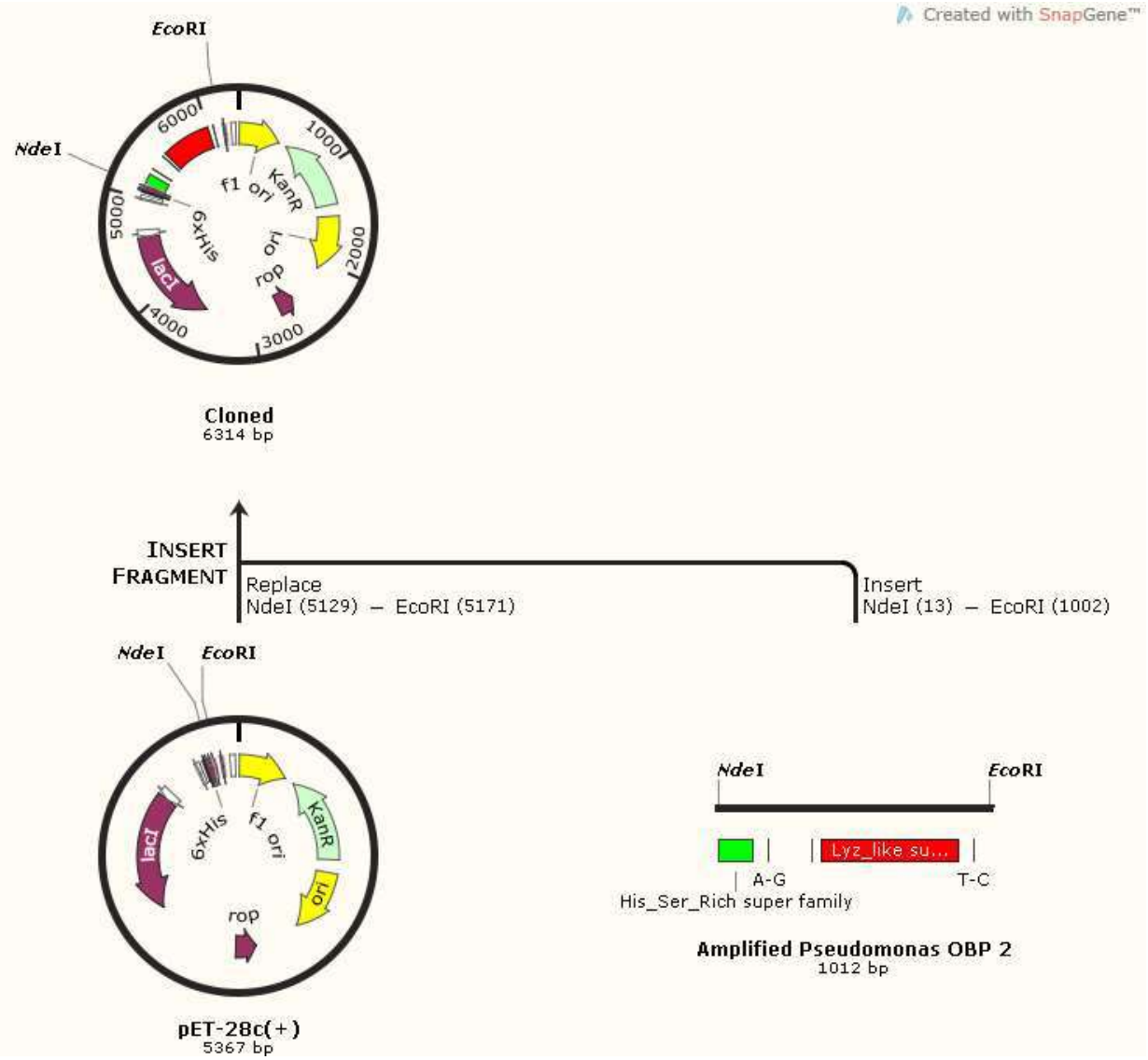


Рисунок 71 - Карта клонирования эндолизина OBPgp279 в вектор pET28c (SnapGene)

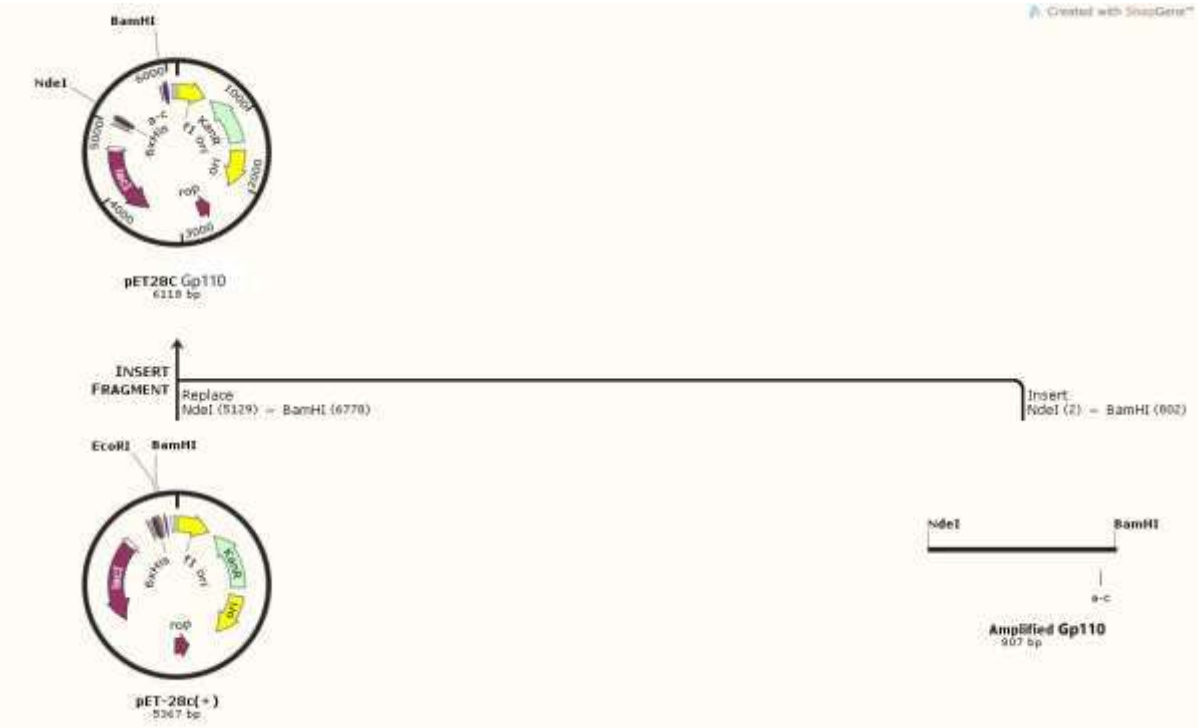


Рисунок 72 - Карта клонирования Gp110 в вектор pET28c (SnapGene)

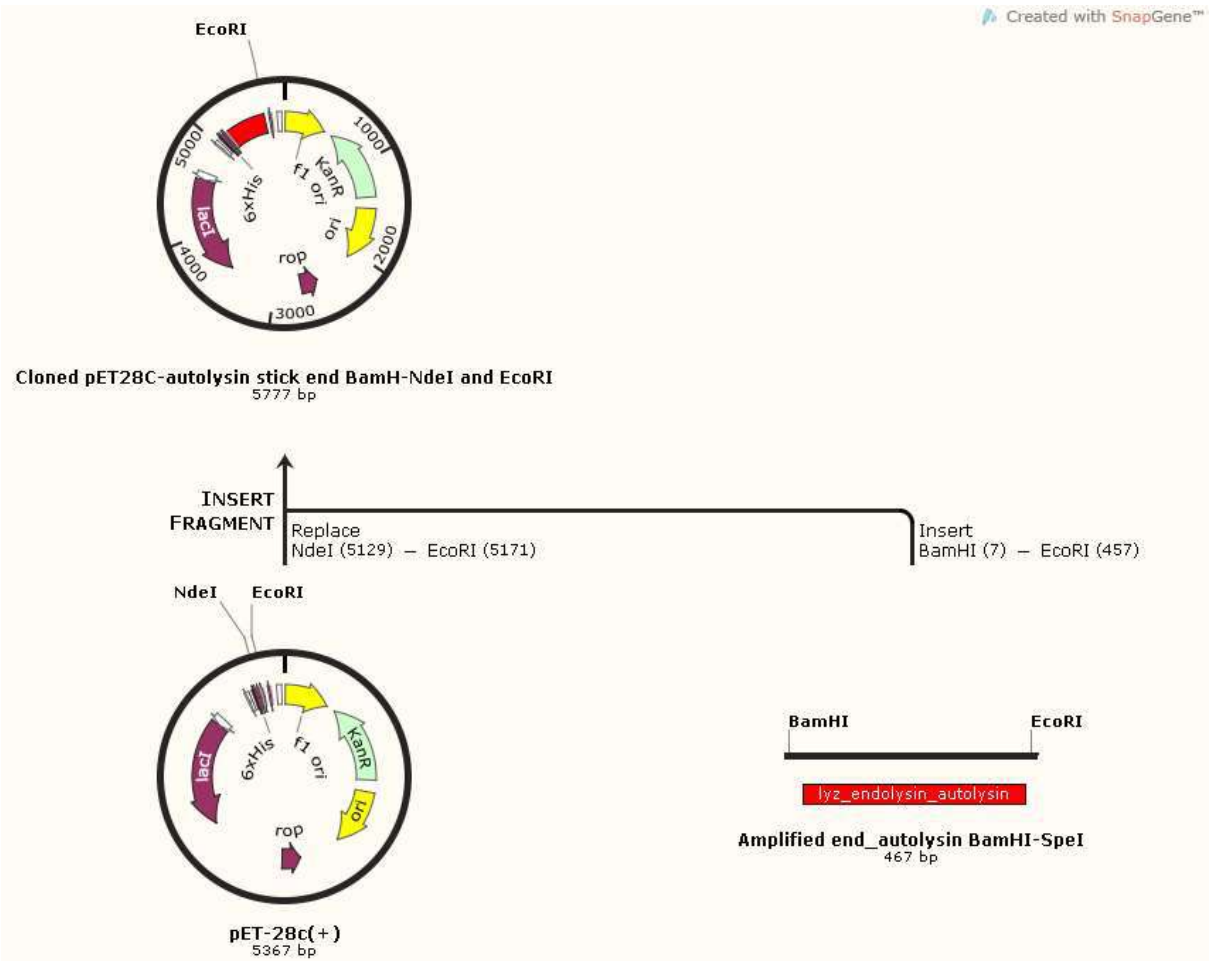


Рисунок 73 - Карта клонирования эндолизина LysPA26 в вектор pET28c (SnapGene)

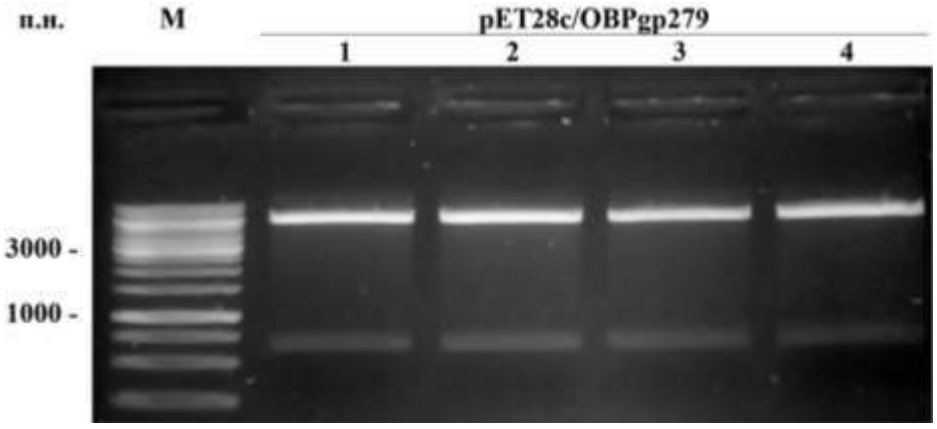
В результате клонирования получены конструкции трех рекомбинантных плазмид: pET28c/*OBPgp279*, размером в 6314 п.н., pET28c/*Gp110* размером в 6118 п.н., pET28c/*LysPA26* размером в 5777 п.н.

5.4.2 Рестрикционный анализ вектора pET28c со вставкой генов OBPgp279, Gp110 и LysPA26

Для получения препаративных количеств генетического материала и подтверждения структурной целостности созданных векторов была проведена серия манипуляций по амплификации и верификации плазмид. Рекомбинантные молекулы, полученные в результате лигирования вектора pET28c с генами OBPgp279, Gp110 и LysPA26 при помощи T4 ДНК-лигазы, были трансформированы в компетентные клетки штамма *Escherichia coli* JM109. Данный штамм был выбран в качестве промежуточного хозяина благодаря его способности обеспечивать стабильную репликацию и высокий выход плазмидной ДНК.

Выделение накопленных рекомбинантных плазмид осуществлялось с использованием набора «GeneJET Plasmid Miniprep Kit» (Thermo Scientific), обеспечивающего высокую степень очистки образцов. С целью верификации правильности встройки целевых генов и исключения ошибок клонирования был проведен рестрикционный анализ выделенных ДНК. Для проверки вектора pET28c/*OBPgp279* применялась комбинация рестриктаз *BamH*I и *EcoR*I в специфическом буфере *EcoR*I. Структурная целостность плазмиды pET28c/*Gp110* подтверждалась гидролизом по сайтам *Nde*I и *BamH*I, в то время как для анализа pET28c/*LysPA26* использовались ферменты *Nco*I и *EcoR*I.

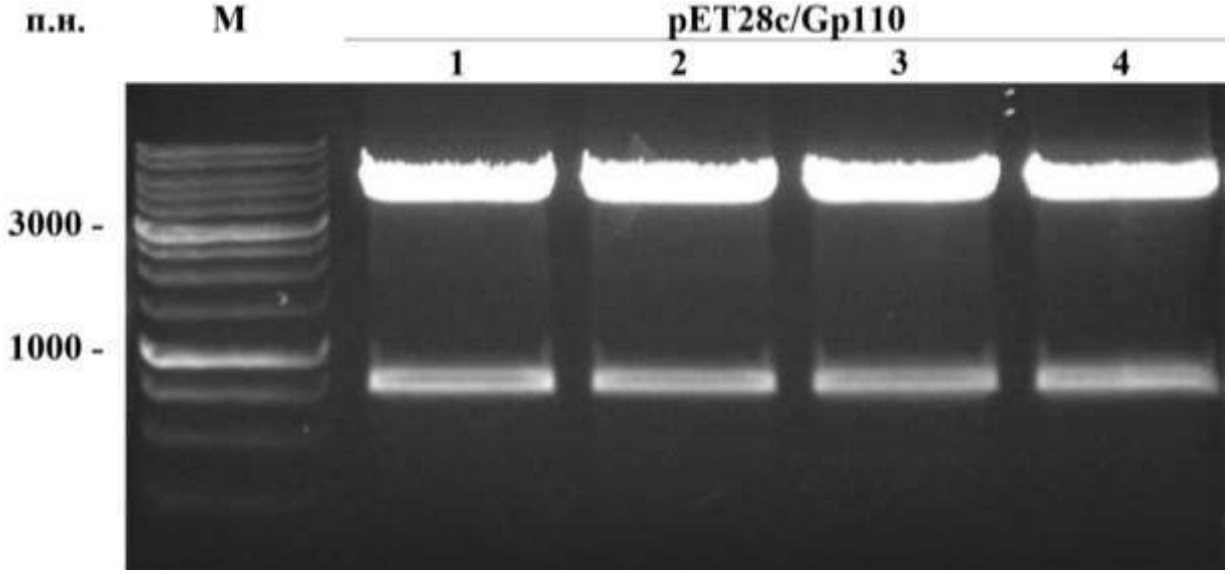
Результаты электрофоретического разделения продуктов рестрикции на 1% агарозном геле продемонстрировали наличие фрагментов, соответствующих расчетным молекулярным массам встроек и векторной части (рисунки 74–76).



M) ДНК маркер молекулярного размера 1 т.п.н.; pET28c/*OBPgp279*) рестрикция клонов (1-4) рекомбинантной плазмиды по сайтам рестрикции *BamH*I/*EcoR*I.

Рисунок 74 – Результаты рестрикции вектора pET28c со вставкой OBPgp279

На фореграмме отчетливо идентифицируются два обособленных участка, молекулярные массы которых полностью соответствуют расчетным параметрам исследуемой генетической системы: векторная часть размером 5663 п.н. и высвобожденная вставка гена эндолизина протяженностью 651 п.н. Соответствие длин полученных фрагментов теоретической схеме расположения сайтов рестрикции подтверждает прецизионную точность встройки гена OBPgp279 в состав экспрессионного вектора и отсутствие нецелевых перестроек в структуре плазмиды.

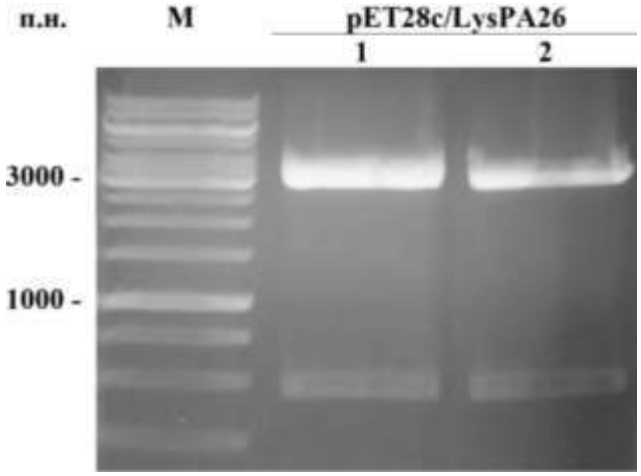


M) ДНК маркер молекулярного размера 1 т.п.н.; pET28c/*Gp110*) рестрикция клонов (1-4) рекомбинантной плазмиды по сайтам рестрикции *Nde*I/*BamH*I.

Рисунок 75 – Результаты рестрикции вектора pET28c со вставкой Gp110

Аналогично результатам, полученным для системы pET28c/*OBPgp279*, контрольный гидролиз плазмид pET28c/*Gp110* и pET28c/*LysPA26* подтвердил их полное соответствие теоретически рассчитанным физическим картам. Электрофоретическая визуализация продуктов рестрикции позволила идентифицировать фрагменты ДНК, размеры которых строго коррелируют с локализацией выбранных сайтов узнавания эндонуклеаз в рамках исследуемых конструкций.

Для рекомбинантной плазмиды pET28c/*Gp110* было зафиксировано разделение на два фрагмента протяженностью 5318 п.н. и 800 п.н., что соответствует вектору и целевой встройке. В случае с вектором pET28c/*LysPA26* размеры полученных участков составили 5265 п.н. и 512 п.н. соответственно. Таким образом, прецизионное совпадение экспериментальных длин фрагментов с расчетными данными (5318/800 и 5265/512 п.н.) объективно свидетельствует о корректности сборки всех трех экспрессионных систем и подтверждает чистоту выделенных генетических препаратов.



M) ДНК маркер молекулярного размера 1 т.п.н.; pET28c/*LysPA26*) рестрикция клонов (1-2) рекомбинантной плазмиды по сайтам рестрикции *Nco*I/*Eco*RI.

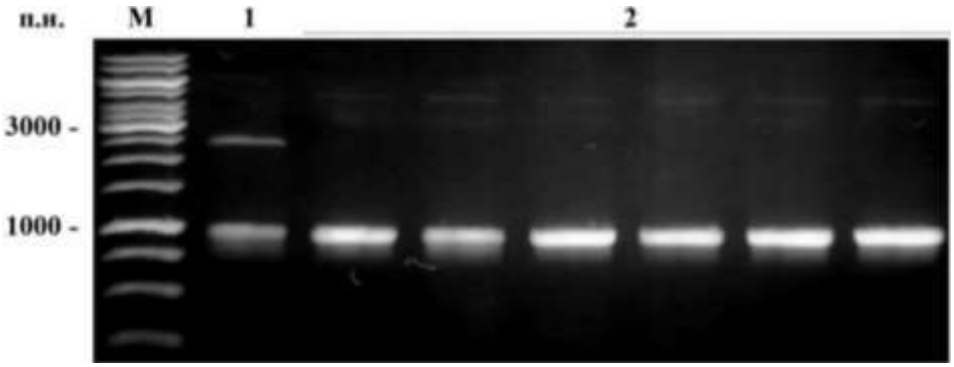
Рисунок 76 – Результаты рестрикции вектора pET28c со вставкой LysPA26

В результате проведенного рестрикционного анализа рекомбинантных плазмид pET28c/*OBPgp279*, pET28c/*Gp110* и pET28c/*LysPA26* продукты расщепления были визуализированы при помощи электрофореза в 1% агарозном геле. На рисунках отчетливо выделяются две полосы: ярко выраженная (верхняя) полоса представляет собой линеаризованный вектор без вставки, а менее яркая (нижняя) полоса соответствует фрагментам вставок по исследованным сайтам рестрикции (*BamH*I и *Eco*RI, *Nde*I и *BamH*I, *Nco*I и *Eco*RI). Таким образом, результаты рестрикционного анализа подтвердили наличие целевых генов-вставок и высокую степень чистоты рекомбинантных плазмид pET28c/*OBPgp279*, pET28c/*Gp110* и pET28c/*LysPA26*.

5.4.3 ПЦР идентификация вставок - генов OBPgp279, Gp110 и LysPA26 в векторной системе pET28c

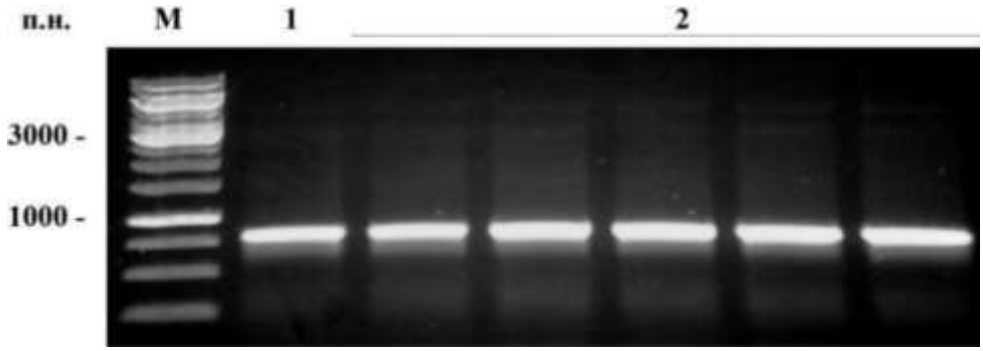
Для окончательной идентификации генов OBPgp279, Gp110 и LysPA26 в составе векторов, после проведения рестрикционного анализа, был применен метод ПЦР-амплификации. В качестве матрицы для реакции использовали полученные рекомбинантные плазмиды, а специфичность процесса обеспечивалась применением подобранных пар праймеров, комплементарных границам исследуемых вставок.

В результате амплификации были получены специфические фрагменты ДНК, размеры которых соответствуют теоретическим значениям для данных локусов: 1012 п.н. для гена OBPgp279, 807 п.н. для Gp110 и 467 п.н. для LysPA26. Визуализация продуктов ПЦР в 1% агарозном геле подтвердила наличие полос высокой интенсивности на уровне ожидаемых молекулярных масс (рисунки 77–79).



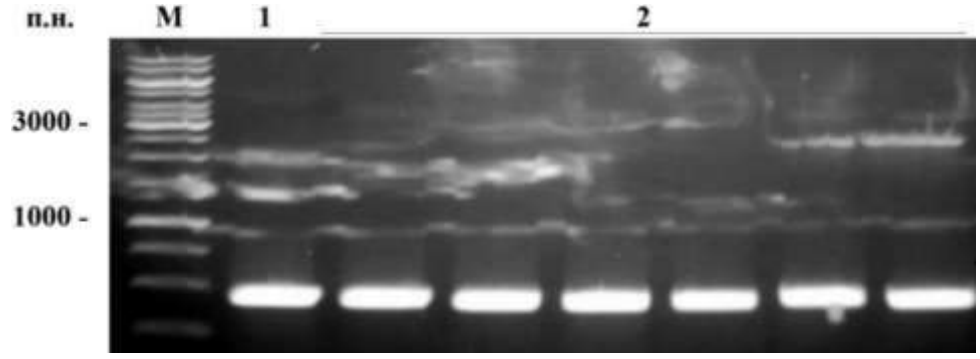
M) ДНК маркер молекулярного размера 1 т.п.н.; 1) pBSK/*OBPgp279*; 2) pET28c/*OBPgp279*.

Рисунок 77 – Результаты ПЦР анализа гена вставки OBPgp279 в векторной системе



M) ДНК маркер молекулярного размера 1 т.п.н.; 1) pBSK/*Gp110*; 2) pET28c/*Gp110*.

Рисунок 78 – Результаты ПЦР анализа гена вставки Gp110 в векторной системе



M) ДНК маркер молекулярного размера 1 т.п.н.; 1) pBSK/*LysPA26*; 2) pET28c/*LysPA26*.

Рисунок 79 – Результаты ПЦР анализа гена вставки LysPA26 в векторной системе

Анализ наличия вставок в составе использованной векторной системы позволил четко визуализировать специфические амплифицированные фрагменты для всех трех генов, кодирующих антибактериальные белки – эндолизины. В результате проведенного ПЦР-скрининга были идентифицированы целевые последовательности со следующими характеристиками ампликонов: ген OBPgp279 продемонстрировал фрагмент размером 1012 п.н., ген Gp110 – 807 п.н., а ген LysPA26 – 467 п.н.

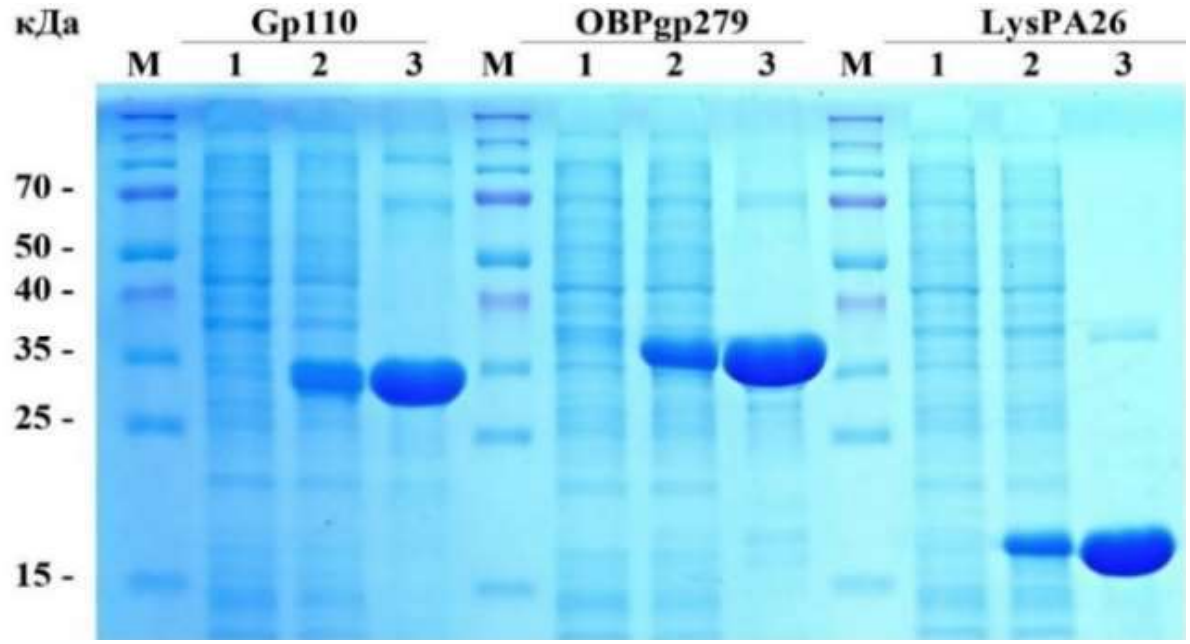
Полученные данные о молекулярной массе амплифицированных участков полностью соответствуют теоретическим параметрам выбранных генов. Таким образом, результаты ПЦР-анализа послужили окончательным верификационным подтверждением успешного лигирования экспрессионного вектора с исследуемыми вставками и готовности сконструированных плазмид к этапу биосинтеза рекомбинантных белков.

5.4.4 Индукция и очистка эндолизинов OBPgp279, Gp110 и LysPA26

По завершении верификации рекомбинантных плазмид pET28c/OBPgp279, pET28c/Gp110 и pET28c/LysPA26 методами рестрикционного анализа и ПЦР была проведена трансформация полученных конструкций в компетентные клетки экспрессионного штамма *Escherichia coli Rosetta* 2 (DE3) pLysS. Успешность трансформации подтверждалась визуально по результатам селективного роста колоний на твердой питательной среде с соответствующими антибиотиками.

В ходе оптимизации условий биосинтеза было установлено, что продолжительность инкубации критически влияет на уровень экспрессии генов исследуемых эндолизинов. Наилучшие показатели выхода белков OBPgp279, Gp110 и LysPA26 были достигнуты при температуре культивирования 30 ºС в течение 16 часов и концентрации индуктора ИПТГ, равной 0,2 мМ (Guo, 2017; Walmagh, 2012; Rodríguez-Rubio, 2016). После завершения процесса индукции целевых белков, содержащих С-концевые 6xHis-метки, бактериальные клетки осаждали центрифугированием. Дезинтеграцию клеточных оболочек проводили методом ультразвукового воздействия с последующим повторным центрифугированием для отделения растворимой фракции.

Выделение очищенных препаратов эндолизинов из полученного клеточного экстракта осуществляли методом металл-аффинной хроматографии. Качество очистки и уровень экспрессии контролировали с помощью электрофореза в ДСН-ПААГ (рисунок 80), сопоставляя образцы клеточных лизатов до и после индукции, а также фракции после хроматографического разделения. Результаты электрофоретического анализа и количественного определения концентрации белка подтвердили высокую интенсивность экспрессии исследуемых эндолизинов в оптимизированных условиях, что свидетельствует об эффективности выбранной стратегии биосинтеза.



М) маркер молекулярной массы белков (кДа); 1) контроль без индукции; 2) индукция с ИПТГ; 3) очищенный белок. Для окраски геля использован Кумасси синий.

Рисунок 80 – ДСН-ПААГ электрофорез очищенных эндолизинов

Сравнительный анализ электрофореграмм выявил качественные различия между контрольными образцами лизата *Escherichia coli* и пробами, полученными после индукции. В опытных образцах на ДСН-ПААГ отчетливо визуализируются мажорные полосы, интенсивность которых свидетельствует о высоком уровне биосинтеза целевых белков. Такая эффективность экспрессии стала результатом прецизионного подбора оптимальных условий культивирования штамма-продуцента.

В ходе исследований были получены препараты эндолизинов со следующими молекулярными массами: OBPgp279 – 38,7 кДа, Gp110 – 31,1 кДа и LysPA26 – 18,8 кДа. Благодаря оптимизации параметров индукции, выход целевых продуктов варьировал в диапазоне от 1,5–2 до 7–9 мкг/мкл, что является достаточно высоким показателем для рекомбинантных систем. Полученные концентрации позволили в полной мере использовать очищенные фракции эндолизинов для последующего тестирования их антибактериального потенциала в отношении грамотрицательных патогенов осетровых рыб.

Достижение высокой концентрации белков при использовании металл-аффинной хроматографии согласуется с данными мировой литературы. Аналогичные результаты высокой эффективности очистки ранее были зафиксированы для таких литических ферментов, как LysK-CHAP (Haddad, 2017), CP25L (Gervasi, 2014) и PlyCP41 (Hammond, 2019). Таким образом, выбранная методология наработки рекомбинантных эндолизинов обеспечила получение препаратов в объеме, достаточном для проведения комплексных испытаний по оценке лизиса клеток *Aeromonas* и *Pseudomonas*.

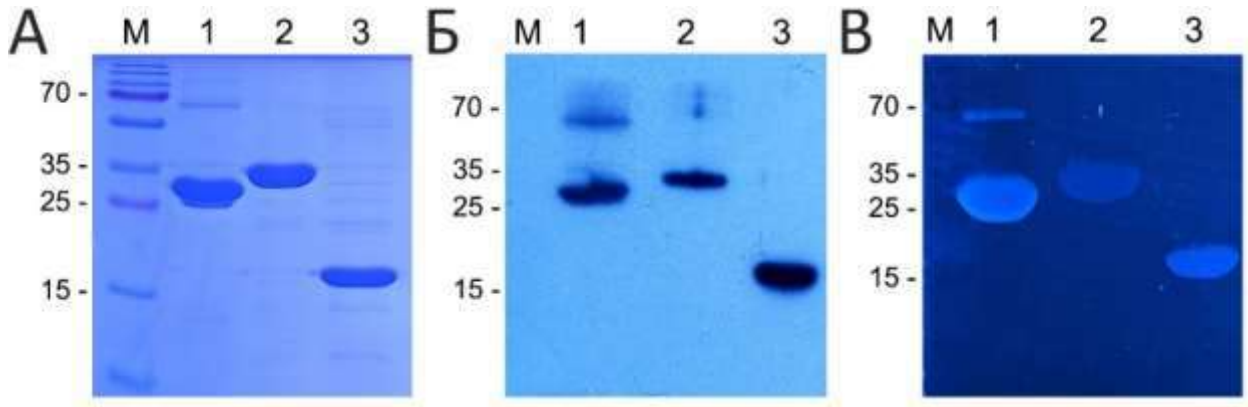
5.5 Антибактериальная активность родительских форм эндолизинов *in vitro*

5.5.1 Зимограмма анализ эдолизинов

Высокий выход очищенных фракций исследуемых эндолизинов позволил перейти к этапу оценки их биологической эффективности в отношении штамма *Aeromonas hydrophila*. Данный патоген был выбран в качестве целевого объекта в связи с подтвержденной в предыдущих исследованиях высокой степенью вирулентности для аквакультуры тиляпии и осетровых рыб (Bakiyev, 2022).

Эффективность использования метода металл-аффинной хроматографии подтверждается достижением 95% чистоты целевых продуктов. На результатах ДСН-ПААГ электрофореза очищенные белки мигрируют в виде единых, четко обособленных полос без признаков присутствия посторонних протеиновых примесей (рисунок 81А). Локализация полос строго соответствует расчетным молекулярным массам: 31,1, 38,7 и 18,8 кДа.

Для дополнительной структурной идентификации и подтверждения рекомбинантной природы белков был проведен вестерн-блоттинг с использованием специфических анти-His-антител. Положительный сигнал в анализе подтвердил наличие гистидиновой метки и полное соответствие размеров белков теоретическим моделям (рисунок 81Б).



А) миграция очищенных белков в полиакриламидном геле при визуализации с использованием окраски Кумасси синего; Б) вестерн-блот анализ очищенных белков; В) анализ зимограммы с использованием пептидогликана *Aeromonas hydrophila* AB005 в качестве субстрата; М) маркер молекулярной массы белков (кДа); 1) очищенный эндолизин Gp110; 2) очищенный эндолизин OBPgp279; 3) очищенный эндолизин LysPA26.

Рисунок 81 – Анализ пептидогликан-гидролазной активности эндолизинов Gp110, OBPgp279 и LysPA26 против штамма *Aeromonas hydrophila* AB005 (Bakiyev, 2023)

Критически важным этапом исследования стала оценка ферментативного потенциала полученных гидролаз. С этой целью применялся метод зимографии

в геле, где в качестве субстрата был использован очищенный пептидогликан штамма *Aeromonas hydrophila* AB005 (Bakiyev, 2023). Данный подход позволил визуализировать зоны лизиса непосредственно в геле, подтверждая функциональную сохранность и каталитическую активность рекомбинантных эндолизинов после всех этапов очистки.

Анализ полученных зимограмм подтвердил наличие выраженной пептидогликан-гидролазной активности у всех трех очищенных рекомбинантных белков в отношении штамма *Aeromonas hydrophila*. О функциональной способности эндолизинов разрушать клеточную стенку свидетельствуют четкие зоны просветления (лизиса) на фоне окрашенного непрозрачного геля, содержащего дезинтегрированные клетки штамма AB005 (рисунок 81В).

Несмотря на общую положительную реакцию, интенсивность литических зон существенно варьировала в зависимости от исследуемого фермента. Для эндолизина OBPgp279 была зафиксирована слабо выраженная область просвета, тогда как LysPA26 продемонстрировал более интенсивную полосу лизиса. Наиболее высокую ферментативную активность на зимограмме проявил эндолизин Gp110. Помимо мажорной полосы в области предсказанной молекулярной массы, для данного белка наблюдалась дополнительная слабая зона активности, мигрирующая чуть ниже маркера 70 кДа. Это явление может указывать на сохранение каталитической активности димерной формой фермента даже в условиях электрофореза (рисунок 81В).

Полученные в ходе зимографического анализа данные объективно подтверждают ферментативную состоятельность рекомбинантных белков и обосновывают целесообразность их дальнейшего использования в качестве терапевтических агентов против выделенных изолятов патогенных бактерий (Bakiyev, 2023).

5.5.2 Анализ антибактериальной активности эндолизинов против бактерий рода *Aeromonas*

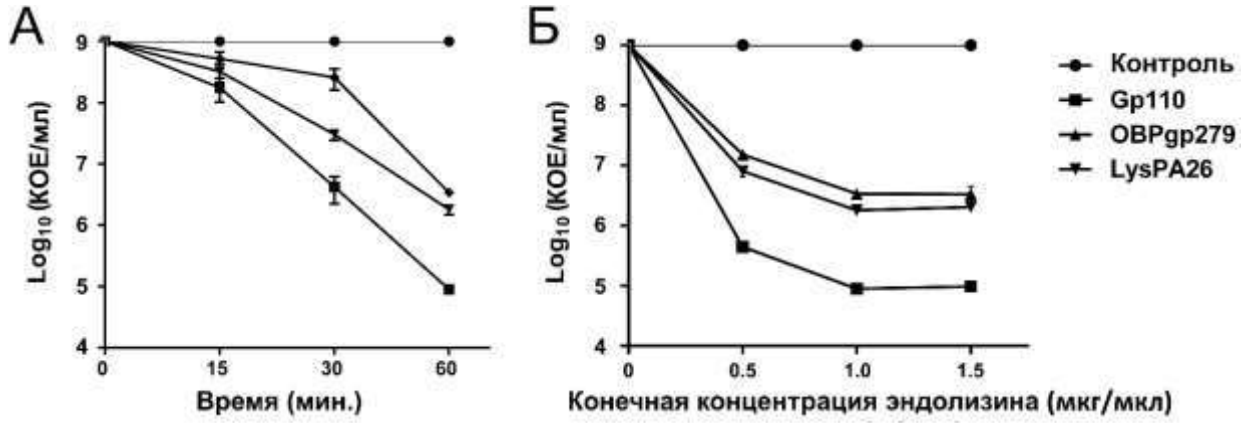
Несмотря на широкое внедрение в ветеринарную практику ряда антибактериальных препаратов, получивших официальное одобрение регулирующих органов, таких как Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов, уровень смертности гидробионтов от инфекций, вызванных патогенными представителями рода *Aeromonas*, продолжает оставаться критически высоким в условиях интенсивной аквакультуры. Данная ситуация обусловлена не только высокой вирулентностью возбудителей, но и стремительно нарастающим уровнем антимикробной резистентности. Подавляющее большинство изолятов аэромонад, циркулирующих в рыбоводных хозяйствах, на сегодняшний день обладают множественной устойчивостью к классическим антибиотикам, что является прямым следствием их нерационального и зачастую бесконтрольного применения. Возникновение и повсеместное распространение таких

устойчивых штаммов требует незамедлительного внедрения принципиально новых стратегий борьбы с бактериальными патогенами. В этом контексте эндолизины – ферменты бактериофагов, обладающие способностью к специфическому расщеплению пептидогликана, – рассматриваются как наиболее многообещающая альтернатива традиционной антибиотикотерапии. Важнейшим преимуществом эндолизинов перед антибиотиками и даже классической фаготерапией является отсутствие документально подтвержденных сведений о развитии к ним резистентности у бактерий, что связано с воздействием фермента на фундаментальные, высококонсервативные связи в структуре клеточной стенки. Накопленный к настоящему времени массив данных подтверждает, что фаговые эндолизины обладают мощным бактерицидным действием и способны эффективно лизировать клетки-мишени как в лабораторных экспериментах *in vitro*, так и в сложных биологических системах *in vivo*.

Хотя выделение и характеристика уникальных эндолизинов из вновь идентифицированных бактериофагов является перспективным направлением, данный процесс сопряжен со значительными временными и трудовыми затратами. В связи с этим оценка эффективности уже известных и хорошо изученных эндолизинов в отношении специфических антибиотикорезистентных видов *Aeromonas* представляется рациональным и прагматичным подходом в поиске эффективных терапевтических агентов. В рамках данного раздела был детально исследован литический потенциал трех родительских эндолизинов – LysPA26, Gp110 и OBPgp279, которые характеризуются различной доменной организацией, включая как однодоменные, так и более сложные двухдоменные структуры. Антимикробная активность указанных ферментов в отношении штамма *A. hydrophila* AB005 определялась на основе прецизионного анализа снижения количества колониеобразующих единиц (КОЕ) после экспозиции бактериальной суспензии с начальной оптической плотностью $ОП_{600}$ = 0,65 в присутствии эндолизинов в конечной концентрации 1 мкг/мкл.

Экспериментальные данные продемонстрировали, что все три исследуемых эндолизина обладают выраженной бактерицидной способностью, однако уровень их активности существенно варьирует в зависимости от структурных особенностей белка. Эндолизин Gp110 проявил себя как наиболее мощный антимикробный агент, значительно превосходя по эффективности препараты OBPgp279 и LysPA26. В то время как последние, несмотря на их статус хорошо охарактеризованных в литературе ферментов, показали лишь умеренную активность в отношении целевого штамма, Gp110 обеспечил наиболее глубокую инактивацию популяции *Aeromonas hydrophila*. Детальное изучение дозозависимого эффекта показало, что внесение 1 мкг/мкл OBPgp279, LysPA26 и Gp110 приводит к снижению численности жизнеспособных клеток патогена на 2,46±0,06, 2,74±0,08 и 4,04±0,07 логарифмических единиц соответственно уже в течение первого часа инкубации. Примечательно, что дальнейшее повышение концентрации ферментов свыше установленного порога в 1 мкг/мкл не приводило к статистически значимому усилению

литической способности, что указывает на достижение функционального насыщения системы в данных условиях. Таким образом, для проведения последующих этапов работы была выбрана рабочая концентрация в 1 мкг/мкл (рисунок 82). Несмотря на то, что исследуемые эндолизины продемонстрировали способность к автономному лизису грамотрицательных клеток без дополнительного внешнего воздействия, было принято решение о целесообразности дальнейшего изучения их эффективности в сочетании с хелатирующим агентом ЭДТА. Использование предварительной обработки суспензии этилендиаминтетрауксусной кислотой направлено на дестабилизацию наружной мембраны бактерий, что может способствовать облегчению доступа эндолизинов к пептидогликановому слою и, как следствие, достижению максимального синергетического эффекта при эрадикации наиболее устойчивых изолятов.

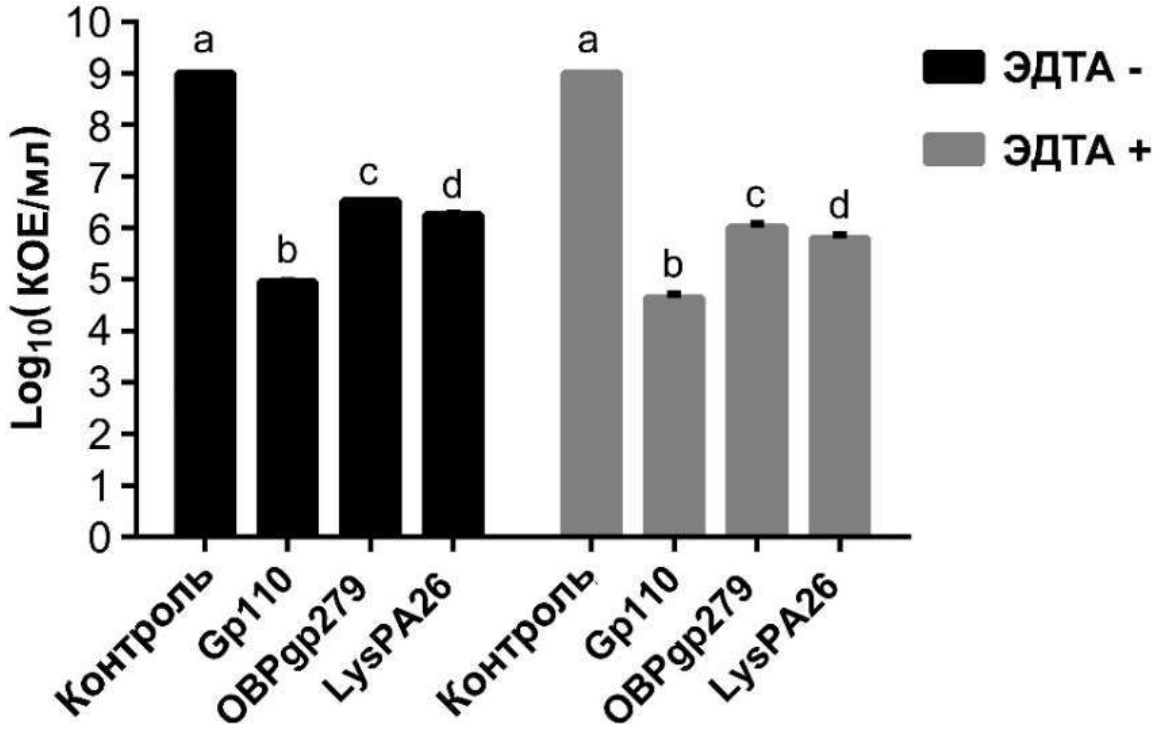


А) зависимая от времени кривая активности эндолизинов в концентрации 1 мкг/мкл против экспоненциально растущих клеток *Aeromonas hydrophila* AB005; Б) бактерицидный эффект при различных концентрациях (мкг/мкл) эндолизинов Gp110, OBPgp279 и LysPA26 против экспоненциально растущих клеток *Aeromonas hydrophila* AB005. Столбики погрешностей представляют собой стандартные отклонения трех независимых повторов.

Рисунок 82 – Антибактериальная эффективность родительских эндолизинов *in vitro* (Bakiyev, 2023)

Одной из ключевых проблем при использовании эндолизинов против грамотрицательных бактерий, таких как *Aeromonas hydrophila*, является наличие сложной наружной мембраны, которая выступает в роли физического и химического барьера, ограничивающего доступ ферментов к пептидогликановому слою. В рамках данного исследования для преодоления этой преграды был использован этилендиаминтетраацетат (ЭДТА) – классический хелатирующий агент, способный связывать двухвалентные катионы металлов (Ca^{2+} и Mg^{2+}), которые стабилизируют липополисахаридный (ЛПС) слой бактериальной стенки. Важнейшим этапом эксперимента стала верификация собственного влияния ЭДТА на жизнеспособность исследуемого

штамма. Как наглядно продемонстрировано на представленных графиках (рисунок 83), ЭДТА в используемых рабочих концентрациях сама по себе не проявляет статистически значимой антибактериальной активности против *Aeromonas hydrophila*. Отсутствие самостоятельного бактерицидного эффекта подтверждается стабильностью показателей КОЕ в контрольных группах, где клетки подвергались воздействию только хелатора без добавления ферментативных препаратов.



Столбики погрешностей представляют собой стандартные отклонения трех независимых повторов. Строчные буквы (a, b, c и d) указывают на статистически значимые различия между значениями согласно тесту Тьюки при $p < 0,05$.

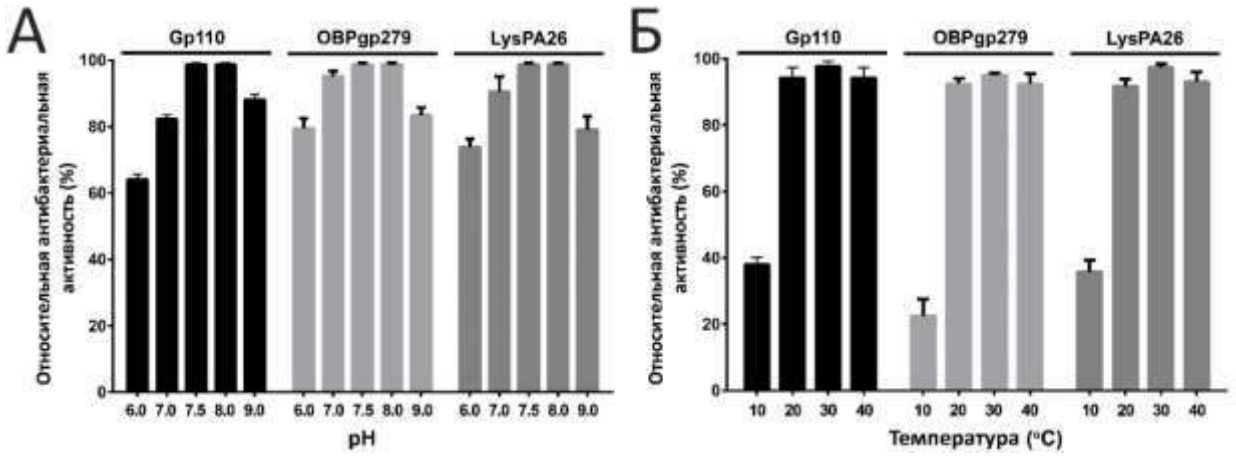
Рисунок 83 - Активность эндолизинов в отношении экспоненциально растущих клеток *Aeromonas hydrophila* AB005 с и без обработки 1 мМ ЭДТА (Bakiyev, 2023)

Экспериментальное изучение сочетанного воздействия эндолизинов и хелатирующего агента ЭДТА позволило выявить значительное усиление бактерицидного потенциала всех исследуемых препаратов, при этом сохранилась иерархия их эффективности, установленная в предыдущих тестах. В присутствии ЭДТА рекомбинантный белок Gp110 вновь продемонстрировал наиболее выраженную литическую активность в сравнении с OBPgp279 и LysPA26. Применение Gp110 в комбинации с хелатором привело к снижению количества жизнеспособных клеток *Aeromonas hydrophila* на 4,35±0,07 логарифмических единиц. В то же время для эндолизинов OBPgp279 и LysPA26 данные показатели составили 2,97±0,06 и 3,21±0,08 log-единиц соответственно

(Bakiyev, 2023). Такое усиление антимикробного действия объясняется дестабилизацией наружной мембраны грамотрицательных бактерий под воздействием ЭДТА, что облегчает доступ ферментов к пептидогликановой мишени и позволяет реализовать их каталитический потенциал в полной мере.

Важнейшим аспектом характеристики рекомбинантных эндолизинов как потенциальных терапевтических средств является определение их стабильности и активности в различных физико-химических условиях, имитирующих среду обитания гидробионтов. В ходе анализа зависимости ферментативной активности от уровня кислотности и температуры окружающей среды было выявлено, что все три эндолизина сохраняют функциональность в достаточно широких диапазонах, однако демонстрируют отчетливые пики эффективности. Установлено, что повышенная антибактериальная активность проявляется при значениях pH среды в интервале 7,5–8,0, что соответствует слабощелочным условиям, характерным для многих типов рыбоводных водоемов.

Температурный оптимум для исследуемых ферментов также оказался весьма стабильным и составил от 20 до 40 ºC (Bakiyev, 2023). Соответствующие данные, визуализированные на рисунке 84, свидетельствуют о том, что эндолизины сохраняют высокую литическую способность в температурных режимах, типичных для выращивания осетровых рыб и тиляпии, особенно в системах замкнутого водоснабжения (УЗВ). Способность белков проявлять максимальную активность при физиологически релевантных значениях pH и температуры подтверждает их высокую биолого-технологическую ценность и обосновывает перспективность их дальнейшего применения в качестве основы для разработки ветеринарных препаратов нового поколения.

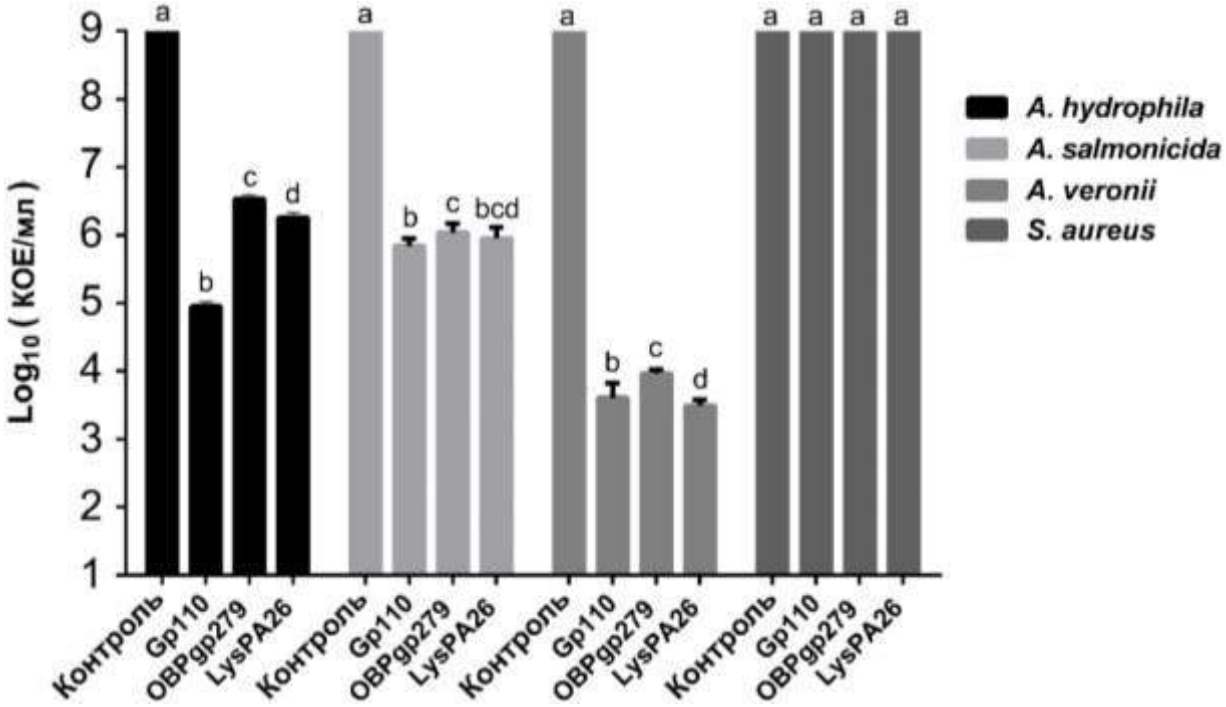


А) Влияние pH на антибактериальную активность; Б) Влияние температуры на антибактериальную активность. Столбики погрешностей представляют собой стандартные отклонения трех независимых повторов.

Рисунок 84 - Влияние pH и температуры на антибактериальную активность Gp110, OBPgp279 и LysPA26 (Bakiyev, 2023)

Известно, что специфичность и антибактериальная активность эндолизинов по отношению к возбудителю-хозяину может заметно варьировать в отношении различных родов и видов бактерий (Zimmer, 2002; Farkasovska, 2003; Loessner, 2005). Поэтому в последующих экспериментах проведен сравнительный анализ действия Gp110 на некоторые виды, принадлежащие к роду *Aeromonas*, такие как *Aeromonas. hydrophila* (OK634406), *Aeromonas salmonicida* (OK634025) и *Aeromonas veronii* (OK634393). Также в исследовании был включен грамположительный штамм золотистого стафилококка *Staphylococcus aureus*.

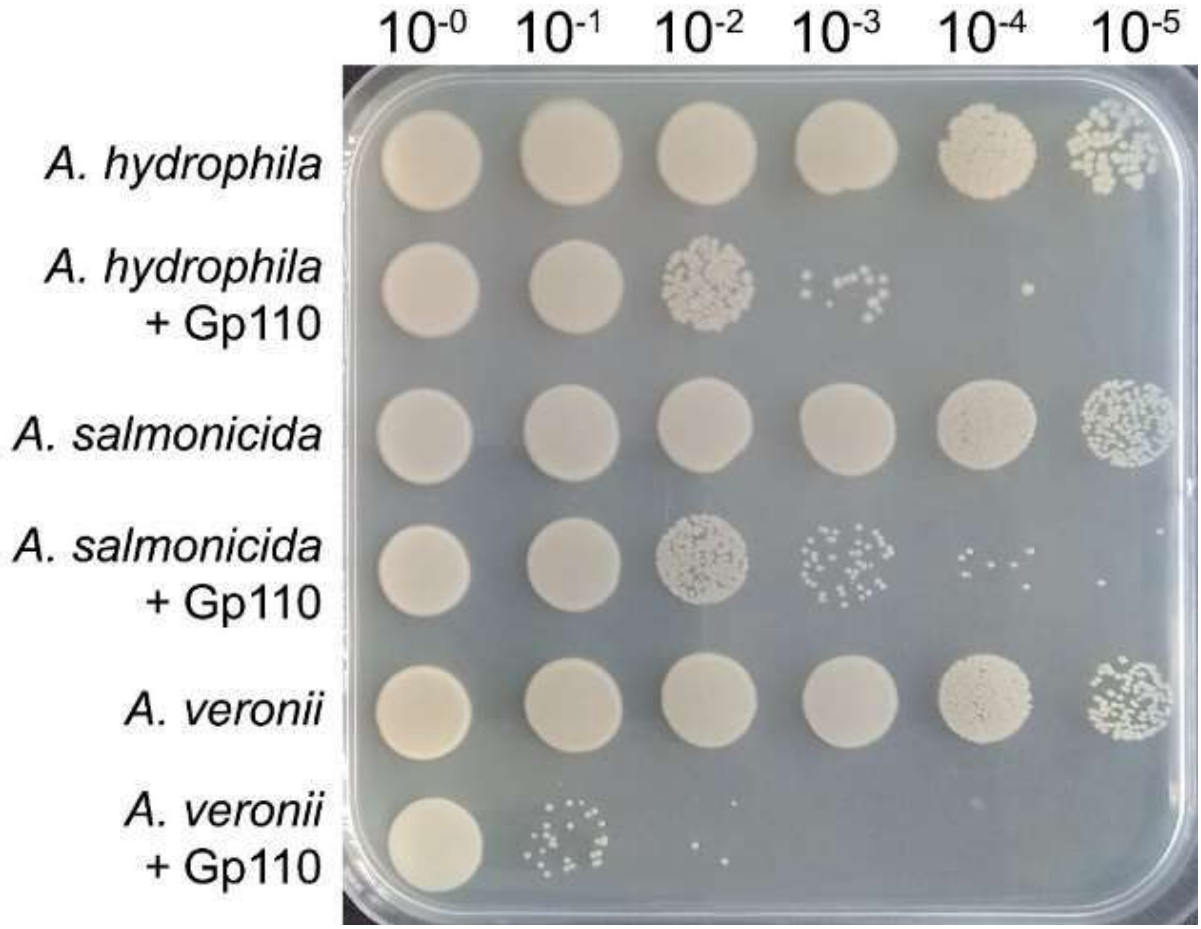
Все ферменты показали широкий, но разнообразный диапазон бактерицидной активности в зависимости от эндолизина и используемых видов бактерий. Так определено, что все три эндолизина показали повышенную активность против *Aeromonas veronii*. Напротив, сниженная активность всех ферментов наблюдалась в отношении *Aeromonas salmonicida*, где максимальная активность наблюдалась у эндолизина Gp110 снижение клеток для которого составило 3,19±0,17 логарифмических единиц. При этом никакой активности в отношении грамположительного штамма *Staphylococcus aureus* не наблюдалось. Результаты антимикробных анализов трех эндолизинов в отношении этих видов бактерий представлены на рисунке 85.



Столбики погрешностей представляют собой стандартные отклонения трех независимых повторов. Строчные буквы (a, b, c и d) указывают на статистически значимые различия между значениями согласно тесту Тьюки при $p < 0,05$.

Рисунок 85 - Активность эндолизинов против экспоненциально растущих бактерий рода *Aeromonas* и *S. Staphylococcus aureus* (Bakiyev, 2023)

Объективным доказательством высокой эффективности выбранного терапевтического агента служат репрезентативные изображения жизнеспособности клеток до и после экспозиции с препаратом Gp110, представленные на рисунке 86 (Bakiyev, 2023).



Рост колоний бактерий *Aeromonas hydrophila* AB005, *Aeromonas salmonicida* AB001, *Aeromonas veronii* AB003 до и после обработки эндолизином Gp110. Контрольные и опытные клетки бактерий наносили в 10-кратном разведении на питательную среду ЛБ агар.

Рисунок 86 - Жизнеспособность клеток до и после инкубации с эндолизином Gp110 (Bakiyev, 2023)

Визуализация результатов подтверждает радикальное снижение плотности бактериальной популяции и деструкцию клеточных структур под воздействием фермента. Фундаментальной особенностью исследуемой группы эндолизинов (Gp110, OBPgp279 и LysPA26) является их доказанная способность к лизису широкого спектра грамотрицательных микроорганизмов. В частности, в ряде предшествующих фундаментальных работ была детально описана их высокая специфическая активность в отношении таких клинически значимых патогенов, как *Pseudomonas aeruginosa* (Guo, 2017; Walmagh, 2012; Rodríguez-Rubio, 2016). Тот факт, что данные ферменты способны эффективно преодолевать сложную

структуру наружной мембраны псевдомонад, послужил теоретической предпосылкой для их апробации против других опасных возбудителей водной среды.

В ходе проведенного цикла исследований было экспериментально установлено, что эндолизины Gp110, OBPgp279 и LysPA26 характеризуются выраженной антибактериальной активностью также и в отношении бактерий рода *Aeromonas*. Это расширяет представление о спектре литического действия данных протеинов, позиционируя их как универсальные инструменты контроля грамотрицательных инфекций в аквакультуре. Тем не менее, сравнительный анализ выявил качественные различия в силе антимикробного воздействия внутри исследуемой группы.

Несмотря на наличие бактерицидного эффекта у всех трех препаратов, именно эндолизин Gp110 показал статистически значимое превосходство в подавлении жизнеспособности аэромонад. Его доменная организация и каталитические свойства обеспечивают наиболее быструю и глубокую эрадикацию патогена в сравнении с OBPgp279 и LysPA26. Таким образом, совокупность данных о широком спектре действия и специфической мощности Gp110 позволяет выделить его как ключевого кандидата для разработки комплексных систем защиты осетровых рыб от смешанных бактериальных инфекций, вызываемых ассоциациями аэромонад и псевдомонад.

5.6 Антибактериальная активность родительских форм эндолизинов *in vivo*

Бактерия *Aeromonas hydrophila* признана ведущим инфекционным агентом, ответственным за масштабные вспышки заболеваний пресноводных рыб во всем мире (Rasmussen-Ivey, 2016). Патоген тесно ассоциирован с развитием эпизоотического язвенного синдрома, который провоцирует массовую гибель гидробионтов в условиях интенсивного выращивания (Iqbal, 1999). Ранее выделенный нами из пораженных особей сибирского осетра (*Acipenser baerii*) штамм *Aeromonas hydrophila* AB005 в ходе экспериментального заражения продемонстрировал высокую вирулентность и способность вызывать острую форму инфекции (Bakiyev, 2022). Ситуация осложняется результатами антибиотикограмм, согласно которым штамм AB005 обладает выраженной мультирезистентностью, что делает традиционные методы лечения неэффективными.

В ходе проведенного цикла исследований (Bakiyev, 2023) эндолизины OBPgp279, LysPA26 и Gp110 показали высокую бактерицидную эффективность в отношении экспоненциально растущей культуры *Aeromonas hydrophila* AB005. Примечательно, что максимальная активность была зафиксирована при концентрации ферментов 1 мкг/мкл без использования вспомогательных агентов, таких как ЭДТА. Количественный анализ показал, что применение LysPA26 и OBPgp279 обеспечивает снижение титра жизнеспособных бактерий примерно на 3 логарифмические единицы, в то время как воздействие Gp110 приводит к наиболее глубокой инактивации патогена – более чем на 4

логарифмические единицы (Bakiyev, 2023). Добавление 1 мМ ЭДТА не вызвало статистически значимого усиления антибактериального эффекта, что коррелирует с более ранними данными об активности этих протеинов против *Pseudomonas aeruginosa* в отсутствие внешних пермеабилизаторов (Guo, 2017; Walmagh, 2012; Rodríguez-Rubio, 2016).

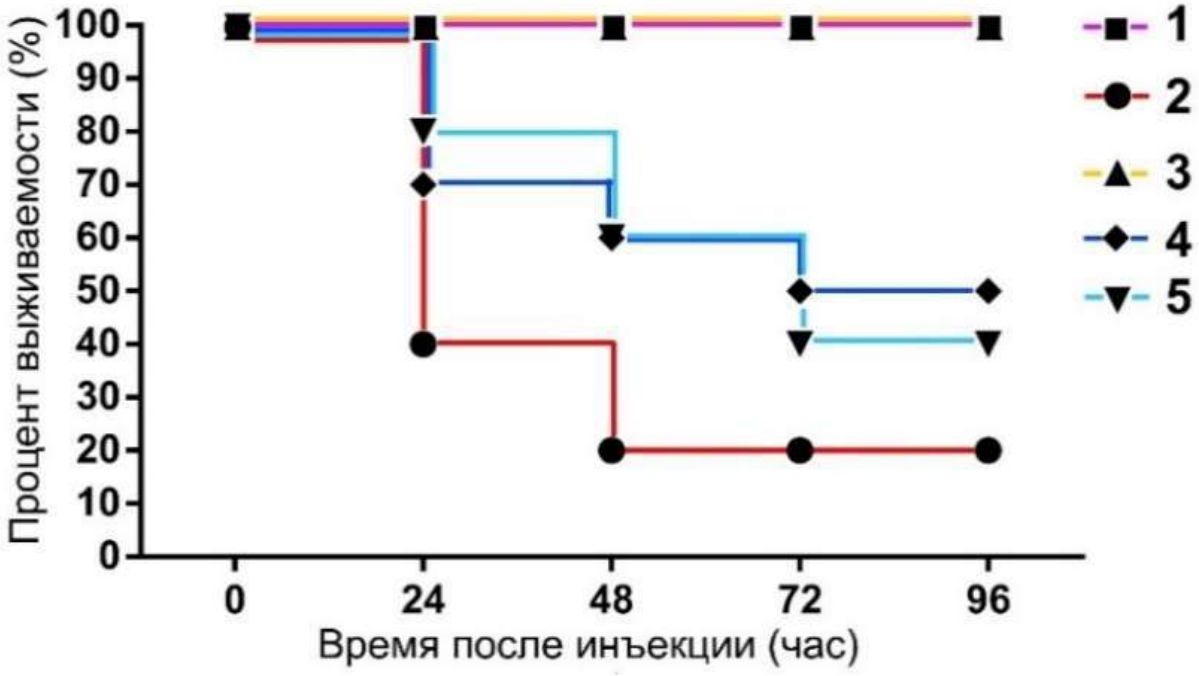
Полученные результаты (Bakiyev, 2023) являются первым в мировой практике сообщением о столь высокой антибактериальной активности эндолизинов OBPgp279, LysPA26 и Gp110 в отношении представителей рода *Aeromonas*. До настоящего времени единственным описанным ферментом с доказанной эффективностью против *Aeromonas hydrophila* являлся эндолизин PlyD4, кодируемый профагом phAhD4, однако его полноценная литическая активность достигалась исключительно в присутствии ЭДТА (Wang, 2022).

Вопрос исключения ЭДТА из состава терапевтических препаратов имеет критическое значение для промышленного рыбоводства. Известно, что ЭДТА обладает токсичностью и ее применение в открытых или замкнутых системах аквакультуры может повлечь негативные последствия для физиологического состояния рыб и экологического благополучия водной среды (Hagiwara, 2006). Тот факт, что исследованные нами эндолизины проявляют высокую самостоятельную активность против клеток аэромонад в экспоненциальной фазе роста без участия хелаторов, открывает новые возможности для создания безопасных ветеринарных средств. Данное обстоятельство стало определяющим фактором для планирования последующих *in vivo* испытаний: при переходе к экспериментам на модели тиляпий было решено использовать исключительно препараты эндолизинов, полностью исключив применение ЭДТА из протокола терапии.

5.6.1 Анализ антибактериальной активности на модели тиляпии

Помимо осетровых рыб, также наиболее культивируемыми в аквакультуре видами являются представители рода *Oreochromis* (FAO, 2020; FAO, 2021). В Казахстане успешно культивируют голубую тиляпию (*Oreochromis aureus*), нильскую тиляпию (*Oreochromis niloticus*) и мозамбикскую тиляпию (*Oreochromis mossambicus*), а также их гибриды (Mamilov, 2021; Moldagalieva, 2021). В этой связи *in vivo* исследования антибактериальной активности эндолизинов проводились на особях тиляпий.

Результаты, полученные *in vitro*, были подтверждены результатами анализов *in vivo*, поскольку выживаемость инфицированных *Oreochromis niloticus* была выше при введении инъекций особям *Oreochromis niloticus* эндолизина Gp110, по сравнению с эндолизинами OBPgp279 и LysPA26 (рисунок 87).

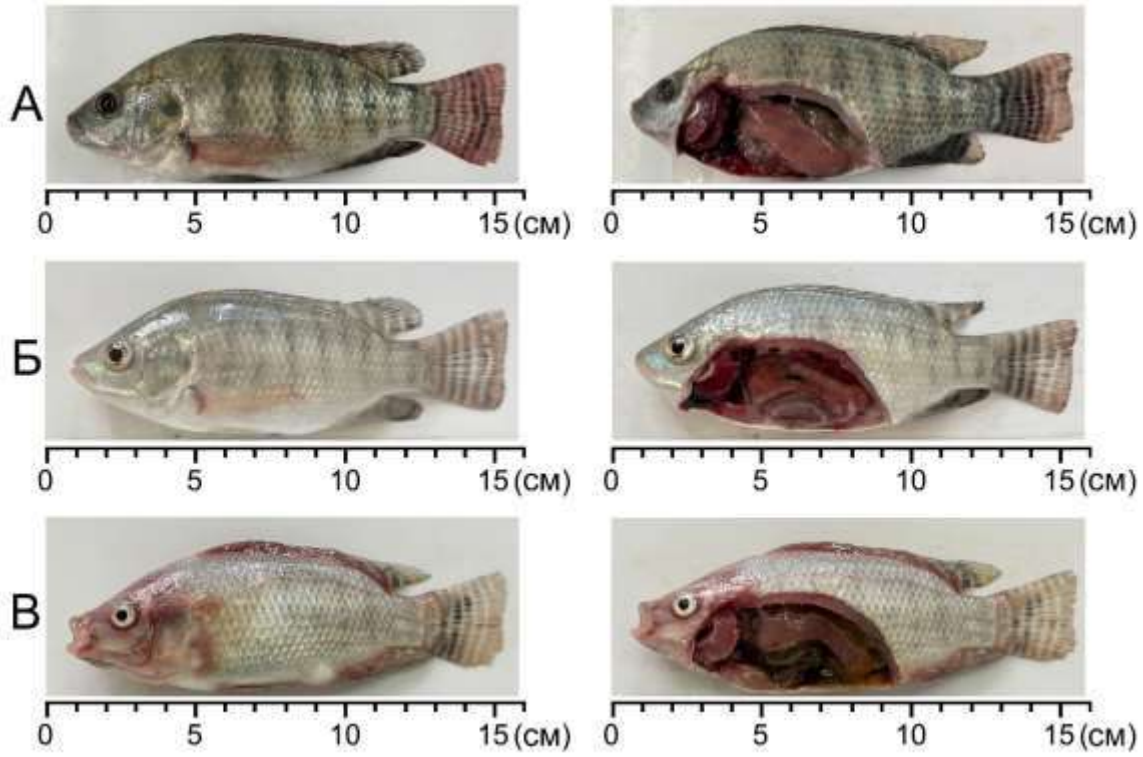


Группы рыб: 1 группа «PBS» - рыбы, которым вводили PBS без заражения; 2 группа «*Aeromonas hydrophila* AB005» – рыбы, инфицированные бактерией (10^7 КОЕ/мл); 3 группа «Gp110» - рыбы, инфицированные бактерией и эндолизином Gp110 (150 мкг/рыбу); 4 группа «LysPA26» - рыбы, инфицированные бактерией и эндолизином LysPA26 (150 мкг/рыбу); 5 группа «OBPgp279» - рыбы, инфицированные бактерией и эндолизином OBPgp279 (150 мкг/рыбу).

Рисунок 87 – Антибактериальная эффективность эндолизинов на модели *Oreochromis niloticus* (Bakiyev, 2023)

Завершающим и наиболее критическим этапом исследования стала проверка биологической эффективности рекомбинантных эндолизинов в условиях живого организма. Испытания проводились на особях нильской тиляпии (*Oreochromis niloticus*), которые подвергались экспериментальному заражению высоковирулентным штаммом *Aeromonas hydrophila* AB005. Для моделирования острой инфекции использовалась инъекционная доза 10^7 КОЕ/мл, вводимая внутрибрюшинно. Данная концентрация патогена в контрольной группе вызывала стремительное развитие заболевания с летальностью 80% в течение 96 часов.

Клиническая картина у инфицированных особей характеризовалась классическими признаками геморрагической септицемии: наблюдались выраженная депигментация кожных покровов, вздутие брюшной полости (асцит) и обширные кожные кровоизлияния, локализованные преимущественно у оснований плавников и жаберных крышек. Патологоанатомическое вскрытие выявило массивные внутренние кровоизлияния в паренхиматозных органах и выраженную ишемию жаберного аппарата (рисунок 88А).



А) контрольная рыба; Б) рыба инфицированная обработанным эндолизином *Aeromonas hydrophila*; В) рыба, инфицированная *Aeromonas hydrophila*.

Рисунок 88 – Терапевтический эффект эндолизина Gp110 на модели *Oreochromis niloticus* (Bakiyev, 2023)

Результаты терапии продемонстрировали исключительный потенциал эндолизина Gp110. Внутрибрюшинное введение препарата в дозировке 150 мкг на одну особь приводило к статистически значимому росту выживаемости (рисунок 87). Экспериментально доказано, что даже однократная инъекция Gp110 способна обеспечить 100% выживаемость рыб в течение всего периода наблюдения (96 часов). Более того, у особей опытной группы, получавших Gp110, отмечалось значительное улучшение состояния внутренних органов и практически полное исчезновение патологических признаков инфекции (рисунок 88Б), что подтверждает выраженное защитное и протекторное действие данного фермента.

Сравнительный анализ показал, что эндолизины LysPA26 и OBPgp279 также обладают терапевтическим эффектом, однако их эффективность существенно уступает лидерному кандидату. Выживаемость инфицированных рыб при использовании LysPA26 составила 50%, а при использовании OBPgp279 – 40%. Это свидетельствует о том, что хотя данные ферменты способны сдерживать развитие инфекции, их каталитической активности в условиях целостного организма недостаточно для полной эрадикации патогена при выбранной схеме дозирования.

Важным результатом исследования стала оценка токсикологии препаратов. Группы рыб, которым вводили только очищенные эндолизины без патогена, демонстрировали 100% выживаемость, нормальное поведение и отсутствие каких-либо физиологических отклонений в течение всего эксперимента. Данный факт служит прямым доказательством безопасности применения рекомбинантных эндолизинов и отсутствия у них системной токсичности для гидробионтов (Bakiyev, 2023). Таким образом, Gp110 может рассматриваться как перспективный биопрепарат для экстренной терапии бактериальных инфекций в промышленной аквакультуре.

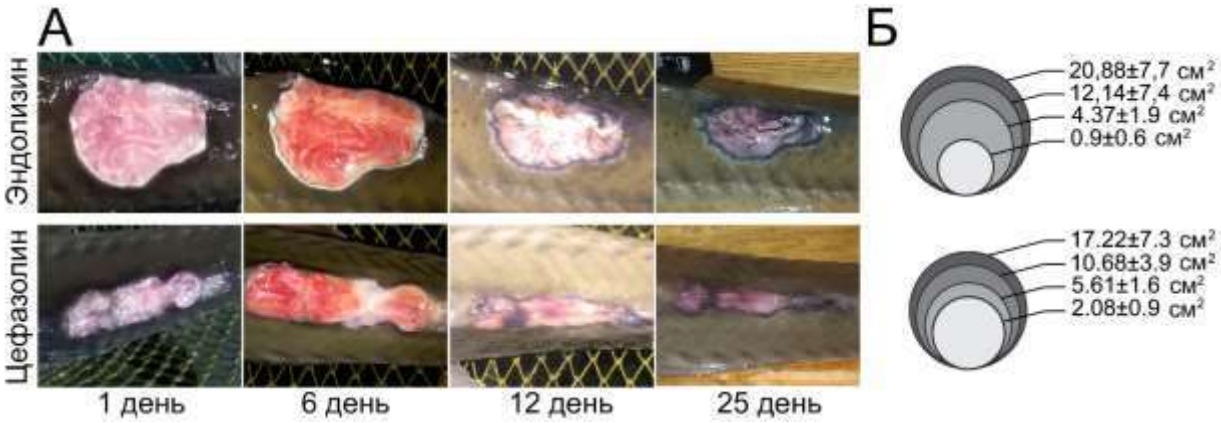
5.6.2 Результаты лечения больных осетровых рыб

В современной структуре рыбохозяйственного комплекса Республики Казахстан особое стратегическое место занимает Западно-Казахстанская область. Именно здесь функционирует ведущее предприятие отрасли — полносистемный осетровый комплекс ТОО «Учебно-научный комплекс опытно-промышленного производства аквакультуры» (г. Уральск), который на сегодняшний день является держателем самого крупного маточного поголовья осетровых рыб в стране. Однако в последние годы интенсификация производства привела к тому, что среди культивируемых особей сибирского осетра (*Acipenser baerii*) стали регулярно регистрироваться вспышки инфекционных заболеваний, сопровождающиеся классической клинической картиной бактериальной геморрагической септицемии и глубокими некротическими изъязвлениями кожных покровов (Sergaliev, 2021; Nurzhanova, 2021).

Сходная симптоматика, выражающаяся в появлении петехиальных кровоизлияний и язвенных дефектов, проникающих через дерму глубоко в мышечные слои, ранее детально описывалась у таких видов, как сазан (*Cyprinus carpio L.*), радужная форель (*Oncorhynchus mykiss*) и большеротый окунь (*Micropterus salmoides*), при их инфицировании патогенными штаммами *Aeromonas hydrophila*. Важно подчеркнуть, что тяжесть данных клинических признаков и скорость прогрессирования некроза тканей значительно возрастают в те периоды, когда рыба подвергается воздействию технологических или экологических стресс-факторов (Huizinga, 1979; Kozińska, 2012). Несмотря на то, что механизмы заживления тканей у гидробионтов изучались достаточно активно, подавляющее большинство работ основывалось на анализе регенерации при искусственно смоделированных механических ранах или хирургических повреждениях (Roy, 2019; Sveen, 2020; Yun, 2021). В то же время вопрос о том, как специфические фаговые эндолизины влияют на процессы восстановления кожных покровов при язвах, вызванных непосредственной деятельностью патогенных микроорганизмов, до настоящего времени оставался изученным в крайне недостаточной степени.

В рамках данного исследования для изучения процессов репаративной регенерации использовались особи сибирского осетра, естественно пораженные

аэромонозом в условиях рыбоводного хозяйства (Bakiyev, 2022), со средней степенью тяжести патологического процесса. В качестве основного терапевтического агента был выбран рекомбинантный эндолизин Gp110, так как данный фермент продемонстрировал статистически значимое превосходство по уровню литической активности как в экспериментах *in vitro*, так и в условиях *in vivo* в отношении штаммов *Aeromonas hydrophila* по сравнению с другими тестируемыми лизинами. Репрезентативные визуальные данные, подтверждающие прогрессивное уменьшение площади язвенных поражений в опытной группе, зафиксированы на рисунке 89.



А) репрезентативные изображения уменьшения площади язв во времени; Б) динамика уменьшения средней площади ран.

Рисунок 89 - Влияние внутримышечной инъекции Gp110 на процесс заживления ран у *Acipenser baerii*, естественным образом пораженных аэромонозом (Bakiyev, 2022)

Анализ динамики выздоровления в первой экспериментальной группе (Gp110) показал, что, несмотря на критическую глубину первичных ран, достигавших мышечного слоя и сопровождавшихся выраженным клеточным некрозом, процессы формирования грануляционной ткани и активной эпителизации дефектных участков инициировались уже через 12 дней после первой инъекции препарата. Количественные показатели заживления ран у рыб, прошедших терапию Gp110, составили 41,8% уже на 6-й день эксперимента, возросли до 79% к 12-му дню и достигли практически полной регенерации – 95,7% – к 25-му дню наблюдения. Сравнительный анализ показал, что эффект применения стандартного антибиотика цефазолина был сопоставим по финальным показателям (около 96% заживления), однако в группе с антибиотикотерапией была отмечена гибель одной особи, тогда как в группе, получавшей Gp110, была зафиксирована стопроцентная выживаемость. В то же время все пять особей *Acipenser baerii* из контрольной группы погибли в срок менее 18 суток с момента начала эксперимента вследствие необратимого развития септического процесса (Bakiyev, 2023).

Современная аквакультура остро нуждается в успешных профилактических мерах и высокоэффективных протоколах лечения для минимизации рисков, связанных с инфекционными заболеваниями. Это особенно актуально для сегмента осетроводства, где эксплуатационные затраты на содержание рыбы чрезвычайно высоки, а период достижения половой зрелости занимает длительное время (Knapp, 2006). Бактериальные патогены остаются фундаментальной причиной смертности этих ценных видов рыб (Bakiyev, 2022; Nurzhanova, 2021; Ginayatov, 2016), а в условиях глобального роста мультирезистентности микроорганизмов поиск альтернативных терапевтических подходов становится жизненно необходимым. Настоящее исследование (Bakiyev, 2023) является первым научным трудом, в котором сообщается о результатах успешных испытаний эффективности эндолизинов при заживлении язвенных поражений у *Acipenser baerii* при естественном течении аэромоноза.

Несмотря на то, что прямое использование белковых препаратов в условиях открытых водоемов может быть сопряжено с определенными технологическими сложностями, эндолизины могут доставляться в организм рыб при помощи пищевых векторов, таких как *Lactococcus lactis* или *Saccharomyces cerevisiae*, интегрированных в состав комбинированных профилактических кормов (Gaeng, 2000; Khatibi, 2014). Дальнейшая разработка специализированных систем доставки и изучение специфичности их действия позволят масштабировать применение эндолизинов в качестве инновационных агентов биологического контроля. Практическая значимость данной работы подтверждается тем, что результаты антибактериальных исследований уже внедрены и используются в производственном цикле ТОО «Учебно-научный комплекс опытно-промышленного производства аквакультуры». Таким образом, полученные результаты убедительно доказывают, что эндолизин Gp110 является крайне перспективным антимикробным кандидатом для профилактики и борьбы с патогенами рода *Aeromonas* в промышленной аквакультуре.

5.7 Конструирование и очистка химерных форм эндолизинов

5.7.1 Получение конструкций химерных форм эндолизинов

В рамках совершенствования биологических характеристик антимикробных белков, направленного на существенное увеличение их литических свойств и расширение спектра антибактериальной активности, были проведены комплексные исследования по созданию химерных конструкций эндолизинов. Современная научная литература содержит сведения о значительном количестве инновационных химерных эндолизинов, сконструированных с применением разнообразных методологических стратегий. К наиболее эффективным подходам можно отнести реконструкцию доменного состава внутри одной группы белков (Mao, 2013; Lee, 2021), рекомбинацию функциональных модулей, принадлежащих к различным

филогенетическим группам эндолизинов (Swift, 2015; Eichenseher, 2022), а также направленное дополнение структуры новыми каталитическими доменами (Eniyan, 2020; Zampara, 2020) или создание конъюгатов с природными соединениями, такими как холины (Briers, 2011). Применение подобных методов генной инженерии во всех описанных случаях приводило к заметному росту общей антибактериальной эффективности химерных молекул в сравнении с их нативными прототипами.

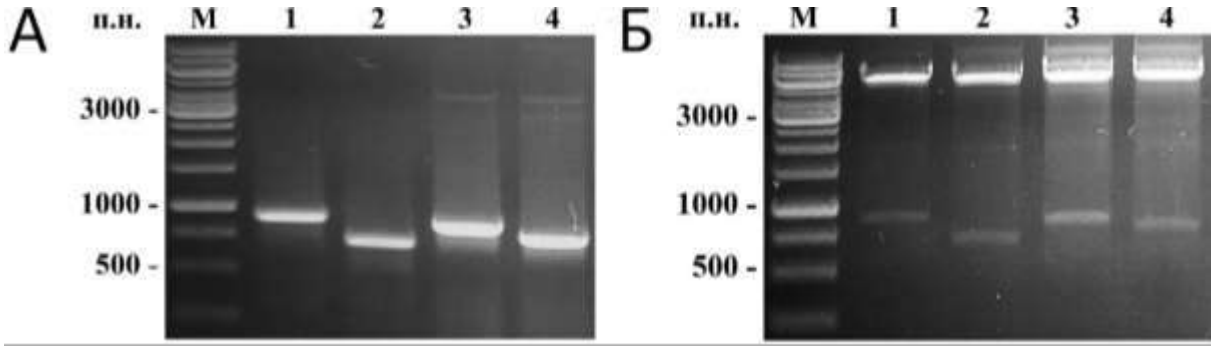
В настоящем исследовании, опираясь на потенциал родительских эндолизинов Gp110, OBPgp279 и LysPA26, был реализован ряд этапов по созданию уникальных химерных форм. Дизайн и проектирование новых литических конструкций осуществлялись с использованием передового программного обеспечения для генетического инжиниринга SnapGene, что позволило с высокой точностью моделировать будущие открытые рамки считывания. В качестве фундаментального материала для конструирования были выбраны функциональные модули родительских белков, а именно: пептидогликан-связывающие домены (CBD) эндолизинов Gp110 и OBPgp279, а также каталитические домены (EAD) LysPA26, OBPgp279 и Gp110.

В процессе молекулярного моделирования были определены расчетные размеры целевых нуклеотидных последовательностей для четырех созданных химерных эндолизинов. Конструкция, объединяющая пептидогликан-связывающий домен Gp110 и каталитический домен OBPgp279, составила 924 п.н., в то время как гибрид CBD Gp110 с каталитическим доменом LysPA26 имел размер 734 п.н. Третья комбинация, включающая CBD OBPgp279 и каталитический домен Gp110, составила 882 п.н., а четвертый вариант на основе CBD OBPgp279 и каталитического домена LysPA26 – 787 п.н. Все полученные генетические кассеты были успешно клонированы в промышленную векторную систему pET28c, общий размер которой в рекомбинантном состоянии находился в пределах 6 т.п.н. Клонирование осуществлялось путем направленной вставки по специфическим сайтам рестрикции *Nde*I и *EcoR*I с применением высокоэффективной T4 ДНК-лигазы. Последующее культивирование трансформированных клеток *Escherichia coli* на селективных средах с добавлением канамицина подтвердило результативность процесса лигирования и наличие устойчивых клонов.

Критически важным этапом верификации правильности сборки конструкций стал комплексный анализ, включающий метод полимеразной цепной реакции и контрольную рестрикцию. ПЦР-амплификация с использованием специфических пар праймеров позволила получить четкие и воспроизводимые результаты: при проведении электрофореза в агарозном геле были зафиксированы полосы, соответствующие расчетным размерам вставок в диапазоне от 0,5 до 1 т.п.н. (рисунок 90).

Рестрикционный анализ полностью детерминировал правильность архитектуры полученных рекомбинантных плазмид. При визуализации результатов ферментативного расщепления в 1% агарозном геле (Рисунок 57Б) отчетливо проявились две целевые фракции: верхняя полоса размером 5325 п.н.

представляла собой линеаризованный вектор pET28c, а нижние полосы соответствовали вставкам четырех новых химерных генов.



А) результаты ПЦР анализа конструкций химерных эндолизинов; Б) результаты рестрикционного анализа; М) ДНК маркер молекулярного размера 1 т.п.н.; 1) Gp110 (CWBD) / OBPgp279 (CD); 2) Gp110 (CWBD) / LysPA26 (CD); 3) OBPgp279 (CWBD) / Gp110 (CD); 4) OBPgp279 (CWBD) / LysPA26 (CD).

Рисунок 90 – Анализ конструкций химерных эндолизинов

В дальнейшем верифицированные рекомбинантные плазмиды были масштабированы и трансформированы в клетки экспрессионного штамма *Escherichia coli* Rosetta 2 (DE3) pLysS, что создало необходимую базу для индукции биосинтеза и получения очищенных рекомбинантных химерных белков-эндолизинов.

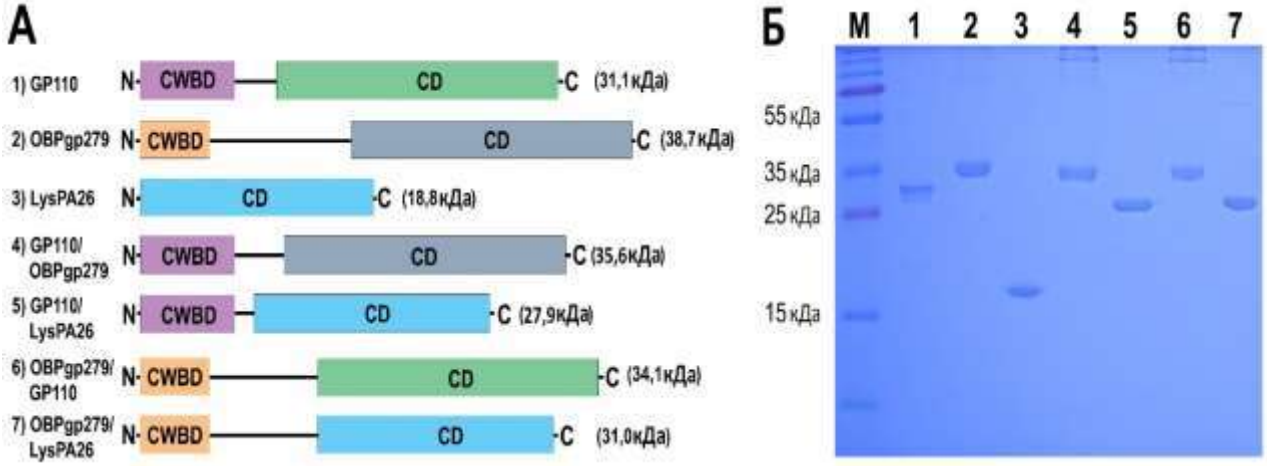
Рестрикционный анализ также полностью подтвердил правильность полученных рекомбинантных плазмид с соответствующими вставками. Так визуализацию рестрикции рекомбинантных плазмид проводили при помощи 1% агарозного геля. На гель электрофорезе (рисунок 90Б) определены две четкие полосы что представляют продукты рестрикции по сайтам рестрикции *Nde*I и *EcoR*I, где верхние полосы размером 5325 п.н. представляют непосредственно вектор pET28c и разно-размерных вставок четырех новых эндолизинов. В последующем рекомбинантные плазмиды были наработаны и трансформированы в клетки *Escherichia coli* (Rosetta 2 (DE3) pLysS) для индукции и экспрессии рекомбинантных белков-эндолизинов.

5.7.2 Очистка химерных эндолизинов и зимограмма анализ

После успешной верификации генетических конструкций, плазмиды, содержащие целевые последовательности четырех химерных эндолизинов, были трансформированы в компетентные клетки штамма *Escherichia coli* Rosetta 2 (DE3) pLysS. Данная экспрессионная система была выбрана благодаря наличию дополнительной плазмиды pLysS, обеспечивающей жесткий контроль фоновой экспрессии, и обеспечению клеток редкими тРНК, что критически важно для эффективного синтеза сложных модульных белков. Процесс индукции биосинтеза новых эндолизинов инициировался путем добавления в

культуральную среду изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозида (ИПТГ) до конечной концентрации 0,2 мМ. Для достижения оптимального фолдинга химерных молекул и минимизации образования тел включения инкубация проводилась при умеренном температурном режиме 30 ºС и интенсивном перемешивании (180 об./мин.) в течение 16 часов.

Аналогично протоколам, использованным для родительских форм, очистка химерных эндолизинов осуществлялась методом металл-аффинной хроматографии. Наличие полигистидиновых последовательностей (His-tag) в составе рекомбинантных конструкций позволило эффективно связывать целевые белки на никель-хелатной смоле с последующей элюцией в градиенте имидазола. Применение данной методики позволило достичь высокого выхода очищенных фракций, концентрация которых в финальных препаратах достигала 8 мкг/мкл, что свидетельствует о высокой эффективности выбранной системы экспрессии для данных гибридных молекул. Подробные схемы архитектуры созданных эндолизинов представлены на рисунке 91А, аминоксилотная последовательность предствалена в таблице 1.

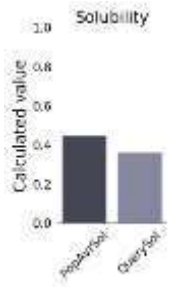
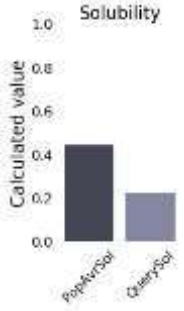


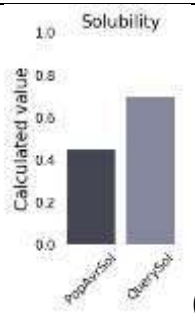
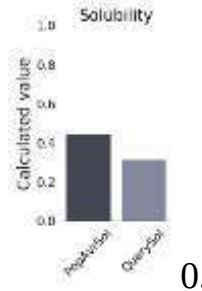
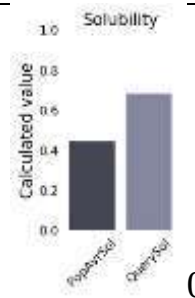
А) конструкции родительских и химерных эндолизинов; Б) ДСН-ПААГ электрофорез очищенных белков. Для окраски геля использован Кумасси синий.

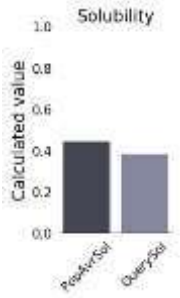
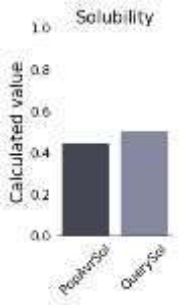
Рисунок 91 – Результаты очистки эндолизинов

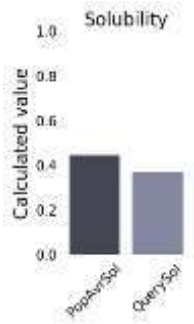
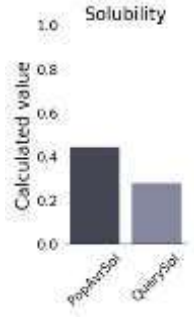
Для визуализации и подтверждения молекулярной массы полученных белков был проведен электрофорез в денатурирующих условиях (ДСН-ПААГ). Результаты электрофоретического анализа (рисунок 58Б) демонстрируют четкое разграничение миграции очищенных фракций как родительских, так и новообразованных химерных эндолизинов. Экспериментально определенные размеры химерных белков полностью соответствуют теоретически предсказанным значениям: для конструкции Gp110 (CWBD) / OBPgp279 (CD) масса составила 35,6 кДа, для Gp110 (CWBD) / LysPA26 (CD) – 27,9 кДа, для OBPgp279 (CWBD) / Gp110 (CD) – 34,1 кДа, и для комбинации OBPgp279 (CWBD) / LysPA26 (CD) – 31 кДа (таблица 22).

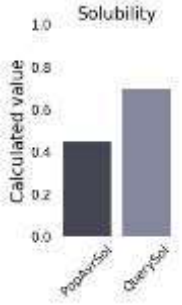
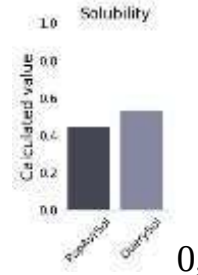
Таблица 22 - Характеристика аминокислотной последовательности исследованных эндолизинов

№	Эндолизин	Аминокислотная последовательность	Теоретическая изоэлектрическая точка (pI) / молекулярная масса (Mw)	Предсказанная нормированная растворимость
1	ORF110 (CBD+CD)	MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMMAIL KLGNRGSEVKALQQSLNKIGFSLTAD GIFGKATENAVKSVQAGAGLVIDGIA GPKTFYAIRNAGDAHQEHLTEADLVD AARELGVELASMKAVNQVESRGTGF TKTGKIKTLFERHIMYKKVTAKFGQA RANALYQLYPTLVNPNSGGYIGGDAE LERLQGAIALDEDCAYESASYGLFQI MGFNCQICGYSNAKEMFTDFLTGERA HLLAFVKFIKADANMWKALKNKNW AEFARRYNGPAYAKNQYDTKLAAAY KSFC	9,10 / 31109,41	 0,361
2	OBP (CBD+CD)	MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMKNSE KNASIIMSIQRTLASLSLYGGRIDGLFG EKCRGAIILMLNKVYPNFSTNKLPSNT YEAESVFTFLQTALAGVGLYTITIDGK WGGTSQGAIDALVKSYRQITEAERAG STLPLGLATVMSKHMSIEQLRAMLPT DRQGYAEVYIDPLNETMDIFEINTPLRI AHFMAQILHETACFKYTEELASGKAY EGRADLGNTRPGDGPLFKGRGLLQIT GRLNYVKCQVYLREKLKDPTFDITSS VTCAQQLSESPLLAALASGYFWRFIKP	8,94 / 38720,35	 0,227

		KLNETADKDDIYWVSVYVNGYAKQA NPYYPNRDKEPNHMKERVQMLAVTK KALGIV		
3	Autolysin (CBD+CD)	MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHRSTSMR TNNIDAIKEHEGLRLVAYLDSVGVWT IGYGDTGPDVVKGLTITKEEAEKRLR KRLVEFEGYVNTYVKVPLKQHQFDA LVSLVYNIGPTNFKTSTLLKKLNAGD YIGAADQFLVWNKGRVDGKLVVIKG LANRRAKERKQFLGE	9,78 / 18932,65	 0,697
4	ORF110 (CBD) + OBP (CD)	MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMMAIL KLGNRGSEVKALQQSLNKIGFSLTAD GIFGKATENAVKSVQAGAGLVIDGIA GPKTFYAIRNAGSTLPLGLATVMSKH MSIEQLRAMLPTDRQGYAEVYIDPLN ETMDIFEINTPLRIAHFMAQILHETACF KYTEELASGKAYEGRADLGNTRPGD GPLFKGRGLLQITGRLNYVKCQVYLR EKLKDPTFDITSSVTCAQQLSESPLLA ALASGYFWRFIKPKLNETADKDDIYW VSVYVNGYAKQANPYYPNRDKEPNH MKERVQMLAVTKKALGIV	9,15 / 33556,55	 0,316
5	ORF110 (CBD) + Autolysin (CD)	MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMMAIL KLGNRGSEVKALQQSLNKIGFSLTAD GIFGKATENAVKSVQAGAGLVIDGIA GPKTFYAIRNAGSTSMRTNNIDAIKEH EGLRLVAYLDSVGVWTIGYGDTGPD VVKGLTITKEEAEKRLRKRLVEFEGY VNTYVKVPLKQHQFDALVSLVYNIGP	9,81 / 25838,68	 0,683

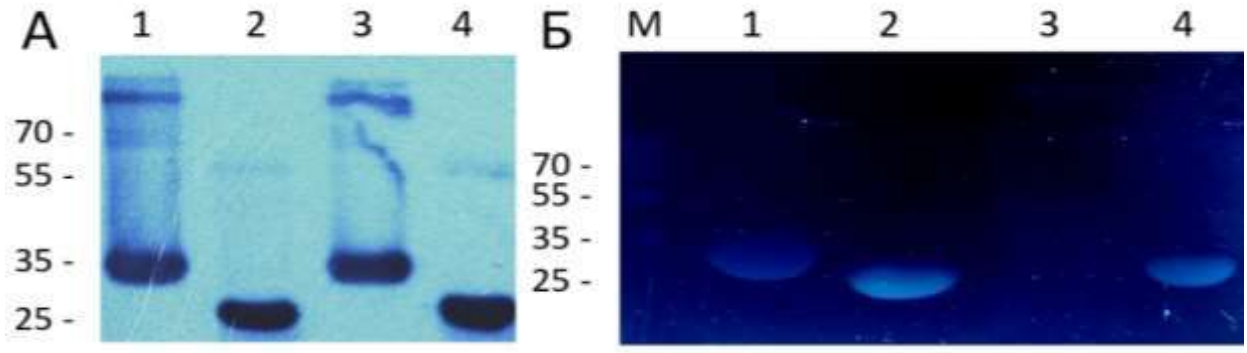
		TNFKTSTLLKKLNAGDYIGAADQFLV WNKGRVDGKLVVIKGLANRRAKERK QFLGE		
6	OBP (CBD) ORF110 (CD)	MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMKNSE KNASIIMSIQRTLASLSLYGGRIDGLFG EKCRGAIILMLNKVYPNFSTNKLPSNT YEAESVFTFLQTALAGVGLYTITIDGK WGGTSQGAIDALVKSYRQITEAERAG SELASMKAVNQVESRGTGFTKTGKIK TLFERHIMYKKVTAKFGQARANALY QLYPTLVNPNSGGYIGGDAELERLQG AIALDEDCAYESASYGLFQIMGFNCQI CGYSNAKEMFTDFLTGERAHLLAFVK FIKADANMWKALKNKNWAEFARRY NGPAYAKNQYDTKLAAAYKSFC	9,31 / 34088,86	 0,384
7	OBP (CBD) Autolysin (CD)	MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMKNSE KNASIIMSIQRTLASLSLYGGRIDGLFG EKCRGAIILMLNKVYPNFSTNKLPSNT YEAESVFTFLQTALAGVGLYTITIDGK WGGTSQGAIDALVKSYRQITEAERAG STSMRTNNIDAIKEHEGLRLVAYLDS VGVWTIGYGDTGPDVVKGLTITKEEA EKRLRKRLVEFEGYVNTYVKVPLKQ HQFDALVSLVYNIGPTNFKTSTLLKKL NAGDYIGAADQFLVWNKGRVDGKLV VIKGLANRRAKERKQFLGE	9,58 / 31002,49	 0,505

8	ORF110 (CBD) + EGFP (CD)	MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMMAIL KLGNRGSEVKALQQSLNKIGFSLTAD GIFGKATENAVKSVQAGAGLVIDGIA GPKTFYAIGSMVSKGEELFTGVVPILV ELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGK LTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLTYGV QCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYV QERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTL VNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYN SHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIE DGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDN HYLSTQSALSKDPNEKRDHMVLLEFV TAAGITLGMDELYK	6,46 / 35912,73	 0,372
9	OBP (CBD) + EGFP (CD)	MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMKNSE KNASIIMSIQRTLASLSLYGGRIDGLFG EKCRGAIILMLNKVYPNFSTNKLPSNT YEAESVFTFLQTALAGVGLYTITIDGK WGGTSQGAIDALVKSYRQITEAERAG SMVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNG HKFSVSGEGEGDATYGKLTLKFICTT GKLPVPWPTLVTTLTYGVQCFSRYPD HMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKD DGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGI DFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMA DKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLAD HYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSA LSKDPNEKRDHMVLLEFVTAAGITLG MDELYK	6,46 / 41417,91	 0,283

10	OBP (CD) only	MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHRSTSMR TNNIDAIKEHEGLRLVAYLDSVGVWT IGYGDTGPDVVKGLTITKEEAEKRLR KRLVEFEGYVNTYVKVPLKQHQFDA LVSLVYNIGPTNFKTSTLLKKLNAGD YIGAADQFLVWNKGRVDGKLVVIKG LANRRAKERKQFLGE	9,78 / 18932,65	 0,697
11	ORF110 (CD) only	MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHRSELAS MKAVNQVESRGTGFTKTGKIKTLFER HIMYKKVTAKFGQARANALYQLYPT LVNPNSGGYIGGDAELERLQGAIALD EDCAYESASYGLFQIMGFNCQICGYS NAKEMFTDFLTGERAHLLAFVKFIKA DANMWKALKNKNWAEFARRYNGPA YAKNQYDTKLAAAYKSFC	9,37 / 22019,02	 0,534

Важной особенностью, выявленной в ходе анализа, стала различная растворимость полученных продуктов. Примечательно, что химерный эндолизин OBPgp279 (CWBD) / Gp110 (CD) с массой 34,1 кДа проявил признаки агрегации и низкой растворимости. Основная фракция данного белка была локализована в клеточных мембранах и нерастворимых компонентах лизата, в то время как в растворимой фракции наблюдались лишь минорные полосы в районе предполагаемой молекулярной массы (рисунок 58). Это явление может быть связано со спецификой взаимодействия доменов различного происхождения, влияющих на кинетику сворачивания полипептидной цепи. Тем не менее, наличие детектируемых количеств белка в растворимой фазе позволило провести предварительную оценку его литического потенциала наряду с другими, более стабильными химерными конструкциями.

Дополнительная идентификация полученных рекомбинантных химерных эндолизинов была осуществлена методом вестерн-блот анализа с применением специфических анти-His антител. Результаты иммунодетекции белков наглядно представлены на рисунке 92А. Аналогично данным, полученным в ходе ДСН-ПААГ электрофореза, на проявочной пленке зафиксированы четкие и изолированные полосы, локализация которых строго соответствует расчетной молекулярной массе исследуемых эндолизинов в диапазоне от 25 до 40 кДа. Также в ходе анализа была документально подтверждена способность химерных молекул к димеризации, что ранее наблюдалось и для их родительских (нативных) форм.



А) вестерн-блот анализ очищенных химерных белков; Б) анализ зимограммы с использованием пептидогликана *Aeromonas hydrophila* AB005 в качестве субстрата; М) маркер молекулярной массы белков (кДа); 1) очищенный химерный эндолизин Gp110 (CWBD) / OBPgp279 (CD); 2) очищенный химерный эндолизин Gp110 (CWBD) / LysPA26 (CD); 3) очищенный химерный эндолизин OBPgp279 (CWBD) / Gp110 (CD); 4) очищенный химерный эндолизин OBPgp279 (CWBD) / LysPA26 (CD).

Рисунок 92 – Анализ пептидогликан-гидролазной активности химерных эндолизинов

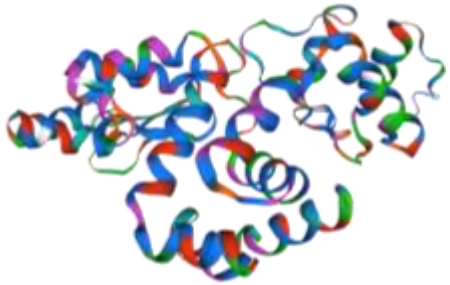
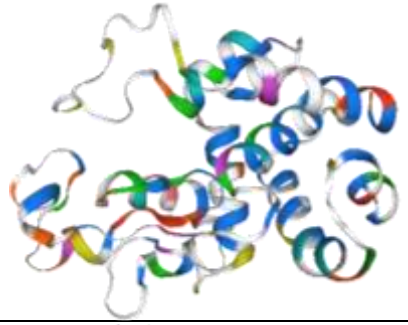
Первичная верификация каталитических свойств синтезированных ферментов проводилась с использованием метода зимографии. В качестве субстрата для определения активности в структуру полиакриламидного геля были интегрированы инактивированные клетки (препарат пептидогликана) бактерии *Aeromonas hydrophila* (рисунок 92Б). Появление зон просветления в местах локализации белков позволило подтвердить сохранение пептидогликан-гидролазной активности у всех созданных химерных конструкций в отношении целевого патогена.

Детальный анализ полученных зимограмм с использованием в качестве субстрата препарата пептидогликана штамма *Aeromonas hydrophila* AB005 позволил провести объективную оценку ферментативного потенциала сконструированных белков в сравнении с исходными родительскими формами. Установлено, что химерные эндолизины характеризуются существенно более высоким уровнем пептидогликан-гидролазной активности, за исключением нативного эндолизина Gp110, который сохранил свои лидерские позиции. Наиболее выраженная каталитическая способность, визуализированная в виде интенсивной и четко очерченной зоны лизиса субстрата, была зафиксирована для химерной конструкции (2) Gp110 (CWBD) / LysPA26 (CD) с молекулярной массой 27,9 кДа. Столь высокая активность данного гибрида, вероятно, обусловлена синергизмом между высокоспецифичным связывающим доменом Gp110 и каталитической мощностью домена LysPA26, что обеспечивает эффективную деградацию клеточной стенки патогена.

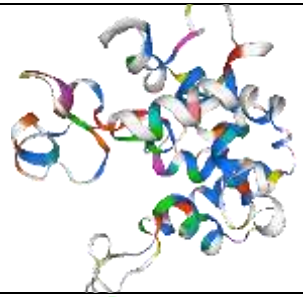
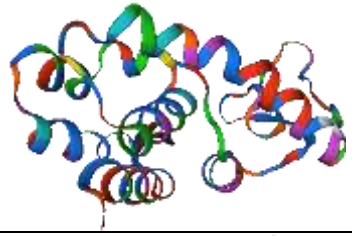
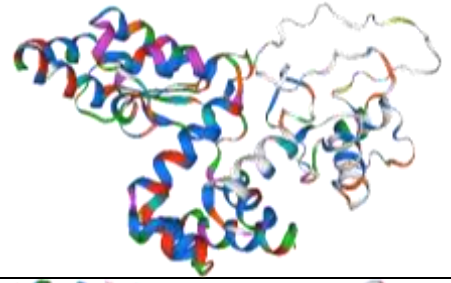
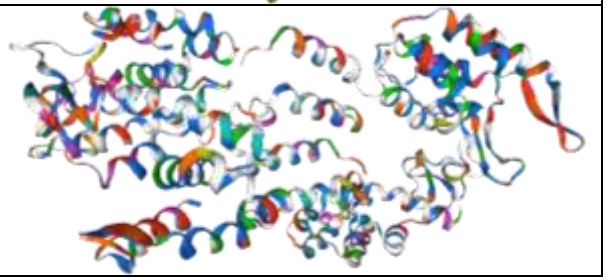
Для более глубокого понимания взаимосвязи между структурой и функциональностью белков был проведен комплексный анализ аминокислотных последовательностей всех исследуемых эндолизинов (результаты систематизированы в таблице 23). Оценка ключевых физико-химических характеристик осуществлялась с применением специализированного биоинформационного сервиса PepCalc.com. В ходе сравнительного анализа было установлено, что наибольшей молекулярной массой среди химерных конструкций обладает белок Gp110 (CWBD) / OBPgp279 (CD), чья масса достигает 35,6 кДа. Данный показатель коррелирует с теоретическими расчетами, проведенными на этапе проектирования нуклеотидных последовательностей.

Особое внимание в работе было уделено прогностическому и экспериментальному определению растворимости полученных рекомбинантных продуктов. Согласно данным компьютерного анализа и результатам практической экспрессии, три химерных эндолизина были классифицированы как хорошо растворимые протеины, что обеспечило их эффективную наработку в цитоплазматической фракции *Escherichia coli*. Однако эндолизин OBPgp279 (CWBD) / Gp110 (CD) был идентифицирован как плохо растворимый белок. Данная характеристика нашла свое практическое подтверждение в ходе выделения: низкая гидрофильность и склонность к агрегации этой молекулы непосредственно отразились на эффективности очистки методом аффинной хроматографии, значительно снизив выход чистого фермента.

Таблица 23 - Характеристика использованных в исследовании эндолизинов

№	Название	Количество аминокислот	Молекулярная масса, кДа	Коэффициент экстинкции, $M^{-1}cm^{-1}$	Изоэлектрическая точка (pI), pH	Чистый заряд при pH 7	Расчетная растворимость	Аналоговая 3D структура белка (https://swissmodel.expasy.org/)
1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	Gp110	285	31,1	26740	9,31	7,8	хорошая растворимость в воде	
2	OBPgp279	348	38,7	38830	9,06	6,8	хорошая растворимость в воде	
3	LysPA26	169	18,8	19060	10,28	9,9	хорошая растворимость в воде	

продолжение таблицы 23

1	2	3	4	5	6	7	8	9
4	Gp110 (CWBD) / OBPgp279 (CD)	323	35,6	28020	8,25	3,1	хорошая растворимость в воде	
5	Gp110 (CWBD) / LysPA26 (CD)	256	27,9	20340	9,93	8,1	хорошая растворимость в воде	
6	OBPgp279 (CWBD) / Gp110 (CD)	309	34,1	37550	9,57	11,6	плохая растворимость в воде	
7	OBPgp279 (CWBD) / LysPA26 (CD)	281	31,0	31150	10,02	11,8	хорошая растворимость в воде	

Эти различия в физико-химическом поведении химер подчеркивают критическую важность правильного пространственного сочетания доменов при дизайне рекомбинантных антибактериальных агентов, так как нарушение растворимости может существенно ограничивать их биодоступность и технологический потенциал.

Проблема низкой растворимости рекомбинантных протеинов, и в частности эндолизинов, является широко распространенным явлением в современной биотехнологии (O'Flaherty, 2005). В научной литературе в качестве основных детерминант, ограничивающих выход целевого продукта в растворимой фазе, выделяют неоптимизированные параметры культивирования бактериальных продуцентов, неверно подобранные условия индукции экспрессии, а также специфические особенности самой архитектуры эндолизина (Tham, 2020). Кроме того, существенное влияние на стабильность молекул оказывает ионная сила и компонентный состав лизисных и очистительных буферных систем (Balaban, 2022).

В рамках нашего исследования был проведен комплекс мероприятий по оптимизации данных параметров, однако в отношении химерной конструкции OBPgp279 (CWBD) / Gp110 (CD) эти меры не привели к значимому улучшению показателей растворимости. Это позволяет предположить, что в данном конкретном случае решающим фактором выступила именно доменная архитектура химеры: вероятно, сочетание связывающего домена OBPgp279 с каталитическим доменом Gp110 приводит к нарушению нативного фолдинга или экспонированию гидрофобных участков, что провоцирует агрегацию белка и его уход в нерастворимую фракцию (тела включения) независимо от внешних условий среды.

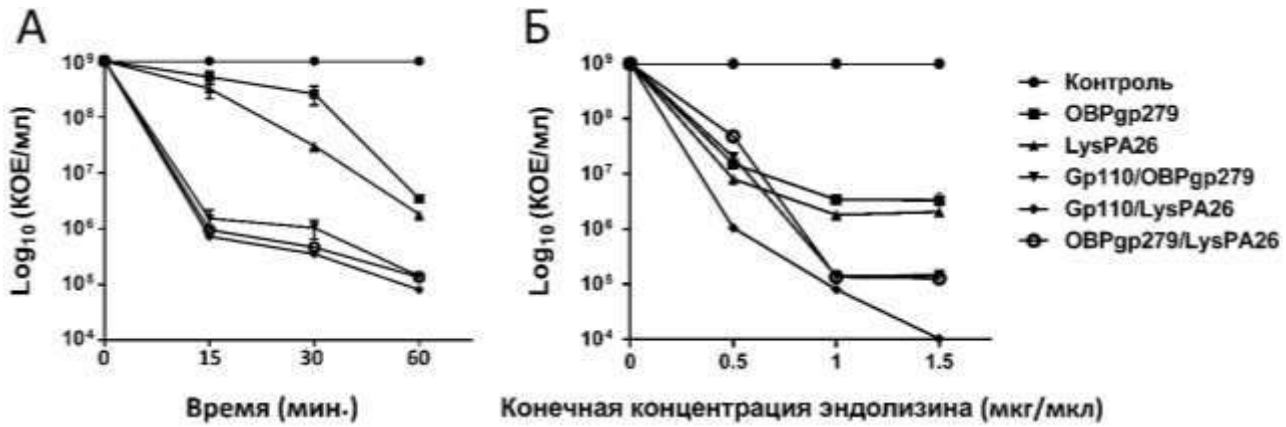
5.8 Антибактериальная активность химерных форм эндолизинов *in vitro* и *in vivo*

5.8.1 Определение активности химерных форм эндолизинов в условиях *in vitro*

Первичный качественный анализ, проведенный методом зимографии, позволил достоверно верифицировать наличие специфической ферментативной активности у всех сконструированных химерных эндолизинов в отношении целевого бактериального патогена *Aeromonas hydrophila*. Однако для полной характеристики потенциала новых антимикробных агентов критически важным этапом стало определение временной зависимости их бактерицидного действия. Изучение кинетики лизиса позволяет оценить скорость взаимодействия фермента с клеточной стенкой и определить временной интервал, необходимый для достижения терапевтически значимого эффекта.

В ходе эксперимента по определению времязависимой антибактериальной активности было установлено, что химерные эндолизины обладают ускоренным механизмом действия по сравнению с исходными родительскими протеинами. Как наглядно продемонстрировано на представленных графиках

(рисунок 93), уже по истечении первых 15 минут экспозиции наблюдается статистически значимое преимущество химерных конструкций. В данный временной отрезок эффективность гибридных ферментов существенно превосходила показатели нативных форм, что выражалось в более резком снижении оптической плотности бактериальной суспензии и сокращении числа жизнеспособных клеток.



А) зависимая от времени кривая активности эндолизинов в концентрации 1 мкг/мкл против экспоненциально растущих клеток *Aeromonas hydrophila* AB005; Б) бактерицидный эффект при различных концентрациях (мкг/мкл) эндолизинов OBPgp279, LysPA26, Gp110 (CWBD) / OBPgp279 (CD), Gp110 (CWBD) / LysPA26 (CD), OBPgp279 (CWBD) / LysPA26 (CD) против экспоненциально растущих клеток *Aeromonas hydrophila* AB005. Столбики погрешностей представляют собой стандартные отклонения трех независимых повторов.

Рисунок 93 - Антибактериальная эффективность эндолизинов *in vitro*

Количественная оценка эффективности антимикробного действия показала неоспоримое преимущество сконструированных химерных белков над их нативными аналогами. Так, при анализе ранней фазы взаимодействия (15 минут инкубации) снижение титра бактерий *Aeromonas hydrophila* под воздействием родительских эндолизинов LysPA26 и OBPgp279 было минимальным и не превышало 1 логарифмической единицы. В то же время химерные конструкции продемонстрировали высокую скорость атаки: снижение численности клеток для Gp110 (CWBD) / OBPgp279 (CD), Gp110 (CWBD) / LysPA26 (CD) и OBPgp279 (CWBD) / LysPA26 (CD) составило 2,85±0,2, 3,19±0,25 и 3,04±0,18 log-единиц соответственно (Рисунок 60А).

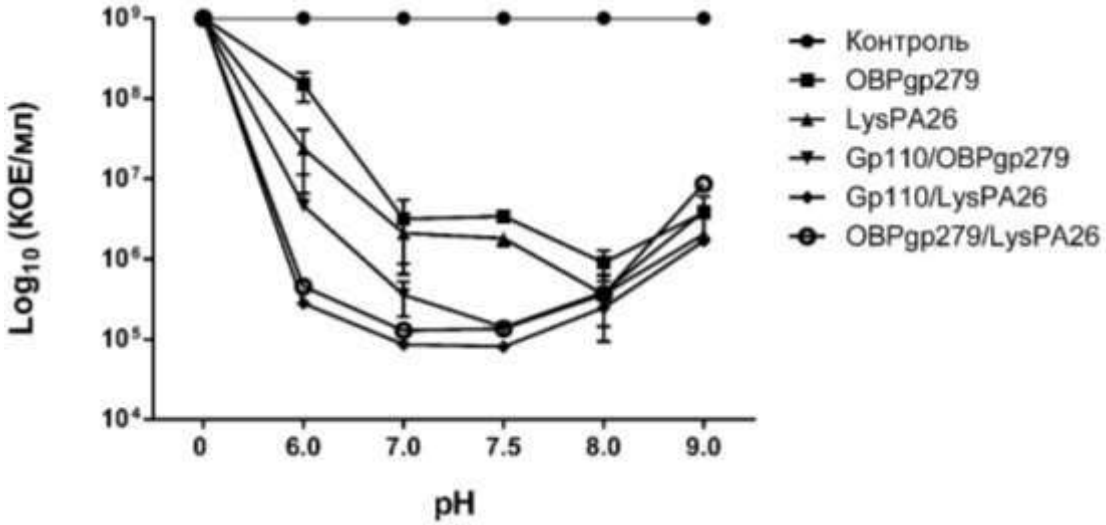
Динамика процесса к 60-й минуте инкубации подтвердила устойчивое превосходство гибридных молекул. Под воздействием химерных эндолизинов итоговое снижение количества жизнеспособных клеток *Aeromonas hydrophila* достигло уровней 3,85±0,04, 4,09±0,08 и 3,9±0,21 log-единиц для вышеуказанных конструкций. Для сравнения, родительские формы LysPA26 и OBPgp279 за аналогичный период обеспечили снижение лишь на 2,46±0,06 и

2,74±0,08 логарифмических единиц. Столь значительная разница в эффективности подчеркивает, что рекомбинация доменов позволила создать белки с более высокой удельной активностью.

Важным этапом работы стало определение зависимости бактерицидного эффекта от концентрации фермента. В ходе испытаний использовались дозировки 0,5, 1,0 и 1,5 мкг/мкл. Аналогично результатам кинетических тестов, лидером по эффективности во всем диапазоне концентраций стал химерный белок Gp110 (CWBD) / LysPA26 (CD). Примечательно, что даже при минимальной дозе 0,5 мкг/мкл этот эндолизин обеспечивал падение титра *Aeromonas hydrophila* на 3 логарифмические единицы, что свидетельствует о его исключительном антибактериальном потенциале.

При анализе зависимости «концентрация-эффект» было замечено, что для большинства химер и их родительских форм увеличение дозировки с 1,0 до 1,5 мкг/мкл не приводило к существенному росту активности. Единственным исключением стал химерный эндолизин Gp110 (CWBD) / LysPA26 (CD), где повышение концентрации до 1,5 мкг/мкл позволило дополнительно снизить количество клеток еще на 1 логарифмическую единицу. На основании полученных данных, а также опираясь на международный опыт аналогичных исследований (Briers, 2014; Loc, 2021; Khan, 2021; Wang, 2021; Shen, 2022), для последующих экспериментов была выбрана стандартная концентрация 1 мкг/мкл и время экспозиции 60 минут.

Параллельно проводилась оптимизация физико-химических условий протекания реакции, в частности значения водородного показателя (pH) (рисунок 94).



Столбики погрешностей представляют собой стандартные отклонения трех независимых повторов.

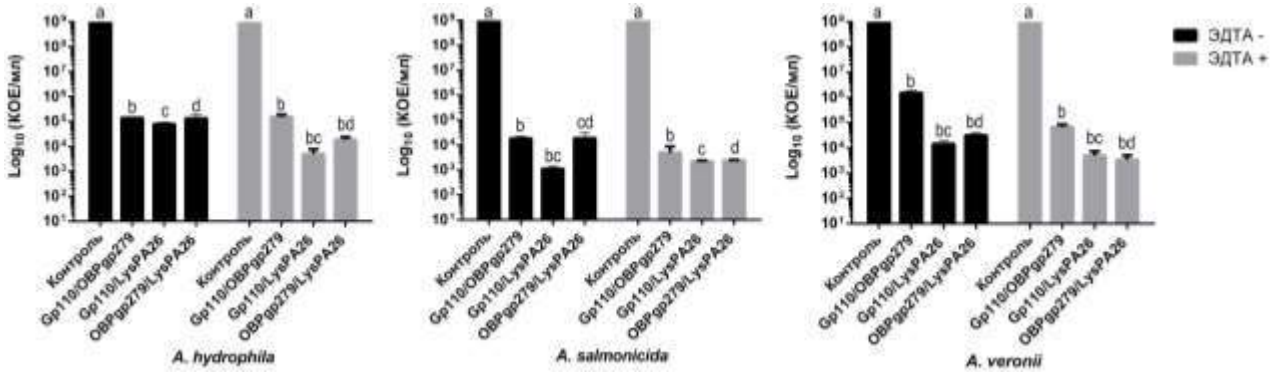
Рисунок 94 – Влияние pH среды на антибактериальную активность эндолизинов

Установлено, что химерные эндолизины проявляют максимальную эффективность в отношении *Aeromonas hydrophila* в нейтральном и слабощелочном диапазоне – при pH 7,0–7,5. В то же время родительские формы сохраняли активность в более широком, но менее выраженном интервале pH 7,0–8,0. Учитывая физиологические особенности водной среды в аквакультуре и полученные экспериментальные данные, все последующие испытания *in vitro* проводились при значении pH 7,5, что обеспечивает оптимальное функционирование ферментативных систем химерных эндолизинов.

Завершающим этапом оптимизации функциональных характеристик новых рекомбинантных белков стало определение широты их антибактериального спектра. По аналогии с ранее проведенными исследованиями родительских форм эндолизинов, химерные конструкции были протестированы на способность подавлять жизнеспособность широкой панели штаммов, ассоциированных с инфекционными заболеваниями осетровых рыб. Основной акцент был сделан на патогенах рода *Aeromonas*, которые являются доминирующими возбудителями бактериальных геморрагических септицемий в условиях промышленной аквакультуры. Проектирование химерных молекул преследовало цель не только повысить скорость лизиса, но и обеспечить более универсальное воздействие на различные серотипы и изоляты аэромонад.

Для комплексной оценки эффективности применялся многоэтапный протокол, включающий первичный скрининг-анализ и последующую верификацию результатов методом прямого подсчета колониеобразующих единиц (КОЕ/мл). Скрининг-анализ позволил оперативно выявить чувствительность различных штаммов к воздействию ферментов, в то время как количественный учет КОЕ обеспечил высокую точность в определении степени эрадикации бактериальной популяции. В результате проведенных испытаний было документально подтверждено, что сконструированные химерные эндолизины обладают значительно более выраженным воздействием на клетки бактерий рода *Aeromonas* в сравнении с исходными нативными формами.

Особо примечательно, что повышенная антибактериальная эффективность химер проявилась в отношении целого ряда специфических штаммов (рисунок 95), которые ранее демонстрировали умеренную устойчивость к воздействию родительских белков. Это свидетельствует о том, что рекомбинация доменов, в частности использование высокоадгезивных связывающих модулей в сочетании с активными каталитическими центрами, позволила преодолеть структурные барьеры клеточных стенок различных видов аэромонад. Полученные данные (рисунок 95) обосновывают преимущество использования именно химерных конструкций в качестве основы для разработки универсальных терапевтических препаратов, способных эффективно купировать вспышки аэромоноза, вызванные полиморфными бактериальными ассоциациями в рыбоводных хозяйствах.



Столбики погрешностей представляют собой стандартные отклонения трех независимых повторов. Строчные буквы (a, b, c и d) указывают на статистически значимые различия между значениями согласно тесту Тьюки при $p < 0,05$.

Рисунок 95 – Анализ антибактериальной активности химерных эндолизинов на необработанные и обработанные ЭДТА клетки бактерий рода *Aeromonas*

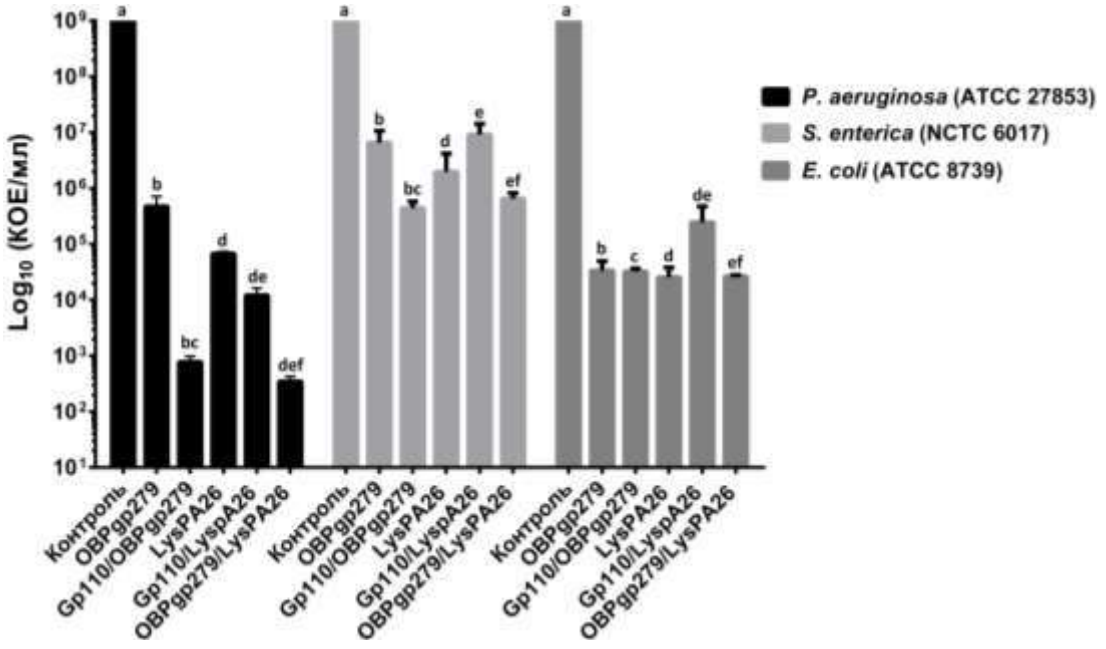
В ходе детального изучения антибактериального спектра новых рекомбинантных конструкций было установлено, что среди широкой панели исследованных представителей рода *Aeromonas* наибольшую чувствительность к воздействию химерных эндолизинов проявил вид *Aeromonas salmonicida*. Примечательно, что высокая литическая активность регистрировалась без использования вспомогательных агентов, таких как ЭДТА. В частности, заметное и статистически значимое улучшение бактерицидного действия в отношении данного патогена наблюдалось у трех химерных эндолизинов: Gp110 (CWBD) / OBPgp279 (CD), Gp110 (CWBD) / LysPA26 (CD) и OBPgp279 (CWBD) / LysPA26 (CD). Наиболее выдающиеся результаты продемонстрировала конструкция Gp110 (CWBD) / LysPA26 (CD), эффективность которой в отношении *Aeromonas salmonicida* практически в два раза превысила показатели родительских форм. При количественном подсчете КОЕ/мл снижение титра жизнеспособных клеток составило 4,73±0,09, 5,96±0,11 и 4,81±0,4 логарифмических единиц соответственно. Для сравнения, нативные родительские эндолизины OBPgp279 и LysPA26 обеспечили снижение лишь на 2,97±0,16 и 3,09±0,24 log-единиц, что подчеркивает преимущество оптимизированной доменной архитектуры химер при воздействии на клеточную стенку *Aeromonas salmonicida*.

Сравнительный анализ восприимчивости различных патогенов позволил выявить определенную иерархию резистентности. Установлено, что по сравнению с видами *Aeromonas salmonicida* и *Aeromonas veronii*, бактерия *Aeromonas hydrophila* остается менее подверженной деструктивному воздействию эндолизинов, включая их химерные формы. Напротив, две растворимые химерные конструкции - Gp110 (CWBD) / LysPA26 (CD) и OBPgp279 (CWBD) / LysPA26 (CD), - наряду с родительскими белками,

проявили стабильно высокую антибактериальную активность против *Aeromonas veronii.*

Важным аспектом исследования стало изучение возможностей усиления литического эффекта при сочетанном применении эндолизинов с хелатирующими агентами. При определении антибактериальной активности в присутствии 1 мМ ЭДТА был зафиксирован отчетливый синергетический эффект в отношении клеток *Aeromonas veronii* (Рисунок 62). Так, эффективность химерных эндолизинов Gp110 (CWBD) / OBPgp279 (CD), Gp110 (CWBD) / LysPA26 (CD) и OBPgp279 (CWBD) / LysPA26 (CD) против предварительно обработанных ЭДТА клеток увеличилась на 1,36±0,22, 0,49±0,28 и 0,99±0,27 логарифмических единиц соответственно по сравнению с образцами без предварительной обработки. Интересно отметить, что в случае с *Aeromonas hydrophila* и *Aeromonas salmonicida* использование ЭДТА оказывало лишь незначительное влияние на активность химер, что указывает на различия в организации наружной мембраны и доступности пептидогликана у этих видов.

Для окончательной верификации широты спектра действия был проведен анализ активности эндолизинов в отношении эталонных штаммов грамотрицательных бактерий других родов: *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Salmonella enterica* (NCTC 6017) и *Escherichia coli* (ATCC 8739) (рисунок 96).



Столбики погрешностей представляют собой стандартные отклонения трех независимых повторов. Строчные буквы (a, b, c, d, e, f) указывают на статистически значимые различия между значениями согласно тесту Тьюки при $p < 0,05$.

Рисунок 96 - Активность эндолизинов против экспоненциально растущих грамотрицательных штаммов бактерий

Полученные данные убедительно доказывают, что как родительские, так и химерные формы эндолизинов способны эффективно подавлять рост данных патогенов, реализуя свой бактерицидный потенциал через прямое разрушение клеточной стенки. Результаты количественного учета КОЕ/мл для контрольных и опытных групп (Рисунок 63) подтверждают универсальный характер литического действия созданных препаратов, что позиционирует их как перспективные средства биоконтроля не только в аквакультуре, но и в более широкой ветеринарной и санитарной практике.

Важнейшим результатом сравнительных испытаний стало выявление значительного улучшения антибактериальных свойств химерных конструкций в отношении грамотрицательного патогена *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). Экспериментально установлено, что совместная инкубация клеток синегнойной палочки с химерными эндолизинами приводит к радикальному снижению титра жизнеспособных бактерий. В частности, для конструкций Gp110 (CWBD) / OBPgp279 (CD), Gp110 (CWBD) / LysPA26 (CD) и OBPgp279 (CWBD) / LysPA26 (CD) падение показателя КОЕ составило 6,12±0,11, 4,93±0,16 и 6,46±0,12 log-единиц соответственно. Это существенно превосходит возможности родительских эндолизинов OBPgp279 и LysPA26, эффективность которых ограничилась значениями 3,35±0,2 и 4,17±0,04 log-единиц.

Параллельно была зафиксирована высокая активность препаратов в отношении энтеропатогенных штаммов *Salmonella enterica* (NCTC 6017) и *Escherichia coli* (ATCC 8739). Элиминация клеток варьировала в диапазонах 2–3 и 3–4,5 log-единиц соответственно, что подтверждает наличие широкого спектра действия созданных ферментов. Обобщая полученные данные, можно констатировать, что как нативные, так и химерные формы эндолизинов обладают мощным бактерицидным потенциалом против ключевых родов грамотрицательных бактерий: *Aeromonas, Pseudomonas, Escherichia* и *Salmonella*. При этом важно подчеркнуть, что чувствительность варьирует не только на уровне родов, но и внутри видов, что было наглядно продемонстрировано на примере различных представителей рода *Aeromonas*.

Анализ полученных результатов позволяет сформулировать обоснованное предположение о том, что эффективность бактерицидного воздействия напрямую детерминирована наличием и специфичностью пептидогликан-связывающего домена (CWBD). Наиболее ярко эта зависимость прослеживается на примере эндолизина LysPA26, нативная структура которого представлена исключительно каталитическим доменом. Интеграция в его структуру связывающего модуля эндолизина Gp110 позволила создать химеру, значительно превосходящую родительскую форму по антибактериальным показателям против аэромонад.

Добавление доменов клеточного связывания от Gp110 и OBPgp279 к каталитической части LysPA26 привело к резкому усилению литической активности конструкций OBPgp279 (CWBD) / LysPA26 (CD) и Gp110 (CWBD) / LysPA26 (CD) в отношении *Aeromonas hydrophila* и *Aeromonas salmonicida*. Тем не менее, отсутствие аналогичного прогресса в опытах с *Aeromonas veronii*

указывает на то, что эффективность связывания модулей CWBD имеет высокую специфичность к составу поверхностных рецепторов конкретных видов. Роль связывающего домена заключается в обеспечении направленной адсорбции фермента на клеточной стенке; так, известно, что CWBD некоторых эндолизинов (например, CD16/50L) характеризуются экстремально высоким сродством к полисахаридам клеточной оболочки (Phothichaisri, 2022).

Отсутствие активности у усеченных форм ферментов подтверждается и мировым опытом: например, каталитическая часть эндолизина Cpl-7 полностью теряет способность подавлять пневмококки в отсутствие своего связывающего домена (Bustamante, 2017). Более того, литература подтверждает, что рациональная замена или модификация CWBD, как это описано для эндолизина OBPgp279, является ключом к повышению антибактериальной активности против *Aeromonas hydrophila* (Кауысбеков, 2023).

На основании комплексного анализа результатов *in vitro* испытаний было определено, что химерный эндолизин Gp110 (CWBD) / LysPA26 (CD) является наиболее эффективным бактерицидным агентом. Благодаря оптимальному сочетанию высокой скорости лизиса, стабильности и широты спектра действия, данная конструкция была выбрана в качестве приоритетного кандидата для проведения последующих широкомасштабных исследований *in vivo* по защите рыб от высокопатогенных штаммов *Aeromonas hydrophila* AB005 и *Aeromonas salmonicida* AB001.

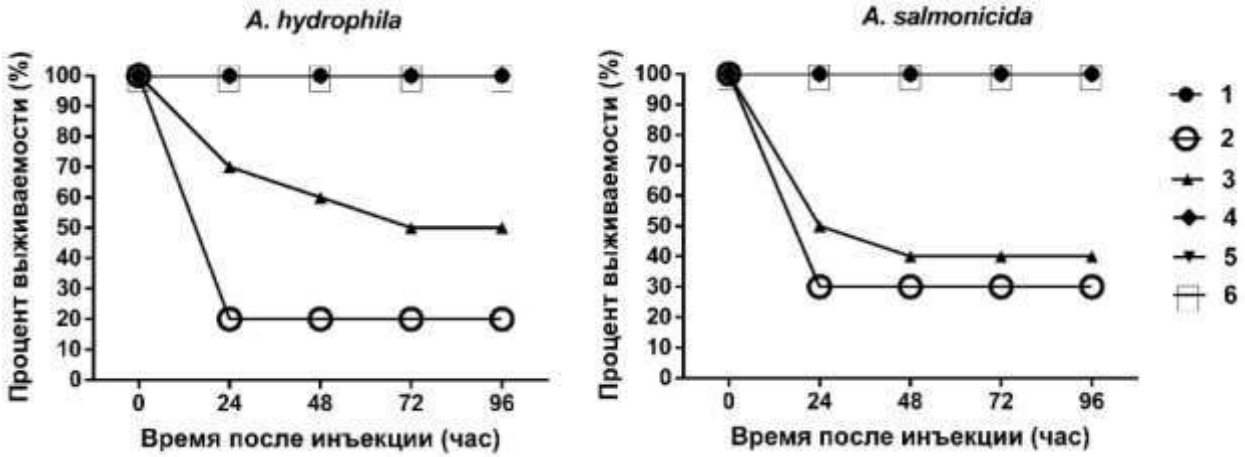
5.8.2 Определение активности химерных форм эндолизинов в условиях *in vivo*

Логическим продолжением работы после завершения лабораторного этапа стала проверка биологической активности наиболее перспективной конструкции в условиях живого организма. На основании комплекса полученных результатов *in vitro* испытаний, для проведения экспериментов *in vivo* был выбран новый химерный эндолизин, объединяющий в своей структуре высокоспецифичный пептидогликан-связывающий домен (CWBD) эндолизина Gp110 и мощный каталитический домен (CD) LysPA26.

В качестве биологической модели, по аналогии с исследованиями родительских форм, использовались особи нильской тиляпии (*Oreochromis niloticus*). Выбор данной модели обусловлен её высокой чувствительностью к аэромонадным инфекциям и репрезентативностью получаемых данных для широкого спектра пресноводных рыб. Учитывая, что химерная конструкция Gp110 (CWBD) / LysPA26 (CD) в лабораторных условиях проявила повышенную эффективность против штаммов *Aeromonas salmonicida* и *Aeromonas hydrophila*, которые ранее были идентифицированы как крайне опасные патогены для тиляпии и молоди осетровых рыб (Bakiyev, 2022; Bakiyev, 2023), именно эти бактериальные культуры были использованы в качестве факторов патогенности для моделирования инфекционного процесса.

Результаты испытаний *in vivo* убедительно подтвердили уникальные антимикробные свойства сконструированного фермента. Принудительное инфицирование рыб высоковирулентными штаммами приводило к стремительному развитию заболевания в контрольных группах, однако применение химерного эндолизина позволило полностью купировать патологический процесс. Анализ выживаемости и клинического состояния подопытных особей показал, что Gp110 (CWBD) / LysPA26 (CD) характеризуется 100% антибактериальной эффективностью против обоих протестированных патогенов – *Aeromonas hydrophila* и *Aeromonas salmonicida*.

В контрольных группах, где инфицированные особи не получали лечения, наблюдалась высокая летальность, что подтверждает патогенность выбранных изолятов. Смертность необработанных *Oreochromis niloticus* достигла 80% при инфицировании *Aeromonas hydrophila* (в дозе 10^7 КОЕ/мл) и 70% при заражении *Aeromonas salmonicida* (в дозе 10^9 КОЕ/мл). Применение родительского эндолизина LysPA26, состоящего только из каталитического домена, позволило лишь частично купировать инфекцию: выживаемость в соответствующих группах составила 50% и 40%. Столь умеренные показатели родительской формы, вероятно, обусловлены отсутствием специфического модуля связывания с клеточной стенкой, что ограничивает скорость лизиса бактерий в системном кровотоке (рисунок 97).



1) группа «PBS», рыбы, которым вводили инъекции PBS без заражения; 2) группа «*Aeromonas hydrophila* AB005» или «*Aeromonas salmonicida* AB001», рыбы, инфицированные бактериями (10^7 и 10^9 КОЕ/мл соответственно); 3) группа «Lys+A», рыбы, инфицированные бактериями обработанные родительским эндолизином (150 мкг/рыбу); 4) группа «Gp/Lys +A», рыбы, инфицированные бактериями обработанные химерным эндолизином (150 мкг/рыбу); 5) группа «Lys», рыбы, которым вводили только LysPA26; 6) группа «Gp/Lys», рыбы, которым вводили только Gp110 (CWBD) / LysPA26 (CD).

Рисунок 97 – Эффективность химерного эндолизина Gp110 (CWBD) / LysPA26 (CD) в *in vivo* исследованиях на модели *Oreochromis niloticus* инфицированной бактериями рода *Aeromonas*

Принципиально иные результаты были зафиксированы в группах, получавших терапию химерным эндолизином Gp110 (CWBD) / LysPA26 (CD). По сравнению с результатами группы LysPA26, использование химерной конструкции обеспечило 100% выживаемость в обеих экспериментальных группах (*Aeromonas hydrophila* и *Aeromonas salmonicida*). Таким образом, включение пептидогликан-связывающего домена Gp110 в структуру LysPA26 позволило радикально улучшить терапевтические показатели препарата, обеспечив абсолютную защиту организма рыбы от летальных доз патогена в течение критического 96-часового периода.

Параллельно с оценкой эффективности проводилось изучение токсикологического профиля используемых белков. Важнейшим показателем применимости новых ферментов в аквакультуре является их системная безопасность. Контрольные группы рыб, получавшие инъекции исключительно эндолизинов LysPA26 и Gp110 (CWBD) / LysPA26 (CD) без инфицирования патогенами, продемонстрировали 100% сохранность поголовья в течение всего периода наблюдения (96 часов). Отсутствие летальности, а также отсутствие патологических изменений в поведении и внешнем виде рыб позволяют сделать достоверный вывод о полной безопасности и биосовместимости как нативного LysPA26, так и новой химерной формы Gp110 (CWBD) / LysPA26 (CD) для организма *Oreochromis niloticus*. Полученные данные открывают широкие перспективы для внедрения данного химерного эндолизина в качестве высокоэффективного и безопасного биопрепарата для профилактики и экстренной терапии аэромонозов у ценных видов рыб.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Комплексное исследование, представленное в монографии, посвящено решению актуальной научно-практической задачи – разработке инновационных методов борьбы с бактериальными инфекциями осетровых рыб с использованием рекомбинантных эндолизинов. В ходе реализации настоящей исследовательской работы был пройден полный цикл исследований, начиная от этиологической расшифровки вспышек заболеваний в аквакультуре Казахстана и заканчивая созданием высокоэффективных химерных антимикробных белков. На первом этапе из патологического материала больных особей сибирского осетра (*Acipenser baerii*) были выделены и идентифицированы шесть культур грамотрицательных бактерий родов *Aeromonas* и *Pseudomonas*. Проведенный фенотипический и биохимический анализ показал, что данные патогены обладают значительной экологической пластичностью, сохраняя способность к активному росту в широких диапазонах температуры, кислотности среды и концентрации солей.

Молекулярно-генетическое генотипирование по генам 16S рРНК, *gyrB*, *rpoD* и *flaA* позволило верифицировать видовую принадлежность изолятов как *Aeromonas hydrophila* AB005, *Aeromonas salmonicida* AB001, *Aeromonas veronii* AB003, *Pseudomonas parafulva* AB004 и *Pseudomonas protegens* AB006. Все полученные последовательности были депонированы в базу данных GenBank NCBI, что подтверждает их уникальность. В ходе патофизиологических испытаний было установлено, что штаммы *Aeromonas hydrophila* и *Aeromonas salmonicida* являются высоковирулентными и вызывают тяжелые поражения внутренних органов и 100% смертность у различных видов рыб, включая нильскую тиляпию и молодь осетровых. Эти данные были подтверждены генетическим анализом, выявившим наличие до семи ключевых генов вирулентности у наиболее агрессивных штаммов. Примечательно, что выделенные бактерии рода *Pseudomonas*, несмотря на отсутствие прямой патогенности для рыб, продемонстрировали экстремально высокую устойчивость к 15 из 19 исследованных антибиотиков, что подчеркивает необходимость поиска альтернативных средств антибактериальной терапии.

Центральной частью работы стало создание и изучение рекомбинантных эндолизинов бактериофагов Gp110, OBPgp279 и LysPA26, а также разработка четырех новых химерных конструкций. После успешного клонирования и экспрессии генов в системе *Escherichia coli* была проведена аффинная очистка белков, сохранивших высокую пептидогликан-гидролитическую активность. Сравнительный анализ показал, что нативные эндолизины обладают широким, но специфичным спектром действия, где наибольшая эффективность была зафиксирована для Gp110. Однако именно рациональный дизайн химерных белков позволил преодолеть ограничения родительских форм. В частности, новый химерный эндолизин Gp110 (CWBD) / LysPA26 (CD) продемонстрировал превосходящую противомикробную активность за счет сочетания высокоаффинного связывающего домена с активным каталитическим центром.

Результаты лабораторных испытаний *in vitro* нашли полное подтверждение в экспериментах *in vivo*. Терапевтические тесты на модели нильской тиляпии показали, что применение эндолизинов Gp110 и химерной формы Gp110 (CWBD) / LysPA26 (CD) обеспечивает 100% выживаемость инфицированных особей, что сопоставимо или превосходит эффект традиционных антибиотиков. Кроме того, была доказана высокая репаративная способность эндолизина Gp110 при лечении кожных язв у сибирского осетра, где процент закрытия ран достигал 95,7% к 25-му дню терапии. Полученные данные позволяют сделать обоснованный вывод о том, что созданные рекомбинантные белки являются безопасными и многообещающими кандидатами для разработки инновационных терапевтических средств. Внедрение данных препаратов в практику аквакультуры позволит эффективно контролировать вспышки аэромоноза, снизить зависимость от антибиотиков и повысить экологическую безопасность производимой продукции.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

Бакиев С. Биология бактерии Aeromonas hydrophila выделенной из больных осетровых рыб, выращиваемых в установках замкнутого водоснабжения (УЗВ) // Международ. науч. конф. студ. молод. уч. «Фараби Әлемі». – Алматы, 2022. – С. 18.

Бакиев С., Алыбаев С., Нуржанова Ф., Джунусов А., Тилвалдиева С. В. Биохимическая идентификация бактериальных патогенов осетровых рыб, выращиваемых в условиях установок с замкнутым циклом водоснабжения // Международ. науч. конф. студ. молод. уч. «Фараби Әлемі». – Алматы, 2020. – С. 228.

Бакиев С., Тилвалдиева С. Реттелетін жүйелер жағдайында өсірілетін бекіре тұқымдас балықтардың ауруын тудыратын Aeromonas sobria бактериясын биохимиялық және молекулалық-генетикалық идентификациялау // Международ. науч. конф. студ. молод. уч. «Фараби Әлемі». – Алматы, 2021. – С. 260

Балтахожа Н.Б., Кауысбеков А.Ж., Бакиев С.С. Бекіре тұқымдас балықтарының патогені Pseudomonas parafulva бактериясын бөліп алу, иденфикациялау және антибиотиктерге төзімділігін талдау // Международ. науч. конф. студ. молод. уч. «Фараби Әлемі». – Алматы, 2022. – С. 283

Бисенбаев А.К., Бакиев С.С. Бактериальные заболевания – лимитирующий фактор развития аквакультуры осетровых рыб // Вест. КазНУ аль-Фараби. Сер. биол. – 2020. – Т. 82, №1. – С. 4-21. – DOI: 10.26577/eb.2020.v82.i1.01

Бисенбаев А.К., Бакиев С.С. Биохимическая и молекулярно-генетическая идентификация бактерии Pseudomonas putida вызывающая заболевание осетровых рыб, выращиваемых в условиях регулируемых систем // VIII Internat. Conf. "Modern biotechnology for science and practice", 2021. – С. 7-8

Влодавец В., Трухина Г. и др. Определение грамотрицательных потенциально патогенных бактерий – возбудителей внутрибольничных инфекций. – Методические рекомендации. Москва, 1986. – 37 с.

Габдуллина А.Т., Бакиев С.С. Тұйық жүйелі сумен қамтамасыз ету қондырғыларында өсірілетін пілмай мен орыс бекіресінің жұмысшы топтарының морфометриялық көрсеткіштерін салыс-тырмалы талдау // Білім және ғылым. - Қазақстан, Орал қ., 2019. - №1. – Б.199-204

Гинаятов Н., Залялов И., Абсатиров Г. Определение чувствительности к антибиотикам возбудителя псевдомоноза осетровых рыб в условиях УЗВ // Учен. запис. Казан. гос. академ. вет. мед. им. Н.Э. Баумана. – 2016. – Т. 2, № 230. – С. 64-67

Исбеков К., Асылбекова С., Сергалиев Н., Абсатиров Г., Болатбекова З., Туменов А., Сариев Б., Какишев М., Бакиев С. Практические рекомендации по предотвращению заболеваний РМС осетровых рыб в условиях УЗВ: профилактика и лечение: рекомендации. –Алматы: НЦП РХ, 2020. –24 с.

Кауысбеков А., Бакиев С. Пептидогликан-байланыстырушы ExeA домені бар эндолизиннің химерлі конструкциясын құрастыру және бактерияға қарсы белсенділігін тексеру // «Фараби Әлемі». – Алматы, 2023. – С. 259.

Сергалиев Н.Х., Туменов А.Н., Сариев Б.Т., Бакиев С.С. Влияние факторов среды на рыбоводно-биологические характеристики осетровых рыб в условиях регулируемых систем // Білім және ғылым. - Казахстан, г. Уральск, 2018. - №4 (53). – С.160-164

Тилвалдиева С., Бакиев С. Aeromonas veronii бактериясын биохимиялық және молекулалық-генетикалық сипаттамалары негізінде идентификациялау мен физиологиялық талдау // «Фараби Әлемі». – Алматы, 2022. – С. 314.

Хоулт Д., Криг Н., Снит П., Стейл Д., Уилльямс С. Определитель бактерий Берджи. В 2-х т. Т.1: Пер. с англ. – М.: Мир, 1997. – 432 с.

Abdel-Latif H. M. R., Khafaga A. F. Natural co-infection of cultured Nile tilapia Oreochromis niloticus with Aeromonas hydrophila and Gyrodactylus cichlidarum experiencing high mortality during summer // Aquac. Res. – 2020. – Vol. 51. – P. 1880–1892. – DOI: 10.1111/are.14538

Abdelkader K., Gutiérrez D., Grimon D., Ruas-Madiedo P., Lood C., Lavigne R., Safaan A., Khairalla A. S., Gaberb Y., Dishisha T., Briers Y. Lysin LysMK34 of Acinetobacter baumannii bacteriophage PMK34 has a turgor pressure-dependent intrinsic antibacterial activity and reverts colistin resistance // Appl. Environ. Microbiol. – 2020. – P. 1–50. – DOI: 10.1128/aem.01311-20

Abdelrahman F., Gangakhedkar R., Nair G., El-Didamony G., Askora A., Jain V., El-Shibiny A. Pseudomonas Phage ZCPS1 Endolysin as a Potential Therapeutic Agent // Viruses. – 2023. – Vol. 15(2). – 520. – DOI: 10.3390/v15020520

Abbott S.L., Cheung W.K.W., Kroske-Bystrom S., Malekzadeh T., Janda J.M. Identification of Aeromonas strains to the genospecies level in the clinical laboratory // J. Clin. Microbiol. – 1992. – Vol. 30. – P. 1262–1266

Abu-Elala N., Abdelsalam M., Marouf S., Setta A. Comparative analysis of virulence genes, antibiotic resistance and gyrB-based phylogeny of motile Aeromonas species isolates from Nile tilapia and domestic fowl // Lett. Appl. Microbiol. – 2015. – Vol. 61, № 5. – P. 429–436. – DOI: 10.1111/lam.12484

Abrami L., Fivaz M., Decroly E., Seidah N. G., Jean F., Thomas G., Leppla S. H., Buckley J. T., van der Goot F. G. The pore-forming toxin proaerolysin is activated by furin // J. Biol. Chem. – 1998. – Vol. 273, № 49. – P. 32656–32661. – DOI: 10.1074/jbc.273.49.32656

Aguilera-Arreola M. G., Hernández-Rodríguez C., Zúñiga G., Figueras M. J., Garduño R. A., Castro-Escarpulli G. Virulence potential and genetic diversity of Aeromonas caviae, Aeromonas veronii, and Aeromonas hydrophila clinical isolates from Mexico and Spain: a comparative study // Can. J. Microbiol. – 2007. – Vol. 53, № 7. – P. 877–887. – DOI: 10.1139/w07-051

Alghabshi A., Austin B., Crumlish M. Aeromonas salmonicida isolated from wild and farmed fish and invertebrates in Oman // Int. Aquat. Res. – 2018. – Vol. 10. – P. 145–152. – DOI: 10.1007/s40071-018-0195-4

Alhazmi M.I. Isolation of Aeromonas spp. from food products: emerging Aeromonas infections and their significance in public health // J. AOAC Int. – 2015. – Vol. 98, № 4. – P. 927–929. – DOI: 10.5740/jaoacint.14-257

Ali A., Carnahan A.M., Altwegg M., Lüthy-Hottenstein J., Joseph S.W. Aeromonas bestiarum sp. nov. (formerly genomospecies DNA group 2 A.

hydrophila), a new species isolated from non-human sources // Med. Microbiol. Lett. – 1996. – Vol. 5. – P. 156–165

Algammal A.M., Mabrok M., Sivaramasamy E. et al. Emerging MDR-Pseudomonas aeruginosa in fish commonly harbor oprL and toxA virulence genes and blaTEM, blaCTX-M, and tetA antibiotic-resistance genes // Sci. Rep. – 2020. – Vol. 10. – P. 1–12. – DOI: 10.1038/s41598-020-72264-4

Almansour A.M., Alhadlaq M.A., Alzahrani K.O., Mukhtar L.E., Alharbi A.L., Alajel S.M. The silent threat: antimicrobial-resistant pathogens in food-producing animals and their impact on public health // Microorganisms. – 2023. – Vol. 11, № 9. – P. 1–25. – DOI: 10.3390/microorganisms11092127

Almeida A. Special issue: Bacteriophage treatment as an alternative technology to inactivate pathogenic bacteria: a generalized worldwide growing acceptance // Microorg. – 2021. – Vol. 10, № 1. – P. 1–6. – DOI: 10.3390/microorganisms10010012

Almeida G.M.F., Mäkelä K., Laanto E., Pulkkinen J., Vielma J., Sundberg L.R. The fate of bacteriophages in recirculating aquaculture systems (RAS) – towards developing phage therapy for RAS // Antibiotics. – 2019. – Vol. 8. – P. 1–9

Altinok I., Kayis S., Capkin E. Pseudomonas putida infection in rainbow trout // Aquaculture. – 2006. – Vol. 261. – P. 850–855. – DOI: 10.1016/j.aquaculture.2006.09.009

Altwegg M., Steigerwalt A.G., Altwegg-Bissig R., Lüthy-Hottenstein J., Brenner D.J. Biochemical identification of Aeromonas genospecies isolated from humans // J. Clin. Microbiol. – 1990. – Vol. 28, № 2. – P. 258–264. – DOI: 10.1128/JCM.28.2.258-264.1990

Amarasiri M., Takezawa T., Malla B., Furukawa T., Sherchand J.B., Haramoto E., Sei K. Prevalence of antibiotic resistance genes in drinking and environmental water sources of the Kathmandu Valley, Nepal // Front. Microbiol. – 2022. – Vol. 13. – P. 1–12. – DOI: 10.3389/fmicb.2022.894014

Andrade L., Kelly M., Hynds P., Weatherill J., Majury A., O'Dwyer J. Groundwater resources as a global reservoir for antimicrobial-resistant bacteria // Water Res. – 2020. – Vol. 170. – P. 1–15. – DOI: 10.1016/j.watres.2019.115360

Andrade L., Chique C., Hynds P., Weatherill J., O'Dwyer J. The antimicrobial resistance profiles of Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa isolated from private groundwater wells in the Republic of Ireland // Environ. Pollut. – 2023. – Vol. 317. – P. 1–37. – DOI: 10.1016/j.envpol.2022.120817

Ansari F., Nagar V. Characterisation of a Novel Jumbo Lytic Aeromonas dhakensis Bacteriophage P19 and Its Endolysin // Microbial Biotechnology. – 2026. – Vol. 19, № 1. – e70289. – DOI: 10.1111/1751-7915.70289

Aoki T., Egusa S., Ogata Y., Watanabe T. Detection of resistance factors in fish pathogen Aeromonas liquefaciens // J. Gen. Microbiol. – 1971. – Vol. 65, № 3. – P. 343–349. – DOI: 10.1099/00221287-65-3-343

ARC. Antimicrobial Resistance Collaborators. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis // Lancet. – 2022. – Vol. 399. – P. 629–655. – DOI: 10.1016/S0140-6736(21)02724-0

Austin B. Taxonomy of bacterial fish pathogens // Vet. Res. – 2011. – Vol. 42. – P. 1–13

Austin B., Austin D.A., Dalsgaard I., Gudmundsdóttir B.K., Hoie S., Thornton J.M., Larsen J.L., O'Hici B., Powell R. Characterization of atypical Aeromonas salmonicida by different methods // Syst. Appl. Microbiol. – 1998. – Vol. 21. – P. 50–64

Austin D.A., McIntosh D., Austin B. Taxonomy of fish associated Aeromonas spp., with the description of Aeromonas salmonicida subsp. smithia subsp. nov. // Syst. Appl. Microbiol. – 1989. – Vol. 11. – P. 277–290

Albert M. J., Ansaruzzaman M., Talukder K. A., Chopra A. K., Kuhn I., Rahman M., Faruque A. S. G., Islam M. S., Sack R. B., Mollby R. Prevalence of enterotoxin genes in Aeromonas spp. isolated from children with diarrhea, healthy controls, and the environment // J. Clin. Microbiol. – 2000. – Vol. 38, № 10. – P. 3785–3790. – DOI: 10.1128/JCM.38.10.3785-3790.2000

Bakiyev S., Bissenbaev A. Aeromonas hydrophila from Siberian sturgeon (Acipenser baerii) //5th Sympos. EuroAsian Biodiver. - Almaty, Kazakhstan – Mugla, Turkey, 2021. - P. 304.

Bakiyev S., Smekenov I., Bissenbaev A. Comparative analysis of potential effects of three phage endolysins against antibiotic-resistant bacteria from the genus Aeromonas //Int. Aquat. Res. – 2023. – Vol. 15. – P. 249-262. – DOI: 10.22034/IAR.2023.1988163.1454

Bakiyev S., Smekenov I., Zharkova I., Kobegenova S., Sergaliyev N., Absatirov G., Bissenbaev A. Characterization of atypical pathogenic Aeromonas salmonicida isolated from a diseased Siberian sturgeon (Acipenser baerii) //Heliyon. – 2023. – Vol. 9. – P. 1-17. – DOI: 10.1016/j.heliyon.2023.e17775.

Bakiyev S., Smekenov I., Zharkova I., Kobegenova S., Sergaliyev N., Absatirov G., Bissenbaev A. Isolation, identification, and characterization of pathogenic Aeromonas hydrophila from critically endangered Acipenser baerii //Aquacult. Rep. – 2022. – Vol. 26. – P. 1-11. – DOI: 10.1016/j.aqrep.2022.101293.

Bakiyev S.S., Bissenbaev A.K. Diseases caused by bacteria of the Aeromonas and Pseudomonas genus when reared fish in controlled systems //Al-Farabi KazNU Exp. Biol. – 2021. - № 2. – P. 4-16. – DOI: 10.26577/eb.2021.v87.i2.01

Bakiyev S.S., Smekenov I.T., Baltakhozha N. B., Kauysbekov A., Bissenbaev A.K. Isolation, identification and physiological growth characteristics of Pseudomonas parafulva from diseased Acipenser baerii //Internation. J. Biol. Chem. – 2022. – Vol. 15. - P. 18-24. – DOI: 10.26577/ijbch.2022.v15.i2.03.

Bakken J. S., Sanders C. C., Clark R. B., Hori, M. Beta-lactam resistance in Aeromonas spp. caused by inducible beta-lactamases active against penicillins, cephalosporins, and carbapenems //Antimicrob. A. Chemot. - 1988. – Vol. 32, № 9. – P. 1314–1319. – DOI: 10.1128/AAC.32.9.1314

Balaban C.L., Suárez C.A., Boncompain C.A., Peressutti-Bacci N., Ceccarelli E.A., Morbidoni H.R. Evaluation of factors influencing expression and extraction of recombinant bacteriophage endolysins in Escherichia coli //Microb. Cell. Fact. – 2022. – Vol. 21, № 1. – P. 1-14. – DOI: 10.1186/s12934-022-01766-9

Baliga P., Goolappa P.T., Shekar M., Kallappa G. S. Cloning, characterization, and antibacterial properties of endolysin LysE against planktonic cells and biofilms of Aeromonas hydrophila //Prob. Antimicr. Prot. - 2022. – Vol. 15, № 3. – P. 646-654. – DOI: 10.1007/s12602-021-09880-7

Baron S. Medical microbiology. 4th edition. - Galveston (TX): University of Texas medical branch at Galveston, 1996. - 1273 p. - URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7627/

Basit A., Qadir S., Qureshi S., Rehman S. U. Cloning and expression analysis of fused holin-endolysin from RL bacteriophage; Exhibits broad activity against multi drug resistant pathogens //Enzyme Microb. Technol. - 2021. – Vol. 149. P. 1-9. – DOI: 10.1016/j.enzmictec.2021.109846

Batra P., Mathur P., Misra M. C. Aeromonas spp.: an emerging nosocomial pathogen //J. lab. Physic. - 2016. – Vol. 8, № 1. – P. 1–4. – DOI: 10.4103/0974-2727.176234

Benbrook C.M. Antibiotic drug use in US aquaculture. Northwest science and environmental policy center Sandpoint, Idaho. – URL: http://www.iatp.org/documents/antibiotic-drug-use-in-us-aquaculture-1 (дата обращения 2021-02-18).

Benie C., Dadie A., Guessennd N., N'gbesso-Kouadio N., Désiré K., Coulibaly N. D., Aka S., Dako E., Djè K., Dosso M. Characterization of virulence potential of Pseudomonas aeruginosa isolated from bovine meat, fresh fish, and smoked fish //Eur. J. Microbiol. Immunol. - 2017. – Vol. 7, № 1. – P. 55–64. – DOI: 10.1556/1886.2016.00039

Bertani G. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic Escherichia coli //J. bacteriol. - 1951. – Vol. 62, № 3. - P. 293–300. – DOI: 10.1128/JB.62.3.293-300.1951

Blasco L., Ambroa A., Trastoy R., Bleriot I., Moscoso M., Fernández-Garcia L., Perez-Nadales E., Fernández-Cuenca F., Torre-Cisneros J., Oteo-Iglesias J., Oliver A., Canton R., Kidd T., Navarro F., Miró E., Pascual A., Bou G., Martínez-Martínez L., Tomas M. In vitro and in vivo efficacy of combinations of colistin and different endolysins against clinical strains of multi-drug resistant pathogens //Sci. Rep. – 2020. - Vol. 10. – P. 1-12. – DOI: 10.1038/s41598-020-64145-7

Bos M.P., Robert V., Tommassen J. Biogenesis of the gram-negative bacterial outer membrane //Annu. Rev. Microbiol. – 2007. – Vol. 61. - P. 191-214. – DOI: 10.1146/annurev.micro.61.080706.093245

Brandi G., Sisti M., Schiavano G. F., Salvaggio L., Albano A. Survival of Aeromonas hydrophila, Aeromonas caviae and Aeromonas sobria in soil //J. Appl. Bacteriol. - 1996. – Vol. 81, № 4. – P. 439–444. – DOI: 10.1111/j.1365-2672.1996.tb03531.x

Briers Y., Lavigne R. Breaking barriers: expansion of the use of endolysins as novel antibacterials against Gram-negative bacteria //Future Microbiol. – 2015. – Vol. 10, № 3. – P. 377-390. – DOI: 10.2217/fmb.15.8

Briers Y., Peeters L. M., Volckaert G., Lavigne R. The lysis cassette of bacteriophage ϕKMV encodes a signal-arrest-release endolysin and a pinholin //Bacterioph. – 2011. – Vol. 1, № 1. – P. 25–30. – DOI: 10.4103/bact.1.1.14868

Briers Y., Walmagh M., Grymonprez B., Biebl M., Pirnay J.-P., Defraine V., Michiels J., Cenens W., Aertsen A., Miller S., Lavigne R. Art-175 Is a highly efficient antibacterial against multidrug-resistant strains and persisters of Pseudomonas aeruginosa //Ant. A. Chem. - 2014. – Vol. 58, № 7. - P. 3774–3784. – DOI: 10.1128/aac.02668-14

Briers Y., Walmagh M., Lavigne R. Use of bacteriophage endolysin EL188 and outer membrane permeabilizers against Pseudomonas aeruginosa //J. Appl. Microbiol. - 2011. – Vol. 110, № 3. – P. 778–785. – DOI: 10.1111/j.1365-2672.2010.04931.x

Briers Y., Walmagh M., Van Puyenbroeck V., Cornelissen A., Cenens W., Aertsen A., Oliveira H., Azeredo J., Verween G., Pirnay J.-P., Miller S., Volckaert G., Lavigne R. Engineered endolysin-based "Artilysins" to combat multidrug-resistant Gram-negative pathogens //mBio. - 2014. – Vol. 5, № 4. – P. 1-11. – DOI: 10.1128/mbio.01379-14

Bronzi P., Rosenthal H. Present and future sturgeon and caviar production and marketing: A global market overview //J. Appl. Ichthyol. – 2014. – Vol. 30. – P. 1536–1546.

Brown L., Wolf J. M., Prados-Rosales R., Casadevall A. Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi //N. Rev. Microbiol. - 2015. – Vol. 13, № 10. – P. 620–630. – DOI: 10.1038/nrmicro3480

Brunetti R., Gasparri F., Marturano S., Prearo M. Pseudomonas fluorescens infection in farmed Siberian sturgeon (Acipenser baeri) //Ittiopatologia. - 2006. – Vol. 3. – P. 221-226.

Burke V., Robinson J., Gracey M., Peterson D., Partridge K. Isolation of Aeromonas hydrophila from a metropolitan water supply: seasonal correlation with clinical isolates //Appl. Environ. Microbiol. - 1984. – Vol. 48, № 2. – P. 361–366. – DOI: 10.1128/AEM.48.2.361-366.1984

Bustamante N., Iglesias-Bexiga M., Bernardo-García N., Silva-Martín N., García G., Campanero-Rhodes M. A., García E., Usón I., Buey R. M., García P., Hermoso J. A., Bruix M., Menéndez M. Deciphering how Cpl-7 cell wall-binding repeats recognize the bacterial peptidoglycan //Sci. Rep. – 2017. – Vol. 7. – P. 1-17. – DOI: 10.1038/s41598-017-16392-4

Boudjerda D., Lahouel M. Virulence and antimicrobial resistance of Escherichia coli isolated from chicken meat, beef, and raw milk // Austral. J. Vet. Sci. – 2022. - Vol. 54, № 3. – P. 1-12.

Cabello F.C. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: A growing problem for human and animal health and for the environment //Environ. Microbiol. – 2006. – Vol. 8. – P. 1137–1144.

Cao H., He S., Lu L. and Hou L. Characterization and phylogenetic analysis of the bitrichous pathogenic Aeromonas hydrophila isolated from diseased Siberian sturgeon (Acipenser baerii) //Isr. J. Aquac. – Bamidgeh. – 2010. – Vol. 62, № 3. – P. 181-188.

Cao Y., Li S., Han S., Wang D., Zhao J., Xu L., Liu H., Lu T. Characterization and application of a novel Aeromonas bacteriophage as treatment for pathogenic

Aeromonas hydrophila infection in rainbow trout //Aquaculture. - 2020. – Vol. 523. – P. 1-8. – DOI: 10.1016/j.aquaculture.2020.73

Carter G. R. Pseudomonas, Aeromonas, Plesiomonas, and Vibrio //Diag. Proc. Vet. Bacteriol. Mycol. - 1990. – P. 77–86. – DOI: 10.1016/b978-0-12-161775-2.50011-6

Cassino C., Murphy M., Boyle J., Rotolo J., Wittekind M. Results of the first in human study of lysin CF-301 evaluating the safety, tolerability and pharmacokinetic profile in healthy volunteers //In.: Proceed. 26th Euro. Cong. Clin. Microbiol. Infect. Dis. - Amsterdam, The Netherlands. - 2016. – P. 1.

Castillo D., Christiansen R. H., Dalsgaard I., Madsen L., Middelboe M. Bacteriophage resistance mechanisms in the fish pathogen Flavobacterium psychrophilum: linking genomic mutations to changes in bacterial virulence factors //Appl. Environ. Microbiol. - 2014. – Vol. 81, № 3. – P. 1157–1167. – DOI: 10.1128/aem.03699-14

CDC. Antimicrobial resistance [Электронный ресурс] //CDC Antimicrobial resistance, 2024. URL: https://www.google.com/search?q=https://www.cdc.gov/antimicrobial-esistance/about/index.html (дата обращения: 29.09.2024).

Chacón M., Figueras M., Castro-Escarpulli G., Soler L., Guarro J. Distribution of virulence genes in clinical and environmental isolates of Aeromonas spp. //ANTON. LEEUW. - 2003. – Vol. 84. – P. 269–278. – DOI: 10.1023/A:1026042125243

Chambers H.F., Deleo F.R. Waves of resistance: Staphylococcus aureus in the antibiotic era //Nat. Rev. Microbiol. – 2009. – Vol. 9. – P. 629-641. – DOI: 10.1038/nrmicro2200.

Chandra G., Fopp-Bayat D. Trends in aquaculture and conservation of sturgeons: a review of molecular and cytogenetic tools //Rev. Aquac. - 2020. – Vol. 3. – P. 119-137. – DOI: 10.1111/raq.12466

Chang Q., Wang W., Regev-Yochay G., Lipsitch M., Hanage W.P. Antibiotics in agriculture and the risk to human health: how worried should we be? //Evol. Appl. – 2015. – Vol. 8, № 3. – P. 240-247. – DOI: 10.1111/eva.12185

Chapman P.F., Cipriano R.C., Teska J.D. Isolation and phenotypic characterization of an oxidase-negative Aeromonas salmonicida causing furunculosis in coho salmon (Oncorhynchus kisutch) //J. Wildl. Dis. – 1991. – Vol. 27, № 1. – P. 61-67. – DOI: 10.7589/0090-3558-27.1.61

Chen F., Sun J., Han Z., Yang X., Xian J. A., Lv A., Hu X. and Shi H. Isolation, identification and characteristics of Aeromonas veronii from diseased crucian carp (Carassius auratus gibelio) //Front. microbiol. – 2019. – Vol. 10. – P. 1-10. – DOI: 10.3389/fmicb.2019.02742

Chesneau V. Immunology in sturgeons with a focus on the Siberian sturgeon mechanisms, responses to stress and stimulation. The Siberian sturgeon (Acipenser Baerii, Brandt, 1869). - 2017. – Vol. 2. – P. 373–402. – DOI: 10.1007/978-3-319-61676-6

Chuah, L. O., Effarizah, M. E., Goni, A. M., & Rusul, G. (2016). Antibiotic Application and Emergence of Multiple Antibiotic Resistance (MAR) in Global

Catfish Aquaculture. Current environmental health reports, 3(2), 118–127. https://doi.org/10.1007/s40572-016-0091-2

Clinical and laboratory standards institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 32nd ed. CLSI supplement M100. - Clinical and laboratory standards institute, USA, 2022. - 362 p.

Coleman G., Whitby P. W. A comparison of the amino acid sequence of the serine protease of the fish pathogen Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida with those of other subtilisin-type enzymes relative to their substrate-binding sites //J. Gen. Microbiol. - 1993. – Vol. 139, № 2. – P. 245–249. – DOI: 10.1099/00221287-139-2-245

Crothers-Stomps C., Hoj L., Bourne D.G., Hall M.R., Owens L. Isolation of lytic bacteriophage against Vibrio harveyi //J. Appl. Microbiol. – 2010. – Vol. 108, № 5. – P. 1744–1750.

Dallaire-Dufresne S., Tanaka K. H., Trudel M. V., Lafaille A., Charette S. J. Virulence, genomic features, and plasticity of Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida, the causative agent of fish furunculosis //Vet. Microbiol. - 2014. – Vol. 169, № 1-2. - P. 1–7. – DOI: 10.1016/j.vetmic.2013.06.025

Damodaran S.E., Madhan S. Telavancin: A novel lipoglycopeptide antibiotic //J. Pharmacol. Pharmacother. – 2011. – Vol. 2, № 2. – P. 135-137. – DOI: 10.4103/0976-500X.81918.

Del Cerro A., Marquez I., Guijarro J. A. Simultaneous detection of Aeromonas salmonicida, Flavobacterium psychrophilum, and Yersinia ruckeri, three major fish pathogens, by multiplex PCR //Appl. Environ. Microbiol. - 2002. – Vol. 68, №. 10. - P. 5177–5180. – DOI: 10.1128/aem.68.10.5177-5180.2002

Dong H., Zhu C., Chen J., Ye X., Huang, Y.-P. Antibacterial activity of Stenotrophomonas maltophilia Endolysin P28 against both Gram-positive and Gram-negative bacteria //Front. Microbiol. – 2015. - Vol. 6. - P. 1-8. – DOI: 10.3389/fmicb.2015.01299

Dong Q., Wang J., Yang H., Wei C., Yu J., Zhang Y., Huang Y., Zhang X.E., Wei H. Construction of a chimeric lysin Ply187N-V12C with extended lytic activity against Staphylococci and Streptococci //Microb. Biotechnol. – 2015. – Vol. 8, №2. – P. 210-220.

Duarte J., Pereira C., Moreirinha C., Salvio R., Lopes A., Wang D., Almeida A. New insights on phage efficacy to control Aeromonas salmonicida in aquaculture systems: An in vitro preliminary study //Aquaculture. - 2018. – Vol. 495. – P. 970–982. – DOI: 10.1016/j.aquaculture.2018.07

Durães F., Sousa E. Omadacycline: a newly approved antibacterial from the class of tetracyclines //Pharmaceuticals. – 2019. – Vol. 12, №2, - P. 1-9. – DOI: 10.3390/ph12020063.

Dutescu I.A., Hillier S.A. Encouraging the development of new antibiotics: are financial incentives the right way forward? A systematic review and case study //Infect. Drug Resist. – 2021. – Vol. 14. – P. 415-434. – DOI: 10.2147/IDR.S287792.

Egido J. E., Costa A. R., Aparicio-Maldonado C., Haas P.-J., Brouns S. J. J. Mechanisms and clinical importance of bacteriophage resistance //FEMS Microbiol. Rev. – 2022. – Vol. 46, № 1. – P. 1–16. – DOI: 10.1093/femsre/fuab048

Eichenseher F., Herpers B.L., Badoux P., Leyva-Castillo J. M., Geha R. S., Zwart M., McKellar J., Janssen F., Rooij B., Selvakumar L., Röhrig C., Frieling J., Offerhaus M., Loessner M.J., Schmelcher M. Linker-improved chimeric endolysin selectively kills Staphylococcus aureus in vitro, on reconstituted human epidermis, and in a murine model of skin infection //Ant. A. Chem. – 2022. – Vol. 66, № 5. – P. 1-18. – DOI: 10.1128/aac.02273-21

El-Bahar H. M., Ali N. G., Aboyadak I. M., Khalil S. A. E. S., Ibrahim M. S. Virulence genes contributing to Aeromonas hydrophila pathogenicity in Oreochromis niloticus //Int. Microbiol. - 2019. – Vol. 22, № 4. – P. 479–490. – DOI: 10.1007/s10123-019-00075-3

El-Barbary M., Hal A. Isolation and molecular characterization of some bacterial pathogens in El-Serw fish farm, Egypt //Egyp. J. Aqua. Bio. Fish. - 2016. – Vol. 20. – P. 115-127. – DOI: 10.21608/ejabf.2016.11183

Elfadadny A., Ragab R.F., AlHarbi M., Badshah F., Ibáñez-Arancibia E., Farag A., Hendawy A.O., De Los Ríos-Escalante P.R., Aboubakr M., Zakai S.A., Nageeb W.M. Antimicrobial resistance of Pseudomonas aeruginosa: navigating clinical impacts, current resistance trends, and innovations in breaking therapies //Front Microbiol. – 2024. – Vol. 15. – P. 1-20. – DOI: 10.3389/fmicb.2024.1374466.

El-Hady M. A., Samy A. A. Molecular typing of Pseudomonas species isolated from some cultured fishes in Egypt //Glob. Vet. - 2011. – Vol. 7, № 6. – P. 576-580.

Eniyan K., Sinha A., Ahmad S., Bajpai U. Functional characterization of the endolysins derived from mycobacteriophage PDRPxv //W. J. Microbiol. Biotech. – 2020. – Vol. 36, № 6. – P. 1-11. – DOI: 10.1007/s11274-020-02858-7.

Ervik A., Thorsen B., Eriksen V., Lunestad B. T., Samuelsen O. B. Impact of administering antibacterial agents on wild fish and blue mussels Mytilus edulis in the vicinity of fish farms //Dis. Aquat. Org. - 1994. – Vol. 18. – P. 45-51.

Eurell T.E., Lewis D.H., Grumbles L.C. Comparison of selected diagnostic tests for detection of motile Aeromonas septicaemia in fish //A. J. Vet. Res. – 1978. – Vol. 39. - P. 1384-1386.

FAO. Oreochromis Mossambicus (Peters, 1852). – URL: https://www.fao.org/fishery/en/aqspecies/2408 (дата обращения 2021-05-10).

FAO. The state of world fisheries and aquaculture 2020. - Rome: Sustainability in action, 2020. - 208 p.

Falcón R., d'Albuquerque T., Luna M. das G., Freitas-Almeida A., Yano T., Adley C. Detection of hemolysins in Aeromonas spp. //M. Biotech. F.-B. Pathogen. M. Prot. - 2006. – Vol. 21. - P.1-13. – DOI: 10.1385/1-59259-990-7:003

Farfán M., Miñana-Galbis D., Fusté M. C., Lorén J. G. Divergent evolution and purifying selection of the flaA gene sequences in Aeromonas //Bio. Dir. – 2009. – Vol. 4. – P. 1-16. – DOI: 10.1186/1745-6150-4-23

Farkasovska J., Godany A., Vlcek C. Identification and characterization of an endolysin encoded by the Streptomyces aureofaciens phage mu 1/6 //Folia. Microbiol. (Praha). – 2003. – Vol. 48. – P. 737-744. – DOI: 10.1007/BF02931507

Fenton M., Ross P., Mcauliffe O., O'Mahony J., Coffey A. Recombinant bacteriophage lysins as antibacterials //Bioeng. bugs. – 2010. - Vol. 1. - P. 9-16.

Fernandes S., Proença D., Cantante C., Silva F.A., Leandro C., Lourenço S., Milheiriço C., de Lencastre H., Cavaco-Silva P., Pimentel M., São-José C. Novel chimerical endolysins with broad antimicrobial activity against methicillin-resistant Staphylococcus aureus //Microb. Drug. Resist. – 2012. – Vol. 18, №3. – P. 333-343.

Fernández-Bravo A., Figueras M. J. An update on the genus Aeromonas: taxonomy, epidemiology, and pathogenicity //Microorganisms. - 2020. – Vol. 8, № 1. – P. 1-39. – DOI: 10.3390/microorganisms8010129

Flores Ribeiro A., Bodilis J., Alonso L., Buquet S., Feuilloley M., Dupont J.-P., Pawlak B. Occurrence of multi-antibiotic resistant Pseudomonas spp. in drinking water produced from karstic hydrosystems //Sci. Tot. Environ. - 2014. – Vol. 490. – P. 370–378. – DOI: 10.1016/j.scitotenv.2014.05.012

Franco-Duarte R., Černáková L., Kadam S., Kaushik K. S., Salehi B., Bevilacqua A., Corbo M. R., Antolak H., Dybka-Stępień K., Leszczewicz M., Relison Tintino S., Alexandrino de Souza V. C., Sharifi-Rad J., Coutinho H., Martins N., Rodrigues C. F. Advances in chemical and biological methods to identify microorganisms-from past to present //Microorganisms. - 2019. – Vol. 7, № 5. – P. 1-32. – DOI: 10.3390/microorganisms7050130

Fryer J. L., Hedrick R. P., Park J. W., Hah Y. C. Isolation of Aeromonas salmonicida from masu salmon in the Republic of Korea //J. Wildl. Dis. – 1988. – Vol. 4, №. 2. – P. 364-369. – DOI: 10.7589/0090-3558-24.2.364

Gaeng S., Scherer S., Neve H., Loessner M.J. Gene cloning and expression and secretion of Listeria monocytogenes bacteriophage-lytic enzymes in Lactococcus lactis //Appl. Environ. Microbiol. – 2000. – Vol. 66. – P. 2951–2958. – DOI: 10.1128/aem.66.7.2951-2958.2000

Gaffney P., Colegrove K., Gulland F., Byrne B., Jang S., Edgar K., Lowenstine L. J. Pathologic, microbiologic and epidemiologic characterization of Pseudomonas sp. In California sea lions (Zalophus californianus) and Pacific harbor seals (Phoca vitulina) //Proceed. 39th Ann. Conf. Inter. Assoc. Aqua. An. Med. - 2008. – P. 10-14.

Gao J., Xi B., Chen K., Song R., Qin T., Xie J., Pan L. The stress hormone norepinephrine increases the growth and virulence of Aeromonas hydrophila //Microbiologyopen. – 2019. – Vol. 8, № 4. – P. 1-10. – DOI: 10.1002/mbo3.664

Gao T., Ding Y., Wu Q., Wang J., Zhang J., Yu S., Yu P., Liu C., Kong L., Feng Z., Chen M., Wu S., Zeng H., Wu H. Prevalence, virulence genes, antimicrobial susceptibility, and genetic diversity of Bacillus cereus isolated from pasteurized milk in China //Front. microbiol. - 2018. – Vol. 9. - P. 1-11. – DOI: 10.3389/fmicb.2018.00533

Gerstmans H., Criel B., Briers Y. Synthetic biology of modular endolysins //Biotechnol. Adv. – 2018. – Vol. 36, №3. – P. 624-640.

Gervasi T., Horn N., Wegmann U., Dugo G., Narbad A., Mayer M. J. Expression and delivery of an endolysin to combat Clostridium perfringens //Appl. Microbiol. Biotechnol. - 2014. – Vol. 98. - P. 2495–2505. – DOI: 10.1007/s00253-013-5128-y

Ghahramani P., Khariton T., Jones S., Murphy J., Boyle G., Jandourek A., Cassino C. Population pharmacokinetic-pharmacodynamic assessment of cardiac

safety endpoints for CF-301, a first-in-class antibacterial lysine //In.: Proceed. ASM Microb. - New Orleans, LA, USA. - 2017. – P. 1.

Ghimpețeanu O.M., Pogurschi E.N., Popa D.C., Dragomir N., Drăgotoiu T., Mihai O.D., Petcu C.D. Antibiotic use in livestock and residues in food-a public health threat: a review //Foods. – 2022. – Vol. 11, №10. – P. 1-25. – DOI: 10.3390/foods11101430.

Gholamhosseini A., Taghadosi V., Shiry N., Akhlaghi M., Sharifiyazdi H., Soltanian S., Ahmadi N. First isolation and identification of Aeromonas veronii and Chryseobacterium joostei from reared sturgeons in Fars province //Iran. Vet. Res. Forum. Spring. – 2018. – Vol. 9, № 2. – P. 113-119. – DOI: 10.30466/VRF.2018.30826

Ghosh D., Veeraraghavan B., Elangovan R., Vivekanandan P. Antibiotic resistance and epigenetics: more to it than meets the eye //Antimicrob. Agents Chemother. – 2020. – Vol. 64, № 2. – P. 1-16. – DOI: 10.1128/AAC.02225-19.

Ginayatov N.S., Zalyalov I.N., Absatirov G.G. Identification of the pathogen of infectious pathology of sturgeon fish in a recirculating aquaculture system //Kazan. State Acad. Vet. Med. – 2016. – Vol. 226. – P. 42-45.

Goto S., Enomoto S. Nalidixic acid cetrimide agar. A new selective plating medium for the selective isolation of Pseudomonas aeruginosa //Jpn. J. Microbiol. – 1970. – Vol. 14, № 1. – P. 65-72. – DOI: 10.1111/j.1348-0421.1970.tb00492.x

Gradil A.M., Wright G.M., Speare D.J., Wadowska D.W., Purcell S., Fast M.D. The effects of temperature and body size on immunological development and responsiveness in juvenile shortnose sturgeon (Acipenser brevirostrum) //Fish Shellfish Immunol. – 2014. – Vol. 40. - P. 545–555. – DOI: 10.1016/j.fsi.2014.07.036

Gradil A.M., Wright G.M., Wadowska D.W., Mark D. Ontogeny of the immune system in Acipenserid juveniles //Dev. Comp. Immunol. – 2014. – Vol. 44. – P. 303–314. – DOI: 10.1016/j.dci.2014.01.006

Graham J.P., Boland J.J., Silbergeld E. Growth promoting antibiotics in food animal production: an economic analysis //Public Health Rep. – 2007. – Vol. 122, №1. – P.79-87. – DOI: 10.1177/003335490712200111.

Green S. K., Schroth M. N., Cho J. J., Kominos S. K., Vitanza-jack V. B. Agricultural plants and soil as a reservoir for Pseudomonas aeruginosa //Appl. microbiol. - 1974. – Vol. 28, № 6. – P. 987–991.

Greisen K., Loeffelholz M., Purohit A., Leong D. PCR primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid //J. Clin. Microbiol. - 1994. – Vol. 32, № 2. - P. 335–351.

GSP agar. Pseudomonas Aeromonas selective agar acc. to Kielwein, glutamate starch phenol red agar. – URL: https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/393/938/50875dat.pdf (дата обращения 2020-12-28).

Gufe C., Hodobo T. C., Mbonjani B., Majonga O., Marumure J., Musari S., Gilbert J., Pious V. M., Jairus M. Antimicrobial profiling of bacteria isolated from fish sold at informal market in Mufakose, Zimbabwe //Int. J. Microbiol. – 2019. - P. 1–7. – DOI: 10.1155/2019/8759636

Gulla S., Lund V., Kristoffersen A.B., Sørum H., Colquhoun D.J. vapA (A-layer) typing differentiates Aeromonas salmonicida subspecies and identifies a number of previously undescribed subtypes //J. Fish Dis. – 2016. – Vol. 39. – P. 329-342. – DOI: 10.1111/jfd.12367

Guo M., Feng C., Ren J., Zhuang X., Zhang Y., Zhu Y., Dong K., He P., Guo X., Qin J. A novel antimicrobial endolysin, LysPA26, against Pseudomonas aeruginosa //Front. Microbiol. – 2017. – Vol. 8, № 293. – P. 1-9. – DOI: 10.3389/fmicb.2017.00293

Guz L., Kozińska A. Antibiotic susceptibility of Aeromonas hydrophila and A. sobria isolated from farmed carp (Cyprinus carpio L.) //Bull. Vet. Inst. Pulawy. – 2004. – Vol. 48. – P. 391-395.

Di J., Zhang S., Huang J., Du H., Zhou Y., Zhou Q., Wei Q. Isolation and identification of pathogens causing haemorrhagic septicaemia in cultured Chinese sturgeon (Acipenser sinensis) //Aquac. Res. - 2018. – P. 1-10. – DOI: 10.1111/are.13830

Haddad Kashani H., Fahimi H., Dasteh Goli Y., Moniri R. A novel chimeric endolysin with antibacterial activity against methicillin-resistant Staphylococcus aureus //Front. Cell. Infect. Microbiol. – 2017. – Vol. 7. – P. 1-12. – DOI: 10.3389/fcimb.2017.00290

Hagiwara M., Watanabe E., Barrett J.C., Tsutsui T. Assessment of genotoxicity of 14 chemical agents used in dental practice // Mutat. Res. – 2006. – Vol. 603. – P. 111–120.

Hammond R.W., Swift S.M., Foster-Frey J.A. et al. Optimized production of a biologically active Clostridium perfringens phage endolysin PlyCP41 in plants // BMC Biotechnol. – 2019. – Vol. 19, № 101. - P. 1-10.

Han Z., Sun J., Lv A. et al. Isolation, identification and characterization of Shewanella algae from reared tongue sole // Aquac. - 2017. – Vol. 468. – P. 356–362.

Handfield M., Simard P., Letarte R. Differential media for quantitative recovery of waterborne Aeromonas hydrophila //Appl. Environ. Microbiol. – 1996. – Vol. 62, № 9. – P. 3544-3547. – DOI: 10.1128/AEM.62.9.3544-3547.1996

Hänninen M.L. Phenotypic characteristics of the three hybridization groups of Aeromonas hydrophila complex // J. Appl. Bacteriol. – 1994. – Vol. 76. - P. 455-462.

Harikrishnan R., Balasundaram C., Heo M.S. Effect of probiotics enriched diet on Paralichthys olivaceus infected with lymphocystis disease virus (LCDV) //Fish Shellfish Immunol. – 2010. – Vol. 29, № 5. – P. 868-874. – DOI: 10.1016/j.fsi.2010.07.031

Hassan M. A., Noureldin E.A., Mahmoud M. A., Fita N. A. Molecular identification and epizootiology of Aeromonas veronii infection among farmed Oreochromis niloticus in Eastern Province, KSA //Egyp. J. Aqua. Res. – 2017. – Vol. 43. – P. 161-167. – DOI: 10.1016/j.ejar.2017.06.001

Høie S., Dalsgaard I., Aase I.L. et al. PCR-based typing analysis of atypical isolates of the fish pathogen Aeromonas salmonicida // Syst. Appl. Microbiol. – 1999. – V. 22. - P. 403-411

Hossain M. J., Sun D., McGarey D. J., Wrenn S., Alexander L. M., Martino M. E., Xing Y., Terhune J. S., Liles M. R. An Asian origin of virulent Aeromonas

hydrophila responsible for disease epidemics in United States-farmed catfish //mBio. – 2014. – Vol. 5, № 3. – P. 1-7. – DOI: 10.1128/mBio.00848-14

Hossain S., Dahanayake P., De Silva B., Wickramanayake M., Wimalasena S., Heo G.-J. Multidrug resistant Aeromonas spp. isolated from zebrafish (Danio rerio): antibiogram, antimicrobial resistance genes and class 1 integron gene cassettes //Lett. Appl. Microbiol. - 2019. – Vol. 68. – P. 370-377. – DOI: 10.1111/lam.13138

Hu M., Wang N., Pan Z. H. et al. Identity and virulence properties of Aeromonas isolates from diseased fish, healthy controls and water environment in China // Lett. Appl. Microbiol. - 2012. – Vol. 55, № 3. - P. 224–233.

Hudzicki J. Kirby-Bauer disk diffusion susceptibility test protocol // A. S. M. - 2009. - P. 1-23.

Huizinga H.W., Esch G.W., Hazen T.C. Histopathology of red-sore disease (Aeromonas hydrophila) in naturally and experimentally infected largemouth bass // J. Fish Dis. – 1979. – Vol. 2, № 4. – P. 263–277.

Humeau Pseudomonas agar base selective medium for detection and enumeration of Pseudomonas spp., according to ISO 13720, ISO/TS 11059 and ISO 16266. Rev.2. – URL: https://www.humeau.com/media/blfa_files/TC_Pseudomonas-gelose-base_EN_020718_5137bad7135953d0074481fa4e64a8b4.pdf (дата обращения 2021-01-23).

Hussain Bhat R. A., Thakuria D., Dubey M. K. et al. Lethal dose and histopathological alterations induced by Aeromonas salmonicida in common carp // Microbial. Pathogenesis. - 2021. – Vol. 158. – P. 1-10

Hutchings M.I., Truman A.W., Wilkinson B. Antibiotics: past, present and future //Curr. Opin. Microbiol. - 2019. - Vol. 51. – P. 72-80. – DOI: 10.1016/j.mib.2019.10.008

Huys G., Coopman R., Janssen P., Kersters K. High-resolution genotypic analysis of the genus Aeromonas by AFLP fingerprinting // Int. J. Syst. Bacteriol. - 1996. - Vol. 46. – P. 572-580

Iqbal M.M., Tajima K., Ezura Y. Pathogenicity of motile Aeromonas species isolated from fishes with epizootic ulcerative syndrome (EUS) // Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ. – 1999. – Vol. 50. – P. 93-100

Janda J. M., Abbott S. L. The genus Aeromonas: taxonomy, pathogenicity, and infection // Clin. Microbiol. Rev. - 2010. – Vol. 23, № 1. – P. 35–73.

Jandourek A., Boyle J., Cassino C., Wittekind M., Kirby H. Long term immunology results of a phase 1 placebo controlled dose escalating study to examine the safety of CF-301 in human volunteers //In.: Proceed. 27th ECCMID. - Vienna, Austria. – 2017. – Vol. 22. – P. 1.

Jandourek A., Boyle J., Murphy G., Cassino C. Inflammatory markers in a phase 1 placebo controlled dose escalating study of intravenous doses of CF-301 in human subjects //In.: Proceed. ASM Microb. - New Orleans, LA, USA. - 2017. – P. 1.

Jiang N., Fan Y. D., Zhou Y., Ma J., Liu W. Z., Zeng L. B. Overview of sturgeon pathogenic disease research //J. Hydroec. - 2016. – Vol. 37, № 2. – P. 1-9.

Jun S.Y., Jung G.M., Yoon S.J. et al. Preclinical safety evaluation of intravenously administered SAL200 containing the recombinant phage endolysin SAL-1 // Ant. A. Chem. - 2014. – Vol. 58. – P. 2084–2088.

Jun S.Y., Jang I.J., Yoon S., Jang K., Yu K.-S., Cho J.Y., Seong M.-W., Jung G. M., Yoon S.J., Kang S.H. Pharmacokinetics and tolerance of the phage endolysin-based candidate drug SAL200 after a single intravenous administration among healthy volunteers //Ant. A. Chem. – 2017. – Vol. 61, № 6. – P. 1-11. - DOI: 10.1128/AAC.02629-16

Jun S.Y., Jung G.M., Yoon S.J. et al. Pharmacokinetics of the phage endolysin-based candidate drug SAL200 in monkeys // Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. – 2016. – Vol. 43. – P.1013–1016.

Kalatzis P. G., Castillo D., Katharios P., Middelboe M. Bacteriophage interactions with marine pathogenic vibrios: implications for phage therapy //Antibiotics. – 2018. – Vol. 7, № 1. – P. 1-23. – DOI: 10.3390/antibiotics7010015

Kasai H., Watanabe K., Gasteiger E., Bairoch A., Isono K., Yamamoto S., Harayama S. Construction of the gyrB database for the identification and classification of bacteria //Gen. Inform. Ser. W. Gen. Inform. - 1998. – Vol. 9. – P. 13-21.

Kayis S., Er A., Kangel P., Kurtoğlu I.Z. Bacterial pathogens and health problems of Acipenser gueldenstaedtii and Acipenser baerii sturgeons reared in the eastern Black Sea region of Turkey //Iran. J. Vet. Res. – 2017. – Vol. 18, № 1. – P. 18-24.

Kaznowski A. Identification of Aeromonas strains of different origin to the genomic species level // J. Appl. Microbiol. – 1998. – Vol. 84. - P. 423-430.

Khan F.M., Gondil V.S., Li C., Jiang M., Li J., Yu J., Wei H., Yang H. A novel Acinetobacter baumannii bacteriophage endolysin LysAB54 with high antibacterial activity against multiple Gram-negative microbes //Front. Cell Infect. Microbiol. – 2021. – Vol. 11. – P. 1-9. – DOI: 10.3389/fcimb.2021.637313

Khatibi P.A., Roach D.R., Donovan D.M. et al. Saccharomyces cerevisiae expressing bacteriophage endolysins reduce Lactobacillus contamination // Biotechnol. Biofuels. – 2014. – Vol. 7, № 104. – P. 1-13

Kim Y.-S., Yoon J.W., Han H.-J. et al. Prevalence and characterization of typical Aeromonas salmonicida Chum salmon isolates in Korea // Fish. Aquat. Sci. – 2011. – Vol. 14. – P. 347-354

King E.O., Ward M.K., Raney D.E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin //J. Lab. Clin. Med. – 1954. – Vol. 44, № 2. – P. 301-307.

Knapp A., Kitschke C., von Meibom S. Proceedings of the international sturgeon enforcement workshop to combat illegal trade in caviar. - Brussels. - 2006. – 172 p.

Korni F. Experimental infection of atypical Aeromonas salmonicida in Nile tilapia Oreochromis niloticus and its treatment // J. fish pathol. - 2015. – Vol. 28. – P. 145-155.

Kozińska A., Pękala A. Characteristics of disease spectrum in relation to species, serogroups, and adhesion ability of motile aeromonads in fish // Scien. World J. – 2012. – P. 1–9.

Kuiper J.W.P., Hogervorst J.M.A. et al. The novel endolysin XZ.700 effectively treats MRSA biofilms in two biofilm models // Biofouling. – 2021. – Vol. 37, № 2. – P. 184-193.

Kümmerer K. Antibiotics in the aquatic environment--a review--part II //Chemosphere. – 2009. - Vol. 75, № 4. – P. 435-441. – DOI: 10.1016/j.chemosphere.2008.12.006

Laith A. R., Najiah M. Aeromonas hydrophila: antimicrobial susceptibility and histopathology of isolates from diseased catfish, Clarias gariepinus (Burchell) //J. Aquac. Res. Dev. – 2014. - Vol. 5, № 2. - P. 1-7.

Lamy B., Laurent F., Kodjo A. Validation of a partial rpoB gene sequence as a tool for phylogenetic identification of aeromonads isolated from environmental sources //Can. J. Microbiol. – 2010. – Vol. 56, № 3. – P. 217-228. – DOI: 10.1139/W10-006

Lane D.J. 16S/23S rRNA sequencing. In nucleic acid techniques in bacterial systematics. Edited by E. Stackebrandt and M. Goodfellow //John Wiley and Sons, Chichester, U.K. - 1991. - P.177–203.

Larsen J.L., Jensen N.J. An Aeromonas species implicated in ulcer-disease of the cod (Gadus morhua) //Nord. Vet. – 1977. – Vol. 29. -P. 199-211.

Larpin Y., Oechslin F., Moreillon P., Resch G., Entenza J.M., Mancini S. In vitro characterization of PlyE146, a novel phage lysin that targets Gram-negative bacteria //PLoS One. – 2018. – Vol. 13, № 2. – P. 1-15. – DOI: 10.1371/journal.pone.0192507

Lee C., Kim J., Son B., Ryu S. Development of advanced chimeric endolysin to control multidrug-resistant Staphylococcus aureus through domain shuffling //ACS Infect. Dis. - 2021. – Vol. 7, № 8. – P. 2081–2092. – DOI: 10.1021/acsinfecdis.0c00812

Lee K. K., Ellis A. E. Glycerophospholipid: cholesterol acyltransferase complexed with lipopolysaccharide (LPS) is a major lethal exotoxin and cytolysin of Aeromonas salmonicida: LPS stabilizes and enhances toxicity of the enzyme //J. Bacteriol. - 1990. – Vol. 172, № 9. – P. 5382–5393. – DOI: 10.1128/jb.172.9.5382-5393.1990

Li C, Fang Q, Zhang Y, Li K, Li Y, Wang R, Peng Y, Zhang G, Xia L, Hu S. Isolation and Characterization of a Novel Virulent Phage ASG01 of Aeromonas salmonicida and Its Cell Wall Hydrolase Activity. Microorganisms. 2024; 12(3):629. https://doi.org/10.3390/microorganisms12030629

Li J., Ni X. D., Liu Y. J., Lu C. P. Detection of three virulence genes alt, ahp and aerA in Aeromonas hydrophila and their relationship with actual virulence to zebrafish //J. Appl. Microbiol. - 2011. – Vol. 110, №. 3. - P. 823–830. – DOI: 10.1111/j.1365-2672.2011.04944.x

Li X., Zhang C., Wei F., Yu F., Zhao Z. Bactericidal activity of a holin-endolysin system derived from Vibrio alginolyticus phage HH109 //Microbial. Pathogen. – 2021. – Vol. 159. – P. 1-7. – DOI: 10.1016/j.micpath.2021.105135

Lian Z., Bai J., Hu X., Lü A., Sun J., Guo Y., Song Y. Detection and characterization of Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida infection in crucian carp Carassius auratus //Vet. Res. Commun. - 2020. – P. 1-12. – DOI: 10.1007/s11259-020-09773-0

Lim J., Hong S. Characterization of Aeromonas salmonicida and A. sobria isolated from cultured salmonid fish in Korea and development of a vaccine against furunculosis //J. Fish. Dis. - 2020. – P. 1-12. – DOI: 10.1111/jfd.13158

Lim J.A., Shin H., Heu S., Ryu S. Exogenous lytic activity of SPN9CC endolysin against Gram-negative bacteria //J. Microbiol. Biotechnol. – 2014. – Vol. 24. – P. 803-811. – DOI: 10.4014/jmb.1403.03035

Lin Q., Li J., Fu X., Liu L., Liang H., Niu Y., Huang C., Huang Z., Mo Z., Li N. Hemorrhagic gill disease of Chinese perch caused by Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida in China //Aquaculture. – 2019. – Vol. 519. – P. 1-5. – DOI: 10.1016/j.aquaculture.2019.734775

Lin Q., Xavier B.B., Alako B.T.F., Mitchell A.L., Rajakani S.G., Glupczynski Y., Finn R.D., Cochrane G., Malhotra-Kumar S. Screening of global microbiomes implies ecological boundaries impacting the distribution and dissemination of clinically relevant antimicrobial resistance genes //Commun Biol. – 2022. – Vol. 5. – P. 1-9. - DOI: 10.1038/s42003-022-04187-x

Ling X., Dong W., Zhang Y., Qian X., Zhang W., He W., Zhao X., Liu J. Comparative transcriptomics and histopathological analysis of crucian carp infection by atypical Aeromonas salmonicida //Fish Shellf. Immunol. - 2019. – Vol. 94. – P. 294-307. – DOI: 10.1016/j.fsi.2019.09.006

Liofilchem. Aeromonas agar. Selective medium for the isolation of Aeromonas hydrophila from environmental samples. Rev.0. – URL: http://www.liofilchem.net/login/pd/ifu/10406_IFU.pdf (дата обращения 2020-12-24).

Loessner M.J. Bacteriophage endolysins--current state of research and applications //Curr. Opin. Microbiol. – 2005. – Vol. 8. № 4. – P. 480-487. – DOI: 10.1016/j.mib.2005.06.002

Loc N. T., Huyen B. T., Hoang H. A., Nga L. P. Cloning and expression of the bacteriophage-derived endolysin against Aeromonas hydrophila //IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci. – 2021. – Vol. 947. – P. 1-8.

Lu Y., Wang Y., Wang J., Zhao Y., Zhong Q., Li G., Fu Z., Lu S. Phage endolysin LysP108 showed promising antibacterial potential against methicillin-resistant Staphylococcus aureus //Front. Cell Infect. Microbiol. – 2021. – Vol. 11. – P. 1-12. – DOI: 10.3389/fcimb.2021.668430

Luk’yanenko V. I., Vasil’ev A. S., Luk’yanenko V. V., Khabarov M. V. On the increasing threat of extermination of the unique Caspian sturgeon populations and the urgent measures required to save them //J. Appl. Ichthyol. - 1999. – Vol. 15, № 4-5. – P. 99–102. – DOI: 10.1111/j.1439-0426.1999.tb00216.x

Lulijwa R., Rupia E. J., Alfaro A. C. Antibiotic use in aquaculture, policies and regulation, health and environmental risks: a review of the top 15 major producers //Rev. Aquac. - 2019. – P. 1-24. – DOI: 10.1111/raq.12344

Lund V., Espelid S., Mikkelsen H. Vaccine efficacy in spotted wolffish Anarhichas minor: relationship to molecular variation in A-layer protein of atypical Aeromonas salmonicida //Dis. Aqua. Org. – 2003. – Vol. 56. – P. 31–42. – DOI: 10.3354/dao056031

Lund V., Jenssen L.M., Wesmajervi M.S. Assessment of genetic variability and relatedness among atypical Aeromonas salmonicida from marine fishes, using AFLP-fingerprinting //Dis. Aquat. Organ. – 2002. – Vol. 50. - P. 119-126. – DOI: 10.3354/dao050119

Lupiola-Gómez P. A., González-Lama Z., Tejedor-Junco M. T., González-Martín M., Martín-Barrasa J. L. Group 1 β-lactamases of Aeromonas caviae and their resistance to β-lactam antibiotics //Can. J. Microbiol. - 2003. – Vol. 49, № 3. - P. 207–215. – DOI: 10.1139/w03-030

Magdy I.H., El-Hady M., Ahmed H.A., Elmeadawy S.A., Kenwy A.M. A contribution on Pseudomonas aeruginosa infection in African Catfish (Clarias gariepinus) //Res. J. Pharm. Bio. Chem. Sci. - 2014. – Vol. 5. – P. 575-588.

Mamilov N.S., Konysbaev T.G., Magda I.N., Vasil'eva E.D. Taxonomic status of four rare alien fish species of the Kapchagay Reservoir // J. Ichthyol. - 2021. - Vol. 61. - P. 339–347.

Manyi-Loh C., Mamphweli S., Meyer E., Okoh A. Antibiotic use in agriculture and its consequential resistance in environmental sources // Molecul. – 2018. – Vol. 23, № 4. – P. 1-48.

Mao J., Schmelcher M., Harty W. J., Foster-Frey J., Donovan D. M. Chimeric Ply187 endolysin kills Staphylococcus aureus more effectively than the parental enzyme //FEMS Microbiol. Lett. - 2013. – Vol. 342, № 1. – P. 30–36. – DOI: 10.1111/1574-6968.12104

Marisa H., Meng L., Alegria W., Deresinski S. Bacteremia due to methicillin-resistant Staphylococcus aureus // Infect. Dis Clin. NA. – 2020. – DOI: 10.1016/j.idc.2020.04.003.

Martinez J.L., Baquero F. Mutation frequencies and antibiotic resistance // Antimicrob. Agents Chemother. – 2000. – Vol. 44, № 7. – P. 1771-1777.

Martínez-Murcia A.J. Phylogenetic positions of Aeromonas encheleia, Aeromonas popoffii // Int. J. Syst. Bacteriol. – 1999. – Vol. 49. - P. 1403-1408.

Martínez-Murcia A.J., Benlloch S., Collins M.D. Phylogenetic interrelationships of members of the genera Aeromonas and Plesiomonas // Int. J. Syst. Microbiol. – 1992. – Vol. 42. - P. 412-421.

Martinez-Murcia A.J., Soler L., Saavedra M.J. et al. Phenotypic, genotypic, and phylogenetic discrepancies to differentiate Aeromonas salmonicida from Aeromonas bestiarum // Int. Microbiol. – 2005. – Vol. 8. - P. 259-269.

Mashzhan A., Smekenov I., Bakiyev S., Utegenova K., Samatkyzy D., Daniyarov A., Kairov U., Sarbassov D., Bissenbaev A. Whole-genome sequencing of a potentially novel Aeromonas species isolated from diseased Siberian sturgeon (Acipenser baerii) using Oxford nanopore sequencing // Microorganisms. 13 (7), - 2025. – P. 1-15

Masuyer G. Crystal Structure of Exotoxin A from Aeromonas pathogenic species //Toxins. - 2020. – Vol. 12, № 6. - P. 1-14. – DOI: 10.3390/toxins12060397

Mateus A. P., Power D. M., Canário A. V. M. Stress and disease in fish //Fish Dis. - 2017. – P. 187–220. – DOI: 10.1016/b978-0-12-804564-0.00008-9

Matyar F., Akkan T., Uçak Y., Eraslan B. Aeromonas and Pseudomonas: antibiotic and heavy metal resistance species from Iskenderun Bay, Turkey (northeast

Mediterranean Sea) //Environ. Monit. Assess. – 2010. – Vol. 167, № 1-4. – P. 309-320. – DOI: 10.1007/s10661-009-1051-1

McIntosh D., Austin B. Atypical characteristics of the salmonid pathogen Aeromonas salmonicida //J. Gen. Microbiol. – 1991. – Vol. 137, № 6. – P. 1341–1343. – DOI: 10.1099/00221287-137-6-1341

Meng Y., Xiao H. B., Zeng L. B. Isolation and identification of the hemorrhagic septicemia pathogen from Amur sturgeon, Acipenser schrenckii //J. Appl. Ichthyol. - 2011. – Vol. 27, № 2. – P. 799–803. – DOI: 10.1111/j.1439-0426.2011.01717.x

Meyer F.P., Collar J.D. Description and treatment of a Pseudomonas infection in white catfish //Appl. Microbiol. – 1964. – Vol. 12, № 3. – P. 201-203. – DOI: 10.1128/am.12.3.201-203.1964

Meyer J.M. Pyoverdines: pigments, siderophores and potential taxonomic markers of fluorescent Pseudomonas species //Arch. Microbiol. – 2000. – Vol. 174, № 3. – P. 135-142. – DOI: 10.1007/s002030000188

Michaelis C., Grohmann E. Horizontal gene transfer of antibiotic resistance genes in biofilms // Antibiot. – 2023. – Vol. 12, № 2. - P. 1-31.

Milud A. Virulence genes detection of Aeromonas hydrophila originated from diseased freshwater fishes //Adv. Environ. Bio. - 2015. – Vol. 9. – P. 22-26.

Moldagalieva D.Z., Uzakov Y.M., Sarsembaeva N.B. Chemical composition and nutritional value of the fish grown under the conditions of a natural hot spring // Cardiometry. – 2021. – Vol. 20. - P. 180-183.

Mukherjee M., Marie L., Liles C. et al. Elevated incidences of antimicrobial resistance and multidrug resistance in the Maumee river // Microorganisms. – 2021. – Vol. 9. – P. 1-13.

Nagar V., Shashidhar R., Bandekar J.R. Characterization of Aeromonas strains isolated from Indian foods using rpoD gene sequencing and whole cell protein analysis //W. J. Microbiol. Biotech. – 2013. – Vol. 29. – P. 745–752. – DOI: 10.1007/s11274-012-1212-1

Nahed A. E., Nada K. A., Ahmed E. A., Fatma I. E., Samir A. M., Alaa M.S.A., Eman A.A.A. Controlling of multidrug resistant Aeromonas hydrophila infected Nile tilapia (Oreochromis niloticus) using Ah01 and Ah02 virulent bacteriophages isolates //S. J. Biol. Sci. – 2022. - P. 1-10. – DOI: 10.1016/j.sjbs.2022.02.050

Nakai T., Park S.C. Bacteriophage therapy for infectious diseases in aquiculture //Res. Microbiol. – 2002. – Vol. 153. – P. 13–18.

Nam I.Y., Joh K. Rapid detection of virulence factors of Aeromonas isolated from a trout farm by hexaplex-PCR // J. Microbiol. - 2007. – Vol. 45. - P. 297–304.

NCBI. Conserved domains on [gi|1036448068|gb|ANK36008|]. Endolysin Gp110 [Salmonella phage 10]. – URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi?INPUT_TYPE=live&SEQUENCE=ANK36008.1(дата обращения 2019-09-29).

Nelson D., Loomis L., Fischetti V.A. Prevention and elimination of upper respiratory colonization of mice by group A streptococci by using a bacteriophage lytic enzyme //Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2001. – Vol. 98, № 7. – P. 4107–4112. – DOI: 0.1073/pnas.061038398

Nelson D. C., Schmelcher M. et al. Endolysins as antimicrobials // Bacteriophages, Part B. - 2012. – P. 299–365

Nikapitiya C., Dananjaya S.H.S., Chandrarathna H.P.S.U., Senevirathne A., Zoysa M. D., Lee J. Isolation and characterization of multidrug resistance Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida and its infecting novel phage ASP-1 from goldfish (Carassius auratus) //Indian. J. Microbiol. – 2019. – Vol. 59. – P. 161–170. – DOI: 10.1007/s12088-019-00782-5

Ninawe A. S., Sivasankari S., Ramasamy P., Kiran G. S., Selvin J. Bacteriophages for aquaculture disease control //Aquac. Int. - 2020. – Vol. 28, № 5. - P. 1925–1938. – DOI: 10.1007/s10499-020-00567-4

Ni P., Wang L., Deng B., Jiu S., Ma C., Zhang C., Almeida A., Wang D., Xu W, Wang S. Characterization of a lytic bacteriophage against Pseudomonas syringae pv. actinidiae and its Endolysin //Viruses. - 2021. – Vol. 13, №4. – P. 1-16. – DOI: 10.3390/v13040631

Noura Salih K.M., Jusuf N.H., Hamid A.A., Yusoff W.M. High prevalence of Pseudomonas species in soil samples from Ternate Island-Indonesia //Pak. J. Biol. Sci. - 2009. – Vol. 12, № 14. – P. 1036-1040. – DOI: 10.3923/pjbs.2009.1036.1040

Nurzhanova F., Absatirov G. et al. The vulnerary potential of botanical medicines in the treatment of bacterial pathologies in fish // Vet. World. – 2021. – Vol. 14, № 3. – P. 551-553

O'Brien D., Mooney J., Ryan D., Powell E., Hiney Maura, Smith P., Powell R. Detection of Aeromonas salmonicida causal agent of furunculosis in Salmonid fish from the tank effluent of hatchery-reared Atlantic salmon smolts //Appl. Environ. Microbiol. - 1994. – Vol. 60. – P. 3874-3877. – DOI: 10.1128/AEM.60.10.3874-3877.1994

Oberbauer V., Mutti M., Schwebs T. et al. Discovery of potent endolysins against Pseudomonas aeruginosa and other gram-negative ESKAPE pathogens // Sci Rep. - 2025. - Vol. 15. - P. 29351

Oechslin F. Resistance development to bacteriophages occurring during bacteriophage therapy //Viruses. - 2018. – Vol. 10, № 7. - P. 1-23. – DOI: 10.3390/v10070351

O'Flaherty S., Coffey A., Meaney W. et al. The recombinant phage lysin LysK has a broad spectrum of lytic activity against staphylococci // J. Bacteriol. – 2005. – Vol. 187, № 20. – P. 7161-7164

Oliveira H., Thiagarajan V., Walmagh M., Sillankorva S., Lavigne R., Neves-Petersen M. T., Kluskens L. D., Azeredo J. A thermostable Salmonella phage endolysin, Lys68, with broad bactericidal properties against Gram-negative pathogens in presence of weak acids //PLOS ONE. – 2014. – Vol. 9, № 10. – P. 1-11. – DOI: 10.1371/journal.pone.0108376

Oliveira H., Vilas Boas D., Mesnage S., Kluskens L.D., Lavigne R., Sillankorva S., Secundo F., Azeredo J. Structural and enzymatic characterization of ABgp46, a novel phage endolysin with broad anti-Gram-negative bacterial activity //Front. Microbiol. – 2016. – Vol. 26, №7. – P. 1-9. – DOI: 10.3389/fmicb.2016.00208

Pachanawan A., Phumkhachorn P., Rattanachaikunsopon P. Potential of Psidium guajava supplemented fish diets in controlling Aeromonas hydrophila infection // J. Biosci. Bioeng. – 2008. – Vol. 106, № 5. – P. 419–424.

Pavan M.E., Abbott S.L., Zorzópulos J., Janda J.M. Aeromonas salmonicida subsp. pectinolytica subsp. nov. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2000. – Vol. 50. - P. 1119-1124.

Pemberton J. M., Kidd S. P., Schmidt R. Secreted enzymes of Aeromonas // FEMS Microbiol. Lett. - 2006. – Vol. 152, № 1. – P. 1–10.

Phothichaisri W., Chankhamhaengdecha S. et al. Potential role of the host-derived cell-wall binding domain of endolysin CD16/50L // Microbiol Spectr. – 2022. – Vol. 10, № 2. – P. 1-22.

Pitt T. L., Barer M. R. Classification, identification and typing of micro-organisms //Med.Microbiol. – 2012. – P. 24–38. – DOI: 10.1016/B978-0-7020-4089-4.00018-4

Plotka M., Kapusta M., Dorawa S., Kaczorowska A.K., Kaczorowski T. Ts2631 endolysin from the extremophilic Thermus scotoductus bacteriophage vB_Tsc2631 as an antimicrobial agent against Gram-negative multidrug-resistant bacteria //Viruses. – 2019. – Vol. 11, № 7. – P. 1-15.

Poirel L., Madec J.Y., Lupo A. et al. Antimicrobial resistance in Escherichia coli // Microbiol Spectr. – 2018. – Vol. 6. – P. 1-27.

Popoff M. Genus III. Aeromonas Kluyver and Van Neil 1936. Bergey's manual of systematic bacteriology. - 1984. – Vol .1. - P. 545–548.

Principi N., Silvestri E., Esposito S. Advantages and limitations of bacteriophages for the treatment of bacterial infections //Front. Pharmacol. – 2019. – Vol.10. – P. 1-9.

Rabaan A. A, Gryllos I., Tomás J. M., Shaw J.G. Motility and the polar flagellum are required for Aeromonas caviae adherence to HEp-2 cells //Infect. Immun. - 2001. – Vol. 69, № 7. - P. 4257-4267. – DOI: 10.1128/IAI.69.7.4257-4267.2001

Radosavljevic V., Milicevic V., Maksimović-Zorić J., Veljović L., Nesic K., Pavlović M., Ljubojević-Pelić D., Marković Z. Sturgeon diseases in aquaculture //Arch. Vet. Med. - 2019. – Vol. 12, № 1. - P. 5-20. – DOI: 10.46784/e-avm.v12i1.34

Ramadan H., Ibrahim N., Samir M., Abd El-Moaty A., Gad, T. Aeromonas hydrophila from marketed mullet (Mugil cephalus) in Egypt: PCR characterization of β-lactam resistance and virulence genes //J. Appl. Microbiol. – 2018. – Vol. 124. – P. 1629-1637. – DOI: 10.1111/jam.13734

Raman R., Prakash C., Makesh M., Pawar N.A. Environmental stress mediated diseases of fish: an overview //Adv. Fish Res. - 2013. - Vol. 5. – P. 141–158.

Rasmussen-Ivey C.R., Figueras M.J., McGarey D., Liles M.R. Virulence factors of Aeromonas hydrophila: in the wake of reclassification //Front. Microbiol. – 2016. – Vol. 7. – P. 1-10. – DOI: 10.3389/fmicb.2016.01337

Roach D., Donovan D. Antimicrobial bacteriophage-derived proteins and therapeutic applications //Bacteriophage. – 2015. – Vol. 5, № 3. – P. 1-16. – DOI: 10.1080/21597081.2015.1062590

Rodríguez-Rubio L., Gerstmans H., Thorpe S., Mesnage S., Lavigne R., Briers Y. DUF3380 Domain from a Salmonella phage endolysin shows potent N-acetylmuramidase activity //Appl.Environ. Microbiol. – 2016. – Vol. 82, № 16. – P. 4975-4981. – DOI: 10.1128/AEM.00446-16

Rodríguez-Rubio L., Martínez B., Donovan D. M., Rodríguez A., García P. Bacteriophage virion-associated peptidoglycan hydrolases: potential new enzybiotics //Crit. Rev. Microbiol. – 2013. – Vol. 39, № 4. - P. 427-434.

Rotolo J.A., Ramirez R.A., Schuch R., Machacek M., Khariton T., Ghahramani P., Wittekind M. PK-PD driver of efficacy for CF-301, a novel anti-staphylococcal lysin: Implications for human target dose //In.: Proceed. ASM Microb. - Boston, MA, USA. – 2016. – P. 1.

Ruban G. I., Khodorevskaya R. P. Caspian Sea sturgeon fishery: a historic overview //J. Appl. Ichthyol. - 2011. – Vol. 27, № 2. – P. 199–208. – DOI: 10.1111/j.1439-0426.2011.01725.x

Ruiz P., Vidal J.M., Sepúlveda D., Torres C., Villouta G., Carrasco C., Aguilera F., Ruiz-Tagle N., Urrutia, H. Overview and future perspectives of nitrifying bacteria on biofilters for recirculating aquaculture systems //Rev. Aquac. - 2020. – Vol. 12. – P. 1478-1494. – DOI: 10.1111/raq.12392

Rupp M., Pilo P., Müller B., Knüsel R., von Siebenthal B., Frey J., Sindilariu P-D., Schmidt-Posthaus H. Systemic infection in European perch with thermoadapted virulent Aeromonas salmonicida (Perca fluviatilis) //J. Fish Dis. - 2019. – P. 1-7. – DOI: 10.1111/jfd.12970

Sah S., Singh R. Phylogenetical coherence of Pseudomonas in unexplored soils of Himalayan region //3 Biotech. – 2016. – Vol. 6, № 2. – P. 1-10. – DOI: 10.1007/s13205-016-0493-8

Sakazaki R., Shimada T. O-serogrouping scheme for mesophilic Aeromonas strains // Japan. J. Med. Sci. Biol. – 1984. – Vol. 37, № 5-6. - P. 247-255.

Salam M.A., Al-Amin M.Y. et al. Antimicrobial resistance: a growing serious threat for global public health // Healthcare (Basel). – 2023. – Vol. 11, № 13. – P. 1-20

Samayanpaulraj V., Velu V., Uthandakalaipandiyan R. Determination of lethal dose of Aeromonas hydrophila Ah17 strain in snake head fish Channa striata // Microbial. Pathogen. - 2019. – Vol. 127. – P. 7–11

Santi M., Pastorino P., Foglini C., Righetti M., Pedron C., Prearo M. A survey of bacterial infections in sturgeon farming in Italy //J. Appl. Ichthyol. – 2019. – Vol. 35. - P. 275– 282. – DOI: 10.1111/jai.13802

Scarpellini M., Franzetti L., Galli A. Development of PCR assay to identify Pseudomonas fluorescens and its biotype // FEMS Microbiol. Lett. – 2004. – Vol. 236, № 2. - P. 257-260

Schmelcher M., Donovan D. M., Loessner M. J. Bacteriophage endolysins as novel antimicrobials //Front. Microbiol. - 2012. – Vol. 7, № 10. – P. 1147–1171. – DOI: 10.2217/fmb.12.97

Schmidt A.S., Bruun M.S., Dalsgaard I., Pedersen K., Larsen J.L. Occurrence of antimicrobial resistance in fish-pathogenic and environmental bacteria associated

with four danish rainbow trout farms //Appl. Environ. Microbiol. – 2000. – Vol. 66, № 11. – P. 4908-4915. – DOI: 10.1128/AEM.66.11.4908-4915.2000

Schulz P., Robak S., Dastych J., Siwicki A. K. Influence of bacteriophages cocktail on European eel (Anguilla anguilla) immunity and survival after experimental challenge //Fish Shellfish Immunol. - 2018. – Vol. 84. – P. 28-37. – DOI: 10.1016/j.fsi.2018.09.056

Sen K., Rodgers M. Distribution of six virulence factors in Aeromonas species isolated from US drinking water utilities // J. Appl. Microbiol. - 2004. – Vol. 97, № 5. - P. 1077–1086.

Sergaliyev N., Kakishev M. et al. Examination of the microbiome of bastard sturgeon cultivated in the conditions of recirculated water // Int. J. Eng. Adv. Technol. - 2019. – Vol. 9, № 1. – P. 4536-4542.

Sergaliev N. K., Kakishev M. G. et al. Microbiome structure in a recirculating aquaculture system and its connection to infections in sturgeon fish // Vet. World. – 2021. – Vol. 14, № 3. – P. 661–668.

Sha J., Kozlova E. V., Chopra A. K. Role of various enterotoxins in Aeromonas hydrophila - induced gastroenteritis // Infect. Immun. - 2002. – Vol. 70, № 4. – P. 1924–1935.

Shen K.-S., Shu M., Tang M.-X. et al. Molecular cloning, expression and characterization of a bacteriophage JN01 endolysin against E. coli O157:H7 // Lebensmittel-Wissenschaft + Technologie. - 2022. – Vol. 165. - P. 1-7.

Sigmaaldrich. 60788 King agar A (Pseudomonas agar for pyocyanin; Pseudomonas agar P; tech agar) medium for the confirmation of Pseudomonas aeruginosa by pyocyanin formation. – URL: https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma-Aldrich/Datasheet/1/60788dat.pdf (дата обращения 2021-01-24)

Singh P.K., Donovan D.M., Kumar A. Intravitreal injection of the chimeric phage endolysin Ply187 protects mice from Staphylococcus aureus endophthalmitis //Antimicrob. Agents Chemother. – 2014. – Vol. 58, №8. – P. 4621-4629.

Sivakami R., Premkishore G., Chandran M. R. Occurrence and distribution of potentially pathogenic Enterobacteriaceae in carps and pond water in Tamil Nadu, India //Aquac. Res. - 1996. – Vol. 27, № 5. – P. 375–378. – DOI: 10.1111/j.1365-2109.1996.tb01263.x

Soler L. Potential virulence and antimicrobial susceptibility of Aeromonas popoffii recovered from freshwater and seawater // FEMS Immunol. Med. Microbiol. – 2002. – Vol. 32, № 3. – P. 243–247.

Spilker T., Coenye T., Vandame P., Lipuma J.J. PCR-Based assay for differentiation of Pseudomonas aeruginosa from other Pseudomonas species // J. Clin. Microb. – 2004. – Vol. 42. - P. 2074–2079.

Stratev D., Odeyemi O.A. An overview of motile Aeromonas septicaemia management //Aquacult. Int. - 2017. – Vol. 25. – P. 1095–1105. – DOI: 10.1007/s10499-016-0100-3

Sudheesh P. S., Al-Ghabshi A., Al-Mazrooei N., Al-Habsi S. Comparative pathogenomics of bacteria causing infectious diseases in fish //Int. J. Evol. Biol. – 2012. – P. 1-16. – DOI: 10.1155/2012/457264

Sulakvelidze A., Alavidze Z., Morris J. G. Bacteriophage therapy // Antimicrob. Agents Chemother. - 2001. – Vol. 45, № 3. – P. 649–659. – DOI: 10.1128/aac.45.3.649-659.2001

Sun D., Jeannot K., Xiao Y., Knapp C.W. Horizontal gene transfer mediated bacterial antibiotic resistance // Front. Microbiol. – 2019. – Vol. 10. - P. 1933

Sun J., Zhang X., Gao X., Jiang Q., Wen Y., Lin L. Characterization of virulence properties of Aeromonas veronii isolated from diseased gibel carp (Carassius gibelio) //Int. J. Mol. Sci. Apr. – 2016. – Vol. 17, № 4. – P. 1-11. – DOI: 10.3390/ijms17040496

Sun W., Tan Y., Jia M., Hu X., Rao X., Hu F. Functional characterization of the endolysin gene encoded by Pseudomonas aeruginosa bacteriophage PaP1 //A. J. Microbiol. Res. - 2010. – Vol. 5. – P. 933-939

Sveen L., Karlsen C., Ytteborg E. Mechanical induced wounds in fish–a review on models and healing mechanisms // Rev. Aquac. – 2020. – Vol. 12, № 4. – P. 2446-2465

Swift S., Seal B., Garrish J., Oakley B., Hiett K., Yeh H.-Y., Woolsey R., Schegg K. M., Line J. E., Donovan D. A thermophilic phage endolysin fusion to a clostridium perfringens-specific cell wall binding domain creates an anti-clostridium antimicrobial with improved thermostability //Viruses. – 2015. – Vol. 7, № 6. – P. 3019–3034. – DOI: 10.3390/v7062758

Tham H.Y., Song A.A., Yusoff K., Tan G.H. Effect of different cloning strategies in pET-28a on solubility and functionality of a staphylococcal phage endolysin // Biotechniques. – 2020. – Vol. 69, № 3. – P. 161-170

Tasho R., Cho J. Veterinary antibiotics in animal waste, its distribution in soil and uptake by plants: A review //Sci. T. Environ. - 2016. – Vol. 563-564. – P. 366-376. – DOI: 10.1016/j.scitotenv.2016.04.140

Taylor M. W. The Discovery of bacteriophage and the d'Herelle controversy //Viruses and Man: A History of Interactions. - 2014. – P. 53–61. – DOI: 10.1007/978-3-319-07758-1_4

Teuber M. Veterinary use and antibiotic resistance //Curr. Opin. Microbiol. – 2001. - Vol. 4, № 5. – P. 493-499. – DOI: 10.1016/s1369-5274(00)00241-1

The medicines (restrictions on the administration of veterinary medicinal products) regulations 1994. – URL: https://www.legislation.gov.uk/uksi/1994/2987/made (дата обращения 2021-02-17)

Thornton J., Howard S.P., Buckley J.T. Molecular cloning of a phospholip-cholesterol acyltransferase from Aeromonas hydrophila // Biochim. Biophys. - 1988. – Vol. 959. - P. 153–159

Tiwari P., Ekka S.R, Tripath J. In vitro study of Pseudomonas spp. isolated from soil //J. Phytol. – 2011. - Vol. 3, № 4. – P. 21-23

Totté J. E. E., van Doorn M. B., Pasmans S. G. M. A. Successful treatment of chronic Staphylococcus aureus-related dermatoses with the topical endolysin Staphefekt SA.100 // C. Rep. Derm. - 2017. – P. 19–25

Umelo E., Trust T. J. Identification and molecular characterization of two tandemly located flagellin genes from Aeromonas salmonicida A449 //J. Bacteriol. - 1997. – Vol. 179, № 17. – P. 5292-5300. – DOI: 10.1128/jb.179.17.5292-5299

Utegenova K.S., Bakiyev S.S., Mambetova D.S., Kauysbekov A.Zh., Bissenbaev A.K. Biochemical and molecular genetic identification of the bacterial pathogen – Aeromonas bestiarum from a diseased Siberian sturgeon (Acipenser baerii) // International journal of biology and chemistry, Almaty, no. 17 (2), – 2024. – P. 18-24

Vaara M., Vaara T. Outer membrane permeability barrier disruption by polymyxin in polymyxin-susceptible and -resistant Salmonella typhimurium //Antimic. A. Chem. – 1981. – Vol. 19, № 4. – P. 578–583.

Vaara M., Vaara T. Polycations as outer membrane-disorganizing agents //Antimic. A. Chem. – 1983. – Vol. 24, № 1. – P. 114-122. – DOI: 10.1128/AAC.24.1.114

Vasilyeva L. M., Elhetawy A. I. G., Sudakova N. V., Astafyeva S. S. History, current status and prospects of sturgeon aquaculture in Russia //Aquac. Res. - 2019. – Vol. 50, № 4. – P. 979–993. – DOI: 10.1111/are.13997

Vaz-Moreira I., Nunes O. C., Manaia C. M. Diversity and antibiotic resistance in Pseudomonas spp. from drinking water //Sci. Tot. Environ. - 2012. – Vol. 426. – P. 366–374. – DOI: 10.1016/j.scitotenv.2012.03.046

Ventola C.L. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats // Pharmacy and therapeutics. – 2015. – Vol. 40, № 4. – P. 277-283

Walmagh M., Briers Y., Santos S. B. dos, Azeredo J., Lavigne R. Characterization of modular bacteriophage endolysins from Myoviridae phages OBP, 201φ2-1 and PVP-SE1 //PLoS ONE. – 2012. – Vol. 7, № 5. – P. 1-10. – DOI: 10.1371/journal.pone.0036991

Wang C., Shi S., Wei M., Luo Y. Characterization of a novel broad-spectrum endolysin PlyD4 encoded by a highly conserved prophage found in Aeromonas hydrophila ST251 strains //Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2022. – Vol. 106. – P. 699–711. – DOI: 10.1007/s00253-021-11752-7

Wang F., Ji X., Li Q., Zhang G., Peng J., Hai J., Zhang Y., Ci B., Li H., Xiong Y., Deng X., Lin L. TSPphg lysin from the extremophilic Thermus bacteriophage TSP4 as a potential antimicrobial agent against both Gram-negative and Gram-positive pathogenic bacteria //Viruses. – 2020. – Vol. 12. – P. 1-12. – DOI: 10.3390/v12020192

Wang G., Clark C. G., Liu C., Pucknell C., Munro C. K., Kruk T. M., Caldeira R., Woodward D. L. and Rodgers F. G. Detection and characterization of the hemolysin genes in Aeromonas hydrophila and Aeromonas sobria by multiplex PCR //J. Clin. Microbiol. – 2003. – Vol. 41, № 3. – P. 1048–1054. – DOI: 10.1128/jcm.41.3.1048-1054.2003

Wang P., Jie L., He T. T., Li N., Mo Z. L., Nie P., Xie H. X. Pathogenic characterization of Aeromonas salmonicida subsp. masoucida turbot isolate from China //J. Fish Dis. - 2020. – P. 1-10. – DOI: 10.1111/jfd.13224

Wang Y., Barton M., Elliott L., Li X., Abraham S., O'Dea M., Munro, J. Bacteriophage therapy for the control of Vibrio harveyi in greenlip abalone (Haliotis laevigata) //Aquaculture. - 2017. – Vol. 473. – P. 251–258. – DOI: 10.1016/j.aquaculture.2017.01

Wang T., Zheng Y., Dai J., Zhou J., Yu R., Zhang C. Design SMAP29-LysPA26 as a highly efficient artilysin against Pseudomonas aeruginosa with bactericidal and antibiofilm activity //Microbiol. Spectr. – 2021. – Vol. 9, № 3. – P. 1-8. – DOI: 10.1128/Spectrum.00546-21

Wedemeyer G. The role of stress in the disease resistance of fishes and shellfishes //Spec. Publ. – 1970. - № 5. - P. 30-35.

WHA. The Government of the Hong Kong special administrative region secretary for health continues to attend 77th World Health Assembly in Geneva [Электронный ресурс] // World Health Assembly, 2024. URL: https://www.info.gov.hk/gia/general/202405/29/P2024052800613.htm (дата обращения: 30.09.2024).

Wiklund T., Dalsgaard I. Occurrence and significance of atypical Aeromonas salmonicida in non-salmonid and salmonid fish species: a review //Dis. Aquat. Organ. – 1998. – Vol. 32. - P. 49-69. – DOI: 10.3354/dao032049

World Bank Reducing disease risk in aquaculture. - Agriculture and environmental services discussion paper 09, World bank report number 88257-GLB, World bank group, Washington DC, 2014. – 119 p.

World Health Organization, WHO Report of a Joint FAO/OIE/WHO Expert consultation on antimicrobial use in aquaculture and antimicrobial resistance. - Geneva. Switzerland. World Health Organization, 2006. – 107 p.

World Health Organization. Vaccines could avert half a million deaths associated with anti-microbial resistance a year [Электронный ресурс] // World Health Organization, 2023. URL: https://www.who.int/news/item/28-07-2023-vaccines-could-avert-half-a-million-deaths-associated-with-anti-microbial-resistance-a-year (дата обращения: 29.09.2024).

World Health Organization: WHO. New report calls for urgent action to avert antimicrobial resistance crisis [Электронный ресурс] //World Health Organization, 2019. URL: https://www.who.int/news/item/29-04-2019-new-report-calls-for-urgent-action-to-avert-antimicrobial-resistance-crisis (дата обращения: 25.09.2024).

Xu C., Kong L., Gao H. et al. A review of current bacterial resistance to antibiotics in food animals // Front. Microbiol. – 2022. – Vol. 13. – P. 1-16.

Xu W., Pan Z., Wu Y. et al. A database on the abundance of environmental antibiotic resistance genes // Sci Data. – 2024. – Vol. 11. – P. 1-9.

Yamamoto S., Harayama S. PCR amplification and direct sequencing of gyrB genes and their application to Pseudomonas putida strains // Appl. Environ. Microbiol. - 1995. – Vol. 61, № 3. - P. 1104–1109.

Yamamoto S., Harayama S. et al. Phylogeny of the genus Pseudomonas: nucleotide sequences of gyrB and rpoD genes // Microbiol. - 2000. – Vol. 146. – P. 2385–2394.

Yanez M. A. Phylogenetic analysis of members of the genus Aeromonas based on gyrB gene sequences //Int. J. Syst. Evol. Microbiol. - 2003. – Vol. 53, № 3. – P. 875–883. – DOI: 10.1099/ijs.0.02443-0

Yang H., Yu J., Wei H. Engineered bacteriophage lysins as novel anti-infectives //Front. Microbiol. – 2014. – Vol. 5. – P. 1-6.

Yang H., Zhang H., Wang J., Yu J., Weia H. A novel chimeric lysin with robust antibacterial activity against planktonic and biofilm methicillin-resistant Staphylococcus aureus //Sci. Rep. – 2017. – Vol. 7. - P. 1-7.

Yang Y., Le S., Shen W., Chen Q., Huang Y., Lu S., Tan Y., Li M., Hu F., Li Y. Antibacterial activity of a lytic enzyme encoded by Pseudomonas aeruginosa double stranded RNA bacteriophage phiYY //Front. Microbiol. – 2018. – Vol. 9. – P. 1-7. – DOI: 10.3389/fmicb.2018.01778

Yazdanpanah L., Zorriehzahra J., Rokhbakhsh Z. F., Kazemi-Pour N. Isolation, biochemical and molecular detection of Aeromonas hydrophila from cultured Oncorhynchus mykiss //Iran. J. Fish. Sci. - 2020. - P. 1-15. – DOI: 10.22092\ijfs.2020.122060

Yuan Y., Li X., Wang L., Li G., Cong C., Li R., Cui H., Murtaza B., Xu Y. The endolysin of the Acinetobacter baumannii phage vB_AbaP_D2 shows broad antibacterial activity //Microb. Biotechnol. – 2021. – Vol. 14, № 2. – P. 403-418. – DOI: 10.1111/1751-7915.13594

Yu H., Zhang L., Feng C., Chi T., Qi Y., Abbas R.S.H., Gao N., Jia K., Zhang Y., Fan R., Cai R., Qian A., Li Y., Sun W., Shan X., Liu N., Zhang L. A phage cocktail in controlling phage resistance development in multidrug resistant Aeromonas hydrophila with great therapeutic potential //Microb. Pathog. - 2021. – Vol. 162. – P. 1-10. – DOI: 10.1016/j.micpath.2021.105374

Yun T., Shin S., Bang K. et al. Skin wound healing rate in fish depends on species and microbiota // Int. J. Mol. Sci. – 2021. – Vol. 22, № 15. – P. 1-11.

Zainab S.M., Junaid M., Xu N., Malik R.N. Antibiotics and antibiotic resistant genes (ARGs) in groundwater: A global review // Water Res. – 2020. – Vol. 187. – P. 1-58

Zampara A., Sørensen M.C., Grimon D., Antenucci F., Vitt A. R., Bortolaia V., Briers Y., Brøndsted L. Exploiting phage receptor binding proteins to enable endolysins to kill Gram-negative bacteria //Sci. Rep. – 2020. – Vol. 10. – P. 1-12. – DOI: 10.1038/s41598-020-68983-3

Zeng H., Li J., Zhao W. et al. The current status and prevention of antibiotic pollution in groundwater in China // Int. J. Environ. Res. Public. Health. – 2022. – Vol. 19. - P. 1-21

Zhang D., Xu D.-H., Shoemaker C. Experimental induction of motile Aeromonas septicemia in channel catfish (Ictalurus punctatus) by waterborne challenge with virulent Aeromonas hydrophila //Aquac. Rep. - 2016. – Vol. 3. – P. 18–23. – DOI: 10.1016/j.aqrep.2015.11.003

Zhang J. T., Zhou S. M., An S. W., Chen L., Wang G. L. Visceral granulomas in farmed large yellow croaker, Larimichthys crocea (Richardson), caused by a bacterial pathogen, Pseudomonas plecoglossicida //J. fish dis. - 2014. – Vol. 37, № 2. – P. 113-121

Zhang S., Abbas M., Rehman M.U., Huang Y., Zhou R., Gong S., Yang H., Chen S., Wang M., Cheng A. Dissemination of antibiotic resistance genes (ARGs) via integrons in Escherichia coli: A risk to human health //Environ. Pollut. – 2020. - Vol. 266, № 2. – P. 1-16. – DOI: 10.1016/j.envpol.2020.115260

Zhang Y., Huang H.-H., Duc H. M. et al. Application of endolysin LysSTG2 as a potential biocontrol agent against Pseudomonas // Food Control. - 2022. – Vol. 131. – P. 1-10

Zhao F., Chao J., Liu Q. Study on pathology and etiology of hemorrhagic septicem in Acipenser baerii //Acta Hydrobiol. Sin. – 2009. – Vol. 33. – P. 316–323.

Zhou Y., Yu L., Nan Z., Zhang P., Kan B., Yan D., Su J. Taxonomy, virulence genes and antimicrobial resistance of Aeromonas isolated from extra-intestinal and intestinal infections //BMC Infect. Dis. – 2019. – Vol. 19. – P. 1-9. – DOI: 10.1186/s12879-019-3766-0

Zhu D., Aihua L., Jianguo W. et al. Correlation between the distribution pattern of virulence genes and virulence of Aeromonas hydrophila strains // Front. Biol. China. – 2007. – Vol. 2, № 2. - P. 176–179.

Zimmer M., Vukov N., Scherer S., Loessner M.J. The murein hydrolase of the bacteriophage f3626 dual lysis system is active against Clostridium perfringens // Appl. Environ. Microbiol. – 2002. – Vol. 68. – P. 5311-5317.

Бакиев Серик Самигуллович

АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ЭНДОЛИЗИНОВ БАКТЕРИОФАГОВ ПРОТИВ БАКТЕРИЙ С МНОЖЕСТВЕННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ

Объем 13,8 п.л. Тираж 500. Заказ № 164

Сверстано и отпечатано в редакционно-издательском центре Западно-Казахстанского университета им. М.Утемисова г. Уральск, пр-т Н.Назарбаева,162.