

На правах рукописи

Мироненко

**МИРОНЕНКО
АНТОНИНА ПЕТРОВНА**

**МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ
ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА ЖУРАВЛЕЙ**

16 00 03 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология,
микология с микотоксикологией и иммунология

А в т о р е ф е р а т
диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук



003 160346

Благовещенск–2007

Работа выполнена на кафедре эпизоотологии, паразитологии и микробиологии института ветеринарной медицины и зоотехнии ФГОУ ВПО «Дальневосточный государственный аграрный университет»

Научные руководители: кандидат ветеринарных наук, профессор Бурик Виктор Владимирович;
кандидат ветеринарных наук, доцент
Землянская Наталья Ивановна

Официальные оппоненты: доктор ветеринарных наук, профессор
Салимов Рафаэль Маммедсалим оглы;
кандидат ветеринарных наук
Копейкин Юрий Александрович

Ведущая организация: Приморская государственная
сельскохозяйственная академия

Защита состоится «2» ноября 2007 года в 14 часов на заседании диссертационного совета КМ 220 027 01 в Федеральном государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Дальневосточный государственный аграрный университет» по адресу 675005, г Благовещенск, ул Политехническая, 86

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке университета

Автореферат разослан «1» октября 2007 года

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор ветеринарных наук, профессор



Мандро Н М

1 ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

1.1 Актуальность темы Государственный природный заповедник «Хинганский», при котором с 1988 года действует станция реинтродукции редких видов птиц, расположен на юго-востоке Амурской области. Основная задача станции – обработка методик сохранения редких журавлей в ареале обитания.

Содержание и разведение диких птиц в неволе неразрывно связано с появлением у них различных патологий. Обеспечение здоровья журавлей в искусственных условиях является одной из основных проблем вольерного содержания (Петров Ю.Ф., Воробушков А.Г., Ефимова П.А., 1981, Бессарабов Б.Ф., 1983, Амонова М.Б., Мамедова Н.М. 1993, Борисенкова А.Н., 2003, Булатов А.С., 2003; Салаутин В.В., 2004)

В естественной среде обитания выживание популяций идет за счет естественного отбора. При содержании в неволе дикая птица гораздо сложнее проходит адаптацию и акклиматизацию, и именно от человека зависит выживание популяций редких видов журавлей.

Чтобы пополнить природные популяции редких видов журавлей здоровой птицей, необходимо слежение за эпизоотической ситуацией на станции, в связи с чем возникает необходимость проведения мониторинговых микробиологических исследований самой птицы, кормов, водных источников и других объектов.

Изучение экологических характеристик условно-патогенных микроорганизмов позволяет определить эпизоотическую ситуацию при полувольном содержании редких видов птиц, прогнозировать вероятную вспышку инфекционной болезни (Роздина О.И., 2002)

Кроме того, на сегодня отсутствуют точные данные по оценке уровня циркуляции микроорганизмов в желудочно-кишечном тракте японских и даурских журавлей, содержащихся на станции реинтродукции

1.2 Цель и задачи исследования Изучить микрофлору верхнего и нижнего отделов желудочно-кишечного тракта японских и даурских журавлей, содержащихся на станции реинтродукции Хинганского государственного природного заповедника, водных источников и кормов для журавлей

Для достижения цели были поставлены задачи:

1 Провести бактериологический мониторинг зева и клоаки журавлей в условиях станции реинтродукции в зависимости от возраста и вида,

2. Изучить изолированную микрофлору зева и клоаки редких видов журавлей, ее видовой состав и свойства,

3 Дать качественную характеристику кормов и воды, используемых для журавлей,

4. Установить взаимосвязь микробной обсемененности зева, клоаки, кормов, воды

1.3 Научная новизна исследования Впервые в условиях вольерного разведения журавлей проведен бактериологический мониторинговый анализ с позиции ветеринарной науки. Изучены биологические и экологические характеристики изолированных микробных культур.

1.4 Теоретическая и практическая значимость работы. Описана изолированная из верхнего и нижнего отделов желудочно-кишечного тракта микрофлора в зависимости от возраста и вида журавлей, определены количественный и качественный состав микроорганизмов, их биохимические, патогенные свойства и чувствительность к антибиотикам, с целью контроля за эпизоотической ситуацией при полувольном содержании журавлей в условиях станции реинтродукции

Материалы исследований могут быть использованы в диагностической работе бактериологическими лабораториями для сравнения сапрофитной и патогенной микрофлоры у журавлей, при разработке профилактических мероприятий на станциях реинтродукции редких видов птиц, а также в учебном процессе при чтении лекций и проведении лабораторно-практических занятий со студентами биологического профиля.

1.5 Реализация результатов исследований Полученные результаты используются в областной Амурской и районной Архаринской ветлабораториях при диагностике бактериальных инфекций журавлей, в учебной и научной работе на кафедрах биологического профиля в ВУЗах России.

1.6 Основные положения, выносимые на защиту:

- морфологическая характеристика микроорганизмов, изолированных от журавлей в зависимости от возраста и вида;
- видовой состав, тинкториальные, культурально-биохимические свойства изолированных культур, чувствительность их к антибиотикам,
- бактериологическая характеристика кормов и воды, используемых для журавлей

1.7 Апробация работы. Основные положения диссертации доложены и обсуждены на международных конференциях в Дальневосточном государственном аграрном университете «Болезни животных Дальнего Востока» (г Благовещенск, 1999), «Биологические ресурсы российского дальнего Востока (г Благовещенск, 2004); на научных конференциях в Дальневосточном госагроуниверситете (1999-2006 гг) и ученых советах Хинганского заповедника (2000, 2001 г)

1.8 Публикации Основные результаты научных исследований отражены в 8 печатных работах

Тема диссертационной работы является составной частью комплексной программы кафедры эпизоотологии, паразитологии и микробиологии ФГОУ ВПО «Дальневосточный государственный аграрный университета» «Ветеринарное благополучие» № гос рег.01200503575

1.9 Объем и структура диссертации Диссертационная работа изложена на 122 страницах компьютерного набора и состоит из введения, обзора литературы, собственных исследований, обсуждения полученных результатов, выводов, практических предложений и списка используемой литературы, содержащего 128 источника, из них 38 иностранных авторов Работа иллюстрирована 33 таблицами и 35 рисунками

2 СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материал и методы исследований

Исследования проводили с 1999 по 2005 гг на кафедре эпизоотологии, паразитологии и микробиологии института ветеринарной медицины и зоотехнии ФГОУ ВПО ДальГАУ, в бактериологическом отделе Амурской областной и Архаринской районной ветеринарных лабораториях

Объектом исследования служили даурские и японские журавли, принадлежащие станции реинтродукции Хинганского государственного природного заповедника в количестве 12 голов, подобранных по принципу аналогов Птица была разделена на взрослых (1987-1998 гг рождения) и молодняк (птенцов) 2004 года рождения (когда проводили основные мониторинговые исследования) Схема постановки опыта представлена в таблице 1

Таблица 1 Схема постановки опыта

№ особей и групп	Вид птиц	Кличка	Год рождения	Живая масса,	
				кг	М±m
1.	Японские журавли (молодняк)	Саламе	2004	8,6	8,3±0,174
2. I		Ташина	2004	8,0	
3		Джельмен	2004	8,3	
4	Японские журавли (взрослые)	Гонгор	1989	11	10,17±0,524
5. II		Архара	1987	9,2	
6		Капитон	1998	10,3	
7	Даурские журавли (молодняк)	Кой	2004	7,2	6,83±0,203
8. III		Картей	2004	6,8	
9		Парис	2004	6,5	
10	Даурские журавли (взрослые)	Ханка	1998	7,8	8,0±0,116
11 VI		Майкур	1996	8,2	
12		Урия	1997	8,0	

Журавли имели хорошее физиологические состояние, клинически здоровы, развивались согласно технологическим требованиям орнитологов, видимых анатомических дефектов в развитии не имели.

Для бактериологического исследования отобрали 16 пропиток из ротовой полости и 88 проб фекальных масс (проведено 3456 бактериологических исследований), 12 проб воды (проведено 36 исследований) и 18 проб зернофуража (проведено 396 исследований)

Мониторинговые исследования желудочно-кишечного тракта журавлей включали эпизоотологический анализ, изучение количественного и качественного состава микроорганизмов, выделенных с ротовой полости, содержимого клоаки, питьевой воды, кормов, а также тинкториальные, культурально-биохимические характеристики микроорганизмов, чувствительность их к антибиотикам

От опытных групп еженедельно, в одно и то же время отбирали пропитки слизи из ротовой полости и пробы содержимого клоаки. Для этого журавлей усаживали на землю, фиксируя их собственным телом.

Пробы зернофуража отбирали по мере поступления, всего отобрано 18 образцов, которые исследовали на количество и качество микробов. Общее количество микроорганизмов подсчитывали на мясопептонном агаре (МПА).

Изучение морфологических, культуральных, тинкториальных, биохимических, серологических и патогенных свойств выделенных микроорганизмов производили по общепринятым методикам (Биргер М.О., 1983; Герхард Ф., 1983; Антонов Б.И., 1986).

Морфологические свойства выделенных бактерий изучали методом световой микроскопии. Препараты готовили из суточных агаровых и бульонных культур микробов. Для световой микроскопии использовали микроскопы МБИ-6, МБР, осветитель ОИ-19.

Для изучения тинкториальных свойств микроорганизмов мазки окрашивали по Граму, Романовскому-Гимзе, 2%-ным раствором фуксина и с использованием 3%-ного раствора КОН по методу С.И. Кондратьева (1983).

Подвижность микроорганизмов определяли просмотром висячей и раздавленной капли, микроскопией в затемненном поле, посевом в полужидкий агар.

Для дифференциации бактериальные посевы производили на среды: мясопептонный агар (МПА), мясопептонный бульон (МПБ), мясопептонный печеночный бульон (МППБ), мясопептонный желатин (МПЖ), глюкозно-глицериновый и кровяной МПА, среды Гисса, Эндо, Левина, Плоскирева, Клиглера, висмут-сульфит агар и молоко. Для выявления дрожжей и грибов использовали среду Сабуро и Чапека.

Рост культур микроорганизмов на разных питательных средах наблюдали в течение 1-7 суток, отмечали характер роста колоний, их размеры, учитывали при этом форму, края, блеск, цвет, профиль, консистенцию и структуру колоний. При культивировании микроорганизмов в жидких питательных средах отмечали наличие осадка, его количество и характер, степень помутнения среды, оттенок, толщину и консистенцию.

пленки при поверхностном росте культуры, учитывали образование пристеночного кольца и изменение цвета среды

Протеолитические свойства микроорганизмов определяли путем установления способности разжижать МПДЖ Степень протеолиза определяли по образованию микроорганизмами индола и сероводорода с помощью индикаторных бумажек, пропитанных 12%-ным раствором щавелевой кислоты и 10%-ным раствором уксусного свинца Соответственно результаты учитывали через 18-24 часа Контролем служили заведомо индоло-сероводородообразующие культуры микроорганизмов и питательная среда без посевов

При изучении биохимических свойств микроорганизмов использовали среды Гисса Посевы культур осуществляли по общепринятой методике бактериологической петлей После инкубирования в термостате в течение 16-24 часов учитывали результаты ферментации углеводов по изменению цвета питательной среды и образованию газов.

Чувствительность микроорганизмов к различным антибиотикам определяли методом диффузии в агар с применением стандартных дисков, изготовленных НИЦФ г.Санкт-Петербурга серии ТУ 9398-001-39484474-2000 со сроком годности один год Оценку результатов проводили с учетом наличия или отсутствия зоны задержки роста микроорганизмов согласно «Методическим указаниям по определению чувствительности микроорганизмов к антибиотикам методом диффузии в агар с использованием дисков» (Чайковский С.М., Гивенталь Н.И., Руван С.П., 1984)

При изучении патогенных свойств микроорганизмов, кроме постановки биопробы, выявляли гемолитические и плазмокоагулирующие (у кокковых форм бактерий) способности С этой целью бактериальные культуры высевали на мясопептонный агар в чашках Петри, содержащий 5% дефибринированной крови барана. При росте микроорганизмов, обладающих гемолитическими свойствами, вокруг колоний в результате лизиса эритроцитов образуется прозрачная зона Учет реакций производили после 20-24 часов инкубации в термостате при 37⁰С.

При фотографировании использовали фотоаппарат «Зенит» и микрофотонасадку МФН-14

Экспериментальный материал обрабатывали методами вариационной статистики.

Пропитки из ротовой полости тут же помещали в стерильные колбы, а содержимое клоаки переносили в стерильные чашки Петри для дальнейшего бактериологического исследования.

Для определения патогенности микрофлоры применяли биопробу на белых мышах массой 14-16 грамм

Взвесь бактерий (500 млн/мл) из агаровой 24-часовой культуры в дозе 0,2 мл внутрибрюшинно вводили трем белым мышам Наблюдение за зараженными животными вели в течение 3-5 дней

Статистическую обработку осуществляли методами вариационной статистики с применением программы Microsoft Excel

2.2 Морфологическая характеристика микроорганизмов, изолированных от журавлей в зависимости от возраста и вида

2.2.1 Морфология микроорганизмов, изолированных из ротовой полости журавлей

Различные формы микроорганизмов определяли путем подсчета в пяти полях зрения под иммерсионной системой микроскопа с применением лейкоцитарного счетчика. Полученные результаты приведены в таблице 2 и рисунке 1

Таблица 2 Микробная обсемененность ротовой полости японских и даурских журавлей

Группы	Общее число микробов млн. в мл	Формы микроорганизмов, в %					
		Палочковидные		Кокковидные			
		грамположительные	грамотрицательные	монококки	диплококки	стрептококки	стафилококки
I	8,63± 0,308**	31,00± 1,155**	69,00± 1,155***	6,00± 0,577**	11,00± 0,577***	30,67± 0,333***	52,33± 0,882***
II	7,36± 0,275**	40,33± 1,764**	59,67± 1,764***	7,00± 1,779	10,67± 2,404*	20,33± 2,186*	62,00± 2,646**
III	4,60± 0,246**	37,67± 2,333**	62,33± 2,333**	11,33± 1,764*	28,33± 1,453**	14,67± 1,764*	45,67± 1,453**
IV	3,83± 0,039***	31,33± 1,202**	68,67± 1,202***	12,33± 1,764*	25,67± 1,764**	10,67± 1,202**	51,33± 2,333**

Примечание * средняя арифметическая достоверность в 95% случаев ($P < 0,05$)
 ** средняя арифметическая достоверность в 99% случаев ($P < 0,01$)
 *** средняя арифметическая достоверность в 99,9% случаев ($P < 0,001$)

Наибольшее количество микроорганизмов выделено из ротовой полости молодых японских журавлей 8,63±0,308 млн/мл, что на 14,71% больше, чем у взрослых японских журавлей. Количество грамположительных микроорганизмов было больше у взрослых японских журавлей, а грамотрицательных – у молодых – на 9,33%. Наибольшее количество стрептококков выделено из ротовой полости молодых японских журавлей, а стафилококков – у взрослых - 30,67±0,333 и 62,00±2,646% соответственно

Количество монококков оказалось больше у взрослых японских журавлей - 7,00±1,779%, а диплококков было на 0,33% больше в ротовой полости молодых японских журавлей.

Количество микроорганизмов выделенных, из ротовой полости даурских журавлей, в зависимости от возраста также отличалось. Общее число микроорганизмов было больше на 16,74% у молодых особей. Количество грамположительных микроорганизмов оказалось больше на 6,34% у молодых особей, а граммотрицательных – у взрослых даурских журавлей. Монококков и стафилококков было больше в ротовой полости взрослых даурских журавлей $12,33 \pm 1,764$ и $51,33 \pm 2,333\%$ соответственно, а диплококков и стрептококков было больше на 2,66 и 4% соответственно в ротовой полости молодых даурских журавлей.



Рисунок 1 Морфология микроорганизмов ротовой полости журавлей в зависимости от вида

Морфологические свойства микроорганизмов выделенных из ротовой полости журавлей в зависимости от вида также отличались (рисунок 1). Общее количество микроорганизмов в ротовой полости японских журавлей было на 47,06% больше, чем у даурских. Наиболее существенно различалось содержание кокковой микрофлоры. Количество монококков и диплококков было больше на 5,33 и 16,16% соответственно в ротовой полости даурских журавлей, а стрептококков и стафилококков, наоборот, у японских журавлей на 12,83 и 8,67% соответственно.

2.2.2 Морфология микроорганизмов, выделенных из содержимого клоаки

Микробная обсемененность клоаки также изменяется в зависимости от возраста журавлей (таблица 3) Общее количество микроорганизмов, выделенных из содержимого клоаки молодых японских журавлей, было на 24,24% больше, чем у взрослых японских Грамположительных микроорганизмов на 12,33% больше в клоаке взрослых японских журавлей, а грамотрицательных, наоборот, – у молодых Монококков и стрептококков было меньше в клоаке взрослых японских журавлей на 4 и 10% соответственно, а диплококков и стафилококков, наоборот - у молодых японских особей на 4,67 и 11% соответственно.

Таблица 3 Микробная обсемененность клоаки японского и даурского журавлей

Группы	Общее число микробов в грамме млн	Формы микроорганизмов, в %					
		Палочковидные		Кокковидные			
		грамположительные	граммотрицательные	монококки	диплококки	стрептококки	стафилококки
I	81,16± 0,144***	20,67± 1,453**	79,33± 1,453***	15,00± 1,732*	11,33± 0,882**	25,00± 1,155**	47,00± 2,082**
II	61,49± 0,402***	33,00± 1,155**	67,00± 1,155***	11,00±0, 577**	16,00± 1,999*	15,00± 1,732*	58,00± 1,155***
III	44,69± 0,173***	25,33± 0,882**	74,67± 0,882***	10,33± 0,882**	25,00± 0,577***	30,67± 1,202**	34,00± 0,577***
IV	37,39± 0,419***	27,33± 0,882**	72,67± 0,882***	10,00± 0,577**	17,33± 0,882**	29,00± 1,528**	43,67± 1,453**

Примечание * средняя арифметическая достоверность в 95% случаев ($P < 0,05$)

** средняя арифметическая достоверность в 99% случаев ($P < 0,01$)

*** средняя арифметическая достоверность в 99,9% случаев ($P < 0,001$)

У даурских журавлей общее количество микроорганизмов, выделенных из клоаки, было также больше у молодых особей - на 16,33%, грамположительных было меньше в клоаке молодых на 2%, а грамотрицательных – в клоаке взрослых даурских журавлей тоже на 2% Количество монококков и стрептококков в клоаке даурских журавлей в зависимости от возраста изменялось незначительно, разница составила 0,33 и 1,67% соответственно в пользу таковых у молодых даурских журавлей

Количество диплококков было на 7,67% больше в клоаке молодых даурских журавлей, а стафилококков на 9,67% - в клоаке взрослых даурских журавлей.

Изучая микробную обсемененность клоаки в зависимости от вида журавлей (рисунок 2) было установлено, что у японских журавлей общее количество микроорганизмов, выделенных из клоаки, в одном миллилитре было на 42,46% выше, чем у даурских. Наиболее существенно отличалось содержание кокковой микрофлоры. Диплококков и стрептококков было на 7,5 и 9,84% больше в клоаке даурских журавлей, а стафилококков, наоборот, на 13,66% было больше у японских журавлей.

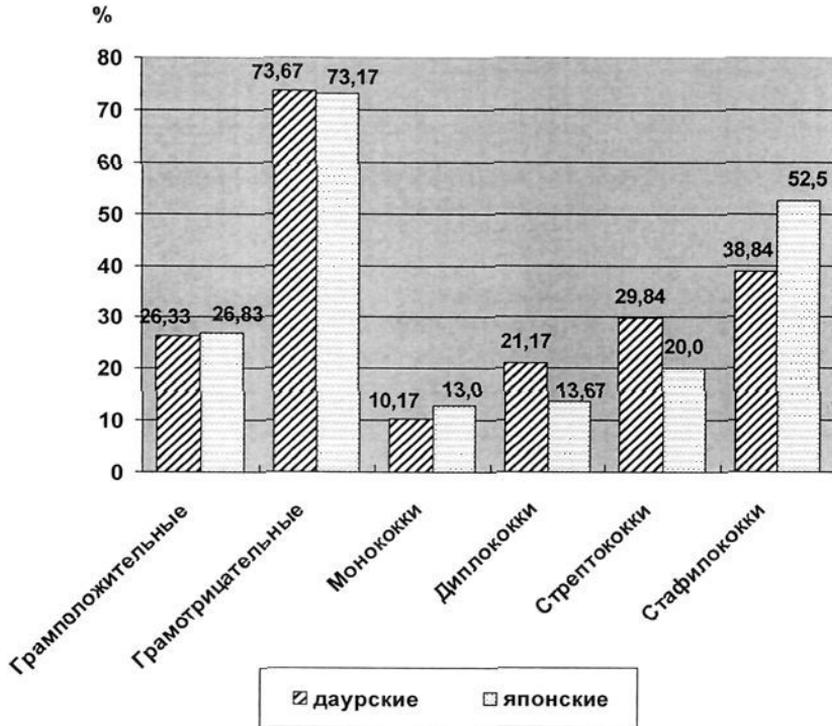


Рисунок 2 Морфология микроорганизмов клоаки журавлей
в зависимости от вида, в %

В процессе исследований установлена корреляционная зависимость между микроорганизмами, выделенными из ротовой полости и клоаки журавлей, независимо от возраста и вида (коэффициент корреляции колебался от 0,47 до 0,88).

2.3 Видовой состав, культурально-биохимические свойства изолированных культур, чувствительность их к антибиотикам

2.3.1 Характеристика и культурально-биохимические свойства микроорганизмов, изолированных из ротовой полости и содержимого клоаки журавлей

Наиболее часто из ротовой полости и клоаки журавлей выделялась культура *Escherichia coli*, инфицированность верхнего и нижнего отделов желудочно-кишечного тракта данным микроорганизмом составила 100 и 88,64% соответственно (таблица 4).

Таблица 4 Видовой состав микроорганизмов изолированных от журавлей

Виды микроорганизмов	Пропитки из ротовой полости n=16		Содержимое клоаки n=88	
	количество проб	% от общего количества	количество проб	% от общего количества
<i>Escherichia coli</i>	16	100	78	88,64
<i>Citrobacter diversus</i>	5	31,25	55	62,5
<i>Enterobacter aerogenes</i>	7	43,75	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	52	59,09
<i>Proteus vulgaris</i>	8	50,0	70	79,55
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	6	37,5	-	-
<i>Streptococcus faecalis</i>	-	-	61	69,32
<i>Salmonella pullorum</i> ,	-	-	27	30,68
<i>Salmonella gallinarum</i>	-	-	29	32,95

Из проб клоаки было больше выделено, чем из ротовой полости культур *Citrobacter diversus* и *Proteus vulgaris* на 31,25 и 29,55% соответственно. Культура *Enterobacter aerogenes* была выделена из 7 (43,75%) проб ротовой полости, а *Enterobacter cloacae* обнаружен в 52 (59,09%) пробах фекальных масс. В пропитках из ротовой полости журавлей находили также *Staphylococcus epidermidis*, инфицированность проб составила – 37,5%. Из проб фекалий были выделены культуры *Streptococcus faecalis*, *Salmonella pullorum*, *Salmonella gallinarum* в 69,32; 30,68 и 32,95% случаев.

Escherichia coli на мясо-пептонном бульоне вызывала интенсивное помутнение, на мясо-пептонном агаре росла в виде сочных, блестящих, выпуклых, гладких, с ровными краями колоний круглой формы, на среде Эндо колонии были S-формы малинового цвета с металлическим блеском

Salmonella pullorum и *Salmonella gallinarum* на МПА образовывали колонии серовато-белого цвета с голубоватым оттенком, диаметром 1-3 мм с ровными краями, на МПБ вызывали помутнение с образованием на дне пробирки осадка, а на поверхности - пленки и пристеночного кольца, на висмутсульфит агаре росли в виде мелких единичных (до 1 мм), плотных блестящих правильной формы колоний черного цвета

Proteus vulgaris – на МПА, средах Плоскирева, Эндо образовывал сплошной ползучий рост матового цвета

Citrobacter diversus на МПА образовывал колонии средних размеров, сероватого цвета, блестящие, выпуклые с ровными краями

Enterobacter cloacae – на среде Левина рос в виде мелких (до 1 мм), выпуклых, полупрозрачных, блестящих с ровными краями колоний.

Streptococcus faecalis – на МПА образовывал отдельные колонии размером до 3 мм, слегка желтоватого цвета с ровными краями, зона гемолиза эритроцитов на кровяном агаре отсутствовала

Stafilococcus epidermidis рос на МПА, средах Плоскирева, Эндо в виде колоний размером 3-4 мм, плоских с ровными краями, тягучей консистенции, серого цвета, на МПБ образовывал слабое равномерное помутнение

Большинство выделенных от журавлей микроорганизмов ферментировали глюкозу, сахарозу, мальтозу – 85,71% культур, показывали положительную реакцию с молоком (71,43%) (рисунок 3) Отрицательные биохимические свойства в отношении лактозы и сахарозы проявили *Salmonella pullorum*, *Salmonella gallinarum*, в отношении мальтозы - *Escherichia coli*, маннита - *Proteus vulgaris*, *Streptococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis*, глюкозы - *Citrobacter diversus* и *Staphylococcus epidermidis* Три (42,86%) культуры *Escherichia coli*, *Citrobacter diversus* и *Proteus vulgaris* показывали положительную реакцию с индолом Образовывали сероводород *Proteus vulgaris*, *Streptococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis* и представители рода *Salmonella*, что составило 57,14% от всех выделенных культур Усваивали цитрат на среде Симмонса *Salmonella pullorum*, *Salmonella gallinarum*, *Citrobacter diversus*, *Enterobacter cloacae*, что составило 42,86% от всех выделенных культур

Подвижностью обладали 71,42% культур микроорганизмов, выделенных от журавлей *Escherichia coli*, *Citrobacter diversus*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus vulgaris*



Рисунок 3 Процент микроорганизмов выделенных, от японских и даурских журавлей, чувствительных к основным тестам

Все изолированные культуры патогенными свойствами не обладали. Падежа лабораторных животных не зафиксировано. Физиологическое состояние зараженных культурами белых мышей в течение пяти дней не изменялось. При убое и вскрытии мышей во внутренних органах патологоанатомических изменений не обнаружено.

2.3.2 Чувствительность микроорганизмов, выделенных от журавлей, к антимикробным препаратам

E. coli, выделенная из ротовой полости журавлей, наибольшую чувствительность проявила к гентамицину, левомицетину, неомицину, стрептомицину и тетрациклину, количество чувствительных культур к указанным антибиотикам составило 100; 93,75; 81,25; 87,5; 68,75 % соответственно. Диаметры зон задержки роста культур колебались от $13,8 \pm 0,84$ мм – у полимиксина до $27,6 \pm 1,29$ мм – у гентамицина.

Citrobacter diversus, выделенная из ротовой полости журавлей, оказалась чувствительной к левомицетину, стрептомицину, гентамицину и полимиксину. Низкие антибиотические свойства к данному микроорганизму проявили тетрациклин и неомицин, всего лишь 40% и 20% культур *Citrobacter diversus* были чувствительны к этим антибиотикам. Диаметры зон задержки роста *Citrobacter diversus* вокруг испытанных антибиотиков колебался от $16,2 \pm 0,77$ мм – у неомицина до $27,4 \pm 3,62$ мм – у левомицетина.

Enterobacter aerogenes, выделенная из ротовой полости журавлей, проявила высокую чувствительность к гентамицину (100%), неблагоприятное влияние оказывали также стрептомицин и полимиксин, 85,71 и 71,43% микроорганизмов *Enterobacter aerogenes* были чувствительны к данным антибиотикам. Более половины культур *Enterobacter aerogenes* - 57,14% оказались чувствительны к левомицетину и стрептомицину. Умеренная устойчивость *Enterobacter aerogenes* была к неомицину и канамицину - 85,71 и 57,14% культур. Диаметры зон задержки роста колебались от $15,6 \pm 0,41$ мм – у неомицина до $28,0 \pm 3,63$ мм – около диска с левомицетином.

Proteus vulgaris был чувствителен к гентамицину (100%), стрептомицину (87,5%), тетрациклину (87,5%), левомицетину (75%) и полимиксину (62,5%). Наименьшую активность в отношении *Proteus vulgaris*, выделенного из ротовой полости журавлей, проявили неомицин и канамицин, соответственно 62,5 и 50% культур были умеренно устойчивы к указанным антибиотикам. Диаметры зон задержки роста *Proteus vulgaris* около дисков с антибиотиками колебался от $14,4 \pm 0,79$ мм – неомицина до $25,8 \pm 2,14$ мм диска с левомицетином.

Культура *Staphylococcus epidermidis*, выделенная из ротовой полости журавлей, показала высокую чувствительность к гентамицину, стрептомицину, канамицину, левомицетину, полимиксину и тетрациклину, 100, 83,33 и 66,67%, выделенным *Staphylococcus epidermidis*, были чувствительны к вышеуказанным антибиотикам. Умеренную устойчивость *Staphylococcus epidermidis* проявил в отношении неомицина – 66,67% культур. Диаметры зон задержки роста культур колебались от $13,2 \pm 1,58$ мм – около диска с полимиксином до $28,0 \pm 3,27$ мм около диска с левомицетином.

В целом же все культуры, выделенные из ротовой полости журавлей, были чувствительны к левомицетину, гентамицину, стрептомицину и тетрациклину, диаметры зон задержки роста микроорганизмов, выделенных из ротовой полости журавлей составили $27,3 \pm 0,36$, $23,76 \pm 1,24$, $20,18 \pm 1,09$ и $21,52 \pm 0,86$ мм соответственно (таблица 5).

Культура *E coli*, выделенная из клоаки, была чувствительная к гентамицину (100%), доклициклину (85,89%), левомицетину (79,49%), тетрациклину (73,08%) (таблица 6). Наименьшую активность в отношении *E coli*, выделенной из клоаки журавлей, проявили линкоспектин и канамицин, соответственно 100 и 88,46% культур обладали устойчивостью к указанным антибиотикам. Бактерии рода сальмонелл, выделенные из клоаки журавлей, были чувствительны к гентамицину (100%), левомицетину (77,78% культур-*Salmonella pullorum* и 72,41% *Salmonella gallinarum*) и доклициклину (77,78% культур-*Salmonella pullorum* и 65,52% *Salmonella gallinarum*).

Низкую активность по отношению к бактериям сальмонеллезной группы проявляли линкоспектин, стрептомицин и канамицин *Citrobacter diversus*, выделенная из клоаки японских и даурских журавлей, была чувствительна к гентамицину, тетрациклину, канамицину, левомицетину и стрептомицину, *Enterobacter cloacae* - к гентамицину, левомицетину, стрептомицину, тетрациклину и доклициклину. *Proteus vulgaris* и *Streptococcus faecalis* были чувствительны гентамицину. *Proteus vulgaris* обладал также чувствительностью к левомицетину и доклициклину, а *Streptococcus faecalis* - к левомицетину, стрептомицину и тетрациклину.

Таблица 5

Бактериальная активность антибиотиков к микроорганизмам, выделены из зева
даурских и японских журавлей

Антибиотики	Диаметры зон задержки роста микроорганизмов, мм					Среднее M±m
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Citrobacter diversus</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	
Левомецетин	27,1±2,26	27,4±3,62	28,0±3,63	25,8±2,14	28,0±3,27	27,3±0,36
Стрептомицин	18,0±0,54	20,6±0,83	19,3±0,85	18,3±0,57	24,7±1,81	20,2±1,09
Гентомицин	27,6±1,29	23,6±1,76	21,6±1,05	20,0±0,32	26,0±0,58	23,8±1,24
Канамицин	17,6±0,31	21,2±1,82	16,7±0,78	17,9±1,19	21,0±1,21	18,9±0,83
Полимиксин	13,8±0,84	16,6±1,46	15,8±1,68	13,9±0,85	13,2±1,58	14,7±0,58
Тетрациклин	22,3±0,43	18,6±0,73	22,6±1,59	20,1±0,45	24,0±1,47	21,5±0,86
Неомицин	18,2±0,38	16,2±0,77	15,6±0,41	14,4±0,79	16,3±0,92	16,1±0,55

Таблица 6 Бактериальная активность антибиотиков к микроорганизмам, выделенных из содержимого клоаки даурских и японских журавлей

Антибиотики	Диаметры зон задержки роста микроорганизмов, мм							Среднее M±m
	Escherichia coli	Salmonella pullorum,	Salmonella gallinarum	Citrobacter diversus	Enterobacter cloaceae	Proteus vulgaris	Streptococcus faecalis	
Левомецетин	24,9±0,73	21,3±0,42	23,1±0,85	24,2±0,67	22,5±0,54	23,0±0,37	26,4±0,51	23,6±0,59
Стрептомицин	15,0±0,24	15,1±0,25	14,0±0,17	19,2±0,47	20,2±0,61	16,1±0,21	23,3±0,52	17,6±1,19
Гентомицин	15,2±0,11	19,9±0,38	19,5±0,67	18,4±0,19	18,1±0,21	20,2±0,27	21,5±0,12	19,0±0,71
Доклицилин	20,1±0,26	20,1±0,17	21,2±0,96	19,2±0,42	21,1±0,67	21,1±0,15	19,1±0,45	20,3±0,31
Канамицин	12,2±0,21	17,1±0,41	16,3±0,29	20,4±0,43	16,2±0,29	14,1±0,09	15,2±0,16	15,9±0,91
Тетрацилин	20,2±0,24	18,9±0,49	20,2±0,55	22,1±0,31	23,4±0,58	18,1±0,29	20,4±0,36	20,5±0,63
Неомицин	14,2±0,16	14,4±0,24	15,1±0,38	18,3±0,47	17,1±0,37	14,1±0,14	16,1±0,33	15,7±0,57
Линкоспектин	7,1±0,12	6,5±0,73	9,1±0,39	8,2±0,14	9,2±0,09	7,4±0,19	11,1±0,41	8,4±0,55

2.4 Бактериологическая характеристика кормов и воды используемых для журавлей

Среднее количество микрофлоры в одном грамме пробы зернофуража составила 3304100. В среднем в разведении с пробой зернофуража $1:10^{-4}$ выросла $16,17 \pm 0,929$ колония ($P < 0,001$), в разведении $1:10^{-5}$ - $8,44 \pm 0,668$ колоний микроорганизмов и в разведении $1:10^{-6}$ - $2,17 \pm 0,459$ ($P < 0,001$) колоний. Наибольшее количество микроорганизмов обнаружено в пробе № 15, – среднее количество выросших колоний по разведениям составило $13,33 \pm 5,239$, наименьшее – в пробе № 14 - $4,67 \pm 2,906$.

Во всех 18 пробах зернофуража выростала культура *E.coli* (100%). Культура *Citrobacter* была выделена в 55,56% проб зернофуража, 50% приходилось на культуры типированные как *Enterobacter cloacene*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus*. Культура *Micrococcus* была выделена в 44,44% случаев. Стрептококки выделялись в 7 (38,89%) пробах зернофуража (рисунок 4).

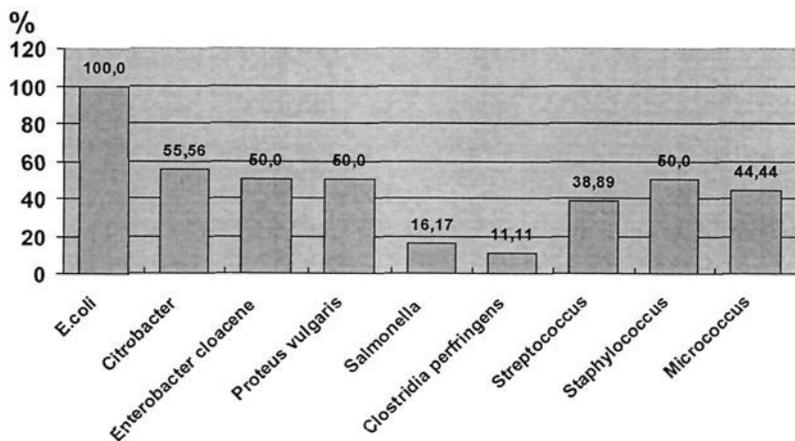


Рисунок 4 Микробная обсемененность зернофуража пшеницы в % от общего количества проб

Сальмонеллы были выделены из проб № 1; 15; 17, то есть в 16,67% случаев, а *Clostridia perfringens* – в 11,11% проб зернофуража. Таким образом, во всех случаях исследования пшеницы присутствует условно- патогенная микрофлора, представленная в основном *E.coli*, *Clostridia perfringens*, *Salmonella*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Citrobacter*, *Enterobacter cloacene* и *Proteus vulgaris*.

В сравнительном аспекте определена обсемененность зернофуража пшеницы, ротовой полости, содержимого клоаки журавлей и воды (рисунок 5).

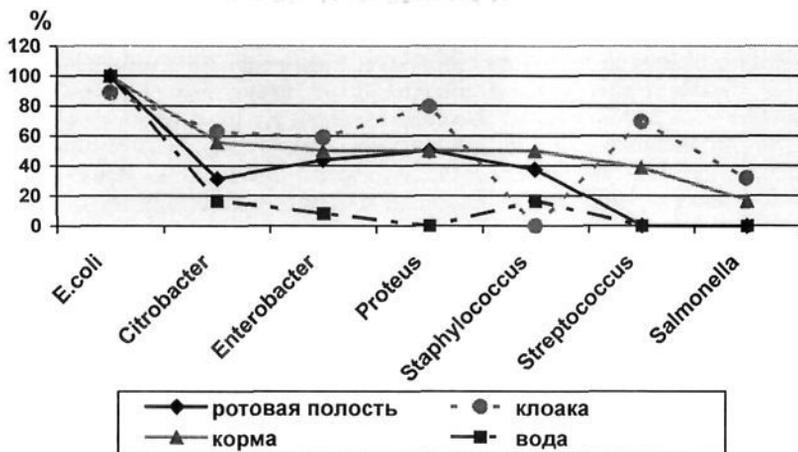


Рисунок 5 Микробная обсемененность ротовой полости, клоаки журавлей, зернофуража и воды в % от общего количества исследованных проб

Наиболее часто из ротовой полости, содержимого клоаки и зернофуража пшеницы выделяется культура *Escherichia coli*, в 100; 88,64 и 100% случаев соответственно.

Среднее количество *Citrobacter* было обнаружено в зернофураже пшеницы - 55,56%. Представители рода *Enterobacter* были выделены в 50% случаев из зернофуража, а инфицированность ротовой полости и клоаки составила 43,75% и 59,09%. Обсемененность *Proteus* ротовой полости и зернофуража составила 50%, а содержимого клоаки - 79,55%. Из зернофуража на 12,5% больше выделено представителей рода *Staphylococcus*, по сравнению с выделенными из ротовой полости. Представители рода *Salmonella* в пропитках с ротовой полости обнаружены не были, но 16,67% проб зернофуража было инфицировано, что на 15,15% меньше, чем обсемененность клоаки журавлей. В трех пробах воды (25%) коли-титр, бактериальная обсемененность превышала норму. В этих же пробах, кроме *E.coli*, присутствует также условно-патогенная кишечная микрофлора *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter diversus*. Причем в 75% случаев из питьевой воды выделена чистая культура *E.coli*, в 16,67% - смесь культур *E.coli* + *Citrobacter diversus* и лишь в одном случае (8,33%) - смесь культур *E.coli* + *Enterobacter cloacae*.

ВЫВОДЫ

1 Наибольшее количество микроорганизмов содержится в ротовой полости молодых японских журавлей $8,63 \pm 0,308$ млн/ мл; наименьшее – у взрослых даурских $3,83 \pm 0,039$ Ротовая полость молодняка журавлей богаче микрофлорой в сравнении со взрослыми – на 14,71% - у японского и 16,74% - у даурского При этом в процентном отношении преобладают грамотрицательные формы (64,34; 65,50%) и стафилококки (57,17, 48,50%).

2. Количество микроорганизмов в одном грамме содержимого клоаки японских журавлей на 42,46% выше, чем у даурских, у молодняка их больше - у японских на 24,24%, даурских - на 16,33% Наибольшее количество микроорганизмов обнаружено у молодых японских журавлей $81,16 \pm 0,144$ в одном грамме, преобладают грамотрицательные палочки (73,17, 73,67%) и стафилококки (52,5, 38,84%).

3. Видовой состав изолированной микрофлоры ротовой полости представлен *E coli* (100%), *Proteus vulgaris* (50,0%), *Enterobacter* (43,75%), *Staphylococcus epidermitis* (37,5%) и *Citrobacter diversus* (31,25%) В содержимом клоаки было больше выделено, чем из ротовой полости культур *Citrobacter diversus* и *Proteus vulgaris* на 31,25 и 29,55% соответственно Культура *Enterobacter aerogenes* была выделена из 7 (43,75%) проб ротовой полости, а *Enterobacter cloacae* обнаружен в 52 (59,09%) пробах фекальных масс.

4 Из выделенных культур 71,42% обладали подвижностью, 71,43% - показали положительную реакцию с молоком, ферментировали глюкозу, сахарозу, мальтозу – 85,71%; лактозу – 54,14%, маннит- 57,14%, усваивали цитрат на среде Симмонса 42,85%, продуцировали индол и сероводород – 42,86 и 51,14% процентов микроорганизмов соответственно

5 Микробная обсемененность зернофуража в процентах от общего количества проб представлена *E coli* (100%), *Citrobacter* (55,56%), *Enterobacter cloacae* (50%), *Proteus vulgaris* (50%), *Staphylococcus* (50%), *Micrococcus* (44,44%), *Streptococcus* (38,89%) В трех пробах воды (25%), коли-титр, бактериальная обсемененность превышала допустимые нормы В воде присутствовали *E coli*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter diversus*

6. Установлена сильная прямая корреляционная связь между микробной обсемененностью зева и корма $r=0,93$, зева и воды $r=0,85$, корма и воды $r=0,91$ Между микробной обсемененностью зева и клоаки, воды и клоаки, клоаки и корма выявлена умеренная корреляционная зависимость, коэффициент корреляции был соответственно 0,34, 0,44 и 0,51

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

Материалы диссертации используются в практической деятельности Хинганского государственного природного заповедника. Составлена справка о результатах бактериологических исследований журавлей в ОГУ «Архаринская районная станция по борьбе с болезнями животных». Материалы могут быть использованы:

- в диагностической работе специалистов ветеринарных лабораторий Амурской области,
- при разработке профилактических мероприятий в случае возникновения инфекционных болезней,
- в учебном процессе при чтении лекций и проведении лабораторно-практических занятий со студентами институтов ветеринарной медицины и зоотехнии и биологических факультетов вузов

СПИСОК работ, опубликованных по теме диссертации

1. Мироненко, А П Экологический мониторинг японских и даурских журавлей Хинганского заповедника / А П Мироненко // Биологические ресурсы российского Дальнего Востока Материалы Международной научно-практической конференции 23-24 сентября 2004 г - Благовещенск ДальГАУ, 2004 - С 168-172
- 2 Мироненко, А.П Микробиологический мониторинг ротовой полости журавлей /А П Мироненко, Н И Землянская // Проблемы зоотехнии, ветеринарии и биологии животных на Дальнем Востоке сб науч тр ДальГАУ.- Благовещенск ДальГАУ, 2005 - С 127-131
- 3 Мироненко, А П Морфология, физиология и патогенез микроорганизмов, изолированных от журавлей / А П Мироненко // Проблемы зоотехнии, ветеринарии и биологии животных на Дальнем востоке сб науч. тр ДальГАУ - Благовещенск ДальГАУ, 2005.- С 140-143
- 4 Мироненко, А П Микрофлора содержимого клоаки редких видов журавлей станции реинтродукции Хинганского заповедника / А П Мироненко, Н И Землянская // Биологические ресурсы Российского Дальнего Востока материалы междунар науч-практич конф (23-24 сентября 2004 г.)- Благовещенск. ДальГАУ, 2004 - С. 198-200
- 5 Мироненко, А П Определение активности антибиотиков к микрофлоре пищеварительного тракта журавлей / А П Мироненко, Н И Землянская // Болезни животных Дальнего Востока сб науч тр. ДальГАУ - Благовещенск ДальГАУ, 2005 - С 67-70
- 6 Мироненко, А П Количественный и качественный состав микрофлоры зернофуража, скармливаемого журавлям / А П Мироненко // Болезни животных Дальнего Востока сб науч. тр ДальГАУ - Благовещенск ДальГАУ, 2006 - С. 38-40
- 7 Мироненко, А П Видовой состав микроорганизмов, изолированных из пищеварительного тракта журавлей / А П. Мироненко // - Математическая морфология Электронный математический и медико-биологический журнал -Т 5 -Вып 4 -2006 URL:
<http://www.smolensk.ru/user/sgma/MMORPH/N-12-html/mironenko/mironenko-2.htm>
<http://www.smolensk.ru/user/sgma/MMORPH/TITL/HTM>
<http://www.smolensk.ru/user/sgma/MMORPH/N-12-html/TITL-12.htm>
<http://www.smolensk.ru/user/sgma/MMORPH/N-12-html/cont.htm>
- 8 Мироненко, А П Микробный фон ЖКТ редких видов журавлей / А П Мироненко, Н И Землянская // Птицеводство - 2006 - № 12 - С 45-46

Мироненко Антонина Петровна
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ
ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА ЖУРАВЛЕЙ

Автореферат

Лицензия ЛР 020427 от 25.04.1997 г.
Подписано к печати 27.09.2007 г. Формат 60x84/16
Уч.-изд. л. - 1,0
Тираж 100 экз. Заказ 165

Отпечатано в отделе оперативной полиграфии издательства ДальГАУ
657005, г. Благовещенск, ул. Политехническая, 86