

УДК 619:579.63

МОНИТОРИНГ ОБЪЕКТОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ НА НАЛИЧИЕ БАКТЕРИЙ РОДА CITROBACTER И ИХ ФАГОВ

*Л.П. Пульчеровская, кандидат биологических наук, доцент
тел. 8(8422)55-95-47, pulcherovskaya.lidia@yandex.ru*

*Д.А. Васильев, доктор биологических наук, профессор
тел. 8(8422)55-95-47, dav_ul@mail.ru*

*С.Н. Золотухин, доктор биологических наук, профессор
тел. 8(8422)55-95-47, fvm.zol@yandex.ru*

*Е.О. Ефрейторова, аспирант
тел. 8(8422)55-95-47, pulcherovskaya.lidia@yandex.ru
ФГБОУ ВО Ульяновская ГСХА*

Ключевые слова: окружающая среда, сточные воды, бактериофаги, негативные колонии, специфичность бактериофагов, бактерии рода *Citrobacter*.

В статье представлены результаты мониторинга объектов окружающей среды на наличие бактерий рода *Citrobacter* и их фагов. Изучены биологические свойства выделенных бактериофагов.

Введение. Цитробактеры широко распространены в окружающей среде. Их обнаруживают в пищевых продуктах, воде, почве и различных стоках. Названные микроорганизмы выделяют из кишечника и мочевыводящих путей человека, лошадей, крупного рогатого скота, собак, грызунов, птиц, рептилий и насекомых. Всё большее значение цитробактеры приобретают в качестве патогенов различных морских, а также тропических аквариумных рыб. Парентеральное введение цитробактеров лабораторным животным (мышам, морским свинкам или кроликам) приводит к развитию абсцессов. [1]

Особое место в этиологии массовых заболеваний новорожденных животных занимает условно-патогенная микрофлора, которая в отличие от возбудителей «классических» инфекций ежедневно поступает с экскрементами клинически здорового маточного поголовья (животных-бактерионосителей). К данной группе и относятся бактерии рода *Citrobacter*.

Согласно литературным данным бактерии рода *Citrobacter* выделяются из фекалий больных диареей сельскохозяйственных животных [2,3], являются причиной гибели диких животных[4].

Столь широкому распространению, скорее всего, способствует устойчивость названных микроорганизмов к внешним воздействиям. В почве бактерии сохраняются более 6 мес, в навозе — до 11 мес, в воде — до 10 мес. Они хорошо переносят замораживание; при 60 °С погибают в течение 30 мин, при 100 °С — моментально; при использовании дезинфектантов (1-2% раствор хлорамина, 2,5% раствор формалина, 5% раствор карболовой кислоты) — через 15 мин.

Перед нами стояла задача – определить распространенность бактерий рода *Citrobacter* и их бактериофагов в окружающей среде, а также изучить основные свойства выделенных бактериофагов.

Материалы и методы. Бактерии и бактериофаги выделили из объектов окружающей среды Ульяновской и Самарской областей.

Материалом для исследований послужили 8 проб из объектов окружающей среды: сточные воды молокоперерабатывающих предприятий, птицефабрики и песок детских песочниц.

Бактерии выделяли бактериологическим методом в соответствии с правилами, указанными в “Методических указаниях по бактериологической диагностике смешанной кишечной инфекции молодняка животных, вызываемой патогенными энтеробактериями”, утверждёнными Департаментом ветеринарии МСХ и П 11 октября 1999 года

Бактериофаги выделяли из объектов окружающей среды параллельно бактериологическим исследованиям по выделению полевых штаммов бактерий рода *Citrobacter*.

Чистые линии фагов получали по методике описанной И.М. Габриловичем (1992), С.Н.Золотухиным (1999), Л.П.Пульчеровской (2002).

При изучении свойств выделенных бактериофагов были использованы методы: определение морфологии, спектра литической активности и специфичности выделенных фагов описанными М.Адамс (1961); В.Я.Ганюшкин (1988), С.Н.Золотухиным (1999).

Результаты исследований и их обсуждение. Все исследования проводили в два этапа. Первый этап опытов был посвящен индикации и идентификации бактерий рода *Citrobacter*.

Посев материала производили на среды Эндо, Плоскирёва и висмут-сульфит агар, инкубировали при температуре 36-37°С 18-20 часов.

Выросшие в чашках на среде Эндо - розовые или красные колонии без металлического блеска, а также бесцветные или сероватые колонии с розовым оттенком, с более тёмным в центре; на агаре Плоскирёва: слегка опалесцирующие выпуклые розовые колонии с тёмным центром или без

него; на висмут-сульфит агаре (через 48 часов инкубации) светло-зелёные, коричневые или черные колонии без окрашивания участка среды под колонией, пересевали в МПБ. В случае роста указанных колоний в посевах из нескольких образцов исследования пересев делали с культур, полученных не менее чем из двух образцов. Культуры микроорганизмов инкубировали при 37°C 6-18 часов (до появления выраженного помутнения среды). Рост бактерий сопровождается появлением неприятного запаха.

Первичные бульонные культуры, полученные после пересева колоний с вышеперечисленных сред, микроскопировали (окраска по Граму) и при наличии в мазках мелких грамотрицательных палочек с закруглёнными концами, не образующих спор и капсул, располагающихся одиночно, попарно или беспорядочно отбирали.

Выделенные микроорганизмы подвергали дальнейшему изучению с целью родовой и видовой идентификации, а также определения патогенных свойств. Видовую принадлежность культур устанавливали на основе определения морфологических и культурально-биохимических свойств. Ферментативные свойства изучали на наборе полужидких сред с углеводами с индикатором ВР, куда входили среды с глюкозой, лактозой, сахарозой, маннитом, мальтозой, а также на средах с мочевиной, сернокислым железом (определение сероводорода), агаре Симмонса, в бульоне Хоттингера (определение индола), МПЖ, среде с фенилаланином. В качестве дополнительных тестов ставили реакции с метилротом и Фогес-Проскауэра, а также определяли подвижность микроорганизмов в полужидком агаре и в препарате «раздавленная капля». Всего было выделено 2 полевых штамма бактерий рода *Citrobacter*.

Второй этап включал выделение бактериофагов цитробактеров. Исследуемые пробы вносили в стерильные колбы, заливали МПБ из расчета 10 мл бульона на 1 г/мл исследуемого объекта. В опытные колбы вносили индикаторные культуры бактерий рода *Citrobacter*. Выдерживали в термостате в течение 5 и 7 дней. Каждая исследуемая проба испытывалась на наличие фагов ко всем имеющимся культурам *Citrobacter*.

Наличие негативных колоний или зон лизиса на газоне роста индикаторной культуры свидетельствовало о присутствии в исследуемом материале бактериофага. В результате исследований 8 проб сточных вод удалось по указанной схеме выявить 3 изолята фагов. Присутствие бактериофагов также свидетельствует о недавнем присутствии названных бактерий в исследуемых объектах.

Негативные колонии отвивали в МПБ с индикаторными культурами. Для этого, в две пробирки с 4,5 мл мясоептонного бульона (рН 7,4-

7,6) добавляли стерильной пипеткой 0,2 мл 18-ти часовой бульонной индикаторной культуры *Citrobacter*. В одну из пробирок отивали негативную колонию, а вторая пробирка служила контролем. Посевы помещали в термостат и инкубировали их при 37°C до выраженного помутнения контроля. Затем содержимое опытной пробирки освобождали от микробных клеток прогреванием в водяной бане при 58-60°C в течение 30 минут. Прогретый фильтрат переносили стерильной пипеткой в пробирку и использовали для проведения пассирования фага. Для получения чистой линии фага проводили до пяти пассажей из изолированных негативных колоний. В результате проведённых исследований из внешней среды выделено 23 изолята бактериофагов, которые отличались между собой по морфологии негативных колоний.

Далее исследование проводили методом агаровых слоев. Использовали МПА, содержащий 1,5%-0,7% агара. Мясопептонный агар разливали в чашки по 25-30 мл. Для подавления роста воздушной микрофлоры перед разливом добавляли к расплавленному агару 0,04%-ный спиртовой раствор генцианвиолета. Чашки подсушивали в термостате в течение 3 часов [5, 6, 7]. Индикаторные культуры выращивали на скошенном МПА в течение 16 часов и смывали физиологическим раствором.

Фаги выделяли из исследуемых проб методом агаровых слоёв с предварительным прогреванием и центрифугированием исследуемого материала по классическим методикам [8, 9-13]. При проведении нескольких анализов ставили один контроль. Через 20 минут после застывания верхнего слоя агара чашки помещали в термостат на 24 часа.

В результате проведённых исследований нами всего было выделено 3 термостабильные рассы фагов, обладающих способностью на индикаторных культурах цитробактеров образовывать негативные колонии 2-х типов (Рис.1): 1-й тип – мелкие прозрачные негативные колонии до 1 мм в диаметре (фаг1 и 3); 2-й тип – полупрозрачные негативные колонии до 3 мм с зоной неполного лизиса по периферии (фаг 2). Нами были изучены их основные биологические свойства: морфология негативных колоний, литическая активность и специфичность.

Для получения чистой линии фага проводили от 5 до 7 пассажей из изолированных негативных колоний [14, 15].

Выделенные бактериофаги обладали разной литической активностью. Литическую активность бактериофагов оценивали по способности фага вызывать лизис бактериальной культуры в жидких и плотных питательных средах и выражалась это тем максимальным разведением,



Рисунок 1 - Морфология негативных колоний: а- фаг 1 и 3; б - фаг 2

Таблица 1- Литическая активность и место выделения фагов бактерий рода *Citrobacter*

Бактериофаг	Литическая активность	
	По Грациа	По Аппельману
1	3×10^9	10^6-10^7
2	3×10^9	10^6
3	2×10^7	10^5

Таблица 2- Спектр литической активности цитробактерных фагов по отношению к штаммам бактерий *Citrobacter*

№ фага	Количество испытанных штаммов	Из них чувствительных к фагу	№ лизируемых штаммов	% лизируемых штаммов
1	13	5	2,3,11,10,101/57	41,5%
2	13	2	2,11	15,4%
3	13	1	6,9, 101/57	23,1%

в котором исследуемый бактериофаг проявлял свое литическое действие. Результаты представлены в таблице №1.

Спектр литической активности является характерной особенностью штаммов фага и его используют для их идентификации [12].

Для изучения спектра литической активности штаммов, выделенных и селекционированных бактериофагов использовали 13 штаммов бактерий рода *Citrobacter*. Исследования проводили методом нанесения фага на газон бактериальной культуры. Опыты показали, что изу-

ченные фаги характеризуются различным спектром литической активности. Результаты представлены в таблице №2.

Видовая специфичность фагов используется широко в практике для дифференциации бактерий. Эта способность фагов определяется, прежде всего, сродством их к рецепторам лизируемых бактерий. Определение видовой специфичности бактериофагов проводили на агаровых средах путем нанесения фага на газон культуры.

Изучение специфичности цитробактерных бактериофагов проводили по отношению к представителям других семейств и родов с использованием штаммов: *E.coli* - 46 штаммов, *Proteus spp.*- 6 штаммов, *Morganella spp.*-6 штаммов, *Klebsiella spp.*- 4 штамма, *Salmonella spp.*- 6 штаммов, *Enterobacter spp.*- 4 штамма, *Y.enterocolitica* - 12 штаммов, *Staphylococcus spp.*-3 штамма, *Streptococcus spp.*-2 штамма, *Pseudomonas aureginisa* - 4 штамма, *Bacillus cereus* - 3 штамма.[16]

В результате изучения специфичности цитробактерных бактериофагов по отношению к представителям других семейств и родов установлено, что данные фаги не лизировали ни одну из испытываемых культур.

Заключение. В результате проведенных исследований нами из исследуемых объектов было выделено 2 полевых штамма бактерий рода *Citrobacter* и 3 бактериофага.

По морфологии выделенные бактериофаги образовывали негативные колонии 2-х типов, обладали различным спектром литической активности и обладали литической активностью в пределах: по Грация 2×10^7 до 3×10^9 по Аппельману от 10^2 до 10^7 . [17-19]

Выделенные фаги были специфичными по отношению к бактериям рода *Citrobacter* и не активны к представителям бактерий других родов и семейств.

Библиографический список

1. Поздеев, О.К.Энтеробактерии: руководство для врачей. / О.К Поздеев, Р.В.Федоров. -М.:ГЭОТАР-Медиа, 2007.-720с.
2. Воронин, Е.С. Этиология и профилактика желудочно-кишечных заболеваний телят // Е.С. Воронин, Д.А. Дервишов и др. Вестник сельскохозяйственной науки. – 1989. - №9. – С.105-110.
3. Мищенко, В.А. Некоторые аспекты патогенеза диареи новорожденных телят // В.А. Мищенко и др. Ветеринария. - 1999. - №9. – С. 20-23.
4. Золотухин, С.Н. Выделение фагов бактерий рода *Citrobacter* из объектов внешней среды и патологического материала // С.Н.Золотухин, Л.П.Пульчеровская, Н.А. Кирьянова, Д.А. Васильев «Вестник УГСХА», Сборник научных трудов, Ульяновск, - 2002. - С. 29-32.

5. Ганюшкин, В.Я. Бактериофаги сальмонелл и их применение в ветеринарии. / В.Я. Ганюшкин Учебное пособие. – Ульяновск, 1988. – с. 45-49.
6. Пульчеровская, Л.П. Бактерии рода *Citrobacter* и их бактериофаги // Л.П.Пульчеровская, С.Н.Золотухин, Д.А.Васильев. - Вопросы микробиологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы. Сборник научных трудов, Ульяновск, - 2000. - С. 53-58.
7. Пульчеровская, Л.П. Выделение и селекция бактериофагов рода *Citrobacter*. // Л.П.Пульчеровская, С.Н.Золотухин, Д.А.Васильев. Вестник ветеринарии. Выпуск V., Оренбург, - 2002. - С. 85-88.
8. Пульчеровская, Л.П. Индикация бактерий рода *Citrobacter* с помощью реакции нарастания титра фага (РНФ)/ Л.П.Пульчеровская, С.Н.Золотухин, Д.А.Васильев// Вестник Ульяновской сельскохозяйственной академии. – 2013.- №1(21). – С.60-64.
9. Калдыркаев, А.И. Разработка системы фаговаров *Bacillus cereus* / А.И. Калдыркаев, Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев [и др.] // Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения: материалы V Международной научно-практической конференции. Ульяновск, 2013. С. 178-185.
10. Садеева, Н.Т. Выделение фагов бактерий вида *Bacillus cereus* / Н.Т. Садеева, Е.В. Меркулова, Н.А. Феоктистова [и др.] // Актуальные проблемы инфекционной патологии и биотехнологии: материалы V-й Всероссийской (с международным участием) студенческой научной конференции. Ульяновск, 2012. С. 14-17.
11. Золотухин С.Н. Бактериофаги *M.morganii* и их применение при желудочно-кишечных заболеваниях поросят
12. Васильев Д.А. Биосенсорная детекция бактерий рода *Bacillus* в молоке и молочных продуктах для предупреждения их порчи / Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин, Н.А. Феоктистова [и др.] // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. 2013. № 4 (24). С. 36-43.
13. Садртдинова Г.Р. Выделение бактериофага *Klebsiella oxytoca* методом индукции /Д.А.Васильев// Актуальные проблемы биологии, биотехнологии, экологии и биобезопасности: Материалы Международной научно-практической конференции посвященной 80-летию заслуженного ученого, профессора В.Л. Зайцева. -Kiik-LTD, 2015.-С.258-260.
14. Садртдинова, Г.Р.Селекция выделенных клонов бактериофагов, активных к *Klebsiella pneumonia* /Г.Р. Садртдинова, Е.А. Ляшенко, Д.А.Васильев// Инфекция и иммунитет.2014.-№S.-С.95.

15. Садртдинова, Г.Р. Сравнительный анализ биологических свойств бактериофагов бактерий *Klebsiella pneumoniae* / Г.Р. Садртдинова, Е.А. Ляшенко, Д.А. Васильев // Инфекция и иммунитет. 2014. - №5. - С.95.С. 94-95.
16. Ефрейторова, Е.О. Изучение биологических свойств бактерий *Serratia marcescens* выделенных из пищевых продуктов и объектов окружающей среды / Ефрейторова Е.О., Пульчеровская Л.П., Васильев Д.А. Технологический институт филиал ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина» Научно-практическая конференция «Наука в современных условиях: от идеи до внедрения» г. Дмитровград, Научный вестник Выпуск №13.. С. 175-180.
17. Катмакова, Н.П. Разработка оптимальных технологических параметров постановки РНФ с биопрепаратом УР – 09 УГСХА / Н.П. Катмакова, С.Н. Золотухин, Д.А. Васильев // Естественные и технические науки. – Москва, 2009. – № 6. – С. 202 – 204.
18. Барт Н.Г. Выделение фагов бактерий рода *Providencia* и изучение их биологических свойств / Н.Г. Барт, С.Н. Золотухин, Д.А. Васильев // Вестник ветеринарии – Ставропольский ГАУ, вып. 59. – 2011. – № 4. – С. 47-48.
19. «Методические рекомендации по индикации и идентификации энтеробактерий рода *Citrobacter* в патологическом материале, кормах, пищевом сырье и объектах внешней среды с применением специфических бактериофагов» Утверждены Отделом ветеринарной медицины РАСХН 4 октября 2004 года. (Методические рекомендации) / С.Н.Золотухин, Д.А.Васильев, Л.С.Каврук. ВНИИВСГиЭ, Москва, 2005 г.

ENVIRONMENTAL MONITORING FOR BACTERIA CITROBACTER KIND AND PHAGES

Pulcherovskaya L.P., Vasiliev D.A., Zolotukhin S.N., Efreitorova E.O.

Keywords: environment, waste water, bacteriophages, negative colonies, the specificity of bacteriophages, bacteria of the genus *Citrobacter*.

This paper presents the results of environmental monitoring for the presence of bacteria of the genus *Citrobacter* and their phages. Studied the biological properties of the isolated phages.