

УДК 57: 579.2

СОЗДАНИЕ СЕЛЕКТИВНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ, ДИФФЕРЕНЦИРОВАНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИИ БАКТЕРИЙ РОДА *KLEBSIELLA*

Г.Р. Садртдинова, аспирант кафедры МВЭиВСЭ
тел. 8(953) 98-14-799, sadrtdinova-guzlik@yandex.ru
С.Н. Золотухин, доктор биологических наук, профессор
тел. 8(8422) 55-95-47, fvm.zol@yandex.ru
Д.А. Васильев, доктор биологических наук, профессор
8(8422) 55-95-47, dav_ul@mail.ru
ФГБОУ ВО Ульяновская ГСХА

Ключевые слова: бактерия, мясопептонный агар, селективная среда, штамм, идентификация.

В статье представлены результаты экспериментальных исследований по созданию селективной среды предназначенной для культивирования бактерий рода *Klebsiella* и обладающей рядом преимуществ по сравнению с аналогами: высокая чувствительность и селективность, выраженные отличия колоний клебсиелл по окраске, цвету, консистенции колоний, состав среды минимален.

Введение. Все виды бактерий рода *Klebsiella* хорошо растут на простых мясных средах при оптимальной температуре культивирования 35 – 37°C при pH – 7,2 [1]. Непременной особенностью бактерий данного рода считают пышный рост и образование на плотных питательных средах больших, выпуклых, частично сливающихся колоний слизистой консистенции. Обычно первичный высев материала для выделения чистой культуры производят на селективные и дифференциально-диагностические среды, в которых заложен принцип ферментации лактозы (агары Плоскирева, Эндо, Левина, Мак-Конки) [2, 3]. Эти среды, как правило, используются для диагностики кишечных инфекций, что в свою очередь затрудняет процесс дифференциации клебсиелл по цвету и морфологии от других представителей семейства *Enterobacteriaceae*. Изучение же большого числа сходных колоний делает исследование трудоемким и приводит к значительному расходу дифференциально-диагностических сред.

Известен ряд сред, основанный на принципе утилизации преимущественно клебсиеллами некоторых субстратов, на замене лактозы

другими избирательными углеводами (инозит, рамноза) и добавлением антибиотиков (карбенициллин) или других ингибиторов (метилвый фиолетовый В и 2В, желчные соли) [4]. Однако все предложенные среды имеют в своем составе компоненты недостаточно подавляющие рост прочих энтеробактерий. Основными недостатками существующих сред являются: недостаточная селективность (обусловленная неполным подавлением роста энтеробактеров, цитробактеров, что приводит к увеличению числа отсеваемых для идентификации колоний), отсутствие четкой цветовой дифференциации колоний бактерий разных родов, сложный многокомпонентный состав.

Цель исследования заключалась в обоснованном подборе компонентов для селективной среды, обеспечивающей ростовые свойства бактериям рода *Klebsiella* и ингибирующей рост сопутствующей микрофлоры.

Материалы и методы исследований. Объектами исследований явились лабораторные штаммы из музейной коллекции кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ Ульяновской ГСХА: *Klebsiella pneumoniae* 1, *Klebsiella pneumoniae* 85, *Klebsiella pneumoniae* 244, *Klebsiella pneumoniae* 53, *Klebsiella pneumoniae* 49, *Klebsiella oxytoca* 1, *Klebsiella oxytoca* 2, *Klebsiella oxytoca* 3, *Klebsiella oxytoca* 24, *Klebsiella oxytoca* 25, *Escherichia coli* 1, *Proteus vulgaris* 24, *Salmonella enteritidis* 53, *Serratia marcescens* 12, *Hafnia alvei* 16.

Для подбора питательной основы и ростовых компонентов провели анализ культивирования бактерий рода *Klebsiella* на 5 агаровых средах: Эндо, Левина, Плоскирева, KL-1-УГСХА, мясопептонный агар [5, 6, 7]. По результатам, в качестве питательной основы можно использовать мясопептонный агар (состоящий из мясопептонного бульона и агара (0,5-2%); служащий основой многих питательных сред.), в качестве ингибитора сопутствующей микрофлоры и индикатора колоний бактерий рода *Klebsiella* - сафранин Т (растворимый в воде/спирте краситель для контрастного окрашивания грамотрицательных бактерий), в качестве источника углеводного питания - сахароза (бактерии данного рода хорошо утилизируют все углеводы). Таким образом, компонентный состав новой селективной среды имеет вид: мясопептонный агар, сахароза, сафранин Т.

В расплавленный мясопептонный агар добавляли 70% водно-спиртовой раствор сафранина, хорошо перемешивали. В полученную смесь добавляли сахарозу, предварительно растворенную в дистиллированной воде и прокипяченную. Среду стерилизовали автоклавированием при 0,5 атм в течение 20 мин. рН исходной среды- 7,2. Цвет исходной среды - темно-красный. Среду разливали в чашки Петри на 2/3 от объема и остав-

ляли до полного застывания. Посев исследуемых штаммов осуществляли на поверхность среды штрихом обычной бактериологической петлей. Инкубацию посевов осуществляют при 370 ° в течение суток.

Результаты исследований и их обсуждение. Положительным результатом считалось образование на поверхности среды крупных слизистых колоний темно-красного цвета, размером 3-4 мм. Результаты проведенных исследований представлены в таблице 1 и на рисунках 1-2.

Таблица 1- Результаты апробации селективной среды

Исследуемый штамм	величина колоний	форма колоний	консистенция	поверхность колоний	цвет колоний
K.pneumoniae 1	3 мм	круглая	слизистая	гладкая	темно-красный
K.pneumoniae 85	3 мм	круглая	слизистая	гладкая	темно-красный
K.pneumoniae 244	3 мм	круглая	слизистая	гладкая	темно-красный
K.pneumoniae 53	3 мм	круглая	слизистая	гладкая	темно-красный
K.pneumoniae 49	3 мм	круглая	слизистая	гладкая	темно-красный
K.oxytoca 1	3 мм	круглая	слизистая	гладкая	темно-красный
K.oxytoca 2	3 мм	круглая	слизистая	гладкая	темно-красный
K.oxytoca 3	3 мм	круглая	слизистая	гладкая	темно-красный
K.oxytoca 24	3 мм	круглая	слизистая	гладкая	темно-красный
K.oxytoca 25	4 мм	круглая	слизистая	гладкая	темно-красный
E.coli 1	2 мм	круглая	пастообразная	гладкая	розовый
P.vulgaris 24	-	-	-	-	-
S.enteritidis 53	-	-	-	-	-
S.marcescens 12	2 мм	круглая	пастообразная	гладкая	красный
H.alvei 16	-	-	-	-	-

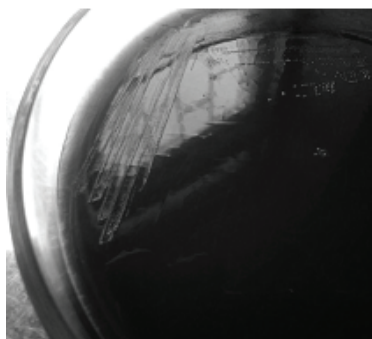


Рисунок 1- Рост *K. pneumoniae* 1
на новой селективной среде

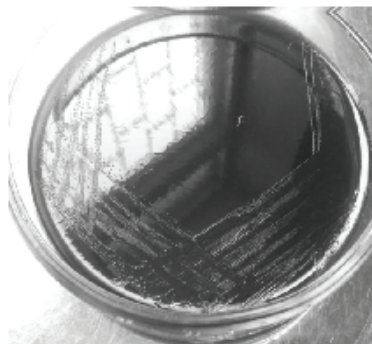


Рисунок 2- Рост *K. oxytoca* 24
на новой селективной среде

Следующим этапом нашей работы стала проверка специфичности использования селективной среды, подтверждение ее узконаправленности. Для этого нами были отобраны штаммы некоторых представителей бактерий семейства *Enterobacteriaceae* (*Escherichia*, *Proteus*, *Salmonella*, *Serratia*, *Hafnia*) (рисунок 3).

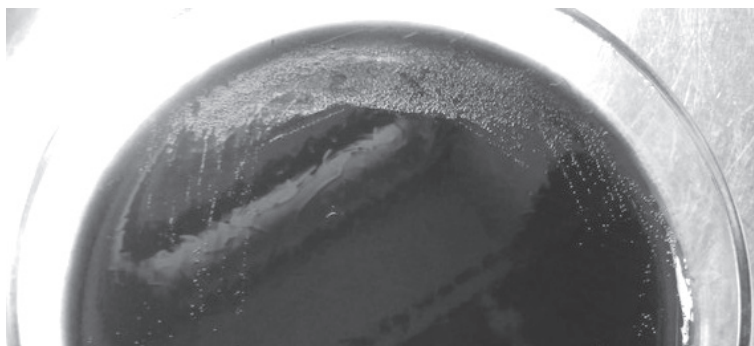


Рисунок 3- Рост *S. marcescens* 12 на новой селективной среде

Через сутки культивирования на новой селективной среде были получены следующие результаты:

- наблюдали отсутствие роста у *P. vulgaris* 24, *S. enteritidis* 53, *H. alvei* 16.

- отмечали рост у культур *S.marcescens* 12 (величина колоний 1-2 мм, цвет-красный, поверхность- гладкая, консистенция- пастообразная, форма колоний- круглая), *Escherichia* (величина колоний 2 мм, цвет-розовый, поверхность- гладкая, консистенция- пастообразная, форма колоний- круглая).

Выводы. При культивировании на новой селективной среде гетерогенных штаммов, отмечаются различия в характеристике колоний по цвету, размерам, консистенции. Преимущества предлагаемой среды в сравнении с прототипами состоят:

- в повышении чувствительности и селективности;
- в выраженном отличии колоний клебсиелл по окраске, что облегчает идентификацию бактерий данного рода близкородственных родов;
- состав среды минимален.

Таким образом, использование предлагаемой нами среды значительно повышает чувствительность бактериологического исследования, направленного на выявление и идентификацию бактерий рода *Klebsiella* в материале от больных людей и животных и в объектах окружающей среды.

Библиографический список

1. Золотухин С.Н. Малоизученные энтеробактерии и их роль в патологии животных // Ульяновск. – 2004. – С. 64 – 75.
2. Булькинова Е.А. Выделение, диагностика и идентификация бактерий рода *Klebsiella*// Материалы Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых.- Ульяновск: Ульяновская ГСХА им.П.А.Столыпина, 2004.-С.257-262.
3. Сасова В. А., Залесских Н. В. Идентификация энтеробактерий и стафилококков / В. А. Сасова, Н. В. Залесских // Информационные материалы — «НПО» «Диагностические системы» — Н. Новгород, 2007. — 28 с.
4. Сиволодский, Е. П. Хромогенная синтетическая среда «Клебсиелла 5-АСК ХРОМ-С» для выделения и идентификации клебсиелл / Е. П. Сиволодский // Клиническая лабораторная диагностика. - 2015. - № 5. - С. 48-51.
5. Сухинин А.А., Виноходов В.О., Макавчик А. Экспресс-диагностика энтеробактерий/Материалы международной юбилейной научно-практической конференции ВНИВИ птицеводства. -СПб.: Санкт-Петербургская гос. акад. вет. мед., 2004, С.128...129.

6. Ленченко Е.М., Плитов ИС. Сравнительная характеристика дифференциально-диагностических сред для индикации возбудителей сальмонеллеза птиц// *Аграрная наука*.2011.№3.С.26-27.
7. Садртдинова Г.Р. Повышение селективных и дифференциально-диагностических свойств плотной агаровой среды, предназначенной для выделения бактерий рода *Klebsiella*// *Материалы IV Международной научно-практической конференции молодых ученых «Молодежь и наука XXI века»*. – Ульяновск: Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина, 2014,т.1 – С. 122-127.

CREATING SELECTIVE MEDIUM FOR ISOLATION, DIFFERENTIATION AND IDENTIFICATION BACTERIA OF GENUS KLEBSIELLA

Sadrtdinova G.R., Zolotukhin S.N., Vasiliev D.A.

Key words: bacteria, plain agar, selective medium, strain, identification.

The article presents results experimental research on selective medium intended for culturing bacteria genus *Klebsiella* and has a number advantages over analogues: high sensitivity and selectivity, expressed differences colonies *Klebsiella* color, texture colonies, composition environment is minimal.