

УДК 57: 579.2

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ПРИ ПЕРВИЧНОЙ ДИАГНОСТИКЕ БАКТЕРИЙ ВИДА *KLEBSIELLA OXYTOSA*

*Г.Р. Садртдинова, ассистент,
тел. 8(953) 98-14-799, sadrtdinova-guzlik@yandex.ru,
Д.А. Васильев, доктор биологических наук, профессор,
тел. 8(8422)55-95-47, dav_ul@mail.ru
ФГБОУ ВО Ульяновская ГСХА*

Ключевые слова: бактерии, бактериоскопия, морфология, питательная среда, инкубирование, колония бактерий.

В статье представлены результаты исследований, связанные с изучением особенностей культивирования бактерий вида *Klebsiella oxytosa* на питательных средах, используемых при первичной диагностике. Отмечены ростовые особенности изучаемых штаммов на каждой из сред. Сравнительный анализ эффективности использования сред в дифференциально-диагностических целях заключался в параллельном посеве гетерогенных штаммов. Культивирование осуществляли при одинаковых температурных режимах (37°C), наблюдение за посевами осуществляли в течение 48-ми часов. Использование питательных сред Эндо, Левина и Плоскирева в исследованиях не обеспечивает четкой идентификации бактерий, в связи с чем необходимо выделение их в чистой культуре и длительная идентификация широким набором биохимических тестов.

Введение. В зависимости от состояния иммунной системы человека бактерии рода *Klebsiella* могут явиться причиной как легкого инфекционного заболевания, так и тяжелого септического проявления [1]. Бактерии вида *Klebsiella oxytosa* представляют собой грамотрицательные факультативно-анаэробные бактерии. Оптимальными условиями культивирования являются температура роста 35-37°C и время инкубирования- 20-24 часа. Штаммы бактерий данного вида, как правило, индолоположительны, отрицательны по аргининдигидролазе и орнитиндекарбоксилазе, обладают подвижностью при 10 °C. Непременной особенностью всех бактерий рода *Klebsiella* считают «пышный» и обильный рост с образованием на плотных питательных средах (Среда Эндо, Среда Плоскирева, Среда Левина) больших, выпуклых, частично сливающихся колоний слизистой консистенции [2].

При первичной диагностике возбудителя применяют бактериологический метод и бактериоскопию. Бактериологический метод связан с посевом исследуемого материала на питательные среды и анализом характера выросших колоний. Среда Эндо, Левина, Плоскирева, ВСА- широко используемые в практике питательные среды [3]. Стоит отметить, что рост на этих средах штаммов гетерогенных бактерий или бактерий, являющиеся сопутствующей микрофлорой при выделении бактерий рода *Klebsiella* имеет ряд отличий: бактерии рода *Escherichia* на среде Эндо образуют ярко-малиновые колонии с металлическим блеском (у *Klebsiella* лишь некоторые штаммы способны образовывать колонии с металлическим блеском, цвет колоний- малиновый), на среде Левина- бактерии рода *Escherichia* образуют черно-синие колонии с металлическим блеском (у *Klebsiella* колонии сине-розового цвета), на среде Плоскирева- бактерии рода *Escherichia* образуют по краям среды колонии серого цвета, в центре розовые или брусничного цвета с желтоватым оттенком (у *Klebsiella* колонии светло-красного цвета); бактерии рода *Enterobacter* на среде Эндо образуют нежно-розовые колонии (у *Klebsiella* колонии подобного цвета встречаются редко), на среде Левина- рост бактерий рода *Enterobacter*, в отличие от рода *Klebsiella*, подавляется, на среде Плоскирева- бактерии рода *Enterobacter* образуют колонии бежевого цвета или с явно выраженным бежевым оттенком (у *Klebsiella* колонии светло-красного цвета); бактерии рода *Serratia* на среде Эндо, Левина и Плоскирева образуют бесцветные, прозрачные (пигментообразующие штаммы- красные) колонии, причем хороший рост отмечается при 30°C (у *Klebsiella* оптимальной температурой роста является 35-37 °С, колонии малинового цвета).

King и Metzger для обнаружения и выделения патогенных энтеробактерий (включая *Salmonella* и *Shigella*) предложили селективный агар- Нектоен Enteric Agar (гектоеновый энтеро-агар). Согласно исследованиям этих ученых, при сравнении с другими селективными средами, гектоеновый энтеро-агар обеспечивает хороший рост грамотрицательной микрофлоры, и в то же время достаточно хорошо подавляет развитие сопутствующих микроорганизмов. Колонии лактозоположительных бактерий четко отличаются по цвету от лактозоотрицательных [4].

Цель исследований заключалась в изучении особенностей роста бактерий вида *K. oxytoca* на питательных средах, используемых для бактериологической идентификации и дифференциации.

Материалы и методы. В работе использовали 2 штамма бактерий изучаемого вида, полученных из коллекции кафедры МВЭиВСЭ (Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина) - АТСС 8724. В качестве гетеро-

генных штаммов использовали бактерии семейства *Enterobacteriaceae*: *H.alvei* 10, *E.aerogenes* 654, *S.marcescens* 21. Культивирование штаммов бактерий проводили на средах Эндо (ГНЦ прикладной микробиологии, г. Оболенск), Левина (ГНЦ прикладной микробиологии, г. Оболенск), Плоскирева (ГНЦ прикладной микробиологии, г. Оболенск), гектоеновый энтеро-агар (HiMedia). Посев на среды культур осуществляли после «подращивания» на мясопептонном бульоне (ГНЦ прикладной микробиологии, г. Оболенск) в течение 24 часов. Суточную культуру каждого штамма высевали на отобранные питательные среды штрихом. Инкубировали посевы в течение 24 часов, при 37 °С [5].

Результаты исследований и их обсуждение. Бактерии *K.oxytoca*, *H.alvei* 10, *E.aerogenes* 654, *S.marcescens* 21 и *S.marcescens*, по сходству биохимических и культуральных признаков, относят к одной трибе- *Klebsielleae* (согласно системе дифференциации, предложенной Э.Юингом и П.Эдварсом) [6, 7, 8]. Сравнительный анализ эффективности использования сред в дифференциально-диагностических целях заключался в посеве гетерогенных штаммов и штаммов вида *K.oxytoca* на изучаемые среды.

Учет результатов исследований и анализ роста бактерий на средах проводили по следующим критериям: величина колонии, форма колонии, характер контура края, рельеф колонии, цвет, консистенция. По совокупности критериев делали вывод о характере роста изучаемых штаммов на данных средах.

Результаты, представленные в таблице 1, позволяют отметить хороший, обильный рост на среде Плоскирева у штаммов *K.oxytoca* 1, *K.oxytoca* ATCC 8724 и *S.marcescens* 21. Слизистые пышные колонии достигали диаметра 2-3 мм, цвет варьировался от светло-розового до розового. Рост на среде Левина у штаммов *K.oxytoca* 1, *K.oxytoca* ATCC 8724- средний, с синне-розовыми колониями в диаметре 1-2 мм. Рост гетерогенных штаммов на среде Левина отличался от штаммов изучаемого вида, характер роста-средний. На среде Эндо у бактерий вида *K.oxytoca* отмечен самый слабый рост, с образованием мелких и редких колоний с металлическим блеском. Штамм *S.marcescens* 21 образовывал на среде Эндо куполообразные колонии светло-розового цвета, лактозо(-), диаметром 2-3 мм.

Отмечены особенности роста на гектоеновом энтеро-агаре. Хороший, обильный рост с образованием крупных выпуклых колоний правильной формы наблюдался у *S.marcescens* 21. У штаммов *K.oxytoca* ATCC 8724, *K.oxytoca* 1 рост был отмечен только на вторые сутки. Величина ярко-оранжевых выпуклых колоний правильной формы варьи-

Таблица 1 - Особенности роста штаммов бактерий семейства Enterobacteriaceae на ДДС

Исследуемый штамм	Питательная среда	рН среды	Условия инкубация	Результат	Характеристика роста
<i>K. oxytoca</i> 1	Эндо	7,4±0,2	37 °С, 24 часа	Куполообразные слизистые колонии малинового цвета, лактозо(+), 2-4 мм.	Средний
	Левина	7,2±0,2	37 °С, 24 часа	Слизистые колонии сине-розового цвета, 1-3 мм.	Средний
	Плоскирева	7,0±0,2	37 °С, 24 часа	Светло- розовые колонии, 2-3 мм.	Обильный
	HEA	7,6±0,2	37 °С, рост наблюдался через 48 часов	Колонии ярко-оранжевого цвета, круглой формы, с ровными краями, мелкие 1мм.	
<i>K. oxytoca</i> ATCC 8724	Эндо	7,4±0,2	37 °С, 24 часа	Куполообразные слизистые колонии малинового цвета, лактозо(+), 2-3 мм.	Средний
	Левина	7,2±0,2	37 °С, 24 часа	Слизистые колонии сине-розового цвета, 1-2 мм.	Средний
	Плоскирева	7,0±0,2	37 °С, 24 часа	Светло- розовые колонии, 2-3 мм.	Обильный
	HEA	7,6±0,2	37 °С, рост наблюдался через 48 часов	Колонии ярко-оранжевого цвета, круглой формы, с ровными краями, мелкие 1-2 мм.	
<i>S. marcescens</i> 21	Эндо	7,4±0,2	37 °С, 24 часа	Куполообразные колонии светло-розового цвета, лактозо(-), 2-3 мм.	Средний
	Левина	7,2±0,2	37 °С, 24 часа	Колонии светло-розового цвета, прозрачные, 2-3 мм.	Средний
	Плоскирева	7,0±0,2	37 °С, 24 часа	Выпуклые, прозрачные бесцветные колонии правильной формы, с ровными краями, 2 мм. Образовывали пигмент.	Обильный
	HEA	7,6±0,2	37 °С, 24 часа	Колонии ярко-оранжевого цвета, круглой формы, с ровными краями, крупные 3-4 мм.	Обильный
<i>H. alvei</i> 10	Эндо	7,4±0,2	37 °С, 24 часа	Куполообразные полупрозрачные колонии, лактозо (-), 2-3 мм.	Средний
	Левина	7,2±0,2	37 °С, 24 часа	Колонии розовато-серого цвета, 1-2 мм.	Средний
	Плоскирева	7,0±0,2	37 °С, 24 часа	Светло- розовые колонии, 2-3 мм.	Слабый
	HEA	7,6±0,2	37 °С, рост наблюдался через 48 часов	Колонии светло-зеленого цвета, круглой формы, с ровными краями, мелкие 1 мм.	Слабый
<i>E. aerogenes</i> 654	Эндо	7,4±0,2	37 °С, 24 часа	Куполообразные колонии малинового цвета, лактозо(+), 2-3 мм.	Средний
	Левина	7,2±0,2	37 °С, 24 часа	Колонии светло-розового цвета, 1-2 мм.	Средний
	Плоскирева	7,0±0,2	37 °С, 24 часа	Светло- розовые колонии с бежевым оттенком, 2-3 мм.	Средний
	HEA	7,6±0,2	37 °С, 24 часа	Колонии желто-оранжевого цвета, круглой формы, с ровными краями, мелкие 1-2 мм.	Слабый

ривалась в пределах 1-2 мм. Бактерии вида *H.alvei* 10 на изучаемой среде образовывали колонии через 48 часов культивирования- светло-зеленые колонии (как цвет среды), правильной формы, 1 мм. Штамм *E.aerogenes* 654 образовывал колонии желто-оранжевого цвета, круглой формы, с ровными краями, мелкие 1-2 мм.

Штамм *S.marcenscens* 21 на вторые сутки культивирования (при тех же временных и температурных условиях) образовал пигмент, приводящий к изменению цвета колоний с ярко-оранжевого до изумрудного с ярко-розовым центром. Величина колоний увеличилась с 3 до 4,5 мм.

Заключение. Анализ полученных данных, позволяет заключить о недостатках всех этих сред, так как на них помимо бактерий рода *Klebsiella* хорошо растут и другие бактерии семейства *Enterobacteriaceae*, что затрудняет отбор колоний для проведения дальнейшей идентификации. Так, отмечены сходные культуральные свойства бактерий - это образование выпуклых светло-розовых колоний, правильной формы, с ровными краями (например на среде Плоскирева). Рост *S.marcenscens* 21 отличается от данных видов характеристикой выросших колоний и образованием через 48 часов красного водорастворимого пигмента- продигиозина.

Определение принадлежности культур к клебсиеллам будет основана на постановке целого ряда подтверждающих тестов (тесты на подвижность, сероводород, мочевины, фенилаланиндезаминазу, цитрат Симмонса, малонат, лизиндекарбоксилазу, инозит), а, следовательно, расхода значительного времени и материальных затрат.

Библиографический список

1. Поздеев, О.К. Энтеробактерии: руководство для врачей. / О.К Поздеев, Р.В.Федоров-М.:ГЭОТАР-Медиа, 2007.-720с.
2. Бульканова 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. Садртдинова Г.Р. Эффективность использования гектоенового энтеро-агара при идентификации бактерий *Klebsiella oxytoca*//Материалы IV Международной научной конференции, посвященной 55-летию аспирантуры ФГБУ «ВНИИЗЖ», 6 декабря 2016 г. / под редакцией Д.А. Лозового. – Владимир: ФГБУ «ВНИИЗЖ», 2016. – С.134-137.
4. Пульчеровская Л.П. Микробиологическое исследование орхидей с признаками бактериальной гнили/ Д.Р. Шапирова, А.Р.Зиятдинова, Е.Д.Ценева, Е.О.Ефрейторова, Г.Р.Садртдинова, Н.Н.Карамышева, Д.Г.Сверкалова// Сту-

- денческий научный форум - 2016. VIII Международная студенческая электронная научная конференция, электронное издание.- 2016.
5. Садртдинова Г.Р. Биохимическая активность бактерий вида *Klebsiella oxytoca*/ С.Н. Золотухин, Д.А. Васильев, Г.Р. Садртдинова// Материалы VII Международной научно-практической конференции «Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения» / - Ульяновск: УГСХА, 2016. Т. III. – С.261-265.
 6. Ефрейторова, Е.О. Изучение биологических свойств бактерий *serratia marcescens* выделенных из пищевых продуктов и объектов окружающей среды / Е.О., Ефрейторова, Л.П.Ппульчеровская, Д.А. Васильев Научный вестник Выпуск №13. г. Дмитровград. Технологический институт филиал ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А.Столыпина» 2014г.С. 175-180.
 7. Садртдинова Г.Р. Создание селективной среды для выделения, дифференцирования и идентификации бактерий рода *Klebsiella*/ С.Н. Золотухин, Д.А. Васильев, Г.Р. Садртдинова// Материалы VII Международной научно-практической конференции «Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения» / - Ульяновск: УГСХА, 2016. Т. III. – С.266-269.
 8. 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».2014.-С.122-127.

ASSESS THE SANITARY CONDITION ENVIRONMENT BY ISOLATION FROM HER BACTERIOPHAGES

Sadrtdinova G.R., Vasiliev D.A.

Key words: *bacteria bacterioscopy, morphology, culture media, incubation, the bacteria colony.*

*The article presents the results of research related to the study of the characteristics of the culture *Klebsiella oxytoca* bacteria on nutrient media used for primary diagnosis. It noted the growth characteristics of the studied strains to each of the media. Comparative analysis of the effectiveness of the use of media in the differential-diagnostic purposes was to parallel heterogeneous crop strains. Cultivation was carried out at the same temperature conditions (37°C), monitoring of crops was carried out for 48 hours. The use of nutrient media Endo, Levin and Ploskireva research does not provide clear identification of bacteria, and therefore should be allocated in a clean culture and continuous identification of a wide range of biochemical tests.*