

УДК 619:579.6

ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫХ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ РАН СОБАК

С.Н. Золотухин, доктор биологических наук, профессор
Ю.В. Пичугин, ветеринарный врач-рентгенолог
Межкафедрального научного центра ветеринарной медицины
А.С. Мелехин, научный сотрудник Межкафедрального научного
центра ветеринарной медицины
Д.С. Золотухин, кандидат биологических наук
89272703480; e-mail: fvm.zol@yandex.ru
ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ

Ключевые слова: *Энтеробактерии; псевдоманады, тинкториальные, морфологические, культуральные, ферментативные, свойства.*

Из раневого экссудата собак с гнойными осложнениями переломов костей конечностей у животных было выделено и идентифицировано 64 грамотрицательных штамма микроорганизмов из них 42 штамма были отнесены нами к семейству Enterobacteriaceae, 6 штаммов принадлежало к виду Enterobacter cloacae, 8 – к виду Citrobacter freundii, 8 - Proteus vulgaris, 19 - Escherichia coli, 2 - к Klebsiella pneumoniae. 22 штамма принадлежали виду Pseudomonas aeruginosa рода Pseudomonas семейства Pseudomonadaceae. Все выделенные культуры обладали типичными для своего вида морфологическими, культуральными и биохимическими свойствами.

Введение. В последнее время расширилось представление о роли условно-патогенных грамотрицательных микроорганизмов в патологии сельскохозяйственных и непродуктивных животных.

По данным отечественных и зарубежных исследователей они являются причиной возникновения желудочно-кишечных и респираторных заболеваний молодняка, эндометритов и маститов у взрослых животных, гнойных раневых осложнений, пищевых токсикоинфекций у людей [1-9].

Интерес к изучению фенотипических свойств грамотрицательных палочек связан с их изменчивостью под воздействием различных абиотических факторов, с которыми названные микроорганизмы постоянно

встречаются как во внешней среде, так и в организме животного и приобретением множественной устойчивости к применяемым антибиотикам [10, 11].

Появление штаммов с изменёнными свойствами затрудняет их идентификацию, что препятствует своевременной диагностике и борьбе с заболеваниями вызываемыми этими бактериями.

Поэтому целью наших исследований было изучение тинкториальных, морфологических, культуральных и ферментативных свойств штаммов грамотрицательных микроорганизмов, выделенных из раневого экссудата собак при послеоперационных осложнениях переломов костей конечностей.

Объекты и методы исследований. Объектом исследования стали 64 грамотрицательных штамма микроорганизмов. 42 штамма были отнесены нами к семейству *Enterobacteriaceae*, 6 штаммов принадлежало к виду *Enterobacter cloacae*, 8 – к виду *Citrobacter freundii*, 8 - *Proteus vulgaris*, 19 - *Escherichia coli*, 2 - к *Klebsiella pneumonia*.

22 штамма принадлежали виду *Pseudomonas aeruginosa* рода *Pseudomonas* семейства *Pseudomonadaceae*.

Культуры микроорганизмов пересевали на питательный агар, агар Эндо, Левина, Плоскирева, висмут-сульфит агар в чашках, которые затем помещали в термостат на 18-48 ч при разных температурных режимах от 10 до 45°C.

У выросших культур изучали морфологические, тинкториальные и культурально-биохимические свойства, по результатам чего была определена их видовая принадлежность [12, 13].

Ферментативные свойства агаровых культур изучали на наборе сред с углеводами и индикатором Андресэ или полужидких средах с индикатором ВР, а также на средах с мочевиной, сернокислым железом (определение сероводорода), агаре Симонса, в МПБ (определение индола), МПЖ, среде с фенилаланином, среде Кларка (реакции с метилротом и Фогес-Проскауэра) [13, 14].

Для обнаружения индола использовали реакцию Эрлиха в модификации Беме (*A. Bohme*) [15].

Подвижность микроорганизмов определяли микроскопией суточных бульонных культур методом «висячая капля» и при посеве «уколом» в полужидкий питательный агар [12].

Результаты исследований. Бактерии вида *E. coli* представляли собой короткие грамотрицательные палочки с закругленными концами, толщиной 0,6-1,0 и длиной 1,5-3,0 мкм, располагающиеся обособленно

или парами, спор не образовывали; 87 (92%) штаммов обладали подвижностью, 8 штаммов имели микрокапсулу (они были неподвижны).

Эшерихии хорошо росли на обычных простых и синтетических питательных средах при температуре от 15 до 46°C. Оптимальная температура роста для них была 37-38°C.

На плотных питательных средах 89 культур *E. coli* образовывали круглые выпуклые колонии средней величины, влажные, с гладкой блестящей поверхностью с ровными краями (S-форма), 6 культур образовывали плоские, сухие со слегка волнистым краем и шероховатой поверхностью колонии (R-форма).

В жидких средах эшерихии росли в виде интенсивного равномерного помутнения среды, образовывали осадок, иногда образовывали пленку на поверхности или пристеночное кольцо. Осадок легко разбивался при встряхивании, образуя гомогенную взвесь.

На дифференциально-диагностической среде Эндо изоляты образовывали колонии малиново-красного цвета с металлическим блеском или без него.

На агаре Левина (среда с эозином и метиленовым синим) образовывали колонии темно-фиолетового цвета.

Штаммы кишечной палочки продуцировали разнообразные ферменты, разлагающие многие углеводы и многоатомные спирты (глюкозу, галактозу, левулезу, лактозу, мальтозу, маннит, рамнозу, некоторые штаммы ферментировали сахарозу и дульцит, раффинозу, салицин, сорбит, глицерин) с образованием пируватов, превращающихся затем в молочную, уксусную и формиковую кислоты.

Все изоляты не разжижали желатин, не расщепляли мочевину, образовывали индол, восстанавливали нитраты в нитриты, давали положительную реакцию с метилротом и отрицательную Фогес-Проскауэра, не выделяли сероводород.

Представители рода *Proteus*, также имели форму коротких, прямых грамотрицательных палочек длиной 1-3 мкм, шириной 0,4-0,8 мкм, обладали подвижностью, спор и капсул не образовывали.

Все штаммы хорошо росли на обычных питательных средах с образованием гнилостного запаха. На плотных питательных средах большинство штаммов протей проявляли способность к «роению» (ползучий рост), выражающейся образованием на поверхности среды вуалевых налетов сероватого цвета с гладкой блестящей поверхностью.

На среде Плоскирева протей образовывали крупные (6-8 мм) полупрозрачные колонии с фестончатыми краями, гладкой поверхностью

сероватого цвета; среда в зоне роста колоний подщелачивается и приобретает желтизну.

На висмут-сульфит агаре через 24-48 ч культивирования колонии протея были плоскими, неправильной формы, имели светло- или темно-коричневый цвет. Все культуры на плотных средах издавали резкий гнилостный запах.

Два штамма были нероящиеся, образовывали на плотных питательных средах мелкие и средние по размеру круглые, выпуклые колонии S-формы, сероватого цвета.

В МПБ бактерии рода *Proteus* вызывали равномерное помутнение среды с наличием осадка, который при встряхивании пробирки легко разбивается.

Все штаммы разных видов бактерий рода *Proteus* редуцировали нитраты, расщепляли мочевины, разжижали желатин, ферментировали глюкозу с образованием кислоты и газа, не изменяли лактозу и маннит, давали положительную реакцию с метилротом, не декарбоксилировали лизин, не гидроксилировали орнитин, дезаминировали фенилаланин.

48 штаммов (90,6%) обладали гемолитическими свойствами и вызывали бета-гемолиз эритроцитов барана.

Бактерии рода *Enterobacter* при микроскопии выглядели короткими, прямыми, грамтрицательными палочками шириной 0,6 - 1,0 мкм и длиной – 1 - 3 мкм, спор не образовывали, большинство обладали подвижностью. В мазках располагались одиночно, иногда попарно.

Энтеробактеры хорошо росли на обычных и дифференциально-диагностических питательных средах, используемых для выделения энтеробактерий. На плотных средах образовывали выпуклые круглые колонии S-формы, среднего размера, напоминающие колонии эшерихий влажной иногда слизистой консистенции. На лактозосодержащих дифференциально-диагностических средах вырастали красные, малиновые (лактозоположительные варианты) колонии с металлическим блеском или без него или розоватые колонии. Штаммы, замедленно разлагающие лактозу, имеют розовые или с бежевым оттенком колонии. В жидких питательных средах образовывали интенсивное помутнение с образованием разбивающегося осадка, иногда пристеночное кольцо.

Все изученные штаммы энтеробактеров не образовывали сероводород и индол, утилизировали цитратные соли, слабо гидролизировали мочевины, не дезаминировали фенилаланин. Большинство штаммов замедленно разжижало желатин, давали отрицательную реакцию с метилротом и положительную реакцию Фогес-Проскауэра, ферментиро-

вали с образованием кислоты и газа глюкозу, маннит, мальтозу, рамнозу, ксилозу, сорбит, арабинозу, раффинозу, лактозу, сахарозу.

По морфологии штаммы бактерий рода *Citrobacter* ничем не отличались от других представителей семейства. Они были представлены мелкими граммотрицательными палочками размером 1,0-3,0 мкм, спор и капсул не образовывали, в мазках располагались одиночно или попарно. Почти все изоляты были подвижны.

Представители этого рода хорошо росли на обычных питательных средах. В отличие от эшерихий рост цитробактерий на средах, содержащих желчные соли, желчные кислоты и бриллиантовый зеленый, не подавлялся. Температурные границы роста были в пределах 12-43°C, оптимальное pH -7,2.

На среде Эндо лактозоположительные варианты цитробактера образовывали колонии, окрашенные в розовый или красный цвет, но лишенные типичного для кишечной палочки металлического блеска; у лактозоотрицательных вариантов колонии были бесцветными или сероватыми с розовым оттенком, более темным в центре.

На среде Плоскирева лактозоотрицательные штаммы *Citrobacter* образовывали слегка выпуклые колонии, окрашенные в тон среды (бледно розоватые); лактозоположительные колонии имели более интенсивную розовую или красную окраску с темным центром.

На висмут-сульфит агаре через 48 часов инкубации цитробактерии давали обильный рост, образуя светло-зеленые, коричневые или черные колонии без окрашивания участка среды под колонией.

Все штаммы ферментировали маннит, рамнозу, сорбит, арабинозу, ксилозу, мальтозу, не ферментировали инозит, не образовывали ферменты лизиндекарбоксилазу, фенилаланиндезаминазу и желатиназу. Мочевину расщепляли слабо и медленно или вообще не изменяли; давали положительную реакцию с метиловым красным и отрицательную – Фогес-Проскауэра. Большинство штаммов не образовывали сероводород и образовывали индол. В отношении сахарозы, салицина, дульцита и адонита штаммы были переменными.

22 штамма бактерий *Ps. aeruginosa* представляли собой мелкие палочки граммотрицательные палочки размером 1,0-1,5 × 0,5 мкм, располагались одиночные и попарно, хорошо росли на простых питательных средах в аэробных условиях при температуре 30-37°C с образованием слизи, встречались подвижные и неподвижные варианты.

У выделенных штаммов была сильно выражена протеолитическая активность. Они разжижали желатин, свертывали сыворотку кро-

ви, гидролизывали казеин, утилизировали гемоглобин, синтезировали гиалуронидазу, восстанавливали нитраты.

Из сахаров псевдоманады окисляли только глюкозу с образованием кислоты. Культуры образовывали сине-зеленый флуоресцирующий пигмент.

Заключение. В результате проведенных исследований раневого экссудата собак с гнойными осложнениями переломов костей конечностей у животных было выделено и идентифицировано 64 граммотрицательных штамма микроорганизмов из них 42 штамма были отнесены нами к семейству *Enterobacteriaceae*, 6 штаммов принадлежало к виду *Enterobacter cloacae*, 8 – к виду *Citrobacter fruedii*, 8 - *Proteus vulgaris*, 19 - *Escherichia coli*, 2 - к *Klebsiella pneumoniae*.

22 штамма принадлежали виду *Pseudomonas aeruginosa* рода *Pseudomonas* семейства *Pseudomonadaceae*.

Все выделенные культуры обладали типичными для своего вида морфологическими, культуральными и биохимическими свойствами.

Библиографический список

1. Makino, Souichi. Serotypes of producing *Escherichia coli* strains that cause extraintestinal infections in humans / Makino Souichi, Asakura Hiroshi, Shirahata Toshikazu [and etc.] // *Kansenshogaku zasshi. J. Jap. Assoc. Infec. Diseases*, 1997, V.71, № 11, P. 1131-1136.
2. Золотухин С.Н. Малоизученные энтеробактерии и их роль в патологии животных. Ульяновск, 2004, 133 с.
3. Золотухин, С.Н. Смешанная кишечная инфекция телят и поросят, вызываемая патогенными энтеробактериями / С.Н. Золотухин, Л.С. Каврук, Д.А. Васильев // Учебное пособие. – Ульяновск. – 2005. - С. 5-8.
4. Мелехин, А.С. Этиология смешанной кишечной инфекции поросят-сосунов / А.С. Мелехин, Д.С. Золотухин, С.Н. Золотухин // *Вестник ветеринарии. – Ставрополь. – 2011. – Т. 59. – № 4. – С. 75-77.*
5. Золотухин, С.Н. Применение биокомпозитного материала «ЛитАр» в сочетании с бактериофагами при лечении переломов конечностей у животных / С.Н. Золотухин, В.Ю. Пичугин [и др.] // *Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии – 2011. - №3. - С.45-49.*
6. Терентьева, Н.Ю. Роль микроорганизмов в этиологии акушерских заболеваний коров / Н.Ю. Терентьева, В.А. Ермолаев // *Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. 2015. № 4 (32). С. 147-155.*
7. Kartsev, N.N. Molecular characterization of enterotoxin-producing *Escherichia coli* collected in 2011-2012, Russia / Kartsev N.N., Fursova N.K., Bannov V.A. [and etc.] // *PLoS ONE. 2015. Т. 10. № 4. С. e0124410.*

8. Онищенко, Г.Г. Молекулярно-генетическая характеристика шига-токсинпродуцирующих *Escherichia coli*, выделенных при вспышке пищевой инфекции в Санкт-Петербурге в 2013 году // Г.Г. Онищенко, И.А. Дятлов, Э.А. Светоч [и др.] Вестник Российской академии медицинских наук. 2015. Т. 70. № 1. С. 70-81.
9. Служкин, П.В. Разнообразие клинических уропатогенных штаммов *Escherichia coli* по генотипам вирулентности П.В. Служкин, Е.И. Асташкин, З.М. Ермоленко [и др.] // В сборнике: Молекулярная диагностика 2017 сборник трудов IX Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. 2017. С. 345-347.
10. Яковлев С.В. Устойчивость *Pseudomonas aeruginosa* к карбапенемам: уроки исследования MYSTIC // Биомедицинская химия. - 2007. Т.53, No 6. - с.98-115.
11. Каврук, Л.С. Влияние экологических факторов на биологические свойства моргенелл / Л.С. Каврук, С.Н. Золотухин // В сборнике: Вопросы микробиологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы. Сборник научных работ. Ульяновск, 1998. С. 51-55.
12. Васильев, Д.А. Методы общей бактериологии: Учебно-методическое пособие / Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин, Н.М. Никишина. – Ульяновск. – 1998. – 150 с.
13. Методические указания по бактериологической диагностике смешанной кишечной инфекции животных, утвержденные Департаментом ветеринарии Министерства сельского хозяйства и Продовольствия РФ. – М., 1999. –19с.
14. Золотухин, С.Н. Методы лабораторной диагностики патогенных энтеробактерий / С.Н. Золотухин, А.Ю. Кузнецов, О.В. Данилов [и др.] // В сборнике: Вопросы микробиологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы. Сборник научных работ. Ульяновск, 1998. С. 87-93.
15. Bohme A. Die An-wendung der Ehrlichschen Indolreaktionen fur bacteriologische Zwecke, Zbl. Bakte, Abt. 1, Bd 40, S. 129, 1905 — 1906.

STUDY OF THE BIOLOGICAL PROPERTIES OF THE CONDITIONAL-PATHOGENIC GRAM-NEGATIVE MICROORGANISMS DIVIDED FROM THE WOUNDS OF DOGS

Zolotukhin S.N., Pichugin Yu.V., Melekhin A.S., Zolotukhin D.S.

Key words: *Enterobacteria; pseudomanes, tinctorial, morphological, cultural, enzymatic, properties.*

From the wound exudate of dogs with purulent complications of limb fractures, 64 gram-negative strains of microorganisms were isolated. 42 of them were assigned to the Enterobacteriaceae family, 6 strains – to the species Enterobacter cloacae, 8 – to the species Citrobacter freundii, 8 – to Proteus vulgaris, 19 – Escherichia coli, 2 – pneumonia Klebsiella. 22 strains belong to the Pseudomonas aeruginosa of the genus Pseudomonas of the Pseudomonadaceae family. All the isolated cultures had morphological, cultural and biochemical properties typical for their species.