

**ВЫДЕЛЕНИЕ ШТАММОВ *Hafnia alvei* ИЗ ОБЪЕКТОВ
ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ И ИЗУЧЕНИЕ ИХ БИОЛОГИЧЕСКИХ
СВОЙСТВ**

Калдыркаев А.И., кандидат биологических наук, доцент,
тел. 8(8422)55-95-47 e-mail: usxa@yandex.ru

Шестаков А.Г., кандидат биологических наук, доцент,
тел. 8(8422)55-95-47 e-mail: andrewschestakov@yandex.ru

Молофеева Н.И., кандидат биологических наук, доцент,
тел. 8(8422)55-95-47 e-mail: nadezhda.molofeeva.67@mail.ru

Хлынов Д.Н., кандидат биологических наук, ст.преподаватель,
тел. 8(8422)55-95-47 e-mail: dmitriy_khlynov@mail.ru

ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ

Ключевые слова: выделение штаммов *Hafnia alvei*, биологические, культуральные и биохимические свойства.

*Статья посвящена исследованиям по выделению штаммов *Hafnia alvei* из объектов внешней среды и изучению их биологических свойств. Описана схема по ее выделению.*

Введение. В доступной литературе вопрос о том, когда впервые были выделены микроорганизмы, в настоящее время относимые к роду *Hafnia*, до настоящего времени остаётся предметом дискуссии. В 1919 году L. Vahr выделил и описал бактерию, патогенную для пчёл, но непатогенную в отношении мышей и морских свинок, и назвал её «*Bacillus paratyphi-alvei*», отнеся её к возбудителю инфекционного поноса или паратифа пчёл [1,12,13]. Впоследствии один из штаммов, по-видимому, идентичный «*Bacillus paratyphi-alvei*» Бара, был охарактеризован как принадлежащий к новой группе кишечных бактерий, описанных Moeller в 1954 и названных *Hafnia group* [2,12,13]. Впоследствии некоторые исследователи поднимали вопрос о легитимности подобного отнесения в связи с тем, что штаммы Бара отличались по некоторым биохимическим характеристикам от штаммов Moeller. Однако сам Moeller заключил, что штамм Бара можно отнести к типовым видам рода *Hafnia*. На VII Международном конгрессе микробиологов (1956) подкомитет

по номенклатуре и классификации бактерий кишечной группы отнёс этот микроорганизм к семейству *Enterobacteriaceae*, роду *Hafnia*, виду *Hafnia alvei* [3,14].

Распространение Hafnia alvei. Большое число типовых микробиологических исследований показывает, что в качестве источника заражения гафниями могут выступать млекопитающие, птицы, рептилии, рыба, почва, вода, сточные воды и пищевые продукты [4, 15]. Тем не менее, в доступной литературе опубликовано очень мало систематических обзоров, посвящённых распространению гафний в окружающей среде.

Гафния хорошо сохраняется в водной среде [3,13]; так, по данным Z. Filipkowska (2003) *Hafnia alvei* обнаруживалась в сточных водах даже после их обеззараживания [3, 5].

Пищевые продукты животного происхождения очень часто инфицированы гафниями. Источником выделения гафний служат мясо (включая рубленое, вакуумно упакованное и копчёное), птица, рыба, молочные продукты, включая кремы и пастеризованное молоко в упаковке. Содержание гафний в вышеупомянутых продуктах обычно колеблется от $7,5 \times 10^{10}$ до $8,0 \times 10^{10}$ КОЕ/г [2, 8]. При этом стоит отметить, что гафнии способны сохраняться и размножаться в пищевых продуктах при широком диапазоне температур, в том числе в условиях холодильника и в замороженных продуктах. Так, исследование, проведённое в Финляндии, показало, что почти 50% представителей энтеробактерий, выделенных из замороженного мяса, относились к виду *H. alvei* [1, 2, 6, 12]. В последующем сообщении авторы отмечают, что 34% образцов рубленного мяса, 14% молока и кремовых продуктов и 12% пресноводной рыбы содержали гафнии [2, 14].

Исследования, проведённые в Ирландии D.M. Kagkli et al. (2007) на трёх различных молочных фермах, показали, что гафнии могут сохраняться в сыром молоке [16].

В сырой пресноводной рыбе, хранящейся в холодильнике, гафнии способны размножаться как в монокультуре, так и в ассоциации с другими микроорганизмами. Так, M.N. Gonzalez-Rodriguez et al. (2001) исследовали образцы ломтиков пресноводной форели и оранжево-розового лосося, расфасованные в пластиковые лотки с вакуумной плёнкой и полученные из двух общенациональных сетей супермаркетов Испании. Авторы установили,

что при хранении нераспакованных образцов при температуре +3°C большинство микроорганизмов, давших логарифмический рост, относились к видам *Hafnia alvei*, *Enterobacter cloacae* и *Citrobacter freundii*. При помещении образцов при комнатной температуре в упакованном виде лосось утратил органолептические свойства через 4 дня (хотя размножение гафний в нём происходило медленнее), а форель - через 7 дней [2, 7, 8, 11, 15].

Овощи, по-видимому, редко служат источником гафний. В доступной литературе мы нашли лишь одно сообщение о выделении *H. alvei* из 9 образцов овощей [7, 11].

Тем самым, основным резервуаром гафний и потенциальным источником заражения людей гафниозом являются животные и продукты животного происхождения.

Цель исследования: Выделить штаммы *Hafnia alvei* из объектов внешней среды и изучить их биологические свойства

Задачи исследования: 1. Изучить биологические свойства референс-штаммов; 2. Выделить «полевые» штаммы бактерий *Hafnia alvei* из объектов внешней среды; 3. Изучить биологические свойства «полевых» штаммов бактерий *Hafnia alvei*.

Материалы и методы исследований.

Объекты исследований: 9 штаммов бактерий *Hafnia alvei* (2 штамма референс-штамма *H.alvei* В-8405 и *H.alvei*9760, и 7 полевых штаммов *H.alvei*. Культуры бактерий: *Escherichia*, *Proteus*, *Citrobacter*, *Schigella*, *Serratia*, *Salmonella* из музея кафедры МВЭиВСЭ. Все названные штаммы бактерий обладали типичными для них биологическими свойствами.

Объекты выделения бактерий: поверхностные воды, сточные воды, фекалии животных, пчелы, патологический материал от больных и погибших животных.

Питательные среды и реактивы: мясопептонный бульон, мясопептонный агар, Эндо среда, среда Левина, Висмут-сульфит агар, Мосселя бульон (Россия, г.Оболонск), среда Кода, натрий хлорид, трихлорметан.

Методы: выделение и идентификацию бактерий вида *Hafnia alvei* проводили в соответствии с определителем бактерий Берги 10-е издание, «Методическими указаниями по бактериологической диагностике смешанной кишечной инфекции молодняка животных, вызываемой

патогенными энтеробактериями», утвержденными Департаментом ветеринарии МСХ и П 11 октября 1999 года, а также использовали литературные данные В.И. Покровского, О.К. Поздеева (1985, 2007).

Результаты исследований и их обсуждение.

Первым этапом нашего исследования было изучение биологических свойств референс-штаммов бактерий *Hafnia alvei*. Выделение из объектов штаммов бактерий с идентичными биохимическими свойствами схожими с *Hafnia alvei* (для идентификации брались данные из литературных источников Покровского В.И. 1985, Поздеева О.К. 2007, и Берги 10-е издание).

Первоначально нами были изучены биологические особенности референс – штаммов *Hafnia alvei*: *H.alvei* В-8405 и *H.alvei* 9760. В сравнении с некоторыми родами энтеробактерий: *Escherichia*, *Proteus*, *Citrobacter*, *Shigella*, *Serratia*, *Salmonella*. Для работы использовали штаммы из коллекции кафедры МВЭ и ВСЭ.

Изучение фенотипические свойства гафний показало, что *Hafnia alvei* подвижные (перитрихи) прямые палочки 0,6-1x2-5 мкм с закругленными концами. Подвижность более выражена при 22 °С; также можно обнаружить и неподвижные особи. Бактерии капсул не образуют, в мазках располагаются беспорядочно, хорошо воспринимают анилиновые красители, на рисунке окраска по Граму (рис.1).

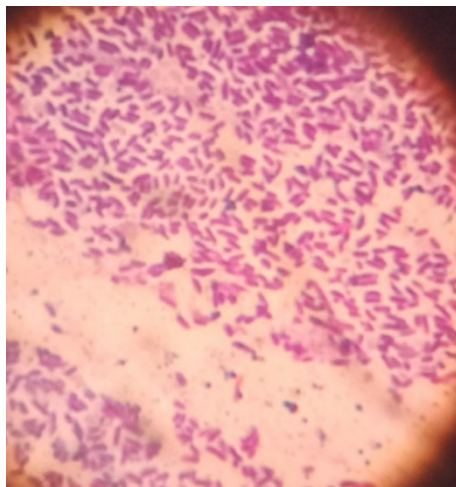


Рис. 1- Окраска по Граму

Для изучения культуральных свойств *Hafnia alvei* использовали как жидкие, так и плотные питательные среды.

Бактерии растут в пределах 12-43 °С; оптимальная температура – 30-37°С; оптимум рН – 7,2-7,4. На твердых средах *Hafnia alvei* растет в виде шероховатых и гладких колоний. На агаре Эндо и Левина единичные колонии почти прозрачные, цвета среды, или розовые d= 2,5-3,5 мм. На Висмут сулит агаре не растут. На ГРМ агаре образуют колонии диаметром 2-4,5 мм; На жидких средах бактерии S-форм растут диффузно, R-формы образуют осадок на дне пробирки, над осадочная жидкость остаётся прозрачной.

Изучение биохимические свойства проводилось с использованием наборов микротестов так и классических методик с использованием сред Гисса. Для определения биохимических особенностей были изучены следующие показатели (тесты): подвижность, выделение сероводорода, сбраживание сахаров рафинозы, лактозы, рамнозы, сорбита, арабинозы, глюкозы и инозит (газ). Выделение индола, разрушение цитрата, ацетата и мочевины, ферментация фенилаланина, фермент лизиндекарбоксилазы, фермент орнитиндекарбоксилазы, реагирует с метилротом при 22°С и 37°С, положительная реакция на фогеса-проскауэра.

Выявлено, что гафнии ферментируют D-глюкозу, D-маннит, L-рамнозу и D-ксилозу с образованием кислоты и газа; сбраживают L-арабинозу, глицерин, мальтозу, D-маннозу и трегалозу; более 50% изолятов разлагают целлобиозу. Они инертны к D-адониту, дульциту, инозиту, лактозе, мелибиозе, раффинозе, сахарозе и D-сорбиту; не образуют индол; не утилизируют цитрат на агаре Симмонса. Большинство штаммов образуют ацетон и дают положительную реакцию с метиловым красным. Бактерии декарбоксилируют лизин и орнитин; не синтезируют аргинин дегидролазу, не образуют H₂S, восстанавливают нитраты, проявляют (3-галактози-дазную активность (в тесте с ОНПГ); не гидролизуют желатин и мочевины (большинство видов). Бактерии растут на средах с KCN, переменны по утилизации салицина, тартрата, эскулина и ацетата. Следует помнить, что биохимические свойства гафний во многом зависят от температуры культивирования.

Первоначально нами были изучены биологические свойства только референс-штаммов *H.alvei* В-8405 и *H.alvei* 9760 (табл. 1).

Таблица 1 - Биохимические свойства *Hafnia alvei*

Свойство	Результат по данным литературных источников	Штаммы <i>Hafnia alvei</i>	
		B-8405	9760
Сероводород	–	–	–
Мочевина	–	–	–
лактоза	–	–	–
Глюкоза (газ)	+	+	+
Инозит (газ)	–	–	–
Арабиноза	+		
Рафиноза	–	–	–
Рамноза	+	+	+
Индол	–	–	–
Утилизация цитрата	–	–	–
Подвижность	+	+	+
Фенилаланиндезаминаза	–	–	–
Утилизация ацетата	±	+	±
Лизиндекарбоксилаза	+	+	+
Орнитиндекарбоксилаза	+	+	+
Метилрот при 37°С	+	+	+
Метилрот при 22°С	–	–	–
Реакция Фогеса-Проскауэра	+	+	+
Сорбит	–	–	–

Анализируя биохимические свойства, к важным тестам были отнесены: лактоза, сорбит, реакция с метиловым красным при 22 и 37°С, реакция Фогеса-Проскауэра. Данные тесты можно использовать для дифференцировки от других энтеробактерий.

Выделение «полевые» штаммов. Изучив биологические свойства *H.alvei* B-8405 и *H.alvei* 9760 (табл. 1) приступили к выделению полевых штаммов *Hafnia alvei* из объектов санитарного надзора. Выделение проводили по следующей схеме (рис.3).

Использование в качестве среды накопления бульона Мосселя позволит искомым бактериям накопиться в искомом объёме если их было изначально мало, в тоже время поможет избежать рост других бактерий не относящихся к энтеробактериям, за счет своих селективных свойств.

Специальных дифференциальных сред для гаффии нет, по биохимическим свойствам дифференцировка достаточно сложна так как

многие биохимические свойства очень вариабельны и схожи с многими видами энтеробактерий.

При изучении ферментативной активности бактерий *Hafnia alvei* обращали внимание изменение ее в зависимости от температуры культивирования. Использование таких тестов как: сахаролитические не возможность ферментацию лактозы и сорбита, реакции с метиловым красным, Фогеса – Проскауэра. Эти биологические особенности подойдут для дифференциальной диагностики *Hafnia* от сходных культур при выделении.

Дифференциацию проводили по Берджи, а также данным дифференциальных таблиц Покровского В.Н. 1985 и Позднева О.К. 2007.



Рис. 3 – Схема выделения полевых штаммов бактерий *Hafnia alvei*

В результате исследований нами отобрано 7 изолятов бактерий *Hafnia alvei* (табл.2).

Таблица 2 - Источники выделения штаммов бактерий вида *Hafnia alvei*

№ п/п	Название образца	Кол-во проб	Кол-во изолированных штаммов рода энтеробактерий	Кол-во подтвержденных штаммов бактерий вида <i>Hafnia alvei</i>
1	Почва	15	10	1
2	Вода рек, сточные воды	16	22	5
3	Навоз и остатки растительного происхождения	5	3	-
5	Молочные изделия	10	2	-
6	Мясные изделия	10	6	1
Итого:		56	42	7

Изучение биологических свойств «полевых» штаммов бактерий *Hafnia alvei*. По результатам выделения полевых штаммов бактерий *Hafnia alvei* отобрали наиболее типичные по биологическим свойствам (табл.3). Биологические свойства изучали описанными выше методами.

Таблица 3 - Биохимические свойства референс и полевых штаммов *Hafnia alvei*

Свойства	Результат по данным литер источников	Штаммы <i>Hafnia alvei</i>								
		В-8405	9760	№1	№2	№3	№4.	№5	№6	№7
Сероводород	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Мочевина	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
лактоза	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Глюкоза (газ)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Инозит (газ)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Арабиноза	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Рафиноза	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Рамноза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Индол	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Утилизация цитрата	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Подвижность	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Фенилаланиндеаминаза	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Утилизация ацетата	±	+	±	+	+	+	+	+	±	+
Лизиндекарбоксилаза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Орнитиндекарбоксилаза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Метилрот при 37°С	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Метилрот при 22°С	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Реакция Фогеса-Проскауэра	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Сорбит	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Заключение.

В результате выделения штаммов *Hafnia alvei* из объектов внешней среды и изучения их биологических свойств установлена биохимическая идентичность, что позволяет использовать примененную схему выделения указанных бактерий для дальнейшего изучения распространения штаммов *Hafnia alvei*.

Библиографический список

1. Габидулин, З.Г. Некоторые биологические свойства бактерий рода *Hafnia alvei*, выделенных при инфекционных процессах различной локализации / З.Г. Габидулин, Г.А. Идиатуллина, Ю.З. Габидулин, Р.С. Суфияров // Проблемы медицинской микологии. – 2014 - Т.16- № 2 - С.55.
2. Евина Д.А. Результаты изучения некоторых биологических свойств бактерии рода *Hafnia alvei* / Евина Д.А. // В сборнике: Актуальные проблемы инфекционной патологии и биотехнологии. Материалы XI-й Международной студенческой конференции. 2018. С. 13-15.
3. Золотухин Д.С. Выделение, селекция и изучение биологических свойств бактериофагов *Hafnia alvei* / Золотухин Д.С., Васильев Д.А., Золотухин С.Н., Семенов А.М., Романова Е.М. // Вестник ветеринарии. 2013. № 1 (64). С. 68-70.
4. Золотухин С. Идентификация возбудителя гафниоза методом *malDI* / Золотухин С., Васильев Д., Золотухин Д. // Ветеринария сельскохозяйственных животных. 2017. № 10. С. 62-66
5. Калдыркаев А.И. Изучение некоторых биологических свойств бактериофагов вида *Bacillus cereus* / А.И. Калдыркаев, Н.А. Феоктистова, Г.Ф. Архипова // Материалы конференции молодых ученых/ ГНУ ВНИИВВиМ РОССЕЛЬХОЗАКАДЕМИИ – Покров, 2009.- 157-159 с.
6. Калдыркаев А.И. Изучение чувствительности бактерий рода *Bacillus* к различным концентрациям хлорида натрия / А.И. Калдыркаев, В.А. Макеев, М.А. Юдина, А.Х. Мустафин, Н.А. Феоктистова, С.В. Мерчина // Материалы Международной научно-практической конференции «Ветеринарная медицина XXI века: инновации, опыт, проблемы и пути их решения». - Ульяновск: УГСХА, 2011. – С.185-188.
7. Клинико-микробиологические особенности острой кишечной микстинфекции, вызванной бактериями *Hafnia alvei* и ротавирусом / Н.М. Грачёва, Н.И. Леонтьева, В.М. Бондаренко и др. // Журн. микробиол. - 2003. - №2. - С. 62-65
8. Литвин В.Ю., Емельяненко Е.Н., Пушкарёва В.И. Патогенные бактерии, общие для человека и растений: проблема и факты // Микробиология. - 1996. № 2. - С. 101-104
9. Общая и санитарная микробиология с техникой микробиологических исследований: учебное пособие / А.С. Лабинская, Л. П. Блинова, А.С. Ещина [и др.]; под редакцией А. С. Лабинской [и др.]. - 4-е изд., стер. - Санкт-Петербург : Лань, 2020. - 588 с.

Грачёва, Н.И. Леонтьева, В.М. Бондаренко и др. // Журн. микробиол. - 2003. - №2. - С. 62-65

8. Литвин В.Ю., Емельяненко Е.Н., Пушкарёва В.И. Патогенные бактерии, общие для человека и растений: проблема и факты // Микробиология. - 1996. № 2. - С. 101-104

9. Общая и санитарная микробиология с техникой микробиологических исследований: учебное пособие / А.С. Лабинская, Л. П. Блинкова, А.С. Ещина [и др.]; под редакцией А. С. Лабинской [и др.]. - 4-е изд., стер. - Санкт-Петербург : Лань, 2020. - 588 с.

10. Определитель бактерий Берджи (2015) [Электронный ресурс] / Под ред. Мартина-Карнахана А. и Жесеф С.В. – Режим доступа: <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm01081>, свободный. – Загл. с экрана.

11. Покровский В.И., Малеев В.В. Актуальные проблемы инфекционной патологии // Эпидемиология и инфекционные болезни. - 1999. - №2. - С. 17 – 20.

12. Энтеробактерии : Руководство для врачей / [И. В. Голубева и др.]; Под ред. В. И. Покровского. - Москва : Медицина, 1985. - 320 с.

13. Энтеробактерии. Автор: Поздеев О. К., Федоров Р. В. Издание: ГЭОТАР-Медиа, 2007. - 720 с.

14. Феоктистова Н.А. Распространение *Bacillus cereus* и *Bacillus mycoides* в объектах санитарного надзора / Н.А. Феоктистова, А.И. Калдыркаев, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2014. – № 1 (25). – С. 68-76.

15. Феоктистова Н.А. Схема идентификации *Bacillus cereus* и *Bacillus mycoides* в объектах санитарного надзора / Феоктистова Н.А., Васильев Д.А., Золотухин С.Н., Макеев В.А., Калдыркаев А.И., Маслюкова К.В., Алешкин А.В., Шморгун Б.И. // В книге: Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности. Материалы Третьей научно-практической конференции с международным участием. 2016. С. 88.

16. Kagli D.M. Contamination of milk by enterococci and coliforms from bovine faeces / D.M. Kagli, M. Vancanneyt, P. Vandamme, C. Hill, T.M.Cogan // J. Appl. Microbiol. - 2007. - V. 103, №5. - P. 1393-1405

ISOLATION OF HAFNIA ALVEI STRAINS FROM ENVIRONMENTAL OBJECTS AND STUDY OF THEIR BIOLOGICAL PROPERTIES

Kaldyrkaev A.I., Shestakov A.G., Molofeeva N.I., Merchina S.V., Khlynov D.N.

Keywords: *isolation of Hafnia alvei strains, biological, cultural and biochemical properties.*

The article is devoted to research on the isolation of Hafnia alvei strains from environmental objects and the study of their biological properties. The scheme for its allocation is described.