

МЕТОДЫ ИНДИКАЦИИ И ИДЕНТИФИКАЦИИ БАКТЕРИЙ ВИДА *SERRATIA MARCESCENS* В ПЕСКЕ ДЕТСКИХ ПЛОЩАДОК

Е.О.Ефрейторова, аспирант,
Л.П.Пульчеровская, кандидат биологических наук, доцент,
тел. 9278339976, pulcherovskaja.lidia@yandex.ru
Д.А.Васильев, доктор биологических наук, профессор,
С.Н.Золотухин, доктор биологических наук, профессор,
Н.И.Молофеева, кандидат биологических наук, доцент,
ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина»

Ключевые слова: песок песочниц, бактерии вида *Serratia marcescens*, бактериофаги, питательные среды, биологические свойства.

В статье описаны результаты исследований по обнаружению бактерий вида *Serratia marcescens* и их бактериофагов в песке песочниц.

Бактерии рода широко распространены в природе: их обнаруживают в почве, воде, пищевых продуктах, а в последние десятилетия они часто стали выделяться от здоровых и больных людей, животных [7].

В связи с ухудшением экологической ситуации и нерациональным применением антибактериальных препаратов в практике, в последнее время наблюдается тенденция увеличения частоты выделения условно-патогенных грамотрицательных бактерий, в частности бактерий рода *Serratia*, при инфекциях различной локализации [7,9,10].

Представители вышеуказанных микроорганизмов в ходе эволюции приобрели способность при попадании в организм человека не только выживать, но и наносить ему вред [8,11].

Способность бактерий рода *Serratia* размножаться в макроорганизме и вызывать инфекционный процесс зависит от наличия у бактерий ряда факторов, определяющих их адгезивную, колонизирующую, цитотоксическую и энтеротоксическую активности возбудителя. В связи с этим изучение этих факторов может позволить разработать критерии этиологической значимости, основанные на изучении указанных биологических характеристик возбудителей и улучшить диагностику инфекций, вызванных бактериями рода *Serratia* [7,9,11]. К сожалению, недостаточно изучена роль отдельных поверхностных структурных элементов бактериальной клетки *Serratia* и факторов, обуславливающих патогенность клинических изолятов, в частности их адгезивная, энтеротоксигенная, гемолитическая, ДНК-азная, лецитин

Согласно научным данным бактерии рода *Serratia* часто являются причиной гнойно-воспалительных, урологических, гинекологических и кишеч-

ных заболеваний [2,5]. Также инфекционные процессы, вызванные этими бактериями, нередко развиваются у детей раннего возраста, онкологических больных, и являются причиной внутрибольничных инфекций [10].

В связи с этими обстоятельствами мы решили провести исследования детских площадок, а точнее песка детских песочниц с целью выделения бактерий вида *Serratia marcescens* и их бактериофагов.

Материалом послужил песок детских песочниц, расположенных около жилых домов и детского сада. Всего было отобрано 8 проб. Присутствие бактериофагов также свидетельствует о недавнем присутствии названных бактерий в исследуемых объектах.

Выделение бактерий проводили бактериологическим методом.

В первой серии опытов при индикации бактерий вида *Serratia marcescens* использовали общепотребительские среды, индикаторные и селективные среды для энтеробактерий [5,6]. Посев проводили на среды КОДА, МПА, Эндо, Плоскирева и Левина. Посевы инкубировали при температуре 30 °С и pH - 7,2.

Через 18-20 ч инкубации учитывали изменения в комбинированной среде, изучали морфологию микроорганизмов, тинкториальные свойства, чистоту культуры и образование пигмента, который появлялся на свету через сутки или практически с ростом культуры. Изучали культуральные свойства бактерий на жидких и плотных средах и отсеивали подозрительные колонии на МПБ с целью получения чистых культур микроорганизмов.

На МПА искомые бактерии образовывали крупные ровные плоско-выпуклые гладкие S-колонии диаметром 1-2 мм (рис.1а); на селективных средах Эндо, Левина и Плоскирева – прозрачные бесцвет-

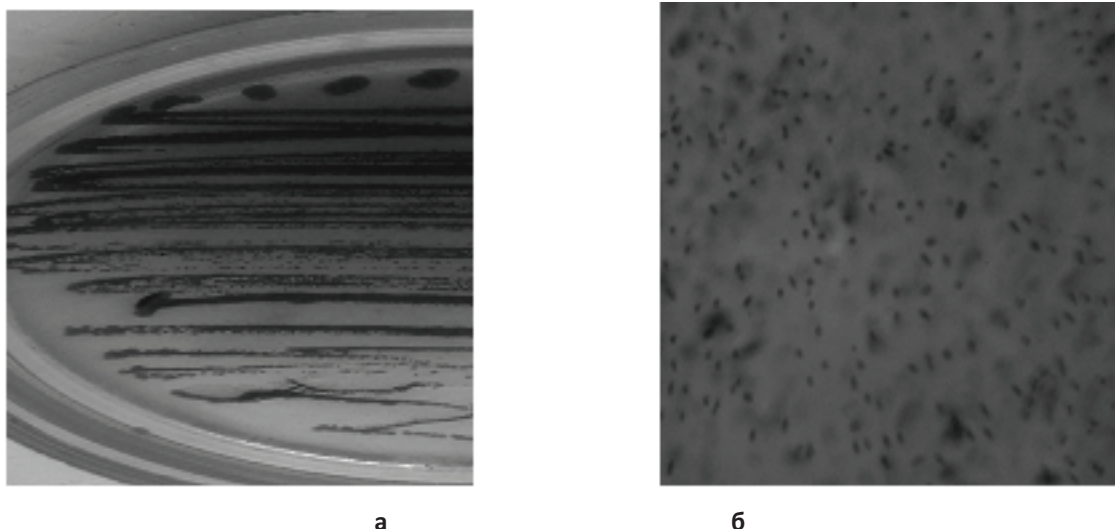


Рисунок 1 - Морфология выделенных микроорганизмов.
а- рост бактерий вида *Serratia marcescens* на МПА; б- морфология выросших микроорганизмов

Таблица 1- Биологические свойства выделенного штамма бактерий вида *Serratia marcescens*

№ п/п	Тест	Выделенные культуры		
		1	2	3
1.	Ацетоин	+	+	+
2.	Мочевина	-	-	-
3.	Желатина	+	+	+
4.	Малонат	-	-	-
5.	Образование к-ты из α-метил -D-глюкозида	-	-	-
6.	Дезоксирибонуклеаза	+	+	+
7.	Липаза (кукурузное масло)	(+)	(+)	(+)
8.	D-глюкоза, образование к-ты в при- сутствии иодацетата, 0,001 М	+	+	+
9.	реакция Форгеса-Проснауэра	+	+	+
	Образование к-ты из			
10.	сахарозы	+	+	+
11.	d-сорбитола	+	+	+
12.	рафинозы	-	-	-
13.	L-арабинозы	-	-	-
14.	Каталаза	+	+	+
15.	Пигмент	+	+	+
16.	Подвижность	+	+	+

ные и цвета среды колонии диаметром 2 мм, напоминающие колонии сальмонелл. При комнатной температуре через 18-24-48 ч колонии серратий становились красными.

По морфологическим свойствам отбирали микроорганизмы палочковидные, располагающиеся беспорядочно и окрашенные – грамтрицательно (рис.1б).



а



б

Рисунок 2 - Морфология негативных колоний

а- 1-й тип – полупрозрачные негативные колонии до 2-3 мм с неровным краем(фаг 1), б- 2-й тип – мелкие прозрачные негативные колонии до 1 мм в диаметре (фаг 2)

Выделенные культуры серратий издавала ароматный запах, напоминающий запах карамели. [3,4,7] Идентификацию искомым микроорганизмов проводили на основании изучения биологических свойств, для этого пересекали выделенные культуры на минимальный дифференцирующий ряд. Подвижность определяли методами «укола в полужидкий агар» и «раздавленная каля». Все исследуемые штаммы бактерий были подвижны. Результаты проведенных исследований представлены в таблице 1.

Во второй серии опытов проводили выделение бактериофагов из тех же объектов.

Исследуемые пробы песка вносили в стерильные колбы, заливали МПБ из расчета 10 мл бульона на 1 г песка. В опытные колбы вносили индикаторные культуры бактерий вида *Serratia marcescens*. Выдерживали в термостате в течение 7 дней.

Исследование проводили методом агаровых слоев. Использовали МПА, содержащий 1,5%-0,7% агара. Допустимо вместо 1,5% МПА использовать агар на рыбном гидролизате. 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 (0,1 мл на каждые 100 мл МПА). Чашки подсушивали в боксе или термостате в течение 3 часов [1,2,3].

Индикаторные культуры бактерий вида *Serratia marcescens* выращивали на скошенном МПА

в течение 16 часов и смывали физиологическим раствором (в количестве 10 мл).

Фаги выделяли из исследуемых проб методом агаровых слоев с предварительным прогреванием и центрифугированием исследуемого материала (по Грациа, 1936). При проведении нескольких анализов ставили один контроль. Через 20-30 минут после застывания верхнего слоя агара чашки помещали в термостат на 18-24 часа.

В результате проведенных исследований нами всего было выделено 2 термостабильные рассы фагов, обладающих способностью на индикаторных культурах серратий образовывать негативные колонии 2-х типов: 1-й тип – мелкие прозрачные негативные колонии до 1 мм в диаметре; 2-й тип – полупрозрачные негативные колонии до 2-3 мм с неровным краем(фаг 1);

Заключение. В результате проведенных исследований из песка песочниц было выделено 3 штамма бактерий *Serratia marcescens* и 2 бактериофага искомым микроорганизмов.

Выделенные культуры *S. marcescens* были грамположительны, подвижны, имели положительную реакцию Фогеса-Проскауэра, разжижали желатин; ферментировали D-глюкозу, мальтозу, D-маннит, сахарозу с образованием кислоты и газа; и были инертны в отношении дульцита и маннита, не образовывали индола, утилизировали цитрат Симмонса. Выделенные штаммы обладали патогенными свойствами, а следовательно, имеют клиническое значение.

Библиографический список:

1. Ефрейторова, Е.О. Изучение биологических свойств бактерий *serratia marcescens* выделенных из пищевых продуктов и объектов окружающей среды / Е.О. Ефрейторова, Л.П.Пульчеровская, Д.А.Васильев. 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.

2. Молофеева, Н.И.К вопросу о роли бактерий рода *Serratia* в патогенезе желудочно-кишечных заболеваний сельскохозяйственных животных/ Н.И.Молофеева, Д.А. Васильев, 1998.
3. Горшкова, Д. Биологические свойства бактерий рода *Serratia*/ Д.Горшкова, Е.О. Бахаровская Материалы IV-й Всероссийской студенческой научной конференции «Актуальные проблемы инфекционной патологии и биотехнологии». Часть вторая. Ульяновск. С.67-70.
4. Ефрейторова, Е.О. Изучение биологических свойств бактерий *serratia marcescens* выделенных из пищевых продуктов и объектов окружающей среды / Е.О., Ефрейторова, Л.П.Пульчеровская, Д.А. Васильев Научный вестник Выпуск №13. г. Дмитровград. Технологический институт филиал ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А.Столыпина» 2014г.С. 175-180.
5. Кузнецова, О.В. Изучение биологических свойств бактерий вида *Serratia marcescens*/ О.В.Кузнецова, Л.П.Пульчеровская, Д.А.Васильев, Е.О.Бахаровская Материалы международной научно-практической конференции. «Ветеринарная медицина XXI века: инновации, опыт, проблемы и пути их решения» Том 1, Ульяновск 2011. - с.154-155.
6. Феоктистова, Н.А. Диагностика картофельной болезни хлеба, вызываемой бактериями видов *Bacillus subtilis* и *Bacillus mesentericus*/ Н.А.Феоктистова, Е.О.Бахаровская, Д.А.Васильев[др.]// Вестник Ульяновской ГСХА.- 2011. - №3(15).- с.61-68.
7. Золотухин, С.Н. Малоизученные энтеробактерии и их роль в патологии животных./ С.Н.Золотухин, , Ульяновск.- 2004.-146с.
8. Абрикосова, Н.Ю. Сравнительное изучение биологических свойств *Serratia marcescens* и *Klebsiella pneumoniae*, выделенных при менингите и сепсисе новорожденных / Н.Ю. Абрикосова // Новосибирск. М.1990. Т.2.С.104-106.
9. Аталикова, Ж.Б. Бактериоцины в типировании серраций: автореф. дис. . канд. мед. наук / Ж.Б. Аталикова. Кабардина- Балкарская республика г. Нальчик, 2000.
10. Белокрысенко, С.С. Микробная экология и ретроспективная оценка возможности прогноза вспышки гнойных менингитов, вызванной штаммом *Serratia marcescens*, в стационаре для выхаживания недоношенных детей / С.С. Белокрысенко, Н.В. Шестопалов, В.П. Гераськина,
11. Karch // Int. J. Med. Microbiol.- 2000, 290.- P. 153-165 Barbers L.J. Molecular weight determination and partial characterization of *Klebsiella pneumoniae* haemolysins / L.J. Barbers, A.J. Eraso, M.C. Pajaro and J. Albesa // Can. J. Microbiol.- 1986.-v.32.-p.884-885.

METHODS OF INDICATION AND IDENTIFICATION OF BACTERIA OF THE SPECIES *SERRATIA MARCESCENS* IN THE SAND PLAYGROUNDS

E. O. Amatarou, L. P. Ulcerosa, D. A. Vasilyev, S. N. Zolotukhin, N. And. Malofeeva

Key words. sand sandboxes, bacteria of the species *Serratia marcescens*, bacteriophages, nutrient, and biological properties.

The article describes the results of studies on the detection of bacteria of the species *Serratia marcescens* and their bacteriophages in the sand sandboxes.