

## ВЫДЕЛЕНИЕ БАКТЕРИЙ РОДА *CITROBACTER*

**Пулчеровская Лидия Петровна**, кандидат биологических наук, доцент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

**Васильев Дмитрий Аркадьевич**, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

**Золотухин Сергей Николаевич**, доктор биологических наук, профессор кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ

432017, г. Ульяновск, бульвар Новый Венец, 1; тел.: 8(8422)55-95-47;

e-mail: pulcherovskaya.lidia@yandex.ru

**Ключевые слова:** *Citrobacter*, биологические свойства, культуры микроорганизмов, патологический материал, дифференциация.

В статье представлены результаты исследований по индикации и идентификации бактерий рода *Citrobacter* из патологического материала, полученного от павших и больных животных и пищевого сырья. Бактериологическая индикация микроорганизмов, применяемая нами, опиралась на почти двадцатилетний опыт работы с бактериями рода *Citrobacter* и проводилась по общепринятым методикам и ключевым биологическим тестам. Для выделения бактерий рода *Citrobacter* в чистую культуру соблюдали ряд условий: максимально ранний посев взятого материала; подбор соответствующих питательных сред для первичного посева; техника выполнения посева обеспечивала рост изолированных колоний; для культивирования посевов использовали оптимальный по температурным условиям и сроку инкубации режим. У выделенных микроорганизмов были изучены основные биологические свойства с целью идентификации названных микроорганизмов, а также для возможного применения выделенных штаммов в качестве индикаторных бактериальных культур при выделении фагов бактерий рода *Citrobacter* из объектов окружающей среды и изучении биологических свойств цитробактерных бактериофагов. Было установлено, что бактериальные культуры, выделенные нами, утилизируют цитрат, декарбоксилировали орнитин, не проявляли лизин декарбоксилазную и аргинин дегидролазную активность, не гидролизуют желатин. Названные микроорганизмы ферментировали D-глюкозу с образованием кислоты и газа, расщепляли L-арабинозу, глицин, D-ксилозу, мальтозу, D-маннит, L-рамнозу, лактозу, D-сорбит, сахарозу, дульцит, образовывали индол и сероводород, не дезаминировали фенилаланин. Проведенные исследования, а именно: совокупность морфологических, тинкториальных, культуральных и биохимических свойств – позволили дифференцировать выделенные нами три культуры как *Citrobacter freundii*.

### Введение

Согласно литературным данным бактерии рода *Citrobacter* широко распространены в окружающей среде, так как их обнаруживают в разнообразных пищевых продуктах, почве, воде и стоках. Их выделяют из кишечника и мочевыводящих путей человека, крупного рогатого скота, лошадей, собак, птиц, грызунов, рептилий и насекомых [1]. В настоящее время цитробактеры все большее значение приобретают как патогены различных морских и тропических аквариумных рыб [2, 3, 4].

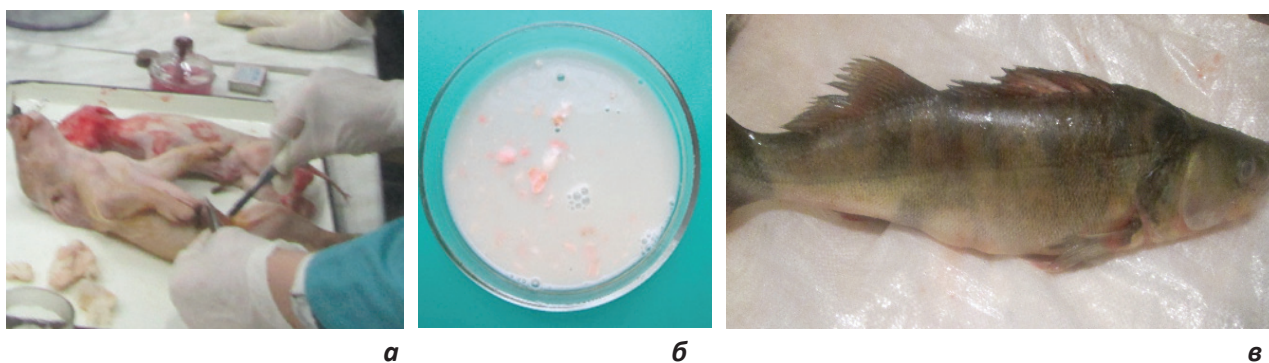
Достаточно часто бактерии рода *Citrobacter* выделяют с различных устройств медицинского назначения и предметов обихода в лечебно-профилактических учреждениях, это обстоятельство обуславливает возникновение госпитальных инфекций у человека с признаками оппортунистических бактериемий, пневмоний, раневых инфекций и поражений мочевыводящих путей [1-5]. Чаще цитробактеры обнаруживают у человека при гастроэнтероколитах, пищевых отравлениях, инфекциях моче- и желчевыводящих путей, отитах, бактериемиях, эндокардитах, менингитах, гнойных осложнениях хирургических ран, остеомиелитах, абсцессах раз-

личных органов [1-6].

Известно, что чаще поражения развиваются после горизонтальной передачи возбудителя фекально-оральным или контактно-бытовым путем. Также имеются данные о случаях вертикальной передачи бактерий от матери плоду [1, 5-7].

Бактерии рода *Citrobacter* также самостоятельно или в ассоциации с другими микроорганизмами могут вызывать заболевания у домашних и диких животных [2, 3, 6-8] и обладают высокой степенью устойчивости к антибиотикам [9, 10].

Согласно литературным данным микроорганизмы, выделенные от больных и здоровых лиц, не отличаются друг от друга по степени гемолитической и антилизоцимной активности. Нет различий в адгезивности и инвазивных свойствах, а также в особенностях метаболизма при росте на средах с различными источниками азотного и углеродного питания. Поэтому выявление условно патогенных бактерий рода *Citrobacter* свидетельствует о неблагополучии исследуемого объекта и весьма интересно с точки зрения выявления штаммов названных бактерий с целью поиска специфических вирулентных бактериофагов, которые могут быть использо-



**Рис. 1 - Исследуемые пробы:**

*а - патологический материал от свиней (мёртвоорожденные поросята и погибшие в первые часы жизни); б - маститное молоко от коров с молочного комплекса «Красный восток» Ульяновской области; в - речная рыба с признаками бактериальных заболеваний.*

ваны при конструировании фагового биопрепарата для диагностики, профилактики и лечения заболеваний, причиной которых могут являться бактерии рода *Citrobacter* как в смешанной, так и в монокультурах [2-12].

Цель работы: выделение бактерий рода *Citrobacter* из патологического материала и пищевого сырья и изучение их основных биологических свойств для возможного применения полученных штаммов в качестве индикаторных бактериальных культур при выделении и изучении биологических свойств цитробактерных бактериофагов.

#### **Задачи исследования:**

1. выделить бактерии рода *Citrobacter* из патологического материала и пищевого сырья;
2. изучить тикториальные, культуральные и биохимические свойства выделенных бактерий рода *Citrobacter*;
3. составить оптимальную схему выделения и бактериологической идентификации бактерии рода *Citrobacter*.

#### **Объекты и методы исследований**

Патологический материал: трупы новорожденных и погибших в первые часы жизни, а также мёртвоорожденные поросята (от свиней свиного комплекса «Волжский» Ульяновской области); молоко, взятое от больных маститом коров, принадлежащих молочному комплексу ООО «Мегаферма Октябрьский», и речная рыба с признаками бактериальных заболеваний (Рис.1).

При проведении исследований руководствовались МУ 04-723/3 («Методические указания по микробиологической диагностике заболеваний, вызываемых энтеробактериями» и «Методические указания по бактериологической диагностике смешанной кишечной инфекции молодняка животных, вызываемой патогенными энтеробактериями»), утверждёнными Департаментом ветеринарии МСХиП 11 октября 1999 года.

Для бактериологического исследования использовали питательные среды: мясопептонный

бульон (НПО «Питательные среды», г. Махачкала); мясопептонный агар (НПО «Питательные среды», г. Махачкала), 0,3%-й, 0,7%-й, 1,5%-й; среда Эндо (ГНЦ прикладной микробиологии, г. Оболенск); висмут-сульфит агар («Биотехновация», г. Москва); среда Кесслера (I), среда Симонса (НИИ питательных сред, г. Махачкала); среда Клигlera (НИИ питательных сред, г. Махачкала); среды Гисса с индикатором VP (НПО «Питательные среды» г. Махачкала); физиологический раствор, pH 7,2-7,6.

Выделение и идентификацию бактерий рода *Citrobacter* применяли, опираясь на почти двадцатилетний опыт работы и общепринятые бактериологические тесты [13].

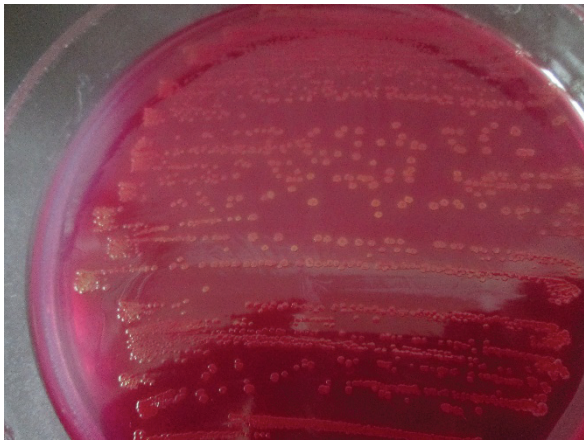
Для выделения бактерий рода *Citrobacter* в чистой культуре соблюдали ряд условий:

- максимально ранний посев взятого материала;
- подбор соответствующих питательных сред для первичного посева;
- техника выполнения посева обеспечивала рост изолированных колоний;
- для культивирования посевов использовали оптимальный по температурным условиям и сроку инкубации режим.

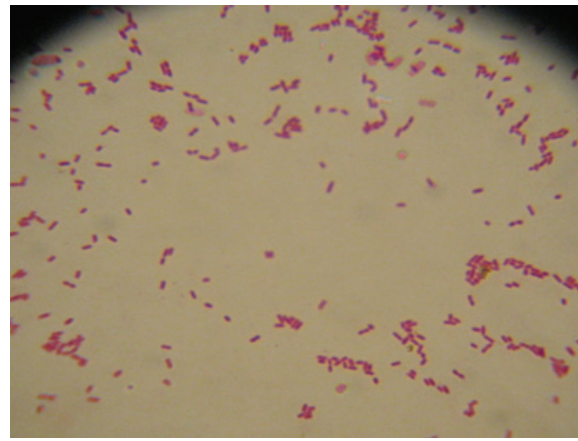
#### **Результаты исследований**

Первичные посевы проб патологического материала и пищевого сырья проводили на дифференциально-диагностические среды: Эндо, Плоскирева и Висмут-сульфит агар. Посевы культивировали в условиях термостата при температуре 37 °C в течение 24 часов.

По истечении 18-24 часов наблюдали рост колоний в S-форме на чашках Петри со средой Эндо: розовые и красные колонии без металлического блеска (Рис. 2) или бесцветные и сероватые колонии с розовым оттенком, с темной окраской в центре; на агаре Плоскирева: слегка опалесцирующие выпуклые розовые колонии с темным центром или без него; на висмут-сульфит агаре (через 48 часов инкубации): светло-зелёные колонии без



а



б

**Рис.2 - Бактерии рода *Citrobacter***

а – рост на среде Эндо; б - морфология клеток (увеличение x900)

окрашивания участка среды под колонией; при этом наблюдался рост колоний, сопровождающийся резким неприятным запахом.

Затем с каждой чашки пересевали в питательный бульон по 3-5 колоний, характерных для цитробактера.

Посевы культивировали в условиях термостата при температуре 37 °С в течение 6-18 часов (до появления выраженного помутнения среды) в условиях термостата.

Из выросших культур микроорганизмов готовили препараты для микроскопии, окрашивали по методу Грама, Трухильо, Ольта и изучали их тинкториально-морфологические свойства.

При обнаружении в мазках мелких грамотрицательных палочек с закруглёнными концами, не образующих спор (окраска по Трухильо) и капсул (окраска по Ольту), располагающихся одиночно и попарно, подвергали дальнейшему изучению с целью родовой и видовой идентификации, а также для определения патогенности.

Подвижность культур определяли, пересевая и выращивая их в 0,3%-м мясопептонном агаре (МПА).

Дальнейшую идентификацию выделенных микроорганизмов мы устанавливали, определяя биохимические свойства, которые основаны на различии у них состава ферментов. Анализируя доступную научную литературу, мы выяснили, что полная информация о биохимических свойствах цитробактеров, особенно новых видов, отсутствует. Поэтому для своих исследований использовали общепринятые тесты в достаточном количестве, чтобы определить родовую и видовую принадлежность выделенных микроорганизмов к роду *Citrobacter*.

Известно, что большая часть видов утилизирует цитрат в качестве единственного источника углерода; проба с метиловым красным положи-

тельная; реакция Фогеса-Проскауэра отрицательная. Бактерии не проявляют лизин декарбоксилазную и аргинин дегидролазную активность, но декарбоксилируют орнитин, не гидролизуют желатин (исключение составляют лишь 15 % штаммов *S.ammolanaticus* – они могут давать разжижение столбика желатина). Большинство названных микроорганизмов ферментируют D-глюкозу с образованием кислоты и газа, расщепляют L-арабинозу, глицин, D-ксилозу, мальтозу, D-маннит, L-рамнозу, лактозу, D-сорбит, сахарозу, дульцит, образуют индол и сероводород, не дезаминируют фенилаланин.

Для выявления ферментативной активности исследуемых микроорганизмов использовали классический метод инокуляции культуры в пробирки, содержащие необходимые субстраты и индикаторы.

Было установлено, что только 3 из 11 выделенных нами подвижных грамотрицательных палочковидных культур, не образующих споры и капсулы, утилизировали цитрат, декарбоксилировали орнитин, не проявляли лизин декарбоксилазную и аргинин дегидролазную активность, не гидролизуют желатин. Названные микроорганизмы ферментировали D-глюкозу с образованием кислоты и газа, расщепляли L-арабинозу, глицин, D-ксилозу, мальтозу, D-маннит, L-рамнозу, лактозу, D-сорбит, сахарозу, дульцит, образовывали индол и сероводород, не дезаминировали фенилаланин.

Для выявления факторов патогенности у выделенных микроорганизмов их пересевали на кровяной мясопептонный агар и помещали посевы в термостат при температуре 37 °С.

Все изучаемые штаммы обладали гемолитической активностью, вызывая β-гемолиз эритроцитов барана.

Постановка реакции с метилротом. По методике Баррета к 1 мл культуры добавляли 1 мл 0,6%-

Таблица 1

**Биохимические свойства выделенных бактерий, отнесенных нами к роду *Citrobacter***

№ штамма	Тест																	
	Индол	Метил-рот	Ацетоин	Цитрат	H <sub>2</sub> S	Фенилаланин	Лизин	Аргинин	Орнитин	Подвижность	Желатин	Глюкоза	Лактоза	Сахароза	Маннит	Дульцит	Рамноза	Ксилоза
1	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+
4	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+
9	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+

го спиртового раствора α-нафтола и 0,4 мл 40%-го раствора калия гидроксида. При положительной реакции через 15 минут появлялось красное (оттенки розового) окрашивание; при отрицательной реакции окрашивания не происходило.

Для постановки реакции Фогеса-Проскауэра к 2,5 мл 2-суточной культуры бактерий добавляли вначале 1 мл 6%-го спиртового раствора α-нафтола, а затем 0,4 мл 40%-го раствора калия гидроксида. Опытные пробирки тщательно встряхивали и спустя 3-5 минут учитывали результат. При наличии в культуре ацетилметилкабинола (рН среды было ниже 5,0) она окрашивалась в розовый цвет (положительная реакция). Окраска культуры в желтый цвет свидетельствовала об отрицательной реакции. Опытные три культуры окрашивались в розовый цвет, что подтвердило принадлежность выделенных микроорганизмов к роду *Citrobacter*.

Результаты исследований по определению биохимических свойств выделенных микроорганизмов представлены в таблице 1.

Совокупность морфологических, тинкториальных, культуральных и биохимических свойств позволила идентифицировать выделенные нами три культуры как *Citrobacter freundii*.

#### Выводы

Проведенное нами бактериологическое исследование патологического материала: трупов новорожденных и погибших в первые часы жизни, а также мертворожденных поросят (от свиной свинокомплекса «Волжский» Ульяновской области); маститного молока, взятого от животных с молочного комплекса «Красный восток» Ульяновской области, и речной рыбы с признаками бактериальных заболеваний – позволило выделить 11 изолятов, из которых три штамма бактерий были идентифицированы как бактерии вида *Citrobacter freundii*. Было установлено, что выделенные микроорганизмы обладали типичными для вида биологическими свойствами и гемолитической активностью.

Выделенные и идентифицированные нами культуры бактерий вида *Citrobacter freundii* будут использованы в дальнейшей работе в качестве

индикаторных штаммов для выделения специфических бактериофагов и изучения их биологических свойств.

Исследования проводятся при поддержке государства в лице ФГБУ «Российский фонд фундаментальных исследований» по научному проекту «Геномика и биология кандидатских бактериофагов для терапии энтеробактериальных инфекций в ветеринарной медицине» №16-44-732038/16 от 03.11.2016 г.

#### Библиографический список

1. Поздеев, О. К. Энтеробактерии: руководство для врачей / О. К. Поздеев. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. – 720 с.

2. Пульчеровская, Лидия Петровна. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов *Citrobacter* и их применение в диагностике: дис. ... канд. биологических наук: 03.00.07, 03.00.23/ Л.П. Пульчеровская. - Ульяновск, 2004. - 186 с.

3. Мониторинг объектов окружающей среды на наличие бактерий рода *Citrobacter* и их фагов/ Л.П. Пульчеровская, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин, Е.О. Ефрейторова // Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения. Материалы VII Международной научно-практической конференции. - 2016. - С. 253-260.

4. Бактериофаги микроорганизмов значимых для животных, растений и человека / Д.А. Васильев [и др.]; под. ред. Д.А. Васильева, С.Н. Золотухина. – Ульяновск: НИИЦМиБ, 2013. – 316 с.

5. Золотухин, С.Н. Малоизученные энтеробактерии и их роль в патологии животных / С.Н. Золотухин. - Ульяновск, 2004. - 146 с.

6. Садртдинова Г. Р. Биохимические тесты для ускоренной внутриродовой детекции бактерий *Klebsiella* / Г.Р. Садртдинова, Д.А. Васильев // Sci article. - 2015. - №17. - С.11-15.

7. Садртдинова, Г. Р. Биохимическая активность бактерий вида *Klebsiella oxytoca*/ Г.Р. Садртдинова, С.Н. Золотухин, Д.А. Васильев // Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения. Материалы VII Международной научно-практической конференции. - Ульяновск, 2016. - С. 261-266.

8. Ефрейторова, Е. О. Идентификация бактерий *Serratia marcescens* в воде открытых водоемов/ Е.О. Ефрейторова, И. Галушко, Е. Барихина // Актуальные проблемы инфекционной патологии и биотехнологии. Материалы VII Международной студенческой научной конференции. - 2014. - С. 9-13.

9. Valvano Miguel A. et al. Chemical communication of antibiotic resistance by a highly resistant subpopulation of bacterial cells. PLoS ONE, 03.07.2013, doi: 10.1371/journal.pone.0068874.

10. Collins J. et al. Bactericidal antibiotics induce

mitochondrial dysfunction and oxidative damage in mammalian cells. *Science Translational Medicine*, 03.07.2013, doi: 10.1126/scitranslmed.3006055.

11. Изучение сахаролитических свойств бактерий, выделенных из различных открытых водоемов РФ/ А.Г.Семанин, Н.П.Пекарская, С.Н. Золотухин, Д.А.Васильев// *Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения. Материалы VIII Международной научно-практической конференции.* – Ульяновск,

2017.- Часть III.- С. 261-265.

12. Диагностика картофельной болезни хлеба, вызываемой бактериями видов *Bacillus subtilis* и *Bacillus mesentericus*/ Н.А.Феоктистова, Е.О. Бахаровская, Д.А. Васильев // *Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии.*- 2011. - №3(15).- С.61-68.

13. Методы общей бактериологии: учебно-методическое пособие / Д.А. Васильев. С.Н. Золотухин, Н.М.Никишина.- Ульяновск, 1998.- 146 с.

## ISOLATION OF BACTERIA OF CITROBACTER GENUS

**Pulcherovskaya L.P., Vasilyev D.A., Zolotukhin S.N.**  
**FSBEI HE Ulyanovsk SAU**  
**432017. Ulyanovsk, Novyy Venets bld., 1;**  
**8 (8422) 55-95-47 e-mail: pulcherovskaya.lidia@yandex.ru**

*Key words: Citrobacter, biological properties, cultures of microorganisms, pathological material, differentiation.*

*The article presents results of studies on the indication and identification of bacteria of Citrobacter genus from pathological material obtained from dead and sick animals and food raw materials. The bacteriological indication of microorganisms, which we used, relied on almost twenty years of experience with bacteria of Citrobacter genus and was carried out according to generally accepted methods and key biological tests. To isolate the bacteria of Citrobacter genus in a pure culture, a number of conditions were kept: the earliest inoculation of the material taken; selection of appropriate nutrient media for primary inoculation; the method of inoculation ensured the growth of isolated colonies; for cultivation, appropriate temperature regime and incubation period were used. The main biological properties of the isolated microorganisms were studied in order to identify the named microorganisms, as well as for possible usage of isolated strains as indicating bacterial cultures in isolating the phages of Citrobacter genus bacteria from environmental objects and studying the biological properties of cytobacter bacteriophages. It was found that the bacterial cultures which we isolated, utilized citrate, decarboxylated ornithine, did not show lysine decarboxylase and arginine dehydrolysis activity, did not hydrolyze gelatin. The mentioned microorganisms fermented D-glucose to form acid and gas, they didn't decompose L-arabinose, glycine, D-xylose, maltose, D-mannitol, L-rhamnase, lactose, D-sorbitol, sucrose, dulcitol, formed indole and hydrogen sulphide, did not deaminate phenylalanine. The carried out researches, namely: a set of morphological, tinctorial, cultural and biochemical properties allowed to differentiate the 3 cultures identified by us as Citrobacter freundii.*

### Bibliography

1. Pozdeev, O.K. *Enterobacteria: a guide for doctors* / O. K. Pozdeev. - Moscow: GEOTAR-Media, 2007.- 720p.
2. Pulcherovskaya Lydiya Petrovna. *Isolation and study of the main biological properties of Citrobacter bacteriophages and their use in diagnosis* / Pulcherovskaya L.P. *Dissertation of Candidate of Biological Sciences: 03.00.07, 03.00.23.* - Ulyanovsk, 2004. - 186 p.
3. *Monitoring of environmental objects for the presence of bacteria of Citrobacter genus and their phages* / Pulcherovskaya L.P., Vasilyev D.A., Zolotukhin S.N., Efreitorova E.O. // *In the collection: Agrarian science and education at the present stage of development: experience, problems and solutions. Materials of the VII International Scientific and Practical Conference.* 2016. - P. 253-260.
4. *Bacteriophages of microorganisms significant for animals, plants and humans. Scientific publication* / D.A. Vasilyev [et al]; Edited by Vasilyev D.A., Zolotukhin S.N. - Ulyanovsk, SRICMB, 2013. – 316p.
5. Zolotukhin, S.N. *Little studied enterobacteria and their role in animal pathology* / S.N. Zolotukhin. - Ulyanovsk, 2004.-146 p.
6. Sadrtidnova G. R. *Biochemical tests for accelerated intrageneric detection of Klebsiella bacteria* / G.R. Sadrtidnova, D.A. Vasilyev // *Sci-article.* - 2015. - № 17. - P.11-15.
7. Sadrtidnova, G. R. *Biochemical activity of bacteria of Klebsiella oxytoca genus*/ G.R. Sadrtidnova, S.N. Zolotukhin, D.A. Vasilyev // *Agrarian science and education at the present stage of development: experience, problems and solutions. Materials of the VII International Scientific and Practical Conference.* - Ulyanovsk, 2016.- P. 261-266.
8. Efreitorova, E.O. *Identification of Serratia marcescens bacteria in surface water* / E.O. Efreitorova, I. Galushko, E. Barakhtina // *Current problems of infectious pathology and biotechnology. Materials of the VII International Student Scientific Conference.* - 2014. - P. 9-13.
9. Valvano Miguel A. et al. *Chemical communication of antibiotic resistance by a highly resistant subpopulation of bacterial cells.* *PLoS ONE*, 07/03/2013, doi: 10.1371/journal.pone.0068874.
10. Collins J. et al. *Bactericidal antibiotics induce mitochondrial dysfunction and oxidative damage in mammalian cells.* *Science Translational Medicine*, 07/03/2013, doi: 10.1126/scitranslmed.3006055.
11. *The study of saccharolytic parametres of bacteria isolated from various surface water reservoirs of the Russian Federation* / A.G. Semanin, N.P. Pekarskaya, S.N. Kuznetsova, S.N. Zolotukhin, D.A. Vasilyev // *Agrarian science and education at the present stage of development: experience, problems and solutions. Materials of the VIII International Scientific and Practical Conference.* - Ulyanovsk, 2017. - Part III.-P. 261-265.
12. *Diagnostics of the potato disease of bread caused by bacteria of Bacillus subtilis species and Bacillus mesentericus* / N.A. Feoktistova, E.O. Bakharovskaya, D.A. Vasilyev // *Vestnik of Ulyanovsk State Agricultural Academy.* 2011. - №3 (15) .- P.61-68.
13. *Methods of general bacteriology: study guide* / A.D. Vasilyev. S.N. Zolotukhin, N.M. Nikishina. - Ulyanovsk, 1998. - 146 p.