

Bakterienresistenzen gegen Cefotaxim? /Hof H., Ehrhard I. //Fac: Fort schr. antimikrob. und antineoplast. Chemother.. 1992 .- 11, № 15 .

17. Latamoxef et infections nosocomiales en milieu hospitalier pédiatrique /Doit Catherine, Bingen E. //Sem. hop. Paris .- 1993 .-69, № 13 .- С. 392 - 396 .

18. Comparative antimicrobial activity of lomefloxacin, norfloxacin, ofloxacin, ciprofloxacin and enoxacin against 500 bacterial isolates /Ismael N. A., Tayeb O. S. //Microbios.- 1993 .- 74, № 300 .- С. 147 - 154 .

19. Untersuchungen zur klonalen Verbreitung eines multiresistenten *Citrobacter freundii*-Strammes auf einer neonatologischen Intensivtherapiestation: Abstr. Pap. Congr. Dtsch. Ges. Hyg. und Mikrobiol., Leipzig, 28 - 30. Sept., 1992 / Gericke Bernd, Dinger Elce, Heuck Dagmar, Tschape Helmut, Voigt Wolfgang, Claus Hermann, Presch Cornelius //Lentralbl. Hyg. und Umweltmed..- 1993 .- 194, № 5 - 6.- С. 340 - 552 .

## МЕТОДЫ ИНДИКАЦИИ И ИДЕНТИФИКАЦИИ БАКТЕРИЙ РОДА *CITROBACTER* В ВОДЕ ОТКРЫТЫХ ВОДОЕМОВ

*Пулчеровская Л.П., Васильев Д.А., Золотухин С.Н., Алексеев М.  
Научно-исследовательский инновационный центр  
микробиологии и биотехнологии  
ФГОУ ВПО «Ульяновская государственная академия»*

*In article methods of indication and identification of bacteria of stem *Citrobacter* in water of open reservoirs are presented.*

*В статье представлены методы индикации и идентификации бактерий рода *Citrobacter* в воде открытых водоемов.*

Вода крайне необходима для нормального функционирования организма человека, животных и растений, поскольку составляет основу их внутренней среды. Она также является и источником распространения возбудителей заболеваний человека, животных и рыб.

Так, например, в зоне Северного Кавказа и других регионах циркулирует ряд инфекционных болезней рыб, в том числе и цитробактериоз, что тормозит производство и снижает товарные и санитарные качества рыбных продуктов. Пораженная *C. freundii* рыба опасна для употребления в пищу людям, а рыбные продукты способны вызывать у человека пищевые токсикоинфекции, воспаленные моче- и желчевыводящих путей, отиты, остеомиелиты и менингиты (В.П. Рагинская, 1973).

Nimbargi Pradhakar M., Hiremath Annapurna B., et al в (1985 ) в Индии провели исследование поверхности тела и внутренней полости рыб, живущих в загрязненных хозяйственно-бытовыми стоками водоемах, с использованием общепринятых методических приёмов. Потенциально-патогенные для человека бактерии выделялись с поверхности тела, из жабр и пищеварительного тракта рыб. Всего на различных частях тела рыб было обнаружено 12 видов микроорганизмов, среди которых были бактерии рода *Citrobacter*.

Karunasagar I., et al (1992) сообщают о гибели породных групп карпа

вследствие соматической инфекции, вызванной *Citrobacter freundii*. Авторы отмечают геморрагические пятна на коже, глазах, в основании плавников. Из образцов крови, почек, печени, селезенки были выделены и идентифицированы *C. freundii*. Результаты изучения вирулентности показали, LD<sub>50</sub> находились в пределах 10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup> для мышей и рыб.

Dos Fernandes Viera Regine Helena, et.al. (1996) провели бактериологический анализ проб морской воды с побережья Fortaleza, взятых с 3 мая по 22 октября 1995 г. В результате проведенных исследований были выделены микроорганизмы принадлежащие к семейству *Enterobacteriaceae* среди которых также были бактерии рода *Citrobacter*.

Из приведенных данных следует, что данный микроорганизм попадает в воду открытых водоемов в результате хозяйственной деятельности человека, со сточными водами, а также с фекалиями больных и здоровых людей и животных.

Из выше сказанного можно сделать вывод, что бактерии рода *Citrobacter* можно обнаружить в речной воде и объектом своих исследований мы выбрали реку Волга.

Для этого мы отобрали пробы воды и исследования проводили по общепринятой методике.

Основой идентификации бактерий рода *Citrobacter* является изучение ферментативных свойств.

Род *Citrobacter* объединяет группу ферментативно родственных бактерий, названных так благодаря их способности утилизировать цитрат (*citrus*-лимон, *bacter*- мелкие палочки) и использовать его в качестве единственного источника углерода. Название было предложено С. Wercam, G. Gjillen (1932), а также У.Е. Mankuburen (1948).

Современная классификация рода включает следующие виды: *Citrobacter freundii*, *C. coseri*, *C. amalonaticus*, *C. farmeri*, *C. youngae*, *C. braakii*, *C. rodentum*, *C. wermanii* и два до сих пор безымянных вида. Для них предложены названия *C. gillenbergii* и *C. murliniae*.

Согласно литературным данным, факторы патогенности у данного рода изучены не достаточно, т.к. до настоящего времени не разработаны экспериментальные модели патогенеза инфекции. Возможно, основные факторы патогенности цитробактеров – микроворсинки, жгутики, энтеротоксин и поверхностный белок адгезии, которые отсутствуют у авирулентных штаммов.

Бактерии рода *Citrobacter* образуют мелкие, прямые, подвижные палочки. Факультативные анаэробы. Температурный оптимум – 37° С, оптимальная рН - 7,2. Спор и капсул не образуют. В мазках располагаются одиночно и парами. По Граму окрашиваются – грамотрицательно. Цитробактеры хорошо растут на простых питательных средах, утилизуют цитрат как единственный источник углерода. На среде Эндо лактозоположительные варианты цитробактера образуют колонии, окрашенные в розовый или красный цвет, но лишённые типичного для кишечной палочки металлического блеска; у лактозоотрицательных вариантов колонии бесцветные или сероватые с розовым оттенком, более тёмным в центре. На среде Плоскирёва лактозоотрицательные штаммы *Citrobacter* образуют слегка опалесцирующие выпуклые колонии, окрашенные в тон среды (слегка розовые); лактозоположительные колонии имеют более интенсивную окраску с темным центром. На висмут-сульфит агаре через 48 часов инкуба-

ции цитробактеры дают обильный рост, образуя светло-зеленые, коричневые или черные колонии без окрашивания участка среды под колонией. Рост их на этой среде более обильный, чем сальмонелл и отличается неприятным запахом. Основой идентификации *Citrobacter* являются их ферментативные свойства. Они утилизируют цитрат в среде Симмонса, образуют газ в глюкозе, ферментируют лактозу в разные сроки (встречаются лактозоотрицательные штаммы), а также ферментируют маннит, рамнозу, сорбит, арабинозу, ксилозу, мальтозу, не ферментируют инозит. Не обладают лизиндекарбоксилазой, фенилаланиндезаминазой и желатиназой. Большинство штаммов образуют сероводород и не образуют индол. Они вариабельны в отношении сахарозы, салицидина, дульцита, раффинозы и адонита. Положительны в реакции с метиловым красным и отрицательны в реакции Фогеса-Проскауэра. Вариабельность некоторых ферментативных признаков *Citrobacter* положена в основу их разделения на виды (таблица 1).

**Таблица 1. Отличительные признаки бактерий группы *C.freundii* (Покровский, Поздеев и др., 1999 г.)**

Тест	<i>C.freundii</i>	<i>C.youngae</i>	<i>C.braakii</i>	<i>C.werkmanii</i>	<i>C.sedlakii</i>
Образование индола	-	-	-	-	+
Утилизация цитрата	+	+	+	+	+
Разложение мочевины	+	+	+	+	+
Орнитин декарбоксилаза	-	-	+	-	+
Утилизация малоната	-	±	-	+	+
Образование кислоты из:					
- сахарозы	+	±	-	±	-
- дульцита	±	+	±	-	+
- мелибиозы	+	-	+	-	+

В результате проведенных исследований нами был выделено два штамма бактерий названного рода (*Citrobacter freundii*).

Существуют еще методы индикации и идентификации бактерий рода *Citrobacter*, которые позволяют определить родовую и видовую принадлежность выделенной культуры микроорганизмов без изучения ферментативных свойств в течение 48 часов вместо 5-7 суток, что позволяет значительно сократить сроки и затраты на диагностические исследования.

Одним из таких методов является фагодиагностика (М.Адамс; Д.М.Гольдфарб (1961); В.Я.Ганюшкин (1988); Т.И.Кольпикова, Бакулов И.А. и др. (1990, 1992)). Методы фагодиагностики являются специфичными, не требуют больших затрат времени, материалов и общедоступны лабораториям всех уровней.

Для индикации микроорганизмов с помощью бактериофагов необходи-

мо иметь набор фагов с определенными биологическими свойствами. Для этих целей, нами были выделены три бактериофага бактерий рода *Citrobacter* (52 УГ-СХА, С-61 УГСХА и С-66 УГСХА) из объектов окружающей среды, которые мы использовали в своей дальнейшей работе. Данные фаги высоко специфичны и позволили нам получить результаты за короткий срок.

Индикацию бактерий проводили в РНФ и обнаружили искомые бактерии в концентрации  $10^2$ - $10^4$  микробных клеток в 1 мл исследуемого материала в присутствии посторонней микрофлоры, без выделения чистой культуры микроорганизма. Бактериологическим методом такую концентрацию микроорганизмов обнаружить, как правило, не удаётся.

Используя строгую специфичность селекционированных нами бактериофагов по отношению к бактериям рода *Citrobacter* мы использовали разработанную нами схему ускоренной идентификации этих микроорганизмов.

Результат исследований считали положительным, если на месте нанесения хотя бы одного из трех штаммов фагов на газоне сплошного роста культуры образовывалась прозрачная зона лизиса со вторичным ростом фагорезистентных микроорганизмов или без него, а также образование негативных колоний фага. Отрицательным считали результат при отсутствии лизиса на газоне роста исследуемой культуры микроорганизмов и отсутствии лизиса в контроле. При положительном результате культуру относили к роду *Citrobacter*. В результате проведенных исследований из проб воды нами были выделены штаммы цитробактеров, о чем свидетельствовали результаты изучения их биологических свойств.

Предлагаемая нами схема позволила идентифицировать цитробактерии за 48 часов (2 суток).

Таким образом, мы считаем, что индикация бактерий рода *Citrobacter* в воде открытых водоемов необходима при определении загрязнения их хозяйственно-бытовыми стоками любыми доступными методами и имеет большое практическое значение.

#### Литература:

1. Адамс М. Бактериофаги. – Москва, 1961. – с. 15-44.
2. Ганюшкин В.Я. Бактериофаги сальмонелл и их применение в ветеринарии. Учебное пособие. – Ульяновск, 1988. – с. 45-49.
3. Лабинская А.С. Микробиология с техникой микробиологических исследований. М.: Медицина, 1978. – 394 с.
4. Определитель бактерий Берджи: В 2-х т.: Пер. 9-го амер.изд. Т.2 Беркли Р., Бок Э., Бун Д. и др.; Под ред Хоулта Дж. И др. – М.: Мир, 1997. – 800 с.
5. Колпикова Т.И., Бакулов И.А. и др. Перспективы практического применения листериозных бактериофагов.// Вопросы ветеринарной вирусологии, микробиологии и эпизоотологии.// Материалы научной конференции ВНИИ-ВиМ. – Покров. – 1992. Часть II. – С.211-212.
6. Лямкин Д.Н., 1972 цитируется по Ожередовой Н.А. Санитарная оценка рыбных продуктов при цитробактериозе.//Ветеринария. 2007.- №5. – С.51-53.
7. Рагинская В.П., 1973 цитируется по Ожередовой Н.А. Санитарная оценка рыбных продуктов при цитробактериозе.//Ветеринария. 2007.- №5. – С.51-53.