DOI <https://doi.org/10.18551/rjoas.2016-10.22>

**ИНДИКАЦИЯ БАКТЕРИЙ РОДА CITROBACTER В ОБЪЕКТАХ
ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ С ПРИМЕНЕНИЕМ БАКТЕРИОФАГОВ В РЕАКЦИИ
НАРАСТАНИЯ ТИТРА ФАГА**

**INDICATION OF CITROBACTER BACTERIAS IN THE ENVIRONMENT USING
BACTERIOPHAGES IN THE PHAGE TITER INCREASE REACTION**

Ефрейторова Е.О., аспирант

Efreitorova E.O., Post-graduate student

Пульчеровская Л.П.*, кандидат биологических наук

Pulcherovskaya L.P., Candidate of Biological Sciences

ФГБОУ ВО Ульяновская ГСХА имени П.А. Столыпина, Ульяновск, Россия
Ulyanovsk State Agricultural Academy named after P.A. Stolypin, Ulyanovsk, Russia

*E-mail: pulcherovskaya.lidia@yandex.ru

АННОТАЦИЯ

Цитробактеры широко распространены в окружающей среде – воде, почве различных стоках; их выделяют из кишечника и мочевыводящих путей человека, лошадей, крупного рогатого скота, собак, грызунов, птиц, рептилий. Также их можно обнаружить в разнообразных пищевых продуктах. Высокая устойчивость бактерий данного рода к внешним воздействиям позволяет им сохраняться в почве более 6 месяцев, в навозе – до 11 месяцев, в воде – до 10 месяцев. В статье рассмотрены вопросы индикации бактерий рода *Citrobacter* в объектах окружающей среды с помощью бактериофагов C66, C61 и C52.

ABSTRACT

Citrobacters are widespread in the environment – they can be found in water, soil, various effluents; they can be isolated from the intestines and urinary tract of man, horses, cattle, dogs, rodents, birds, reptiles. Also they can be found in a variety of food products. Due high resistance to external influences, they persist in soil for more than 6 months, in manure - up to 11 months, in water - up to 10 months. Article describes using bacteriophages C66, C61 and C52 for indication of *Citrobacter* bacterias in different objects of environment.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА

Индикация, бактериофаги, окружающая среда, титр фага.

KEY WORDS

Indication, bacteriophages, environment, phage titer.

Цитробактеры относятся к типу протеобактерий, к классу гамма-протеобактерий, порядку энтеробактерий и входят в семейство *Enterobacteriaceae*. По антигенной структуре близки к сальмонеллам. Выделяют более 40 О-серогрупп и более 90 Н-антигенов. Основные факторы вирулентности: пили, поверхностный белок адгезии, эндотоксины. Цитробактеры устойчивы ко многим антибиотикам. Род *Citrobacter* включает в себя несколько видов, представляющих собой опасность для человека [8].

Приведенные сведения позволили нам взять в качестве исследуемых объектов – воду открытых водоемов, песок пляжей и детских песочниц, т.е. тех мест, где присутствует часто много людей, животных и насекомых.

Целью исследований явилось постановка реакции нарастания титра фага (РНФ) для обнаружения бактерий рода *Citrobacter* в объектах окружающей среды с помощью индикаторных бактериофагов C66, C61 и C52 ранее выделенных нами из объектов окружающей среды.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Для постановки РНФ использовали индикаторные бактериофаги, которые представляли собой специфические вирулентные фаги с широким спектром литического действия на штаммы бактерий рода *Citrobacter* ранее выделенные нами из объектов окружающей среды: С66 (титр фага 3×10^9 фаговых корпускул в 1 мл с размером негативных колоний от 3,0 до 8,0 мм); С61 (титр фага 4×10^9 фаговых корпускул в 1 мл с размером негативных колоний от 0,5 до 1,0 мм) и С52 (титр фага 3×10^9 фаговых корпускул в 1 мл с размером негативных колоний от 2,0 до 3,0 мм) [1, 7].

Фаги не лизировали бактерии гетерологичных семейств, родов, видов.

Препараты необходимых бактериофагов представляли собой прозрачные светло желтого и желтого цвета лизаты патогенных штаммов бактерий; пригодные для применения в течение года со дня изготовления при хранении в условиях температуры 2-4°C [1,5].

При проведении исследований использовали питательные среды: мясопептонный бульон (МПБ), мясопептонный 0,3 % и 1,5% агар (МПА). Для подавления роста воздушной микрофлоры перед разливом в чашки Петри 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. Полужидкий 0,3 % МПА разливали в пробирки по 2,5 мл.

Для проведения исследований использовали ранее разработанную нами схему постановки РНФ (2004).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Пробы воды открытых водоемов в количестве 5 мл, пробы песка с пляжей и детских песочниц в количестве 5 г помещали в стерильные колбы и заливали МПБ (рН 7,2-7,4) в соотношении 1:10. Содержимое колб встряхивали в шуттель-аппарате с последующим отстаиванием взвеси песка в течение 10 минут. Приготовили по 3 широкие пробирки (диаметр 20 мм): в пробирки №1 и 2 вносили по 9 мл исследуемой взвеси, в пробирку 3 – 9 мл стерильного МПБ. Затем в пробирки №1 и 3 добавили 1мл индикаторного фага в рабочем разведении, а в пробирку №2 вносили 1 мл МПБ (контроль на присутствие свободного фага). Рабочее разведение фага содержало 1×10^3 корпускул в 1 мл. При титре фага 3×10^9 корпускул в 1 мл – 1:100000. Пробирка №1 – опытная; №2 – контроль на выявление в пробах свободного фага; №3 – контроль на титр индикаторного фага. Все пробирки выдерживали в термостате в течение 16 часов при температуре 37°C.

После культивирования в термостате содержимое каждой пробирки разводили МПБ так, чтобы при посеве 1 мл содержимого из пробирки №3 (контроль титра фага) образовывалось несколько десятков негативных колоний (стерильных пятен) колоний фага. В пробирке №3 индикаторный фаг находится в концентрации нескольких тысяч корпускул в 1 мл, следовательно, чтобы получить несколько десятков корпускул в 1 мл содержимое разводили в 20 раз. Содержимое пробирок №1 и №2 разводили аналогично. Инактивацию микрофлоры разведенных смесей пробирок №1, №2 и №3 проводили путем прогревания в водяной бане при температуре 60°C в течение 30 минут. После этого содержимое пробирок методом агаровых слоев.

Питательный агар разливали в чашки Петри по 25-30 мл. Для подавления роста воздушной микрофлоры перед разливом добавляли к расплавленному агару 0,04%-ный спиртовой раствор генцианвиолета. Чашки подсушивали в термостате в течение 3 часов. Индикаторные культуры цитробактера выращивали в МПБ в течение 12-16 часов. МПА с 0,7%-ным содержанием агара заготовили заранее в пробирках по 2,5 мл, расплавляли, охлаждали до температуры 46-48°C. В пробирку добавляли 0,2 мл индикаторной культуры, 1 мл разведенной и прогретой исследуемой смеси, перемешивали и выливали вторым слоем на чашки с 1,5%-ным МПА. Для определения количества корпускул фага в опытной пробе и в контроле титра (пробирки №1 и №3)

использовали по две чашки, для пробы на свободный фаг (пробирка №2) – одну чашку. Через 20-3- минут после застывания верхнего слоя агара чашки помещали в термостат на 12-16 часов [6-9].

Результат реакции учитывали путем подсчета негативных колоний бактериофага в опытных и контрольных чашках. Оценку результатов проводили согласно таблице 1.

Таблица 1 – Критерии оценки РНФ [9]

Увеличение количества корпускул индикаторного фага в опытной пробе в отношении к количеству корпускул в контроле	Оценка
Увеличение в 2,5 раза	Сомнительная
Увеличение от 3 до 5 раз	Слабо положительная
Увеличение свыше 5 раз	Положительная
Увеличение более 10 раз	Резко положительная

Результаты проведенных исследований объектов внешней среды в реакции нарастания титра фага с целью индикации бактерий рода *Citrobacter* представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Результаты проведенных исследований

№ исследуемой пробы	№ фага	Количество негативных колоний в контроле	Количество негативных колоний в опыте	Увеличение негативных колоний (раз)	Результат РНФ
Пробы воды открытых водоемов					
1	52	18	105	5,8	положительный
	61	22	лизис	>10	
	66	15	89	5,9	
2	52	12	16	1,2	отрицательный
	61	20	29	1,5	
	66	13	31	2,4	
3	52	14	127	9,4	положительный
	61	18	лизис	>10	
	66	14	лизис	>10	
Песок пляжей					
4	52	16	67	4,1	сомнительный
	61	21	84	4,0	
	66	17	69	4,1	
5	52	18	108	6,0	положительный
	61	21	106	5,0	
	66	15	99	6,6	
Песок детских площадок					
6	52	17	98	5,8	положительный
	61	15	89	5,9	
	66	18	99	5,5	
7	52	15	22	1,6	отрицательный
	61	20	48	2,4	
	66	15	33	2,2	
8	52	13	лизис	>10	положительный
	61	19	146	7,6	
	66	18	лизис	>10	
9	52	13	144	11	положительный
	61	17	122	7,2	
	66	12	115	9,5	
10	52	18	19	1,1	отрицательный
	61	19	15	-	
	66	15	14	-	
11	52	17	17	-	отрицательный
	61	19	22	1,1	
	66	16	18	1,1	

Из таблицы видно, что при исследовании проб воды открытых водоемов бактерии рода *Citrobacter* были обнаружены в 2-х пробах, в третьей отсутствовали.

При исследовании проб песка с пляжей искомые бактерии обнаружены в одной пробе, т.к. здесь наблюдали увеличение количества корпускул в исследуемом материале в пределах от 5 до 6,6 раз, а во второй результат сомнительный т.к. увеличение бактериофага было менее чем в 5 раз.

В песке детских песочниц бактерии рода *Citrobacter* были обнаружены в 3-х из шести объектов. Во всех исследуемых пробах свободный фаг отсутствовал.

Используя реакцию нарастания титра фага с фагами бактерий рода *Citrobacter*, полученными нами из объектов окружающей среды (воде открытых водоемов и песке пляжей и детских площадок) позволили провести индикацию бактерий без их выделения в чистую культуру в течение 18 часов. РНФ является высокоспецифичной и обладает достаточной чувствительностью для обнаружения указанных микроорганизмов.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Золотухин С.Н. Бактериофаги *M.morganii* и их применение при желудочно-кишечных заболеваниях поросят // Автореферат дис. канд. вет. наук. - Ульяновск, 1994.
2. Кузнецов А.Ю. // Автореферат дис. канд. биол. наук. – Ульяновск, - 2000.
3. Золотухин, С.Н. Выделение фагов бактерий рода *Citrobacter* из объектов внешней среды и патологического материала // С.Н.Золотухин, Л.П.Пульчеровская, Н.А.Кириянова, Д.А. Васильев «Вестник УГСХА», Сборник научных трудов, Ульяновск, - 2002. - С. 29-32.
4. Феоктистова Н.А. Выделение и изучение биологических свойств фагов бактерий рода *Proteus*, конструирование на их основе биопрепарата и разработка параметров его практического применения// Автореферат дис.канд.дисс.биол.наук.-Саратов, 2006.
5. Пульчеровская Л.П. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов *Citrobacter* и их применение в диагностике// Автореферат дис.канд.дисс.биол.наук.- Саратов, 2004.
6. Пульчеровская Л.П. Индикация бактерий рода *Citrobacter* с помощью реакции нарастания титра фага (РНФ) / Л.П.Пульчеровская, С.Н.Золотухин, Д.А.Васильев // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2013. – № 1(21). – С. 60 – 64.
7. Ляшенко Е.А. Выделение и изучение биологических свойств фагов бактерий рода *Klebsiella*, конструирование на их основе биопрепарата и разработка параметров его практического применения // Автореферат дис. канд. дисс. биол. наук.- Саратов, 2006.
8. Ефрейторова Е.О., Пульчеровская Л.П., Васильев Д.А. 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. 2014 г. С. 175-180.
9. Золотухин С.Н. «Методические рекомендации по индикации и идентификации энтеробактерий рода *Citrobacter* в патологическом материале, кормах, пищевом сырье и объектах внешней среды с применением специфических бактериофагов» Утверждены Отделом ветеринарной медицины РАСХН 4 октября 2004 года./ С.Н. Золотухин, Пульчеровская Л.П., Васильев Д.А., Каврук Л.С.- М.: ВНИИВСГиЭ, 2005г.
10. Конструирование вакцины «Виросальм» на основе парамиксовируса типа 1 голубинового варианта штамма «PN-T» / Пименов Н.В., Зотова З.В. // Ветеринарный врач. 2011. № 4. С. 2-4.
11. Бактериофаги в борьбе с сальмонеллезом птиц / Пименов Н.В. // В сборнике: Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности Материалы Международной научно-практической конференции. Редакционная коллегия: Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин, А.В. Алешкин. 2013. С. 51-55.