

УДК 57:579.2

**ОСОБЕННОСТИ РОСТА БАКТЕРИЙ *KLEBSIELLA OXYTOCA* НА СРЕДАХ,  
ИСПОЛЗУЕМЫХ В ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНО-ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ЦЕЛЯХ**  
FEATURES OF *KLEBSIELLA OXYTOCA* BACTERIAS' GROWTH ON MEDIA  
USED FOR DIFFERENTIAL DIAGNOSTIC PURPOSES

**Садртдинова Г.Р.\***, соискатель

Sadrtdinova G.R., Post-graduate student

**Васильев Д.А.**, доктор биологических наук

Vasilyev D.A., Doctor of Biological Sciences

**Ульяновский государственный аграрный университет, Ульяновск, Россия**

Ulyanovsk State Agrarian University, Ulyanovsk, Russia

\*E-mail: [sadrtdinova-guzlik@yandex.ru](mailto:sadrtdinova-guzlik@yandex.ru)

**АННОТАЦИЯ**

В статье представлены результаты исследований, связанные с изучением особенностей культивирования бактерий вида *Klebsiella oxytoca* на питательных средах, используемых в дифференциально-диагностических целях: Эндо, Левина, Плоскирева. Отмечены ростовые особенности изучаемых штаммов на каждой из сред. Скучный рост, с образованием мелких колоний бактерий наблюдался на среде Эндо. Отмечено, что наряду со штаммами, хорошо ферментирующими лактозу, имелись штаммы со слабой лактазной активностью. Поэтому, в зависимости от степени ферментации лактозы, на дифференциально-диагностических средах бактерии образовывали как ярко-малиновые, так и светло-розовые колонии (штаммы *K. oxytoca* 24 и *K. oxytoca* 26 образовывали лактозотрицательные колонии светлорозового цвета). Наиболее благоприятной средой для культивирования является среда Плоскирева (7,0+0,2).

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА**

Бактерии, штамм, свойства, диагностика, бактериоскопия, морфология, питательная среда, цвет, инкубирование, колония бактерий.

В мире достаточно распространенными являются заболевания, вызванные условно-патогенными микроорганизмами, среди которых *Klebsiella* занимает ведущее место. В зависимости от состояния иммунной системы человека этот возбудитель может явиться причиной как легкого инфекционного заболевания, так и тяжелого септического проявления [1]. Бактерии вида *Klebsiella oxytoca* представляют собой грамотрицательные факультативно-анаэробные бактерии. Оптимальными условиями культивирования являются температура роста 35-37°C и время инкубирования- 20-24 часа. Штаммы бактерий данного вида, как правило, индолположительны (в связи с чем и были выделены в отдельный вид), отрицательны по аргининдигидролазе и орнитиндекарбоксилазе, обладают подвижностью при 10 °С. Непременной особенностью *Klebsiella* считают «пышный» и обильный рост с образованием на плотных питательных средах (Среда Эндо, Среда Плоскирева, Среда Левина) больших, выпуклых, частично сливающихся колоний слизистой консистенции [2].

При первичной диагностике патогена применяют бактериологический метод и бактериоскопию. Бактериологический метод связан с посевом материала на питательные среды, позволяющие дифференцировать штаммы гетерогенных бактерий (анализируя характер выросших колоний). В практике наиболее часто используются среды: Эндо, Левина, Плоскирева, ВСА. Стоит отметить, что рост на этих средах штаммов гетерогенных бактерий или бактерий, являющиеся сопутствующей микрофлорой при выделении бактерий рода *Klebsiella* имеет ряд отличий: бактерии рода *Escherichia* на среде Эндо образуют ярко-малиновые колонии с металлическим блеском (у *Klebsiella* лишь некоторые штаммы способны образовывать колонии с

металлическим блеском, цвет колоний- малиновый), на среде Левина- бактерии рода *Escherichia* образуют черно-синие колонии с металлическим блеском (у *Klebsiella* колонии сине-розового цвета), на среде Плоскирева- бактерии рода *Escherichia* образуют по краям среды колонии серого цвета, в центре розовые или брусничного цвета с желтоватым оттенком (у *Klebsiella* колонии светло-красного цвета); бактерии рода *Enterobacter* на среде Эндо образуют нежно-розовые колонии (у *Klebsiella* колонии подобного цвета встречаются редко), на среде Левина- рост бактерий рода *Enterobacter*, в отличие от рода *Klebsiella*, подавляется, на среде Плоскирева- бактерии рода *Enterobacter* образуют колонии бежевого цвета или с явно выраженным бежевым оттенком (у *Klebsiella* колонии светло-красного цвета); бактерии рода *Serratia* на среде Эндо, Левина и Плоскирева образуют бесцветные, прозрачные (пигментообразующие штаммы- красные) колонии, причем хороший рост отмечается при 30 °С (у *Klebsiella* оптимальной температурой роста является 35-37 °С, колонии малинового цвета) [3]. Бактериоскопия заключается в окрашивании мазков сложным (по Граму) или простым методом (если этого достаточно).

*Цель исследований* заключалась в изучении особенностей роста бактерий вида *K. oxytoca* на питательных средах, используемых для бактериологической идентификации и дифференциации.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В работе использовались 7 штаммов бактерий выделенных из внешней среды и типированных как бактерии *K. oxytoca* и 1 штамм, полученный из коллекции кафедры МВЭиВСЭ (Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина) - АТСС 8724. В качестве гетерогенных штаммов использовали бактерии семейства *Enterobacteriaceae*: *E. coli* 383, *E. cloacae* 397, *S. marcescens* 21. Для изучения особенностей роста штаммов бактерий, использовали среды, которые наиболее часто используются в практике: среда Эндо (ГНЦ прикладной микробиологии, г. Оболенск), среда Левина (ГНЦ прикладной микробиологии, г. Оболенск), среда Плоскирева (ГНЦ прикладной микробиологии, г. Оболенск). Посев на среды суточных культур осуществляли после «подращивания» на мясопептонном бульоне (ГНЦ прикладной микробиологии, г. Оболенск) в течение 24 часов. Суточную культуру каждого штамма высевали на отобранные питательные среды штрихом. Инкубировали посева в течение 24 часов, при 37 °С [4].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ роста бактерий на средах проводили по следующим критериям: величина колонии, форма колонии, характер контура края, рельеф колонии, цвет, консистенция.

Характер роста бактериальных колоний дифференцировали: - слабый (диаметр выросших колоний едва достигает 1 мм, количество колоний <20; диаметр колоний меньше 0,5 мм, количество колоний больше 50); средний (диаметр выросших колоний 1-2 мм, количество-20-50; диаметр- 2-3 мм, но количество колоний <30); обильный (диаметр выросших колоний 2-3 или 3-4 мм, количество >50). Результаты представлены в таблице 1.

Результаты, представленные в таблице 1, позволяют отметить хороший, обильный рост на среде Плоскирева у 62,5% всех исследуемых штаммов (*K. oxytoca* 1, *K. oxytoca* 2, *K. oxytoca* 3, *K. oxytoca* 25, *K. oxytoca* АТСС 8724). Слизистые пышные колонии достигали диаметра 2-3 мм, цвет варьировался от светло-розового до розового.

Рост на среде Левина у 50,0% штаммов (*K. oxytoca* 1, *K. oxytoca* 10, *K. oxytoca* 25, *K. oxytoca* АТСС 8724)- средний, с сине-розовыми колониями в диаметре 1-2 мм. У 37,5% штаммов (*K. oxytoca* 3, *K. oxytoca* 24, *K. oxytoca* 26,-) рост слабый, количество сине-розовых колоний едва достигало 20.

Таблица 1 – Характеристика роста штаммов бактерий *K. oxytoca* на ДДС

Исследуемый штамм	Питательная среда	pH среды	Условия инкубация	Результат	Характеристика роста
<i>K. oxytoca</i> 1	Эндо	7,4±0,2	37 °С, 24 часа	Куполообразные слизистые колонии малинового цвета, лактозо(+), 2-4 мм.	Средний
	Левина	7,2±0,2	37 °С, 24 часа	Слизистые колонии сине-розового цвета, 1-3 мм.	Средний
	Плоскирева	7,0±0,2	37 °С, 24 часа	Светло- розовые колонии, 2-3 мм.	Обильный
<i>K. oxytoca</i> 2	Эндо	7,4±0,2	37 °С, 24 часа	Куполообразные слизистые колонии малинового цвета, лактозо(+), 2-4 мм.	Средний
	Левина	7,2±0,2	37 °С, 24 часа	Слизистые колонии сине-розового цвета, 1-2 мм.	Обильный
	Плоскирева	7,0±0,2	37 °С, 24 часа	Светло- розовые колонии, 2-3 мм.	Обильный
<i>K. oxytoca</i> 3	Эндо	7,4±0,2	37 °С, 24 часа	Куполообразные слизистые колонии малинового цвета, лактозо(+), 2-4 мм.	Обильный
	Левина	7,2±0,2	37 °С, 24 часа	Слизистые колонии сине-розового цвета, 1 мм.	Слабый
	Плоскирева	7,0±0,2	37 °С, 24 часа	Светло- розовые колонии, 2-3 мм.	Обильный
<i>K. oxytoca</i> 10	Эндо	7,4±0,2	37 °С, 24 часа	Куполообразные слизистые колонии малинового цвета, лактозо(+), 1-2 мм.	Средний
	Левина	7,2±0,2	37 °С, 24 часа	Слизистые колонии сине-розового цвета, 2 мм.	Средний
	Плоскирева	7,0±0,2	37 °С, 24 часа	Светло- розовые колонии, 2-3 мм.	Средний
<i>K. oxytoca</i> 24	Эндо	7,4±0,2	37 °С, 24 часа	Куполообразные слизистые колонии светло-розового цвета, лактозо(-), 1-2 мм.	Слабый
	Левина	7,2±0,2	37 °С, 24 часа	Слизистые колонии сине-розового цвета, 1 мм.	Слабый
	Плоскирева	7,0±0,2	37 °С, 24 часа	Светло- розовые колонии, 2-3 мм.	Средний
<i>K. oxytoca</i> 25	Эндо	7,4±0,2	37 °С, 24 часа	Куполообразные слизистые колонии малинового цвета, лактозо(+), 1-2 мм.	Средний
	Левина	7,2±0,2	37 °С, 24 часа	Слизистые колонии сине-розового цвета, 1-2 мм.	Средний
	Плоскирева	7,0±0,2	37 °С, 24 часа	Светло- розовые колонии, 2-3 мм.	Обильный
<i>K. oxytoca</i> 26	Эндо	7,4±0,2	37 °С, 24 часа	Куполообразные слизистые колонии светло-розового цвета, лактозо(-), 1-2 мм.	Средний
	Левина	7,2±0,2	37 °С, 24 часа	Слизистые колонии сине-розового цвета, 1 мм.	Слабый
	Плоскирева	7,0±0,2	37 °С, 24 часа	Светло- розовые колонии, 2-3 мм.	Средний
<i>K. oxytoca</i> ATCC 8724	Эндо	7,4±0,2	37 °С, 24 часа	Куполообразные слизистые колонии малинового цвета, лактозо(+), 2-3 мм.	Средний
	Левина	7,2±0,2	37 °С, 24 часа	Слизистые колонии сине-розового цвета, 1-2 мм.	Средний
	Плоскирева	7,0±0,2	37 °С, 24 часа	Светло- розовые колонии, 2-3 мм.	Обильный

На среде Эндо отмечен самый слабый рост бактерий, с образованием мелких и редких колоний с металлическим блеском. Отметим, что два штамма (*K. oxytoca* 24, *K. oxytoca* 26) образовывали лактозотрицательные колонии.

Бактерии *K. oxytoca*, *E. cloacae* и *S. marcescens* согласно системе дифференциации, предложенной Э.Юингом и П.Эдварсом (объединение по сходству биохимических и культуральных признаков), относят к одной трибе- *Klebsiellae* [5,6,7]. Бактерия *E. coli* – является модельным микроорганизмом в микробиологических исследованиях (поскольку является одним из самых хорошо изученных микроорганизмов) [8]. Кроме того, *E. coli* является микроорганизмом, культуральные

свойства схожи со многими энтеробактериями (в частности *Klebsiella*), что приводит к значительным затруднениям при выделении бактерий [9, 10].

Сравнительный анализ эффективности использования сред в дифференциально-диагностических целях заключался в посеве гетерогенных штаммов и штаммов вида *K. oxytoca* на среду Плоскирева (наиболее благоприятная по составу питательная среда, на которой рост бактерий вида *K. oxytoca* отличается своим обилием и пышным ростом) [11, 12, 13, 14, 15]. Инкубация посевов производилась в условиях термостата при 37°C, с наблюдением за изменениями в течении 2-х суток (таблица 2).

Таблица 2 – Сравнительный анализ эффективности использования среды Плоскирева в дифференциально-диагностических целях

Исследуемый штамм	Среда Плоскирева			
	Условия культивирования	рН среды	Характеристика колоний	
			Через 24 часа	Через 48 часов
<i>K. oxytoca 1</i>	37 ± 1°C	7,0±0,2	Выпуклые колонии светло-розового цвета, диаметром 2-3 мм. Правильной формы, с ровными краями, слизистой, тянущейся консистенции.	Выпуклые колонии светло-розового цвета, правильной формы, с ровными краями, слизистой, тянущейся консистенции. Отмечали увеличение некоторых колоний до 3,5 мм.
<i>K. oxytoca 24</i>	37 ± 1°C	7,0±0,2	Выпуклые колонии светло-розового цвета, диаметром 2-3 мм. Правильной формы, с ровными краями, слизистой консистенции.	Выпуклые колонии розового цвета, правильной формы, с ровными краями, слизистой консистенции. Отмечали увеличение некоторых колоний до 3 мм.
<i>E. coli 383</i>	37 ± 1°C	7,0±0,2	Выпуклые колонии розового цвета, диаметром 1,5-2,5 мм. Правильной формы, с ровными краями, слизистой консистенции.	Выпуклые колонии розового цвета, правильной формы, с ровными краями, слизистой консистенции. Отмечали увеличение некоторых колоний до 3,5 мм.
<i>E. cloacae 397</i>	37 ± 1°C	7,0±0,2	Выпуклые колонии светло-розового, с заметным при проходящем свете желтоватым оттенком, диаметром 2-3,5 мм. Правильной формы, с ровными краями, слизистой консистенции.	Выпуклые, колонии светло-розового цвета, с заметным при проходящем свете желтоватым оттенком. Увеличение размера колоний не наблюдали (2-3,5 мм). Правильной формы, с ровными краями, слизистой консистенции.
<i>S. marcescens 21</i>	37 ± 1°C	7,0±0,2	Выпуклые, прозрачные бесцветные колонии, напоминающие колонии сальмонелл, диаметром 1-2 мм. Правильной формы, с ровными краями, мажущей консистенции.	Выпуклые колонии с заметным красным пигментом, диаметром 1-2 мм. Правильной формы, с ровными краями, мажущей консистенции.

Согласно результатам, представленным в таблице 2, отмечены сходные культуральные свойства бактерий *K. oxytoca 1*, *K. oxytoca 24*, *E. cloacae 397*, *E. coli 383* – это образование выпуклых светло-розовых колоний, правильной формы, с ровными краями и слизистой консистенцией. Рост *S. marcescens 21* отличается от данных видов характеристикой выросших колоний и образованием через 48 часов красного пигмента.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований, обильный рост, с образованием большого количества слизистых «пышных» колоний правильной формы отмечен на среде Плоскирева (62,5% всех изучаемых штаммов *K. oxytoca*); формирование небольшого количества колоний (или большого количества, но мелких колоний) фиксируется на среде Эндо; на среде Левина рост бактерий можно охарактеризовать как средний – с образованием средней величины и небольшого количества колоний. Использование среды Плоскирева в исследованиях не обеспечивает прямой идентификации бактерий, в связи с чем необходимо выделение их в чистой культуре и

последующая идентификация широким набором тестов, что длительно и трудоемко. Анализ полученных данных, позволяет заключить о недостатках всех этих сред, так как на них помимо бактерий рода *Klebsiella* хорошо растут и другие бактерии семейства *Enterobacteriaceae*, что затрудняет отбор колоний для проведения дальнейшей идентификации.

Для определения принадлежности культур к клебсиеллам необходима постановка целого ряда подтверждающих тестов (тесты на подвижность, сероводород, мочевины, фенилаланиндезаминазу, цитрат Симмонса, малонат, лизиндекарбоксилазу, инозит), а следовательно, значительного времени и материальных затрат. В целях ускорения исследования, значительного сокращения объема работы и материальных средств эффективным считаем разработку хромогенной питательной среды для одноэтапного выделения и прямой идентификации бактерий рода *Klebsiella*.

## БИБЛИОГРАФИЯ

1. Поздеев, О.К. Энтеробактерии: руководство для врачей. / О.К. Поздеев, Р.В.Федоров-М.:ГЭОТАР-Медиа, 2007.-720с.
2. Булькинова Е.А. Выделение, диагностика и идентификация бактерий рода *Klebsiella*// Материалы Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых.- Ульяновск: Ульяновская ГСХА им.П.А.Столыпина, 2004.-С.257-262.
3. Сельников О.П. Микробиологическая и патоморфологическая характеристика клебсиеллезной инфекции // Журн. микробиол. – 1992. – Т. 54. – № 2. – С. 75 – 80.
4. Золотухин С.Н. Биохимическая активность бактерий вида *Klebsiella oxytoca*/ С.Н. Золотухин, Д.А. Васильев, Г.Р. Садртдинова// Материалы VII Международной научно-практической конференции «Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения» / - Ульяновск: УГСХА, 2016. Т. III. – С.261-265.
5. Васильев Д.А. Биохимические тесты для ускоренной внутриродовой детекции бактерий *Klebsiella*/ Г.Р.Садртдинова, Д.А.Васильев// Электронный периодический научный журнал «SCI-ARTICLE.RU».- 2015.-№17- С.11-15.
6. Васильев Д.А. Биохимическая активность бактерий вида *Klebsiella oxytoca*/ Г.Р. Садртдинова, С.Н. Золотухин, Д.А. Васильев// Материалы VII Международной научно-практической конференции «Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения» / - Ульяновск: УГСХА, 2016. Т. III. – С.261-265.
7. Садртдинова Г.Р. Агрегация бактерий *Klebsiella oxytoca* и *Klebsiella pneumoniae* под влиянием химического фактора// Инфекция и иммунитет.-т.5 (№.4)-С.377-381.
8. Пульчеровская Л.П. Микробиологическое исследование орхидей с признаками бактериальной гнили/ Д.Р. Шапирова, А.Р.Зиятдинова, Е.Д.Ценева, Е.О.Ефрейторова, Г.Р.Садртдинова, Н.Н.Карамышева, Д.Г.Сверкалова// Студенческий научный форум - 2016.VIII Международная студенческая электронная научная конференция, электронное издание.- 2016.
9. 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.
10. Молофеева Н.И. Проблема диагностики *Escherichia coli* 0157:n7// Тезисы докладов Всероссийской научно-практической конференции "Молодые ученые - агропромышленному комплексу". Ульяновск: УГСХА, 2001. – С.79-80.
11. Родионова А.В. Сравнительная оценка дифференциально- диагностических свойств питательных сред, используемых для выделения бактерий рода *Klebsiella* // Материалы IX-й Международной студенческой научной конференции «Актуальные проблемы инфекционной патологии и биотехнологии»/ - Ульяновск: УГСХА, 2016. Т. II. - С.184-187.

12. Ляшенко Е.А. Оценка CRA- метода в обнаружении биопленок образованных бактериями рода *Klebsiella*/ Г.Р.Садртдинова, Е.А.Ляшенко, Д.А.Васильев, А.Г.Шестаков// Материалы VI Международной научно-практической конференции «Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения».- Ульяновск: Ульяновская ГСХА им.П.А.Столыпина, 2015, часть II.-С.122-124.
13. Садртдинова Г.Р. Изучение антибиотикочувствительности штаммов бактерии *Klebsiella oxytoca*, выделенных из трупов домашней птицы// Материалы Всероссийской научно-методической конференции с международным участием «Аграрная наука в условиях модернизации и инновационного развития АПК России, посвященной 85-летию Ивановской государственной сельскохозяйственной академии имени Д.К. Беляева». Иваново: Ивановская государственная сельскохозяйственная академия им.Д.К.Беляева.- 2015-Т.3.- С.90-92.
14. Садртдинова Г.Р. Создание селективной среды для выделения, дифференцирования и идентификации бактерий рода *Klebsiella*/ С.Н. Золотухин, Д.А. Васильев, Г.Р. Садртдинова// Материалы VII Международной научно-практической конференции «Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения» / - Ульяновск: УГСХА, 2016. Т. III. – С.266-269.
15. Садртдинова Г.Р. Повышение селективных и дифференциально- диагностических свойств плотной агаровой среды, предназначенной для выделения бактерий рода *Klebsiella*// Материалы IV Международной научно-практической конференции молодых ученых «Молодежь и наука XXI века».2014.-С.122-127.