

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ СССР
ГЛАВНОЕ САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЕ УПРАВЛЕНИЕ

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ
ПО ИДЕНТИФИКАЦИИ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ
НЕФЕРМЕНТИРУЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Москва — 1985 г.

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ СССР

Главное санитарно-эпидемиологическое управление

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИДЕНТИФИКАЦИИ
ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ НЕФЕРМЕНТИРУЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Москва - 1985 г.

Методические рекомендации разработаны Московским ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательским институтом гигиены им. Ф. Ф. Эрисмана (д.м.н. Г.П.Калина, к.м.н. Л.М.Виноградова, к.м.н. Г.М.Трухине).

Методические рекомендации рассмотрены Лабораторным Советом при Главном санитарно-эпидемиологическом управлении Минздрава СССР и рекомендованы к утверждению.

Рекомендации предназначены для использования в практике бактериологических лабораторий гигиенического и эпидемиологического профиля научно-исследовательских институтов, медицинских институтов и, по показаниям, республиканских, краевых, областных и городских санитарно-эпидемиологических станций,

"УТВЕРЖДАЮ"

Начальник Главного санитарно-эпидемиологического управления Министерства здравоохранения СССР

В.Е.Ковшило В.Е.Ковшило

"14 августа" 1985 год

№ 3923-85

Методические рекомендации
по идентификации грамотрицательных неферментирующих
микроорганизмов.

I. Введение.

В последние годы внимание гигиенистов и эпидемиологов привлекает обширная группа грамотрицательных неферментирующих микроорганизмов /НФМ/, широко распространенная в объектах окружающей среды. Доказана патогенность таких /*Bacteroides pertussis*, *Bordetella pertussis*, *Flavobacterium meningosepticum*, *Moraxella lacunata*/ и роль в патогенезе заболеваний человека и животных других НФМ /*Acinetobacter calcoaceticus*, *Bordetella bronchiseptica*, *Legionella pneumophila*, *Bordetella parapertussis*/. Однако, частое нахождение многих из них в кишечнике человека свидетельствует о возможном их индикаторном значении. Поэтому возникла необходимость в систематике НФМ, а также удобных и доступных для широких исследований идентификации микроорганизмов, обнаруживаемых при исследованиях поверхностных и подземных вод, воды централизованного водоснабжения, сточных жидкостей, почвы, смывов с предметов окружения больных в лечебных учреждениях и в патологическом материале. В основу идентификации положено систематизирование признаков по степени их значения, дополненное тестами, необходимыми

в отдельных случаях для более четкой идентификации того или иного НФМ, внешне медицинского и (или) санитарного значения, в целях дифференциации последних от хемолитотрофных и сапрофитных НФМ, широко распространенных в воде и почве. В предлагаемом виде с данным набором ключевых признаков и количеством идентифицируемых НФМ предлагаемая схема разработана в СССР впервые.

I. Лабораторное оборудование, реактивы, материалы.

I.1. Основы питательных сред.

I.1.1. Агар микробиологический. ГОСТ 17206-71.

I.1.2. Дрожжи хлебопекарные прессованные. Технические условия Г71-81.

I.1.3. Молоко коровье пастеризованное. Технические условия 13277-79.

I.1.4. Пептон сухой ферментативный для бактериологических целей. Технические условия 13805-76.

I.2. Реактивы.

I.2.1. I-натол. Технические условия 5838-79.

I.2.2. Натрий уксуснокислый 3-водный. Технические условия 199-78.

I.2.3. Реактивы. Калий гидроокись. Технические условия 24363-80.
(СТ 63В 1439-78).

I.2.4. Диметил-пара-фенилендиамин ТУ 6-09-18-28-72.

I.2.5. Калий азотнокислый. Технические условия 4217-77
(СТ.САВИ697-79).

I.2.6. Аммоний сернокислый. Технические условия 3769-78.

I.2.7. Калий сернокислый. Технические условия 4145-74.

I.2.8. Магний сернокислый 7-водный. Технические условия 4523-77.

I.2.9. Тетраметил-пара-фенилендиамид ТУ 6-09-18-28-72.

I.2.10. Калий фосфорнокислый однозамещенный. ТУ 4198-76.

I.2.11. Калий фосфорнокислый двузамещенный 3-водный. Технические условия 2493-75.

- I.2.I2. Натрий-аммоний фосфорнокислый двузамещенный 4-водный.
Технические условия 4170-78.
- I.2.I3. Аммоний хлористый. Технические условия 3773-72.
- I.2.I4. Магний хлористый 6-водный. Технические условия 4209-77.
- I.2.I5. Натрий лимоннокислый трехзамещенный. ТУ 22280-76.

I.3. Углеводы, спирты.

- I.3.I. Д-глюкоза. Технические условия 6038-79.
- I.3.2. Глицерин. Технические условия 6259-75.
- I.3.3. Ксилоза ТУ 6-09-20-45-77.
- I.3.4. Лактоза ТУ 6-09-22-93-79.
- I.3.5. Мальтоза ВТУ 257-59.
- I.3.6. Спирт этиловый ректификованный. ТУ 6962-67.

I.4. Красители, индикаторы.

- I.4.I. Бромтимоловый синий. ТУ 6-09-20-45-77.
- I.4.2. Индикаторы. Феноловый красный. ГОСТ 4599-73.
- I.4.3. Хлорид 2-, 3-, 5-трифенилтетразола. ТУ 6-09-38-38-78.

I.5. Лабораторное оборудование, посуда, материалы.

- I.5.I. Посуда и оборудование лабораторное, стеклянное. Типы, основные параметры и размеры. ГОСТ 25336-82 Е (СТ СЭВ 2945-81).
- I.5.2. Термостат электрический с автоматической терморегулировкой до 60°С с термометром ценой деления 0,2°С.
- I.5.3. Проволока из никелевого и медноникелевых сплавов для удлиняющих проводов к термоэлектрическим преобразователям.
ТУ 1791-54.

2. Питательные среды.

- 2.I. Среда для определения окислации и ферментации глюкозы (0/Ф). Пертон 2,0; хлорид натрия 5,0 г; 2-замещенный фосфат калия - 0,3 г; глюкоза 10,0 г; агар 4,0-6,0 г; 1,6% щелочной раствор фено-

лового красного 2,5 мл; вода до 1000,0 мл.; рН 7,4-7,6. После растворения ингредиентов разлить в пробирки в количестве, достаточном для получения высоты столбика не менее 6 см (примерно 7,5-8,0 мл.). После стерилизации при 0,5 атм 15 мин, охладить в вертикальном положении. Посев иглой (не короче 6-7 см) уколом до дна пробирки. Инкубация 35-37°C 18-20 часов или 30°C 42-44 часа. Пожелтение всего столбика-окислация и ферментация положительны (+/+), пожелтение только верхней части столбика, иногда всего 1,5-2,0 см. от поверхности, окислация без ферментации (+/-), отсутствие пожелтения всего столбика и, как правило, желочение (малиновый цвет) поверхности среды - отсутствие ферментации и окислации (0/0). В некоторых случаях наблюдается пожелтение нижней половины столбика при малиновой окраске верхней, что может быть следствием высокой протеолитической активности, в результате чего образованием кислоты за счет окислации глюкозы сменяется щелочением в результате интенсивного расщепления пептона.

2.2. Определение нитратазной активности. Пептон 20,0 г; хлорид натрия 5,0 г; нитрат калия 2,0 г; агар 1,0-3,0 г; жидкий дрожжевой экстракт 200,0 мл; вода до 1000,0 мл. Разлить по 4-5 мл в пробирки, стерилизовать при 1 атм. 20 мин. Посев уколом до дна пробирки. Процесс восстановления нитрата может идти с различной глубиной реакции - от восстановления нитрата в нитрит, до редукции последнего до выделения свободного азота. Нитрат-редуктазная активность способствует утилизации кислорода в анаэробных условиях и диффузному росту нитратаза-активных НММ в среде. Неактивные НММ растут в этой среде лишь на поверхности в виде более или менее толстой пленки. При завершении редукции нитрата в нитрит до конечного этапа - образования свободного азота, в среде данного состава в толще и на поверхности образуются пузырьки газа - при 0,1% агара в виде обильной пены, при 0,3% - в толще среды. Реакцию можно

сопоставить с определенным способностью роста при 42°C, но учитывая, что некоторые НМ не способны расти при этой температуре или продуцировать свободный азот, необходимо дублировать посев с инкубацией при 30-35°C. Выделение свободного азота в более ранние сроки (через 4-5 часов после посева, но не позже) можно определить, используя феномен "раскаленной петли", погружение которой в среду вызывает интенсивное освобождение азота в виде пузырьков газа или пены на поверхности среды.

2.3. Оксидация углеводов (мальтозы, ксилозы, сахарозы) и других C-содержащих компонентов. Пептон 2,0; хлорид натрия 5,0 г; углевод 2,0 г; 1,6% щелочной раствор бромтимолового синего 5,0 мл; агар 12,0 *; вода до 1000,0 мл., pH 7,2-7,4. После стерилизации при 0,5 атм 15 мин, разлить среду в чашки. Посев макроколониями (12-18), инкубация при 35°C 18-20 часов или 30°C до 2 суток. При определении оксидации лактозы концентрацию последней увеличивают до 10% и длительность инкубации до 2-7 суток при 35°C и до 4-7 суток при 30°C.

2.4. Определение желатиназной активности. Питательный агар 1,2% (масопептонный или фабричный порошковый) 1000,0 мл; желатин 200,0 г; стерилизация при 0,5 атм 15 мин, разлить в чашки нетолстым слоем (не более 16 мл в чашку). После застывания среды ее поверхность залить тонким слоем 2% агара на дистиллированной воде. Посев микроколониями (ближками) в количестве 12-18. Инкубация при 35°C 1-2 суток или при 30°C 2-3 суток. Положительный результат - зона помутнения вокруг колоний.

2.5. Определение продукции феназона (смесь пигментов - флюоресцина, псорубина, меланина и др.) (среда Кинг-А), Пептон 20,0 г; агар 12,0 г; глицерин 10,0 г; сульфат калия 10,0 г; хлорид магния

* Во всех случаях, при отсутствии специального указания, применяется агар-агар, но не сухой питательный агар фабричного производства.

1,4 г; вода до 1000,0 мл., рН 7,2. Посев макроколониями на чашках. Инкубация 25°C 18-24 часа. Продукция феназинов разных оттенков, от бурого (сочетание рубрина с пиянином) до отчетливо зеленого или красного, в зависимости от преобладания того или иного феназина. Пигментация может проявляться в виде темнокоричневого или черного окрашивания, но феномен наступает обычно поздно (иногда на 7-14 сутки).

2.6. Определение утилизации С и N содержащих соединений. Различают два типа обменных процессов, свойственных НФМ. При первом углерод и азот утилизируются микроорганизмом в среде ограниченного минерального состава, при втором базовая среда должна быть полноцвой, содержать те или иные факторы роста, высоко питательные вещества или натуральные животные белки.

2.6.1. Состав базовой минеральной среды ограниченного состава может быть различным, от сложных наборов большого количества разных солей до простых, содержащих немногие органические, типа сред Козера или Симмонса. Может быть рекомендован следующий комплекс солей: Однозамещенный фосфат калия 1,5 г; сульфат магния 0,02 г; хлорид натрия 0,5 г; ^{фосфат алюминия 0,10 г;} агар 1,2 г; 1,6% щелочной раствор бромтимолового синего 0,5 мл; вода 1000,0 мл. После растворения стерилизовать при 1,0 атм 20 мин, хранить в холодильнике, применять по мере необходимости, прибавляя разные источники углеродного питания к 100,0 мл базовой среды: по 5 мл стерильных водных растворов 10% глюкозы, 6,0% ацетата натрия или цитрата натрия, 10% различных углеводов. Этанол прибавлять перед разливкой в чашки в количестве 1,2% для определения кислотообразования или 0,8 мл для определения утилизации. Посев разных штаммов макроколониями (близкими) по 12-18-24 в чашке.

2.6.2. Базовая среда для второго типа метаболизма может быть различной для разных НФМ. Основная минеральная база аналогична ре-

исменяемой в п.2.6.1. Дополнительно могут быть введены метионин (0,2-0,3%), дрожжевой экстракт (0,3%), различные аминокислоты (также до 0,3%); некоторые НМ нуждаются в полноценных средах, типа сердечно-мозгового настоя, иногда в нативных животных белках - крови, кровяной сыворотке в обычно принятых для таких сред концентрациях. Подбор для каждого НМ необходимых компонентов сложен, затрудняет процесс идентификации; проще ограничиться констатацией отсутствия роста и изменения реакции среды в минимальной среде с глюкозой для сахаролитов (кислая реакция в положительном случае) и с ацетатом натрия для щелочеобразователей (щелочная реакция в положительном случае).

2.7. Определения уреазной активности. Может быть использована синтетическая минеральная среда (п.2.6.1.) с заменой источника азотного питания мочевиной в количестве 0,1% и уменьшением содержания глюкозы до 0,1%. Определение в чашках посевам макроколони. При интенсивной уреазной реакции щелочение подлежащего слоя среды наступает уже через 3-4 часа после посева, в умеренной реакции - через 16-18 часов. Целесообразно после 3-4 часов инкубации при 30-35°C чашки до следующего утра оставить при комнатной температуре.

2.8. Определение металлического блеска. Сухой питательный агар порошковый Дагестанского производства Э060; пептон 10,0; вода до 1000,0 г. После стерилизации при 1 атм 20 мин внести 100,0 мл стерильного снятого молока, 30,0 мл 10% водного раствора хлорида трифенилтетразола (ТТХ) (самостерилизуется при комнатной температуре в течение 2-3 суток), смешать и разлить в чашки, по 20-25 мл. Посев макроколони. После инкубации при 35-37°C в течение 22-24 часов на поверхности микроколони появляются золотистые окрашивания. При данном составе среды - реакция вся поверхность макроколони покрыта золотистым налетом. При отрицательном результате следует

поддерживать посевы на среде при комнатной температуре 2-3 суток.

3. Реакции и реактивы.

3.1. Качественные реакции.

3.1.1. Реакция оксидазы по Ковачу. Реактив: тетраметил-пара-фенилендиамин хлорид 0,5 г; вода 100,0 мл. Реактив наносить на платяную или хлопчатобумажную ткань на колонии (макроколонию). Положительная реакция - порозовение, а затем окрашивание в глубокий фиолетовый цвет. Альтернативно - пропитать фильтровальную бумагу реактивом и наносить на нее микробную массу из макроколонии. Положительный результат тот же.

3.1.2. Реакция Цитохромоксидазы по Гэби и Хедли. Реактивы: А) альфа-нафтол 1,0 г; этанол 100,0 мл; Б) Диметил-пара-фенилендиамин хлорид (или оксалат) 2,0 г; вода 100,0 мл. Реактивы хранить отдельно в холодильнике, размешивать небольшими порциями непосредственно перед употреблением. Способы применения те же, что в п.3.1.1. Результат - при положительной реакции колония или микробная масса на фильтровальной бумаге приобретает синий (ультрамариновый) цвет.

3.1.3. Реакция оксидазы по Ковачу рекомендована специально для неферментирующих микроорганизмов; реакция цитохромоксидазы по Гэби и Хедли - как для неферментирующих, так и преимущественно для ферментирующих микроорганизмов (аэромонад, псевдомонад, вибрионов). В СССР распространен в основном метод Гэби и Хедли (цитохромоксидаза), неправильно трактуемый некоторыми как реакция оксидазы, хотя последний термин должен быть применен к реакции с тетраметил-пара-фенилендиаминном. Некоторые микроорганизмы дают различные реакции с тем и другим реактивом (см. таблицу I).

3.2. В некоторых случаях возникает необходимость определить принадлежность изучаемой культуры к грамтрицательной группе. С

Таблица № 1.

Систематизированная идентификация грамотрицательных ферментирующих цитохромоксидаза-отрицательных микроорганизмов.

Микроорганизмы	Основные ключевые признаки										Дополнительные призн.						
	Цитохромоксидаза	Фуксидация/ферментация	Уксусная кислота	Полнаяность	Желатиназа	Окисления 10% лактозы	Нитратаза	Свободный азот	Утилизация С в минеральной среде с глюкозой	Утилизация С в минеральной среде с ацетатом натрия	Утилизация С в глюкозной среде	Рост при 42°C	Утилизация сахарозы	Утилизация этанола	Гемолиз	Леситиназа	Пигмент
<i>Bordetella parapertussis</i>	0	0/0	0	0	0	0	0	0	0	0	+		0				коричневый
<i>Acinetobacter Anoffi</i>	0	0/0	0	0	0	0	0	0	+	±	+	+	+	0			Р±
<i>N. baumgartneri</i>	0	0/0	0	0	+	Р ⁰	0	0	0	-	+	+	+	+	+	+	
<i>V. alcaligenes</i>	0	0/0	0	0	+	Р ⁰	0	0	0	-	+	+	+	+	+	+	
<i>Acinetobacter anitratus</i>	0	0/0	Р ⁰	0	+	0	0	+	+	+	+	+	+	0	0	0	
<i>A. baumannii</i>	0	0/0	Р ⁰	0	+	+	0	0	+	+	+	+	+	0	0	0	
<i>V. baumannii</i>	0	0/0	Р ⁰	0	+	+	0	0	+	+	+	+	+	0	0	0	
<i>Xanthomonas</i>	0	0/0	+	+	Р ⁰	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	желтый
<i>Pseudomonas</i>	0	0/0	+	+	0	Р ⁰	0	0	0	0	+	0	+	0	0	+	желтый или 0
<i>Zanthomonas maltophilia</i>	0	0/0	+	+	0	Р ⁰	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	желтый
<i>Flavobacterium meningosepticum</i>	0	0/0	+	+	Р ⁰	+	±	0	0	0	+	0	0	0	0	0	желтый 0
<i>Pseudomonas</i>	0	0/0	+	+	Р ⁰	+	Р ⁰	0	Р ⁰	+	+	Р	+				желтый или 0
<i>seraia</i>	0	0/0	+	+	Р ⁰	+	Р ⁰	0	Р ⁰	+	+	Р	+				желтый или 0
ферментиру-	Р	+						Р	А	З	Л	М	Ч	Н	Н	Е	
ющие грамотрицательные микроорганизмы																	

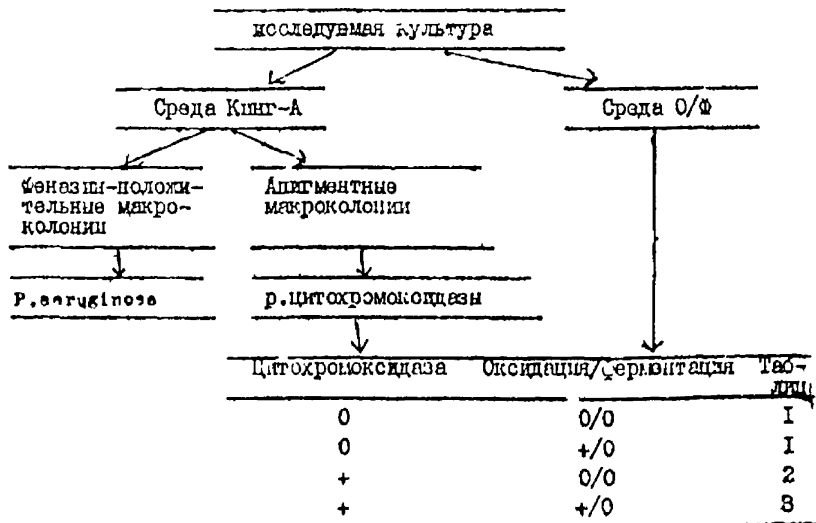
1) Реакция по Ковачу положительна; 2) Может быть замедленная ферментация. Р-различно; Р⁺-чаще положительно; Р⁰-чаще отрицательно.

этой целью, микробную массу с свежей агаровой культуры петлей вносят в 3% водный раствор KCN. Грамотрицательные микроорганизмы после нескольких секунд перемешивания массы в растворе ослизываются и за петлей тянутся трудно отрывающиеся нити. Этот феномен отсутствует у грамположительных микроорганизмов.

4. Систематизированные таблицы ключевых признаков НЭМ.

4.1. Обоснования систематизации и подбора ключевых признаков. При отборе ключевых признаков были учтены основные, имеющие медицинское и санитарное значения, неферментирующие микроорганизмы. Лишь немногие из включенных в набор признаков у некоторых НЭМ нестабильны, являясь решающими в отношении других НЭМ (например окисления мальтозы, продукция свободного азота). Принятый набор обеспечивает надежную идентификацию большинства НЭМ и лишь для уточнения некоторых необходимы дополнительные тесты.

4.2. Схема последовательной первичной идентификации неферментирующих микроорганизмов.



4.3. Систематизация признаков выявила три основных группы НФМ:

1. Пятихромоксидаза-отрицательные, делящиеся на подгруппы
1а. Не оксидирующие глюкозу (несахаролиты);
1б. Оксидирующие глюкозу (сахаролиты).
2. Пятихромоксидаза-положительные, но не оксидирующие глюкозу.
3. Пятихромоксидаза-положительные, оксидирующие глюкозу (сахаролиты).

В подгруппах первой группы и в 2 и 3 группах дальнейшая дифференциация проведена по двум другим решающим ключевым признакам - оксидации мальтозы и подвижности. Комбинации этих четырех решающих ключевых признаков выявляют подгруппу третьего порядка, каждая состоит из немногих видов, дифференциация которых по остальным ключевым признакам и, в отдельных случаях, по дополнительным тестам, не составляет труда. (таблица 2, 3)

4.4. Пользование таблицами. Из и.4.1 следует, что после получения чистой культуры НФМ с селективно-дифференциальной среды и отсева ее на среду Кинг-А для выявления и исключения из дальнейшего изучения феназин-образующих (пигментных). *P.aeruginosa*, рекомендуется посев макроколонидами в чашке), определяется отношение к реакции пятихромоксидазы. Одновременно с посевом на среду Кинг-А производится посев в среду О/Г. Эти два теста - пятихромоксидаза и оксидативно-ферментативная реакция, позволяют определить принадлежность изучаемого микроорганизма к той или иной группе уже через сутки после инкубации при 35-37°C или через двое суток после инкубации при 30°C. Остальные ключевые признаки могут быть определены одновременно, но в целях экономии труда и сред предпочтительно на втором этапе выявить отношение к мальтозе, подвижность и характер роста на нитратной среде (при 42°C и при 35-37°C), учитывая диффузное помутнение среды при положительной нитратной реакции, рост на поверхности среды в виде плотного

Таблица №2
Систематизированная идентификация Гранотрицательных неферментирующих
цитохромоксидаза-положительных несхарофилов.

Микроорганизм	Основные ключевые признаки										Дополнительные признаки								
	Цитохромоксидаза	Окисление глицерина	Окисление метанола	Подвижность	Делительная способность	Окисление 10% желатина	Нитрат аза	Свободный азот	Утилизация С и минеральной среде с глюкозой	Утилизация С в среде с ацетатом натрия	Утилизация глицерина по Диффузии	Утилизация этанола	Утилизация цитрата натрия	Окисление кислоты	Гемолиз	Уреаз	Свертываемость сырной сыворотки крови	Триптофан-деаминаза	Рост при 42° С
<i>Corynebacterium atlanticum</i>	+	o/a	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0					
<i>C. jeikeium</i>	+	o/a	0	0	0	0	0	0	+	+	+	0	0						
<i>Corynebacterium osloense</i>	+	o/a	0	0	0	0	0	0	+	+	+	0	0						
<i>Corynebacterium jeikeium</i>	+	o/a	0	0	0	0	+	0	0	+	0	0	0			0	0		
<i>Corynebacterium jeikeium</i>	+	o/a	0	0	0	0	+	0	0	+	0	0	0			0	+		
<i>Corynebacterium jeikeium</i>	+	o/a	0	0	1)	0	+	0	0	+	0	0	0			+	0		
<i>Corynebacterium jeikeium</i>	+	o/a	0	0	+	0	0	0	0	+	+				+	+	0		
<i>Zooglyca illipeensis</i>	+	o/b	0	+	0	0	0	0	0	+	0								
<i>Pseudomonas tolosensis</i>	+	o/b	0	+	0	0	0	0	0	+	+	0							0
<i>Pseudomonas fluorescens</i>		o/a	0	+	0	0	0	0	0	+	+								+
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	+	o/a	0	+	0	0	0	0	0	+	+	+	0						p ⁰
<i>Alcaligenes faecalis</i>	+	o/a	0	+	0	0	p ²⁾	0	+	+	+				0				
<i>Corynebacterium bronchisepticum</i>	+	o/a	0	+	0	0	0	0	0	+	+	0			+				
<i>Aeromonas hydrophila</i>	+	o/a	0	+	0	0	+	0	+	+	+	+			0				
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	+	o/b	0	+	p ⁰	0	0	0	0	+	+	+			0				+
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	+	o/a	0	+	0	0	0	0	0	+	+	0							p ⁰

1) Только в средах, обогащенных сывороткой крови или солями жирных кислот /бутират, к-проат/. 2) Преимущественно свеже-выделенные.

Таблица № 3
 Систематизированная идентификация грамотрицательных неферментирующих
 цитохромоксидаза-положительных сахаролитов

Микроорганизмы	Основные ключевые признаки										Дополнительные признаки			
	Цитохромоксидаза	Окислительная ферментация	Окислительная ферментация	Подвижность	Желатиназа	Окислительная ферментация	Нитрат-редуктаза	Свободный азот	Утилизация С в минеральной среде с глюкозой	Утилизация С в минеральной среде с ацетатом натрия	Утилизация С в полужидкой среде	Рост при 42°C	Утилизация этанола	Золотистый блеск
<i>Alcaligenes putrefaciens</i>	+	+	0	+	0	0	Р	+	+	+	0	+		
<i>Alcaligenes edwardsii</i>	+	+	0	+	0	0	+	Р	+	+	0	0		
<i>Alcaligenes pallens</i>	±	+	0	+	0	0	0	+	+	+	0	+	0	Бледно-желтый
<i>Pseudomonas meniscina</i>	+	+	0	+	0	0	+	+	+	+	+	+	0	
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	+	+	0	+	+	0	+	+	+	+	0	+	0	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+	0	±	Р	0	+	+	+	+	+	+	+	Феназин или 0
<i>Pseudomonas putida</i>	+	+	0	Р	+	0	0	0	+	+	+	0	0	Флуоресцеин
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	+	+	0	+	0	Р	Р	+	+	+	0	+	0	Флуоресцеин
<i>Pseudomonas flava</i>	+	+	0	+	0	0	0	+	+	+	0	+	0	бледно-желтый
<i>Paracoccus denitrificans</i>	+	+	0	+	0	0	+	+	+	+				
<i>Alcaligenes aquimarinus</i>	+	+	0	+	0	0	0	+	+	+				
<i>Zoogloea ramulosa</i>	+	+	0	+	0	0	0	+	+	+				
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	+	+	0	+	0	0	+	+	+	+	Р		0	
<i>Pseudomonas pseudoalcali</i>	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+		0	оранжево-кремовый

- 1) Преимущественно-осеже-выделенные
 2) Производящие капюлу-неподвижные

кольца при отрицательной нитратной реакции и продукцию свободного азота), после чего при некоторых комбинациях этих признаков становятся излишними остальные тесты, либо намечается необходимость в проведении лишь некоторых из них, а иногда и использование рекомендуемых дополнительных тестов.

4.6. При массовых исследованиях могут быть выявлены культуры, не укладывающиеся в предлагаемый набор признаков. В зависимости от обстоятельств, такие варианты подлежат дополнительному изучению (если это вызвано необходимостью), либо исключаются в тех случаях, когда с той же селективно-дифференциальной среды сняты другие колонии, полностью отвечающие той или иной комбинации ключевых признаков и, следовательно, идентифицируемых как той или иной НФМ.

5. Ориентирные основных неферментирующих микроорганизмов

5.1. Включенный в таблицы набор не исчерпывает обилия неферментирующих микроорганизмов, обитающих в окружающей среде. Отобрали лишь имеющие медицинское и (или) санитарное значение НФМ, а также сапрофиты или фитопатогены, от которых их нужно дифференцировать. Характеристика включенных в таблицы НФМ и их ключевые признаки даны в соответствии с литературными данными последних лет и на основании собственного материала. В таблицах представлены роды *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, отдельные представители родов *Bordetella*, *Flavobacterium*, *Achromobacter*, *Alcaligenes* а также *Zoogloea*, *Xanthomonas*, *Parasarcina*. В таблицы не включены провизорные группы "15" и "16" в роде *Moraxella*, "У4-1", "У4-2", "У4-3" (*Agrobacter radiobacter*) в роде *Achromobacter*, "У6", "У6-2" в роде *Bordetella*, как имеющие лишь единичные ключевые признаки, отличающие их от легализованных видов.

5.2. Род *Pseudomonas* включает 265 видов, из которых по основным свойствам охарактеризованы 32, не считая фитопатогенных и морских псевдомонад. В таблицы включены наиболее часто встречающиеся и имеющие медицинское значение или симулирующие их 10 видов сахаролитов и 6 несакхаролитов. Наибольший интерес представляет группа флуоресцирующих псевдомонад - *P.aeruginosa*, *P.fluorescens* и *P.putida*, которые дифференцируются на основании ключевых признаков - глубокой редукции нитратов-нитритов с освобождением свободного азота при 42°C и при 35°C, желатиназной реакции, росте на средах Кинг-А и "Блеск". Эти же тесты, как и некоторые дополнительные, могут служить ориентиром после определения основных ключевых признаков - р.цитохромоксидазы, окисления глюкозы и мальтозы, и для остальных представителей рода.

5.3. *Acinetobacter calcoaceticus*. В практических целях удобнее изменить номенклатуру этого единственного вида рода *Acinetobacter*, считая его подвидами на самостоятельные виды: *A.lwoffii*, *A.nitrativus*, *A.haemolyticus* (с двумя вариантами - *haemolyticus* и *alcaligenes*). Все они цитохромоксидаза-отрицательны, неподвижны, утилизируют в минеральной среде этанол и, в зависимости от вида, глюкозу и (или) ацетат натрия. Ключевые признаки для *A.nitrativus* - окисление 10% лактозы, для *A.haemolyticus* - гемолиз, гидролиз желатина и продукция лецитиназы, для *A.lwoffii* - отсутствие всех этих свойств, но способность утилизировать ацетат натрия и этанол в минеральной среде.

5.4. Род *Moraxella* представлен 7 видами. Общие ключевые признаки: р.цитохромоксидаза положительна, подвижность и окисление глюкозы и других углеводов отсутствует. *M.calcoaceticus* и *M.croatica* способны утилизировать ацетат натрия в минеральной среде без дополнительных ростовых факторов, различаясь по способ-

ности ассимилировать нитрат натрия, а *M. atlantica* не утилизирует ни тот, ни другой источник С. *M. bovis* и *M. lacunata* расщепляют желатин, но последняя для проявления этой активности требует добавления к среде кровяной сыворотки или солей жирных кислот с высоким содержанием атомов углерода (бутират, каприат). *M. bovis* обладает выраженной гемолитической активностью, а при использовании "шоколадного" агара гемолитическую активность проявляет и *M. lacunata*, которая, в отличие от *M. bovis* продуцирует нитратазу, как и *M. nonliquefaciens* и в меньшей степени *M. phenylpyruvica*. Последняя деацетирует фенилаланин и триптофан. Спорным является наличие фенилаланин-деаминазы у *M. cetylalis*. И, наконец, *M. bovis* и *M. lacunata* разжижают свернутую кровяную сыворотку. Провизорная группа "М5" будучи сходной с *M. osloensis* по большинству ключевых признаков, отличается по отсутствию способности утилизировать ацетат натрия в минеральной среде. Группа "М6" отличается от прочих видов моракселлы по отсутствию каталазы.

5.5. *Aeromonas xylooxidans*, входящий в группу цитохромоксидаза-положительных несакхаролитов, единственным в этой группе окисляет ксилосу, особенно четко при 10% концентрации последней. Провизорные группы этого рода "Vd-1", "Vd-2" и "Vd-3" (*Aerobacter radiobacter*) отличаются от *A. xylooxidans* по энергичной уреазной активности, последние две по окислению сахарозы, мальтозы и маннита.

5.6. *Flavobacterium meningosepticum* отличается от сходной с ним по другим признакам *Pseudomonas cerealis* по отсутствию окисления сахарозы, а от сходных видов рода *Aeromonas* и провизорной группы "I" по окислению маннита. Для этого НЭМ, как и для *P. maltophilia* и *P. cerealis* характерно двойное отношение к окислительной реакции: они положительны по оксидазе и отрицательны по цитохромоксидазе.

5.7. Виды рода *Bordetella*, в зависимости от цитохромоксидазной реакции расположены в первой и второй таблицах. Отличия их от сходных НКМ других родов даны в таблицах. Вид *B. pertussis* исключен из таблиц, как требующий особых методов культивирования. Для *B. bronchiseptica* характерна высокая уреазная активность (гидролиз мочевины в первые 4 часа инкубации) и отсутствие утилизации нитрата натрия в минеральной среде (потребность в дополнительных факторах роста), в отличие от провизорной группы "IV-2a", ассимилирующей нитрат натрия. Провизорная группа "IVe" отличается от *B. bronchiseptica* по редукции нитрата до образования свободного азота.

5.8. Наиболее распространенный и изученный вид рода *Aerobacter* - *A. faecalis*, отличается от сходных с ним *P. acidovorans* по утилизации нитрата натрия, а от *B. bronchiseptica* по отсутствию уреазной активности. Виды *A. odorans* и *A. liquefaciens* объединены в таблице 2 с *A. faecalis*, поскольку ключевыми признаками этих видов (по *Вегану* - синонимов *A. faecalis* служат нитратная активность и выделение при редукции нитрата (*A. denitrificans*) или нитрита (*A. odorans*) свободного азота. Однако, нитратаза обнаружена и у 43-82% *A. faecalis* свежесделанные штаммы которого могут также выделять свободный азот. Виды *A. paragotus*, *A. entrophus* и *A. aquamarinus* необычны по окислению глюкозы, а последний и мальтозы, и включены в таблицу 3 как подлежащие дальнейшему изучению с позиций их принадлежности к роду *Pseudomonas* (сходство в строении ДНК).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В целях облегчения идентификации выделенных при исследовании объектов окружающей среды грамотрицательных неферментирующих микроорганизмов (НФМ), представляющих медицинский (эпидемиологический) и санитарный (гигиенический) интерес, предлагается наиболее существенные ключевые признаки, систематизированные по основной решающим ключевым признакам на группы: 1. Цитохромоксидаза-отрицательных НФМ; 2. Цитохромоксидаза-положительных не окисляющих глюкозу (несахаралитов) НФМ и 3. Цитохромоксидаза-положительных, окисляющих глюкозу (сахаралитов) НФМ, с подразделением в каждой группе на основе окисцации мальтозы и подвижности на подгруппы и с последующим использованием других ключевых признаков. Применение такой систематизированной идентификации, основанной на небольшом наборе тестов, позволит ориентироваться в большом количестве разнообразных по своим свойствам НФМ и дифференцировать их от сапрофитных и хемолитотрофных НФМ, обитающих в воде и почве.

Достаточность данного набора ключевых признаков для идентификации основных, имеющих медицинское и санитарное значение неферментирующих микроорганизмов, обоснована изучением большого количества штаммов НФМ, выделенных на протяжении трех лет из воды поверхностных водоемов, сточных водосточей и объектов окружающей среды в лечебных учреждениях.

Ограниченный набор предназначенных для идентификации НФМ методов и питательных сред, не требующих специального лабораторного оборудования, дефицитных, импортных или дорогостоящих реактивов и материалов, может быть использован не только в лабораторных научно-исследовательских институтах и кафедрах гигиенического и эпидемиологического профиля, но и в санитарно-эпидемиологических станциях по соответствующим показаниям.