

ВЫДЕЛЕНИЕ И ТИПИРОВАНИЕ БАКТЕРИИ *PSEUDOMONAS PUTIDA*

Д.А. Васильев, Д.А. Викторов, И.И. Богданов, А.Г. Шестаков
Научно-исследовательский инновационный центр
микробиологии и биотехнологии УГСХА, г. Ульяновск.

Бактерия *Pseudomonas putida* является возбудителем псевдомоноза прудовых рыб. Вспышки данного заболевания регистрируются чаще в форме энзоотии в водоемах России и других стран, применяющих промышленные методы рыбоводства. Псевдомонозом болеют карпы, караси, пестрые и белые толстолобики, белые и черные амур, буффало и другие карповые рыбы, в том числе аквариумные. Заболевают рыбы в возрасте от сеголетков до производителей, но чаще — сеголетки и двухлетки. Источником возбудителей заболевания являются больные рыбы, их трупы, дикие рыбы-бактерионосители, обитающие в водоемных источниках. Они передаются прямым контактом и опосредованно через воду, с орудиями лова, тарой, спецодеждой, а также при перевозках рыб. Заражение происходит через поврежденный кожный покров и жабры.

Современные методы диагностики псевдомонозов опираются в основном на клинические признаки, которых достаточно лишь для того, чтобы дифференцировать псевдомонозы от других заболеваний рыб: аэромоноза, хронических токсикозов, ассоциативных инфекций. Возбудителем псевдомоноза рыб могут являться не только бактерии вида *Pseudomonas putida*, но и ряд других патогенных штаммов флюоресцирующих бактерий рода *Pseudomonas*, вызывая схожие клинические признаки. Чаще встречаются следующие виды: *Pseudomonas cyprinisepticum*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aureofaciens*, *Pseudomonas chlororaphis*, *Pseudomonas dermoalba*, *Pseudomonas intestinalis*. В связи с этим при выборе методов борьбы и профилактики крайне важно дифференцировать псевдомонозы по виду возбудителя.

Целью исследования является разработка схемы выделения и системы тестов для идентификации *Pseudomonas putida*. Данная цель достигалась путём предварительного изучения биологических свойств референс-

штаммов *Pseudomonas putida* (№901, IV-89; ATCC 12633 IV-87), полученных из коллекции института имени Тарасевича, подбора имеющихся тестов и конструирования оригинальных питательных сред.

В дальнейшем объектами для исследования являлись сточные воды города Ульяновска. Первоначальным этапом схемы выделения мы предлагаем посев 1 мл исследуемого субстрата на 5 мл предложенной нами синтетической среды — бульон с сукцинатом натрия и солями следующего состава: сукцинат натрия — 4,0 г, нитрат калия — 0,5 г, фосфат калия двузамещённый — 0,5 г, фосфат калия однозамещённый — 0,1 г, сульфат магния — 0,2 г, хлорид кальция — 0,1 г, вода дистиллированная — 1 л.

Сукцинат натрия в данной среде служит единственным источником углерода и доступен в качестве питательного субстрата для бактерий неферментирующей группы. Нитрат калия служит источником азота, фосфат калия двузамещённый, фосфат калия однозамещённый, сульфат магния и хлорид кальция необходимы для обеспечения биохимических процессов в клетках *Pseudomonas putida*. После 48-72 часов культивирования при оптимальной для *Pseudomonas putida* температуре (30°C) наблюдалось образование взвеси бактериальной массы, поверхностной плёнки, осадка, в некоторых случаях окраска среды в желтовато-зеленоватый цвет, очевидно, за счёт выделяемых бактерией пигментов. Рост бактерий на данной среде указывает на их способность использовать сукцинат натрия в качестве единственного источника углеродного питания. Из бульона с сукцинатом натрия и солями осуществляли посев на чашки Петри с предлагаемой нами селективной средой следующего состава: фурадонин — 160,0 мг, глюкоза 10,0 г, пептон — 2,0 г, калий фосфорнокислый двузамещённый — 0,05 г, магний сернокислый — 0,1 г, бромтимоловый синий

– 0,03 г, агар-агар – 15,0 г, вода дистиллированная – 1 л. Фурадонин в данной среде присутствует в качестве ингибирующего агента, подавляющего рост грамположительных палочек и кокков и грамотрицательных палочек семейства Enterobacteriaceae. Пептон является источником аминокислот, калий фосфорнокислый двузамещённый и магний сернокислый обеспечивают электролитный состав среды, необходимый для биохимических процессов. Бромтимоловый синий присутствует в среде для индикации повышения кислотности за счёт окисления глюкозы. После культивирования на данной среде в течение 48 часов при 30°C с её поверхности отбивали колонии различной морфологии, но дающие положительную реакцию, то есть утилизирующие глюкозу путём окисления. Положительная реакция при этом характеризуется изменением цвета индикатора бромтимолового синего с зеленоватого цвета до жёлтого, что вызвано снижением pH среды за счёт окисления глюкозы.

На этом этапе при использовании разработанной нами схемы выделения и питательных сред было выделено 65 штаммов, относящихся к бактериям неферментирующей группы.

После получения чистых культур микроорганизмов проводилось исследование их биохимических свойств по предлагаемым нами тестам: тест на оксидазу, тест на каталазу, рост на агаре с 0,2% хлоридом бария, изучение тинкториальных свойств, тест на подвижность, рост при 4°C в течение 120 часов, рост при 41°C в течение 120 часов, рост на бульоне с ацетамидом, тест на желатиназу.

Все 65 выделенных культур бактерий были способны использовать сукцинат натрия в качестве источника углерода, утилизировали глюкозу путём окисления, являлись оксидазо- и каталазоположительными. Для постановки теста на оксидазу использовался 1% раствор 2-N-диметилпарафенилендиамина, теста на каталазу – 3% раствор перекиси водорода, которые наносили на колонии 24-часовой культуры бактерий на мясопептонном агаре. Положительная реакция теста на оксидазу характеризовалась приобретением розовой окраски бактериальных колоний с нанесённой на них каплей 1% раствора 2-N-диметилпарафенилендиамина в течение 3

минут. Положительная реакция на каталазу – вспенивание капли перекиси водорода, нанесённой на бактериальные колонии, за счёт образования пузырьков кислорода. Устойчивость бактерий к солям двухвалентного бария проверялась методом посева бактериальных культур на чашки Петри с мясопептонным агаром с добавлением 0,2% хлорида бария и последующей 24-часовой выдержкой при 30°C. Положительная реакция, характерная для бактерий рода *Pseudomonas*, проявлялась в отсутствии роста на данной среде.

Все псевдомонады при окраске по Граму выявляются как грамотрицательные палочки, подвижные благодаря наличию полярных жгутиков. Подвижность выявлялась методом микроскопии бактериальной взвеси в препарате раздавленная капля.

Для теста на способность к утилизации ацетамида использовалась питательная среда следующего состава: ацетамид – 10,0 г, натрий хлористый – 5,0 г, калия гидрофосфат – 1,39 г, калия дигидрофосфат – 0,73 г, магния сульфат – 0,5 г, феноловый красный – 0,012 г, агар-агар – 15,0 г, вода дистиллированная – 1 л. Результат оценивался после 24-часовой выдержки при 30°C. При наличии у исследуемых штаммов способности к утилизации ацетамида на данной среде наблюдался рост бактерий с изменением цвета индикатора фенолового красного с оранжевого до малинового за счёт защелачивания среды ионами аммония при утилизации ацетамида. Для вида *Pseudomonas putida* характерно отсутствие способности к утилизации ацетамида.

Способность к росту при 4°C и 41°C, а также способность разжижать желатин, исследовались для дифференцирования *Pseudomonas putida* от штаммов других псевдомонад, отличающихся по этим признакам. Оценка способности к росту при 4°C и 41°C проводилась культивированием в питательном бульоне при соответствующей температуре в течение 120 часов. Для *Pseudomonas putida* характерна способность к росту при 4°C и отсутствие роста при 41°C. **Определение фермента желатиназы** (тест на разжижение желатина) проводили по стандартной методике – путём засева чистой культуры уколом в столбик застывшего 15%-ного раствора желатина в питательном бульоне с последующей инкубацией при 30°C в течение 48 часов. Результат данного теста

Таблица - Результаты тестов, проведённых на 65 выделенных штаммах

Тест (в скобках указана реакция, характерная для <i>Pseudomonas putida</i>)	Количество штаммов с положительными для <i>Pseudomonas putida</i> результатами
Рост на бульоне с сукцинатом натрия (+)	65
Реакция на элективной среде с глюкозой и фурадопином (+)	65
Оксидаза (+)	65
Каталаза (+)	65
Рост на агаре с 0,2% хлоридом бария (-)	65
Окраска по Граму (-)	65
Подвижность (+)	64
Рост при 4°C (+)	65
Рост при 41°C (-)	64
Рост на бульоне с ацетамидом (-)	64
Тест на желатиназу (-)	36

для *Pseudomonas putida*, по нашим данным, отрицателен, то есть бактерия *Pseudomonas putida* не содержит фермента желатиназы и не способна к разжижению желатина.

После выполнения всех вышеперечисленных тестов нами были получены результаты, приведённые в таблице.

Исходя из этих данных, нами был сделан вывод, что из 65 выделенных культур,

33 штамма (50,8%) проявляют аналогичные свойства, что позволяет отнести их к виду *Pseudomonas putida*.

Таким образом, разработанная нами схема позволяет дифференцировать *Pseudomonas putida* от других видов бактерий, выделять данный микроорганизм из объектов окружающей среды, а также правильно диагностировать псевдомоноз рыб.

Литература

1. Беляков В.Д., Ряпис Л.А. Сапрофиты медицинского значения и природа их патогенности на примере псевдомонад // Экология возбудителей сапронозов. М., 1988. С.7-20.
2. Викторов Д.А., Богданов И.И., Шестаков А.Г, Васильев Д.А. Разработка системы тестов для выделения и идентификации *Pseudomonas putida*. Материалы международной научно-практической конференции «Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения», Ульяновск., ГСХА, т. 4, 2009.
3. Рубан Е.Л. Физиология и биохимия представителей рода *Pseudomonas*. М.: Наука, 1986.
4. Смирнов В.В., Киприанова Е.А. Бактерии рода *Pseudomonas*. Киев. Наукова думка, 1990, с. 176-187.
5. Campanella L., Russo M.V. Prevention by *Pseudomonas putida* of the benzene accumulation in tumor and normal tissues (pilot study). *Exp Oncology* 2002; 24: 231-233.