

ОСОБЕННОСТИ РАСПРОСТРАНЕНИЯ БАКТЕРИЙ РОДА *PSEUDOMONAS* В ВОДНОЙ ЭКОСИСТЕМЕ РЕКИ КУБАНИ

Ключевые слова: *Pseudomonas*, река Кубань, водная экосистема, пробы воды.

Введение

Водная толща реки Кубани заселена большим количеством микроорганизмов.

Определение общей численности *Pseudomonas* в естественных водах является **актуальным** на современном этапе исследований, так как распределение и видовой состав бактерий этого рода играют важную роль в санитарно-микробиологическом аспекте.

Распределение представителей рода *Pseudomonas* в реке Кубани связана с определением их доли в микробном сообществе, а также роли в экосистеме реки в целом.

Изучение видового состава необходимо для экологического мониторинга качества воды в реке Кубани, так как отдельные виды *Pseudomonas* относятся к потенциально патогенным бактериям, и поэтому некоторые учёные предлагают использовать *Pseudomonas aeruginosa* в качестве дополнительного индикатора качества воды [1]. Поэтому идентификация различных представителей рода *Pseudomonas* и изучение их биологических свойств является актуальной проблемой современности.

Бактерии рода *Pseudomonas* – большая гетерогенная группа микроорганизмов, широко населяющих биосферу и принимающие активное участие в процессах минерализации органических соединений, очищении окружающей среды от загрязнения. Они являют собой пример истинного космополитизма, в основе которого лежит их высокая биохимическая лабильность, обеспечивающая им приспособляемость к разнообразным условиям среды [2].

Цель исследования: выделить, идентифицировать и изучить морфологические, культуральные, тинкториальные и биохимические свойства видов рода *Pseudomonas* в реке Кубани, а также их распределение в воде и придонных слоях воды.

Задачи:

- выявить, идентифицировать представителей рода *Pseudomonas* в воде реки Кубани на глубине 10 и 50 см;
- исследовать количественный состав *Pseudomonas*, выделенных в кубанской воде в весенне-летний период;
- изучить закономерности распределения бактерий рода *Pseudomonas* в воде на глубине 10 и 50 см.

Материалы и методы

Исследование проводили в весенне-летний период 2010 г. с поверхности реки Кубани вблизи населённого пункта Старая Станица и лесной зоны г. Армавира. Изучение микрофлоры речной воды проводили на базе бактериологической лаборатории СЭС г. Армавира.

Отбор проб проводили с использованием помостов в местах, где глубина реки не менее 0,5 м.

Поверхностные пробы отбирали стерильным батометром в ёмкости (1-2 л), специально предназначенные для этих целей, плотно закрывающиеся резиновыми пробками с интервалами 3-5 минут [3].

Глубинные пробы отбирали специальным батометром, предназначенным для этих целей.

Поверхностные пробы отбирали с глубины 10 см от поверхности воды, а придонные пробы – 50 см от дна.

Пробы воды отбирали 1 раз в месяц в 3-кратной повторяемости каждого образца. За весь период исследования было проанализировано около 30 проб кубанской воды.

Отобранную пробу воды маркировали и в сопроводительных документах указывали места отбора проб, дату, время забора и другую информацию (температуру воды, погодные условия).

Доставку проб воды осуществляли в контейнерах – холодильниках при температуре 4°C.

Вне лаборатории проводили первичную обработку проб воды (фильтрование).

В лаборатории воду отстаивали 2 ч. После этого надосадочную жидкость сливали, осадок разливали в пробирки ёмкостью по 20 мл и центрифугировали в течение 5 мин. при 1500 об/мин. [4].

Надосадочную жидкость сливали, а полученный осадок использовали для идентификации бактерий рода *Pseudomonas*.

Экспериментальная часть

Для определения бактериального состава пробы воды высевали на плотные питательные среды: 5%-ный кровяной агар, МПА с 2%-ным глицерином, ГРМ-агар [5].

На данных средах изучали 2 группы микроорганизмов: гетеротрофов и представителей рода *Pseudomonas*. Затем проводили отбор типичных колоний *Pseudomonas*.

Санитарно-бактериологические анализы воды выполняли с использованием метода десятикратных серийных разведений.

Колонии бактерий пересевали на первично-дифференцирующие среды (Кларка, Хью-Лейфсена, ацетамидный агар, Кинг-Б) и использовали системы индикаторные бумажные (СИБы).

Все засеянные питательные среды инкубировали в течение 24 ч при температуре 37°C.

Для определения максимальных и минимальных температур роста колоний посе́вы инкубировали в термостате при оптимальной $t = 37^\circ\text{C}$, а также в холодильнике при $t = 5^\circ\text{C}$ в течение 18-24 ч и рН среды 7,2-7,4.

Среду Кинг Б использовали для усиления способности псевдомонад продуцировать сине – зелёный пигмент пиоцианин, ярко-красный – пиорубин и бурый – пиовердин.

Среду Хью-Лейфсена с глюкозой применяли для определения способности псевдомонад окислять глюкозу до глюконовой кислоты в аэробных условиях. Посев производили в два столбика агара, один из которых заливали 1 мл стерильного вазелинового масла. Посевы инкубировали в термостате в течение 24 ч при $t = 37^\circ\text{C}$.

Ацетамидный агар использовали для дифференциальной диагностики *Ps. aeruginosa*, поскольку она обладает способностью использовать ацетамид в качестве единственного источника азота и углерода.

Морфологические и тинкториальные свойства клеток (формы, размеры, их

подвижность) изучали с помощью окраски мазков по Граму и Синёву, также микроскопировали нативные препараты.

Окраску жгутиков производили по методу Лёффлера в модификации Пешкова.

Гемолитическую активность определяли при просмотре через 24 ч колоний, выросших на 5%-ном кровяном агаре.

Наличие зон просветления вокруг колонии указывает на наличие в культуре гемолиза.

Для изучения продукции каталазы на предметное стекло наносили каплю 3%-ного раствора перекиси водорода и петлёй вносили исследуемую суточную культуру. Образование пузырьков газа подтверждало положительную каталазную активность.

Гидролиз крахмала определяли путём обработки агаровой пластинки раствором Люголя. Для этого на поверхность среды наливали 3-5 мл раствора Люголя. Среда, содержащая крахмал, окрашивалась в синий цвет, а зона гидролиза оставалась бесцветной.

С помощью индикаторных бумаг СИБ определяли способность колоний образовывать цитохромоксидазу. Исследуемую культуру наносили на смоченную физиологическим раствором индикаторную бумагу. При положительной реакции на месте нанесения культуры появлялось сильнее окрашивание бумаги в течение 30 с.

Остальные биохимические тесты (лецитиназа, манит и др.) определяли с помощью СИБ.

Характерной особенностью большинства представителей рода *Pseudomonas* является положительный тест на образование цитохромоксидазы, а также образование различных пигментов (сине-зелёного, зеленовато-жёлтого, флуоресцирующего фиолетового, красного и др.).

В зависимости от условий роста и состава питательной среды пигменты образуются в различных количественных соотношениях, и поэтому окраска культуральной среды может изменяться. Иногда какой – либо из пигментов может утрачиваться совсем. Все виды, входящие в этот род, являются каталазоположительными, дают отрицательные реакции на индол, не реагируют с метиловым красным и не образуют ацетилметилкарбинола.

Морфологию колоний, размер, пигментообразование, цвет, структуру, определяли при культивировании на плотных питательных средах.

На МПА *Ps. fluorescens* отмечается диссоциация на 3 колониальных типа:

- 1) желтовато-серые, слабо выпуклые, маслянистой консистенции;
- 2) слизистые, выпуклые, розоватые, крупные;
- 3) розоватые, более плотные, мелкие.

Колонии *Ps. putida* на МПА образуют круглые, гладкие, с блестящей поверхностью, желтоватые, прозрачные колонии.

Ps. alcaligenes при росте на кровяном агаре образует колонии с тонкими, неровными, «ползущими» краями.

Колонии *Ps. putida* на МПА образует круглые, гладкие, с блестящей поверхностью, желтоватые прозрачные колонии.

Ps. aeruginosa на МПА образует зеленоватые слизистые колонии.

При росте на МПА *Ps. diminuta* образует колонии белого цвета.

Ps. pseudoalcaligenes характеризуется способностью окислять сахара и расти при 42°C, образуя на кровяном агаре колонии серовато-белого цвета.

Ps. maltophilia на МПА образует слизистые, выпуклые к центру, желтовато-серые, более жёлтые в центре колонии.

Идентификацию микроорганизмов проводили на основании морфологических, культуральных, тинкториальных,

биохимических свойств в соответствии с Определителем бактерий Берджи [6].

Статистическая обработка данных проводилась в пакете программ Microsoft Office Excel 2003 (Корпорация Microsoft, 2003).

Обсуждение результатов

Биоразнообразие бактерий рода *Pseudomonas*, высеянных из воды реки Кубани на глубине 10 и 50 см, представлена следующими видами: *Ps. acidovorans*, *Ps. alcaligenes*, *Ps. fluorescens*, *Ps. putida*, *Ps. aeruginosa*, *Ps. ceracia*, *Ps. diminuta*, *Ps. maltophilia*, *Ps. pseudoalcaligenes*, *Ps. putida*, *Ps. putrefaciens*, *Ps. stutzeri*, *Ps. testosteroni*, *Ps. mendocina*, *Ps. caryophylli*.

Условно-патогенные виды *Ps. aeruginosa*, *Ps. ceracia*, и *Ps. caryophylli* выделили из воды вблизи населённого пункта Старая Станица, так как там имеется влияние хозяйственно-бытовых сточных вод и других антропогенных факторов.

Наибольшее количество представителей рода *Pseudomonas* наблюдалось в пробах, взятых на глубине 10 см, что составляло 54,6% от количества гетеротрофов в летний период в районе населённого пункта Старая Станица.

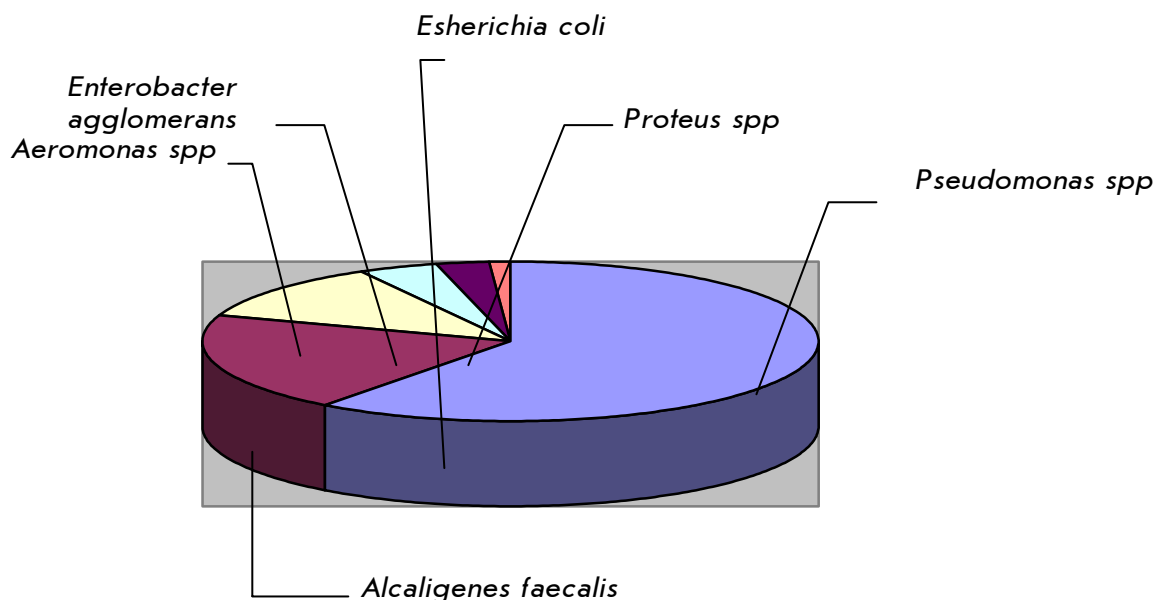


Рис. 1. Качественный состав микрофлоры воды реки Кубани на глубине 10 см

Численность бактерий рода *Pseudomonas*, выделенных из воды реки Кубани в весенне-летний период 2010 г., %

Место отбора проб	Глубина 10 см		50 см	
	весенний период	летний период	весенний период	летний период
Район Старой Станицы	33,9	54,6	15,6	23,2
Район Лесхоза	21,5	34,3	11,3	17,7

В поверхностных слоях преобладают в основном сапрофитные и условно-патогенные формы микроорганизмов: *Ps. acidovorans*, *Ps. alcaligenes*, *Ps. fluorescens*, *Ps. putida*, *Ps. cepacia*, *Ps. diminuta*, *Ps. maltophilia*, *Ps. pseudoalcaligenes*, *Ps. putida*, *Ps. aeruginosa*, *Ps. putrefaciens*, *Ps. stutzeri*, *Ps. testosteroni*, *Ps. caryophylli*, *Ps. mendocina*.

В летнее время с повышением температуры воды и увеличением содержания взвешенного вещества в реке Кубани количество сапрофитной и условно-патогенной флоры возрастает как в районе населённого пункта, так и в районе армавирского лесхоза (54,6 и 34,3%; 23,2 и 17,7%) в зависимости от глубины взятия проб.

Мозаичность распространения микроорганизмов в воде на различной глубине связана с неоднородностью рельефа и влиянием течений.

Выводы

В ходе экспериментальной работы идентифицировано 15 видов рода *Pseudomonas* в пробах воды из реки Кубани на глубине 10 и 50 см: *Ps. acidovorans*, *Ps. alcaligenes*, *Ps. fluorescens*, *Ps. putida*, *Ps. cepacia*, *Ps. diminuta*, *Ps. maltophilia*, *Ps. pseudoalcaligenes*, *Ps. putida*, *Ps. putrefaciens*, *Ps. stutzeri*, *Ps. aeruginosa*, *Ps. testosteroni*, *Ps. caryophylli*, *Ps. mendocina*.

В микрофлоре воды на глубине 10 и 50 см доминировали условно-патогенные бактерии родов *Pseudomonas* и *Aeromonas*.

Весной численность *Pseudomonas* на глубине 10 см в районе Старой Станицы составила 33,9%, 50 см – 15,6%. В летнее время численность бактерий данного рода в районе населённого пункта на глу-

бине 10 см составляла 54,6%, 50 см – 23,2%.

В водах реки Кубани, протекающей в районе армавирского лесхоза, численность *Pseudomonas* в весенний период на глубине 10 см составляла 21,5%, 50 см – 11,3%. Численность этих микроорганизмов в летний период составляла на глубине 10 см – 34,3%, 50 см – 17,7%.

Виды *Ps. fluorescens*, *Ps. putida*, *Ps. stutzeri*, *Ps. mendocina* выделяются повсеместно.

Виды *Ps. aeruginosa*, *Ps. cepacia*, *Ps. caryophylli* выделяются в основном в водах вблизи населённых пунктов там, где имеется влияние хозяйственно-бытовых сточных вод, а также связано с неоднородностью рельефа и влиянием течений и составляют менее 1% в районе населённого пункта и отсутствуют в водах реки, протекающей на территории лесхоза.

Библиографический список

1. Кузнецов С.И. Микробиологическое изучение внутренних водоёмов / С.И. Кузнецов, В.И. Романенко. – М.: Наука, 1963.
2. Рубан Е.Л. Физиология и биохимия представителей рода *Pseudomonas* / Е.Л. Рубан. – М.: Наука, 1986.
3. МУК 4.2. 1884-04. Санитарно-микробиологический, санитарно-паразитологический анализ воды поверхностных водных объектов. – М., 2004.
4. ГОСТ 18963-73. Методы санитарно-биологического анализа воды. – М.: Стандартинформ, 2006.
5. Нетрусов А.И. Практикум по микробиологии / А.И. Нетрусов. – М.: АСА-DEMIA, 2005.
6. Хоулт Дж. Определитель бактерий / Дж. Берджи Хоулт, Н., Криг П. Снит. – М., 1997.

