

УДК 579

Е. А. Василенко, А. А. Лещенко

## МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВЫЖИВАЕМОСТИ В ОБЪЕКТАХ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ БАКТЕРИЙ РОДА *PSEUDOMONAS* – ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ДЕСТРУКТОРОВ ЭКОТОКСИКАНТОВ

Освоение человечеством углеводов как относительно недорогого и доступного источника энергии остро ставит вопрос нанесения серьёзного ущерба окружающей среде в процессе их добычи и транспортировки.

Многие виды псевдомонад патогенны для человека и животных, тем не менее бактерии рода *Pseudomonas* принимают активное участие в процессах очистки окружающей среды от антропогенных загрязнений. Принимая во внимание постоянно растущую экологическую нагрузку и медленные темпы естественной очистки природных экосистем, вопрос использования углеводородокисляющих микроорганизмов для биоремедиации поражённых углеводородами объектов окружающей среды становится особенно востребованным, позволяя тем самым рассматривать бактерии рода *Pseudomonas* как перспективный объект в области биотехнологии. В статье рассмотрены методы определения выживаемости в объектах внешней среды бактерий рода *Pseudomonas* – потенциальных деструкторов экотоксикантов.

*Ключевые слова:* псевдомонады, углеводороды, выживаемость, нефтезагрязнение, экотоксиканты.

Развитие промышленности напрямую связано с ростом числа используемых химических веществ. Это, в свою очередь, приводит к проблеме загрязнения экотоксикантами объектов окружающей среды, достигшей в наше время глобальных масштабов и охватывающей не только сферы охраны экологии, безопасности здоровья и жизни населения, микробиологии и биотехнологии, но также и юридические и социальные области знаний.

В условиях возрастающей добычи углеводородного сырья Россия остро нуждается не только в существенном приросте его запасов, но и в углублённом изучении и создании новых и более безопасных технологий промышленной разработки источников углеводородов, глубокозалегающих и приповерхностных скоплений нефти и газа, в технологиях очистки почвы от нефтяного загрязнения [1]. Присутствие экотоксикантов в окружающей среде вызывает гибель населяющих её организмов, снижение иммунитета, аллергические реакции, изменение наследственности, нарушение естественного хода природных процессов [2].

Целесообразность использования биологических методов очистки объектов окружающей среды обусловлена способностью микроорганизмов к превращению различных органических веществ, ксенобиотиков в утилизируемую форму. Ещё в начале XX века была показана способность микроорганизмов к окислению нефти и её отдельных компонентов [3, 4]. Однако даже такой, казалось бы, экологичный подход к очистке окружающих экосистем требует тщательной проработки вопроса использования микроорганизмов в замкнутых технологических циклах. Даже если биопрепараты на основе микроорганизмов будут обладать «аборигенностью» по отношению к условиям их внедрения, то нельзя не принимать во внимание их возможные патогенные свойства, что при определённых обстоятельствах может вызвать осложнения.

Представители рода *Pseudomonas* способны усваивать большое число органических субстратов, в том числе гетероциклические и ароматические соединения, не используемые другими бактериями [5]. Так как естественное самоочищение природных экосистем происходит с весьма низкой скоростью, следует принять во внимание, что разработка и совершенствование технологий биоремедиации сточных вод, питьевой воды, а особенно рекультивации почв, загрязнённых нефтепродуктами, является областью активных и перспективных исследований [6].

Данная статья ставит целью описание методов определения выживаемости в объектах окружающей среды бактерий рода *Pseudomonas*, участвующих в деструкции экотоксикантов, для обозначения перспектив их дальнейшего практического использования в биотехнологических отраслях.

Благодаря своей нетребовательности псевдомонады встречаются повсеместно: в почве, водоёмах, сточных водах, воздухе, на растениях, а, следовательно, выделение материала для изучения экологии и распространённости псевдомонад в окружающей среде возможно из любого вышеперечисленного источника. Но так как в поднятой нами теме затрагивается вопрос выживаемости бактерий рода *Pseudomonas* в объектах окружающей среды, будет целесообразно выделять их из водных источников: реки Вятки и водопроводной сети. Обеспечение населения города качественной питьевой водой является одной из важнейших биотехнологических задач, касающихся, в том числе, профилактики инфекционных заболеваний.

Для предварительной идентификации псевдомонад из окружающей среды используется цетримидный агар. Данная среда является селективной для *P.aeruginosa*, так как входящие в состав питательной среды соединения четвертичного аммония (цетримид или цетилтриметиламмоний бромид), селективно ингибируют рост других бактерий.

Таблица 1

#### Состав питательной среды с цетримидом

Состав	г/л
Перевар панкреатический желатина	20,0
Магния хлорид	1,4
Калия сульфат	10,0
Цетримид	0,3
Агар-агар	15,0
Дистиллированная вода, см <sup>3</sup>	1000

В питательную среду дополнительно вносится глицерин (10 мл на 1 л бульона). Нагревают среду на слабом огне до полного растворения компонентов, охлаждают до температуры (45-55) °С. Устанавливают рН так, чтобы он составлял (7,2±0,2) ед. рН при температуре 25°С, после чего среду стерилизуют в течение 15 минут в автоклаве при температуре (121±1) °С. Среда в чашках мутная, светло-коричневая. Исследуемый материал распределяется по поверхности питательной среды. Инкубируют в течение 48 часов при температуре 35 °С [7]. Выросшие колонии высевают на чашки с МПА для получения чистой культуры, идентификации культурально-морфологических, тинкториальных, биохимических и других свойств.

*P. aeruginosa* обладает широким спектром приспособительных черт: характеризуется ростом в широком диапазоне температур (4-42) °С, что указывает на способность длительно сохраняться в условиях повышенной температуры тела больного. Данный вид характеризуется хорошим ростом на простых питательных средах в аэробных условиях при температуре (30-37) °С, а также при температуре 42°С, что используется как один из дифференциально-диагностических признаков.

Выживаемость бактерий рода *Pseudomonas* исследуют путём введения в колбы со стерильной и нестерильной водой суточных суспензий агаровых культур штаммов бактерий синегнойной палочки в конечной концентрации  $1 \times 10^6$  КОЕ/мл. Контаминированные образцы воды хранят при комнатной температуре. В дальнейшем через определённые промежутки времени проводят высевы из заражённых объектов на цетримидный агар, подсчитывают количество выросших колоний. Полученные в итоге сведения позволяют судить о сроках выживаемости и способности к размножению синегнойных палочек в стерильной воде.

Микроорганизмы рода *Pseudomonas* также характеризуются высоким уровнем резистентности к различным антимикробным веществам. Данная особенность может быть обусловлена наличием у бактерий ферментов,

разрушающих или модифицирующих антибиотики, а также особенностями строения их липополисахаридов [8].

Антибиотическую устойчивость штаммов псевдомонад определяют методом серийных разведений антибиотического препарата в плотной питательной среде, проводя посев исследуемых штаммов микроорганизмов на поверхность агаровой пластинки, содержащей последовательные двойные разведения антибиотиков.

Сначала готовят серию разведений антибиотического препарата, где концентрация каждого последующего разведения должна быть в 2 раза меньше предыдущего. Затем в стерильную и ещё не застывшую агаризованную питательную среду, соблюдая все правила асептики, вносят растворы антибиотиков (1 часть рабочего антибиотического раствора на 9 частей расплавленной питательной среды). Посев производят суспензией, содержащей  $1 \times 10^7$  КОЕ/мл, чего можно добиться разведением стандарта микробной суспензии, соответствующей стандарту 0,5 по МакФарланду в 10 раз. Одновременно с этим проводят контрольный высев партии штаммов на питательную среду в чашках Петри без антибиотических веществ, осуществляя тем самым контроль чистоты культуры высева образцов на неселективные питательные среды. Инкубируют при температуре 35 °С в течение 24 часов. За минимальную ингибирующую концентрацию принимают то значение, при котором была вызвана полная задержка видимого роста.

Вторым методом определения антибиотикоустойчивости является диско-диффузионный метод, который основан на способности антибиотиков диффундировать из пропитанных ими бумажных дисков в питательную среду. К качеству питательных сред и для определения антибиотикоустойчивости методом диффузионных дисков выдвигаются те же требования, что и при постановке предыдущей методики.

Для посева используют стандартную суспензию микроорганизмов, соответствующую по плотности 0,5 по стандарту МакФарланда и содержащую

примерно  $1,5 \times 10^8$  КОЕ/мл. Аппликацию дисков производят стерильным пинцетом, аккуратно прижимая диск с антибиотиком к поверхности агаровой пластинки с целью обеспечения её плотного прилегания. Инкубируют при температуре 35 °С в течение 24 часов. Диаметр зон ингибирования роста измеряют с точностью до 1 мм, желательно на тёмной поверхности для их более точной регистрации.

С целью изучения ростовых свойств псевдомонад в условиях присутствия нефтепродуктов, как основного источника углерода, используется агар с нефтью, информация о котором была разработана И. П. Погорельским с соавторами [9]. Данная среда предоставляет возможность выращивания бактерий любого вида и рода, содержащих наследуемые системы биодеструкции углеводородов нефти [10] с целью приготовления посевного материала для глубинного культивирования в ферментёре при параметрах, оптимальных для микроорганизмов-деструкторов, получения биомассы и приготовления на их основе биопрепаратов для очистки и рекультивации почв, подверженных нефтяному загрязнению.

Таблица 2

### Состав питательной среды с нефтью

Состав	г/л
NaCl	5,0
Аммоний фосфорнокислый однозамещенный ( $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ )	1,0
Калий фосфорнокислый двузамещенный ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )	1,0
Магний сернокислый ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	0,2
Агар-агар	15,0
Нефть	5,0
Глюкоза	1,0
Дистиллированная вода, см <sup>3</sup>	1000

Навеску солей растворяют в дистиллированной воде и устанавливают рН 7,5. Солевою основу и агар-агар в течение 15 минут автоклавируют при

температуре  $(121 \pm 1)$  °С. Сразу после стерилизации к агаризованной солевой основе добавляют 1,0 г глюкозы, предварительно растворенной в 5,0 мл дистиллированной воды и стерилизованной фильтрованием через микропористый фильтр (размер пор 0,2 мкм). Затем в растопленную питательную среду вливают 5,0 г сырой нефти и в горячем виде подвергают обработке на ультразвуковом низкочастотном диспергаторе (УЗДН-1) при рабочей частоте  $(35 \pm 1)$  кГц в течение 2-2,5 минут. Полученную суспензию, содержащую эмульгированную нефть, разливают в стандартные чашки Петри. После охлаждения питательная среда с нефтью и глюкозой готова к использованию.

Обработка разогретой в процессе автоклавирования питательной среды после внесения глюкозы и нефти ультразвуком позволяет получить гомогенную, нерасслаивающуюся эмульсию агаризованной среды с нефтью, которая после охлаждения обеспечивает рост нефтеокисляющих микроорганизмов и позволяет характеризовать колонии по морфологическим признакам.

Суспензию бактерий псевдомонад высевают на поверхность застывшей питательной среды в чашках Петри. Посевная доза составляет  $(9,5-9,8) \times 10^4$  КОЕ/мл. Посевы инкубируют при температуре 37 °С в течение 48 часов. В качестве контроля используют лабораторный штамм *E. coli* 803. Присутствие в питательной среде нефти способствует усилению роста псевдомонад, которые используют углеводороды нефти в качестве источника углерода, в то время как бактерии штамма *E. coli* 803 такой способностью не обладают.

После выращивания культуры бактерий производят смыв с поверхности агаровой пластинки 0,85%-ным раствором NaCl (5 мл с одной чашки Петри в 3-х повторях). Затем делают серийные разведения суспензий и последующий их высеив на питательную среду с целью определения концентрации бактерий в 1 мл смыва.

Полученные в результате опыта данные позволяют оценить степень ассимиляции углеводов нефти исследуемыми штаммами бактерий рода *Pseudomonas*.

Таким образом, анализ источников литературы по теме статьи позволяет судить о высокой приспособляемости бактерий рода *Pseudomonas*, что и обуславливает их выживаемость и, как следствие, – широкую распространённость в окружающей среде. Описанные в статье методики, позволяют нам также экспериментально убедиться в этом, и рассматривать псевдомонад с точки зрения реализации биодеструктивного потенциала в биотехнологических сферах для создания биопрепаратов, нацеленных на эффективную деструкцию экотоксикантов.

### Список литературы

1. Гиниятуллина Д. Р. Проблемы исследования и освоения углеводов (краткий обзор зарубежных публикаций). Ч. 2 // Вестник Казанского технологического университета: Охрана окружающей среды. Экология человека. 2012. № 9 (15). С. 212–213.
2. Экотоксиканты : учеб.-метод. пособие для лекционного курса «Химия в экологии» / Н. А. Улахович, М. П. Кутырева, Э. П. Медянцева, С. С. Бабкина. Казань : Изд-во Казан. гос. ун-та. 2010. 56 с.
3. Таусон В. О. К вопросу об усвоении парафина микроорганизмами // Журнал русского ботанического общества. 1925. Т. 9. С. 161–179.
4. Таусон В. О. Бактериальное окисление сырых нефтей // Нефтяное хозяйство. 1928. Т. 14. № 2. С. 220–230.
5. Шлегель Г. Г. Общая микробиология : пер. с нем. М. : Мир, 1987. 567 с. : ил.
6. Вельков В. В. Стандартизация формата описаний промышленных технологий биоремедиации // Биотехнология. 2001. № 2. С. 70–76.
7. ГОСТ Р 54755-2011. Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества бактерий вида *Pseudomonas aeruginosa*.
8. Захарова И. Я., Танатар Н. В. Липополисахариды бактерий рода *Pseudomonas* // Микробиол. журн. 1984. 46, № 6. С. 78–92.
9. Патент № 2390555 Российская Федерация. Питательная среда для выращивания углеводородокисляющей бактерий с повышенной деструктивной способностью / И. П. Погорельский, В. И. Дробков, Р. Ш. Зиганшин; заявитель и патентообладатель ФГУ «48 ЦНИИ» Минобороны России. № 2008141195/13; заявл. 16.10.2008; опубл. 27.05.2010.

10. *Ветрова А. А.* Деструкция нефти бактериями рода *Pseudomonas*, содержащими различные плазмиды биодegradации / А. А. Ветрова, А. А. Овчинникова, А. Е. Филонов и др. // Известия ТулГУ. Естественные науки. 2008. № 2. С. 186–193.

**ВАСИЛЕНКО Евгений Александрович** – студент Института микробиологии и биотехнологии, кафедры микробиологии, Вятский государственный университет. 610000, г. Киров, ул. Московская, 36.

E-mail: [evgeniiodintsov@mail.ru](mailto:evgeniiodintsov@mail.ru)

**ЛЕЩЕНКО Андрей Анатольевич** – доктор технических наук, профессор кафедры микробиологии, Вятский государственный университет. 610000, г. Киров, ул. Московская, 36.

E-mail: [leshchenko58@mail.ru](mailto:leshchenko58@mail.ru)