

ЕЛЕНА СЕРГЕЕВНА ОБУХОВА

аспирант кафедры зоологии и экологии животных эколого-биологического факультета, Петрозаводский государственный университет (Петрозаводск, Российская Федерация)
Obyhova_elena@mail.ru

НАТАЛЬЯ АНАТОЛЬЕВНА СИДОРОВА

кандидат биологических наук, доцент кафедры фармакологии, организации и экономики фармации, микробиологии и гигиены медицинского факультета, Петрозаводский государственный университет (Петрозаводск, Российская Федерация)
vanlis@petrsu.ru

ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА АХРОМОГЕННЫХ ВИДОВ РОДА *PSEUDOMONAS* В УСЛОВИЯХ ДИНАМИКИ ТЕРМИЧЕСКОГО РЕЖИМА КУЛЬТИВИРОВАНИЯ*

Доминирующей группой бактерий в микрофлоре водоемов Карелии является род *Pseudomonas*. Такое положение в биоценозе может быть обусловлено приспособленностью микроорганизмов к действию внешней среды. Наиболее значимым фактором физической природы является воздействие температуры. Целью данной работы стало изучение влияния температуры на параметры роста и развития *Pseudomonas alcaligenes* и *Pseudomonas cichoril*. Исследованию подвергались 25 ахромогенных штаммов *Pseudomonas alcaligenes* и *Pseudomonas cichoril*, выделенных из водоемов Карелии и аутофлоры рыбы. Микроорганизмы культивировали на мясопептонном бульоне (МПБ) при температуре от 5 до 35 °С в течение 24–120 ч. Скорость роста, время достижения максимальной плотности и скорость генерации устанавливали спектрофотометрически. В ходе исследований показано, что наибольшая скорость роста у *Pseudomonas alcaligenes* и *Pseudomonas cichoril* отмечается при культивировании с температурой 15 °С, наименьшее время достижения максимальной плотности у *Pseudomonas alcaligenes* – 15 °С, у *Pseudomonas cichoril* – 20 °С.

Ключевые слова: псевдомонады, температурный фактор, скорость роста, скорость генерации

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время все большее внимание исследователей привлекают различные виды бактерий с высокой экологической пластичностью [9], [11]. Распространенные бактерии, такие как *Pseudomonas*, способны модулировать экспрессию генов в ответ на широкий круг стрессоров окружающей среды, обеспечивая физиолого-биохимическую адаптацию. Данные литературы свидетельствуют, что представители рода *Pseudomonas* являются одной из доминирующих культивируемых групп микроорганизмов, изолируемых из кишечника различных видов рыб. Псевдомонады наряду с аэромонадами являются типичными представителями водных микробиоценозов и нормофлоры рыб [7]. В больших количествах они представлены в грунтах и прудовой воде [3].

Физиологическое поведение бактериальных клеток часто зависит от температуры и обеспечивается посредством терморегулируемых доменов. Обширные литературные данные свидетельствуют, что при акклиматизации пойкилотермных организмов к низкой температуре, как правило, идут значительные внутриклеточные перестройки, включая увеличение разме-

ра клеток, повышение активности ферментов и изменение состава мембран [10], [11]. В связи с этим цель данной работы заключалась в том, чтобы оценить влияние динамики температуры на активность *Pseudomonas alcaligenes* и *Pseudomonas cichoril*.

МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ

Для исследования в чистую культуру выделены 25 ахромогенных штаммов *Pseudomonas alcaligenes* и 25 – *Pseudomonas cichoril* из микрофлоры воды и аутофлоры форели. Оба вида характеризуются большим разнообразием условий обитания и, следовательно, обладают хорошими адаптационными возможностями, быстро приспосабливаясь к изменениям в окружающей среде, поэтому представляют собой удобные модели для изучения влияния температурного режима на физиологические свойства микроорганизмов. Бактерии культивировали на мясопептонном бульоне в колбах Эрлен – Мейера объемом 250 мл на круговой качалке (180–200 об./мин) при температуре от 5 до 35 °С в течение 24–120 ч. Физиологические параметры – скорость роста, время достижения максимальной плотности и скорость генерации – устанавливали спектрофотометрически.

Таблица 1
Влияние температуры на скорость роста
Pseudomonas alcaligenes (е. о. п.)

Время, ч	Т инкубирования						
	5 °С	10 °С	15 °С	20 °С	25 °С	30 °С	35 °С
0	0	0	0	0	0	0	0
24	0,10	0,20	0,23	0,23	0,13	0,09	0,09
48	0,11	0,40	0,72	0,62	0,34	0,31	0,30
72	0,22	0,60	0,85	0,65	0,58	0,36	0,29
96	0,45	0,80	0,89	0,89	0,89	0,57	0,41
120	0,63	1,20	1,30	0,90	1,00	0,80	0,72

Таблица 2
Время достижения максимальной
плотности (ч) и одной генерации – G (мин)
Pseudomonas alcaligenes (n = 25) при
разных температурах культивирования

Температурные условия культивирования	Время достижения max P	G
5 °С	27,12 ± 0,53	31,12 ± 0,41
10 °С	18,24 ± 0,51	29,45 ± 0,38
15 °С	16,11 ± 0,48	24,56 ± 0,36
20 °С	17,20 ± 0,43	27,54 ± 0,34
25 °С	21,30 ± 0,49	29,35 ± 0,38
30 °С	24,80 ± 0,52	31,16 ± 0,41
35 °С	27,82 ± 0,53	32,48 ± 0,43

Таблица 3
Время достижения максимальной
плотности (ч) и одной генерации – G (мин)
Pseudomonas cichoril (n = 25) при разных
температурах культивирования

Температурные условия культивирования	Время достижения max P	G
5 °С	32,16 ± 0,47	30,60 ± 0,39
10 °С	25,31 ± 0,27	30,24 ± 0,37
15 °С	21,20 ± 0,24	29,11 ± 0,32
20 °С	18,42 ± 0,19	21,40 ± 0,26
25 °С	24,50 ± 0,26	31,10 ± 0,33
30 °С	27,80 ± 0,32	35,24 ± 0,48
35 °С	28,20 ± 0,33	35,40 ± 0,48

Таблица 4
Влияние температуры на скорость роста
Pseudomonas cichoril (е. о. п.)

Время, ч	Т инкубирования						
	5 °С	10 °С	15 °С	20 °С	25 °С	30 °С	35 °С
0	0	0	0	0	0	0	0
24	0	0,09	0,29	0,12	0,09	0	0
48	0,23	0,56	0,67	0,25	0,34	0,26	0,18
72	0,34	0,78	0,78	0,67	0,42	0,37	0,28
96	0,39	0,92	0,89	0,74	0,64	0,62	0,54
120	0,76	0,98	1,21	0,92	0,83	0,72	0,69

Для расчета продолжительности одной генерации (мин) псевдомонад при разных температурных условиях использовали формулу [6]:

$$G = (0,3010 \cdot t) / (\log b - \log a),$$

где t – время роста популяции; b – количество бактерий через заданный период культивирования; a – количество засеянных бактерий.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В ходе исследований установлено, что при экспозиции 48, 72 и 120 ч наибольшая скорость роста *Pseudomonas alcaligenes* наблюдается при температуре 15 °С. При 24-часовой экспозиции получен одинаковый показатель – 0,23 при температурах 15 и 20 °С, а при 96-часовой – 0,89 при температурах 15, 20 и 25 °С (табл. 1).

Наименьшее время, за которое популяция *Pseudomonas alcaligenes* достигает максимальной плотности, 16,11 ± 0,48 ч, при этом генерация составляет 24,56 ± 0,36 мин. Такие данные получены при температуре культивирования 15 °С (табл. 2).

Для *Pseudomonas cichoril* наименьшая скорость достижения максимальной плотности составляет 18,42 ± 0,19 и наблюдается при условиях культивирования с температурой 20 °С, генерация в таком случае равна 29,11 ± 0,32 (табл. 3).

Для роста *Pseudomonas cichoril* оптимальной температурой также является 15 °С, в трех вариантах инкубирования из пяти при этом значении оптическая плотность максимальна и составляет соответственно 0,29; 0,67 и 1,25 единиц для времени экспозиции 24; 48 и 120 ч. При инкубировании 72 ч получен одинаковый показатель – 0,78 при температуре 10 и 15 °С, а при экспозиции 96 ч наибольший рост зафиксирован при температуре 10 °С и составляет 0,92 е. о. п. (табл. 4).

По результатам изучения влияния температуры на особенности роста и скорость генерации *Pseudomonas alcaligenes* и *Pseudomonas cichoril* можно отметить, что температура выполняет ведущую роль в популяционной изменчивости бактерий. Установлен оптимальный температурный диапазон для *Pseudomonas alcaligenes* и *Pseudomonas cichoril* – 15–25 °С, который наряду с питательным субстратом является направляющим и стабилизирующим фактором отбора. При переходе от низких температур (5 °С) к высоким (35 °С) создается стрессовая ситуация, усиливающая гетерогенность популяции, вследствие чего увеличивается потенциальная возможность освоения штаммами новой экологической ниши. Снижение температуры может привести к возникновению у псевдомонад способности к прототрофному питанию. В таких условиях проявляются сапрофитические свойства микроорганизма, позволяющие ему долго сохраняться в окружающей среде.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучены физиологические свойства *Pseudomonas alcaligenes* и *Pseudomonas cichoril* в условиях динамики термического режима культиви-

рования. Установлено влияние температуры на скорость роста и скорость генерации исследуемых штаммов. Показано, что температурный оптимум для изучаемых микроорганизмов – 15–25 °C.

* Работа выполнена при поддержке Программы стратегического развития ПетрГУ в рамках реализации комплекса мероприятий по развитию научно-исследовательской деятельности на 2012–2016 гг., а также при поддержке программы «Умник».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Воробьев А. А., Гинцбург А. Л., Бондаренко В. М. Мир микробов // Вестник РАМН. 2000. № 11. С. 11–14.
2. Йегер Л. Клиническая иммунология и аллергология. М.: Медицина, 1990. Т. 1. 721 с.
3. Каховский А. Е. Распределение сапротрофных бактерий родов *Aeromonas* и *Pseudomonas* по акватории рыбоводного пруда // Болезни рыб и водная токсикология. М.: ВНИИПРХ, 1987. С. 21–30.
4. Лукьяненко В. И. Иммунология рыб. Врожденный иммунитет. М.: Агропромиздат, 1989. 347 с.
5. Миллер Г. Г. Биологическое значение ассоциаций микроорганизмов // Вестник РАМН. 2000. № 1. С. 45–51.
6. МУК 2293–81. Методические указания по санитарно-микробиологическому исследованию почвы. 1981. 87 с.
7. Нур Эльдин Ами М. А. О частоте выделения из органов клинически здоровых белых толстолобиков условно-патогенных бактерий *Aeromonas punctata* и *Pseudomonas* // Тез. докл. VI Всесоюзного совещания по болезням и паразитам рыб. М., 1974. С. 169–172.
8. Harikrishnan R., Balasundaram C., Heo M.-S. Fish health aspects in grouper aquaculture // Aquaculture. 2011. № 320. P. 1–21.
9. Hartig C., Loffhagen N., Harms H. Formation of trans fatty acids is not involved in growth-linked membrane adaptation of *Pseudomonas putida* // Appl. Env. Microbiol. 2005. Vol. 71. P. 1915–1922.
10. Klein W., Weber M. H. W., Marahiel M. A. Cold shock response of *Bacillus subtilis*: isoleucine-dependent switch in the fatty acid branching pattern for membrane adaptation to low temperatures // J. Bacteriol. 1999. Vol. 181. P. 5341–5349.
11. Medeot D., Bueno M., Dardanelli M., Garcia de Lema M. Adaptational changes in lipids of *Bradyrhizobium** SEMIA 6144 nodulating peanut as a response to growth temperature and salinity // Curr. Microbiol. 2007. Vol. 54. P. 31–35.

Obukhova E. S., Petrozavodsk State University (Petrozavodsk, Russian Federation)

Sidorova N. A., Petrozavodsk State University (Petrozavodsk, Russian Federation)

PHYSIOLOGICAL FEATURES OF ACHROMOGENIC SPECIES OF GENUS *PSEUDOMONAS* IN DYNAMIC CONDITIONS OF THERMAL CULTIVATION

The dominant group of bacteria in microbial flora of Karelian water is *Pseudomonas* genus. This biocenosis phenomenon is observed in Karelian water basins due to high adaptive ability of the microorganisms. The most important physical factor affecting adaptive characteristics of the studied microorganisms is external temperature. Therefore, the aim of this work is to reveal and study the effect of thermal actions on growth parameters and development of *Pseudomonas alcaligenes* and *Pseudomonas cichoril*. 25 achromogenic strains of *Pseudomonas alcaligenes* and *Pseudomonas cichoril* allocated from Karelian water reservoirs and autoflora of fish were researched. Microorganisms were cultivated in beef-extract broth (BCH) at temperatures ranging from 5 to 35 °C for 24–120 hours. Spectrophotometric analysis identified bacteria's growth rate, time required to reach the maximum density, and generation rate. The research showed that the highest growth rate in *Pseudomonas alcaligenes* and *Pseudomonas cichoril* is observed when cultivation temperature reaches 15 °C. The shortest time to reach the maximum density of *Pseudomonas alcaligenes* is achieved at the temperature of –15 °C, and *Pseudomonas cichoril* –20 °C.

Key words: *Pseudomonas*, temperature factor, the rate of growth, the generation

REFERENCES

1. Vorob'ev A. A., Gintsburg A. L., Bondarenko V. M. The world of microbes [Mir mikrobov]. Vestnik RAMN [Herald of the Russian Academy of medical Sciences]. 2000. № 11. P. 11–14.
2. Yeger L. Klinicheskaya immunologiya i allergologiya [Clinical immunology and allergology]. Moscow, Meditsina Publ., 1990. Vol. 1. 721 p.
3. Kakhovskiy A. E. Distribution of saprotrophic genera of bacteria *Aeromonas* and *Pseudomonas* in fishpond waters [Raspredelenie saprotrofnikh bakteriy rodov *Aeromonas* i *Pseudomonas* po akvatorii rybovodnogo pruda] // Bolezni ryb i vodnaya toksikologiya [Diseases of fish and aquatic toxicology]. Moscow, VNIIPRKH Publ., 1987. P. 21–30.
4. Luk'yanenko V. I. Immunobiologiya ryb. Vrozhdenyy immunitet [Immunological biology of fish. Innate immunity]. Moscow, Agropromizdat Publ., 1989. 347 p.
5. Miller G. G. Biological significance of associations of microorganisms [Biologicheskoe znachenie assotsiatsiy mikroorganizmov]. Vestnik RAMN [Herald of the Russian Academy of medical Sciences]. 2000. № 1. P. 45–51.
6. МУК 2293–81. Metodicheskie ukazaniya po sanitarno-mikrobiologicheskomu issledovaniyu pochvy [Methodical instructions on sanitary-microbiological study of soil]. 1981. 87 p.
7. Nur El'din Amin M. A. About the frequency allocation of bodies of clinically healthy white carp conditionally pathogenic bacteria *Aeromonas punctata* and *Pseudomonas* [O chastote vydeleniya iz organov klinicheski zdorovykh belykh tolstolobikov uslovno-patogennykh bakteriy *Aeromonas punctata* i *Pseudomonas*]. Tezisy dokladov VI vsesoyuznogo soveshchaniya po boleznyam i parazitam ryb [Abstracts of all-Union meeting on the diseases and parasites of fishes]. Moscow, 1974. P. 169–172.
8. Harikrishnan R., Balasundaram C., Heo M.-S. Fish health aspects in group aquaculture // Aquaculture. 2011. № 320. P. 1–21.
9. Hartig C., Loffhagen N., Harms H. Formation of trans fatty acids is not involved in growth-linked membrane adaptation of *Pseudomonas putida* // Appl. Env. Microbiol. 2005. Vol. 71. P. 1915–1922.
10. Klein W., Weber M. H. W., Marahiel M. A. Cold shock response of *Bacillus subtilis*: isoleucine-dependent switch in the fatty acid branching pattern for membrane adaptation to low temperatures // J. Bacteriol. 1999. Vol. 181. P. 5341–5349.
11. Medeot D., Bueno M., Dardanelli M., Garcia de Lema M. Adaptation changes in lipids of *Bradyrhizobium** SEMIA 6144 nodulating peanut as a response to growth temperature and salinity // Curr. Microbiol. 2007. Vol. 54. P. 31–35.

Поступила в редакцию 04.07.2013