

**УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ СХЕМЫ ВЫДЕЛЕНИЯ
PSEUDOMONAS AERUGENOSA
ИЗ ПАТОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА**

Артемова Анастасия Владимировна, магистрант

тел.: 8(8422) 55-95-47, artanast@yandex.ru

**Васильев Дмитрий Аркадьевич, доктор биологических
наук, профессор**

тел. 8(8422) 55-95-47, dav_ul@mail.ru

Ломакин Артём Андреевич, аспирант

тел. 8(8422) 55-95-47, artemy.lomkin@yandex.ru

ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ

Ключевые слова: *Pseudomonas*, *Ps. aeruginosa*, схема выделения, идентификация, биологические свойства

В статье представлены результаты исследований была разработана бактериологическая схема выделения и идентификации *Ps.aeruginosa* из патологического материала. Согласно разработанной нами бактериологической схеме можно провести выделение и идентификацию бактерий вида *Ps. aeruginosa* в течении 96 часов. Согласно разработанной нами бактериологической схеме можно провести выделение и идентификацию бактерий вида *Ps. aeruginosa* в течении 96 часов.

Введение. *Pseudomonas aeruginosa* является наиболее важным видом в ветеринарной медицине. Инфекции, вызванные этим агентом, становятся все более частыми; они могут возникнуть из-за производства токсинов, и вследствие образования биопленки. Разработанные ранее схемы идентификации *Pseudomonas aeruginosa* относятся к рутинным методам. Эти методы за счет многоступенчатости, значительно расходуют время

исследования. Однако, очевидно, что для оценки санитарного состояния объектов эта схема не приемлема [1-10].

Объекты и методы исследований. В работе были использованы референс-штаммы бактерий *Pseudomonas aeruginosa* -243 музея кафедры микробиологии, эпизоотологии и ВСЭ Ульяновской ГАУ. Так же в работе были использованы пробы полученные от животных с раневыми инфекциями.

В исследовании были использованы: ГРМ-бульон (НПО «Питательные среды», г. Махачкала), агар бактериологический (Испания), среда Эндо (НПО «Питательные среды», г. Махачкала), питательная среда Левина-ГРМ с эозинметиленовым синим для выделения патогенных и условно патогенных энтеробактерий (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск), агар висмут-сульфит для выделения сальмонелл (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск), ТТХ-агар (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск), агар Плоскирева-ГРМ (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск), среда МакКонки (TMmedia, Индия), среда для подсчета микробного числа (TMmedia, Индия), сыворотка КРС жидкая (Биолот, Россия), среда Симмонса (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск), среда Кристенсена с мочевиной (Himedia, Индия), цетримидный агар (Himedia, Индия), бульон с лизином / орнитином / аргинином (Himedia, Индия), агар Клиглера-ГРМ (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск), среды Гисса (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск), диски с антибиотиками (НИИ им. Пастера г. Санкт-Петербург) желатин (Россия), хлорид натрия (Россия), глюкоза (Россия), лактоза (Россия), хлорид бария (Россия) N,N-Диметил-N-фенилендиамин, 97% Sigma-Aldrich, перекись водорода (Россия). В работе были использованы публикации: «Егорова О. Н. Эпидемиология и профилактика синегнойной инфекции. Федеральные клинические рекомендации. – М., 2014. – 82 с. – 2014»; «MID 17: identification of *Pseudomonas* species and other non glucose fermenters// PublicHealthEngland, 2015».

Результаты исследований их обсуждение. Сперва было произведено исследование референс-штамма *Pseudomonas aeruginosa* -243. По результату

исследования было установлено, что бактерии являются грамотрицательными палочками с закруглёнными концами. В мазках клетки располагаются единично, парами, иногда образуют цепочки. Подвижность бактерий проверили несколькими методами, при помощи метода «висячей капли» и посевом в 0,4% полужидкий агар. В обоих случаях было установлено, что все штаммы бактерий *Ps. aeruginosa* обладают подвижностью. бактерии вида. Неприхотливы к разным субстратам и росту на различных питательных средах. *Ps. aeruginosa* растут на таких средах как ГРМ-бульон, среда Эндо, висмут-сульфит агар, среда Плоскирева, среда Левина, среда МакКонки, цитримидный агар, агар для подсчета микробного числа, ТТХ-агар. Также установлено что бактерии чувствительны к содержанию бария хлорда в среде в концентрации 8 грамм на литр. При росте на ГРМ-агаре с добавлением 15% сыворотки крови крупного рогатого скота через 24 часа культивирования при 37⁰С был детектирован гемолиз бэтта-типа. По результату проведенных исследований выявлено, что бактерии *Ps. aeruginosa* обладают окислительным типом метаболизма, ферментами каталаза и цитохромоксидаза. Бактерии ферментируют глюкозу, фруктозу, имеют положительную реакцию на OF-тест, расщепляют цитрат, утилизируют аргинин, разжижают желатин. Следующие характеристики были отрицательны: уреазная активность, ферментация лактозы дульцина, сахарозы, арабинозы, дульцита, маннозы, мальтозы, утилизация лизина и орнитина, продукция сероводорода.

Из представленных выше результатов была создана схема ускоренного выделения и идентификации бактерий вида *Ps. aeruginosa* из патологического материала. В основу схемы легли такие биологические свойства как морфология клеток, культуральные и биохимические свойства.

Забор материала предлагается осуществлять при помощи стерильных ватных тампонов и помещать в ГРМ-бульон. Культивировать бактерии рекомендуется в термостате при 37⁰С в течении 18-24 часов.

Вторым этапом производится посев на цетримидный агар. На этой среде происходит подавление сопутствующих бактерий в частности *E.coli* и *Staphylococcus aureus*. После инкубирования при 37⁰С в течении 18-24 часов проводится окраска по методу Грама колоний, морфологически схожих по типу с *Ps. aeruginosa*. Клетки колоний, окрасившихся как грамотрицательные палочки, следует проверить на наличие ферментов цитохромоксидаза и каталаза, которые присутствуют у *Ps.aeruginosa*. Отличительным свойством бактерий этого рода-флюоресценция. Ее можно детектировать при потоке ультрафиолетового света с длиной волны около 253 нм.

Третьим этапом необходимо получить чистую культуру выделенной бактерии. Колонии, которые соответствовали всем вышеизложенными свойствам, пересеивают на ГРМ-агар и культивируют при 37⁰С в течении 18-24 часов.

Выявление нефлоурисцирующих штаммов выполнить посев на ГРМ-агар с хлоридом бария.

При помощи разработанной схемы нами был выделен штамм *Ps.aeruginosa* из патологических образцов, полученных от животных с раневыми поражениями. Данный штамм проявлял свойства характерные для представителей этого вида описанные ранее в литературе.

По результату проведённых исследований можно сделать вывод, что выделанный штамм бактерий относится к виду *Pseudomonas aeruginosa*. При помощи разработанной схемы можно идентифицировать этот вид бактерий за 96 часов. По результату проведённых исследований было установлено, что выделенная бактериальная культура утилизировала цитрат натрия, окисляла глюкозу, маннит, обладала ферментом желатиновой и аргининдекорбоксилазой, растёт при 42⁰С. Следующие характеристики были отрицательными: окисление лактозы, мальтозы, фруктозы, сахарозы, дульцита, сорбита, утилизация мочевины. Характеристика выделенных

штаммов из пробы №2 и №7 с референс-штаммом *Pseudomona saeruginosa*-
243

Свойство	Штамм №2	<i>Ps. aeurogeonasa</i> 243
1	2	3
Рост на цетримидом агаре	+	+
Окраска по Граму	Грамотрицательные палочки	Грамотрицательные палочки
Оксидаза	+	+
Каталаза	+	+
Утилизация цитрата	+	+
Уреаза	-	-
ОФ-тест	+	+
Глюкоза	+	+
Лактоза	-	-
Разжижение желатина	+	-
Мальтоза	-	-
Маннит	+	-
Раффиноза	-	+
Флуоресценция	+	-
Рост с BaCl ₂	-	-
Аргинин	+	+
Рост при 42 ⁰ С	+	+

Для видовой типизации использовать следующие тесты: расщепление аргинина, цитрата, мочевины, расщепление желатина, ОФ-тест и рост при 42⁰С. По результату исследования выявлено, что выделенный штамм из пробы №2 обладает устойчивостью к фуросонину, импинему. Но бактерии чувствительны к представителям β-лактамных пенициллинов,

аминогликозидов, цефалоспоринов, карбипинемов, гликопептидам, фторхинолонам и к другим синтетическим антибиотикам.

Заключение. Было создана схема ускоренного выделения и идентификации бактерий вида *Ps.aeruginosa* из патологического материала. В основу схемы легли такие биологические свойства как морфология клеток, культуральные и биохимические свойства. Благодаря этой схеме можно произвести выделение и идентификацию *Ps.aeruginosa* в течении 96 часов. В результате исследования образцов по разработанной был выделен и идентифицирован штамм *Ps.aeruginosa* из патологических образцов, полученных от животных с раневыми поражениями. Данный штамм проявлял свойства характерные для представителей этого вида описанных ранее в литературе.

Библиографический список

1.Шестаков А. Г. и др. Разработка параметров получения максимального титра бактериофага PA04 *Pseudomonas aeruginosa* в клеточной культуре на плотной среде //Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения: материалы IX Международной научно-практической конференции, посвященной 75-летию Ульяновского государственного аграрного университета имени ПА Столыпина. 20-21 июня 2018 года.-Ульяновск: УлГАУ, 2018.-Часть 2. – УлГАУ, 2018.

2.Arsevska E. et al. Small animal disease surveillance: pruritus and *Pseudomonas* skin infections //Veterinary Record. – 2018. – Т. 183. – №. 6. – С. 182-187.

3.Cabassi C. S. et al. Activity of AMP2041 against human and animal multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates //Annals of clinical microbiology and antimicrobials. – 2017. – Т. 16. – №. 1. – С. 17.

4.de Melo A. C. C. et al. Characterization of a bacteriophage with broad host range against strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from domestic animals //BMC microbiology. – 2019. – Т. 19. – №. 1. – С. 134.

5.Hansen G. M. et al. Pseudomonas aeruginosa microcolonies in coronary thrombi from patients with ST-segment elevation myocardial infarction //PloS one. – 2016. – T. 11. – №. 12. – C. e0168771.

6.Pye C. Pseudomonas otitis externa in dogs //The Canadian Veterinary Journal. – 2018. – T. 59. – №. 11. – C. 1231.

7.Rahme L. G. et al. Use of model plant hosts to identify Pseudomonas aeruginosa virulence factors //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1997. – T. 94. – №. 24. – C. 13245-13250.

8.Saharan P., Duhan J. S., Gahlawat S. K. Detection of Pseudomonas fluorescens from broth, water and infected tissues by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method //African Journal of Biotechnology. – 2015. – T. 14. – №. 14. – C. 1181-1185.

9.Schroth M. N. et al. Epidemiology of Pseudomonas aeruginosa in agricultural areas //Journal of medical microbiology. – 2018. – T. 67. – №. 8. – C. 1191-1201.

10. Sharma D. et al. Mucoid Pseudomonas aeruginosa infection in a cat with sever chronic rhinosinusitis //Veterinary clinical pathology. – 2019.

IMPROVING THE ALLOCATION SCHEME PSEUDOMONAS AERUGINOSA FROM PATHOLOGICAL MATERIAL

Artemova A.V., Vasiliev D. A., Lomakin A.A..

Keywords: Pseudomonas, Ps.aeruginosa, a scheme for the isolation, identification, biological properties

The article presents the results of research and developed a bacteriological scheme for the isolation and identification of *Ps.aerugenosa* from pathological material. According to the bacteriological scheme developed by us, it is possible to isolate and identify Ps-type bacteria.aeruginosa for 96 hours. According to the

bacteriological scheme developed by us, it is possible to isolate and identify Ps-type bacteria.aeruginosa for 96 hours.