Бактериология, 2017, том 2, №1, с. 54–60
Bacteriology, 2017, volume 2, No 1, p. 54–60

DOI: 10.20953/2500-1027-2017-1-54-60

Определение специфической активности питательных сред для *Pseudomonas aeruginosa*

А.П.Шепелин, А.Б.Сергеева, О.В.Полосенко

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Российская Федерация

Остро стоящий вопрос экологической ситуации, современные разработки новых поколений антисептиков, широкое применение антибиотиков в медицине, в пищевой промышленности, сельском хозяйстве, небрежное использование антибактериальной терапии – все это ведет к модификации бактерий и появлению у них новых факторов патогенности. Среди многообразия микромира выделенная и описанная более ста лет назад синегнойная палочка является серьезной проблемой в различных областях жизни и по настоящее время.
Ключевые слова: Pseudomonas aeruginosa, питательные среды

Для цитирования: Шепелин А.П., Сергеева А.Б., Полосенко О.В. Определение специфической активности питательных сред для *Pseudomonas aeruginosa*. Бактериология. 2017; 2(1): 54–60. DOI: 10.20953/2500-1027-2017-1-54-60

Determination of nutrient medium specific activity for *Pseudomonas aeruginosa*

A.P.Shepelin, A.B.Sergeeva, O.V.Polosenko

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rospotrebnadzor, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation

Acute ecological problems; modern development of new generations of antiseptics; widespread usage of antibiotics in medicine, food industry, agriculture; carelessness usage of antibacterial therapy, all this causes bacteria modifications and their new pathogenicity feature.
Among the variety of the microcosm isolated and described over one hundred years ago *Pseudomonas aeruginosa* infection is currently a serious problem in various fields of life.
Keywords: Pseudomonas aeruginosa, culture medium

For citation: Shepelin A.P., Sergeeva A.B., Polosenko O.V. Determination of nutrient medium specific activity for *Pseudomonas aeruginosa*. Bacteriology. 2017; 2(1): 54–60. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2017-1-54-60

Семейство *Pseudomonadaceae*, к которому относится *P. aeruginosa*, включает свободноживущие грамотрицательные неферментирующие бактерии, которые обитают преимущественно в почве и воде и имеют ограниченное клиническое значение в патологии человека. В отличие от большинства представителей данного рода, синегнойная палочка является основным возбудителем псевдомонадных инфекций у человека и входит в состав его нормальной микрофлоры [1].

Характерной биологической особенностью синегнойной палочки является ее способность вырабатывать пигменты. Различают культуры, продуцирующие синий пигмент пиоцианин и желто-зеленый флуоресцеин. Некоторые штаммы, кроме того, выделяют другие пигменты: желтый (гемопиоцианин), красный (пиорубин) и черный (меланин). Культуры также имеют специфический запах, напоминающий запах цветущей липы. Синегнойная палочка обладает сравнительно слабой сахаролитической активностью. Имеет достаточно выраженные протеолитические свойства. Она легко приспосабливается к большинству антибиотиков, устойчива даже к очень высоким их концентрациям. Патогенна для человека [2].

Для корреспонденции:

Шепелин Анатолий Прокопьевич, доктор биологических наук, заместитель директора по научно-производственной работе ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Россия, Московская область, Серпуховский район, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: +7 (4967) 31-2157
E-mail: shepelin@obolensk.org

Статья поступила 25.11.2016 г., принята к печати 15.03.2017 г.

For correspondence:

Anatoly P. Shepelin, Sc.D., Deputy director of research and production, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology

Address: 142279 Obolensk, Serpukhov District, Moscow Region, Russia
Phone: +7 (4967) 31-2157
E-mail: shepelin@obolensk.org

The article was received 25.11.2016, accepted for publication 15.03.2017

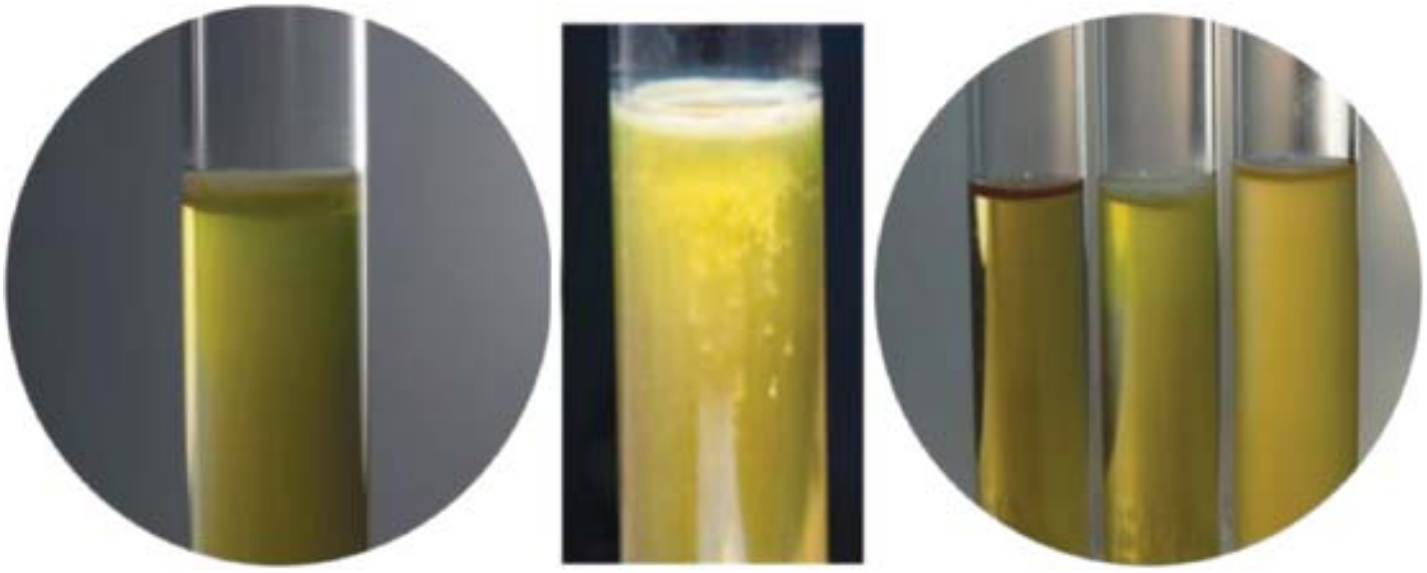


Рис. 1. ***Pseudomonas aeruginosa*** **на питательной среде №8 ГРМ (ФБУН ГНЦ ПМБ).**

Излюбленным местом обитания синегнойной палочки являются бассейны, где в межплиточном пространстве они создают целые колонии. Способность к образованию биопленок (колония синегнойных палочек формирует сплошной пласт, покрытый биополимером, который способен надежно защитить их от воздействия неблагоприятных факторов окружающей среды) и способность сохраняться в воде до 1 года при температуре 37°С создают целый спектр проблем в этой области.

Целый ряд особенностей позволяет синегнойной палочке также лидировать по частоте возникновения и внутрибольничных инфекций.

Основная опасность кроется в факторах патогенности синегнойной палочки:

• подвижность за счет жгутиков;

• способность выработки токсинов (эндотоксин, экзотоксин, эндогемолизин, фермент лейкоцидин), которые вызывают поражение эритроцитов, клеток печени, запуск интоксикации, гибель лейкоцитов в очагах;

• высокая устойчивость к ряду антибактериальных средств за счет способности образовывать вокруг своих колоний слизеподобную капсулу – гликокаликс (в частности, устойчива к бета-лактамам, аминогликозидам, фторхинолонам), что затрудняет эффективность лечебных мероприятий у таких больных [3];

• способность к неспецифической адгезии – бактерия обладает свойством прикрепляться к небиологическим объектам: катетерам, трубкам аппарата искусственной вентиляции легких, эндоскопам, хирургическим инструментам [4].

Все эти факторы создают необходимость лабораторного контроля больничных учреждений, а также контроля в области производства продуктов питания, лекарственных препаратов, косметической продукции и др. объектов в санитарной и клинической микробиологии.

Синегнойная инфекция характеризуется отсутствием клинически специфических симптомов, что значительно затрудняет постановку предварительного диагноза, и окончательный диагноз выставляется только после лабораторного обследования. Корректная идентификация *P. aeruginosa* и родственных микроорганизмов обусловлена, в первую очередь, различиями в их природной чувствительности (устойчивости) к антибиотикам [5]. Ведущим методом диагностики является бактериологический с последующей бактериоскопией.

Метод выявления бактерий вида *P. aeruginosa* при лабораторной диагностике на первом этапе включает предварительное обогащение в неселективной среде. Для этой цели используются различные питательные бульоны.

ФБУН ГНЦ ПМБ выпускает различные питательные среды для накопления и идентификации псевдомонад. Так, питательная среда №8 ГРМ предназначена для выращивания синегнойной палочки и стафилококков при контроле микробной загрязненности нестерильных лекарственных

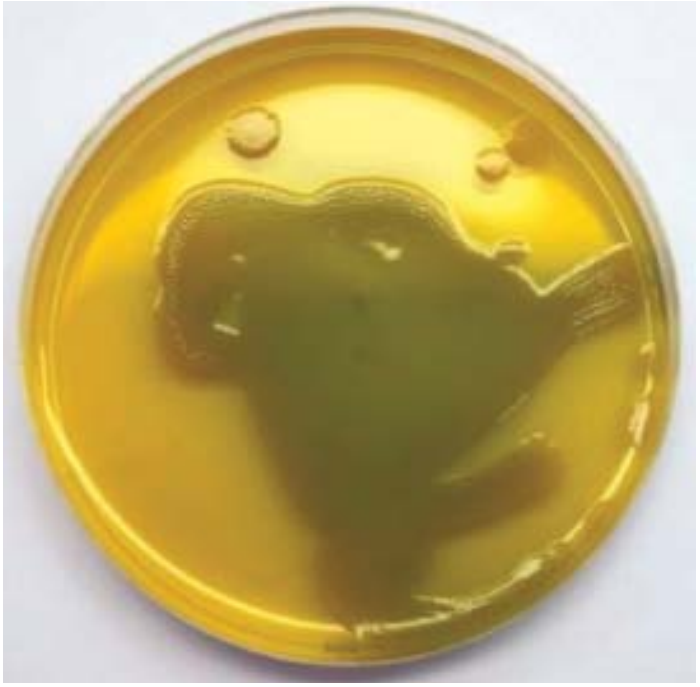


Рис. 2. **Рост *P. aeruginosa* 27/99 на ГРМ-агаре (ФБУН ГНЦ ПМБ).**

средств и других объектов, а также при проведении исследований в санитарной и клинической микробиологии.

Характерной особенностью бактерий *P. aeruginosa* является образование слизи. В связи с этим на жидких средах образуется особая серовато-серебристая пленка. При старении культур происходит образование мути с последующим выпадением слизистого осадка (рис. 1).

В качестве питательной среды для культивирования различных неприхотливых микроорганизмов, в том числе и синегнойной палочки, используется ГРМ-агар. Рост тест-штамма *P. aeruginosa* 27/99 на ГРМ агаре сопровождается образованием сине-зеленого пигмента через 18–20 ч инкубации при температуре (37 ± 1)°С (рис. 2).

Большинство штаммов синегнойной палочки производит пигмент пиоцианин, имеющий сине-зеленый цвет. Для выявления пигмента пиоцианина у синегнойной палочки при контроле микробной загрязненности нестерильных лекарственных средств, а также при проведении исследований в санитарной и клинической микробиологии используют среду № 9-ГРМ [6] (рис. 3).

На плотных питательных средах она диссоциирует на R-, S-, и M-формы, которые продуцируют характерные пигменты: пиоцианин (феназиновый пигмент сине-зеленого цвета), пиовердин (желто-зеленый флюоресцирующий в ультрафиолетовых лучах) и пиорубин (бурого цвета).

Рост псевдомонад на питательных средах ФБУН ГНЦ ПМБ вызывает интерес своим разнообразием.

1. На среде Плоскирева – ГРМ рост *P. aeruginosa* 453 наблюдается в виде мелких жемчужного цвета колоний, а на среде с эозин-метиленовым синим (среда Левина)

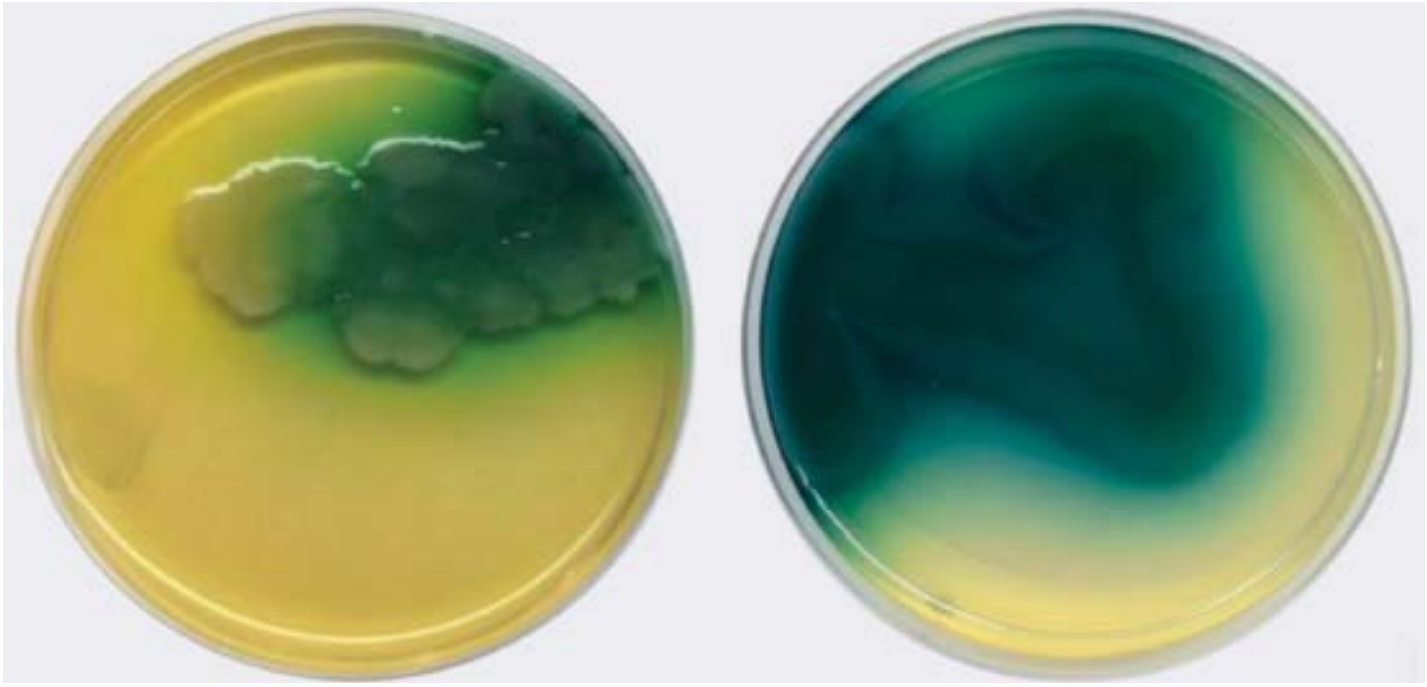


Рис. 3. ***P. aeruginosa*** **на среде №9 производства ФБУН ГНЦ ПМБ.**

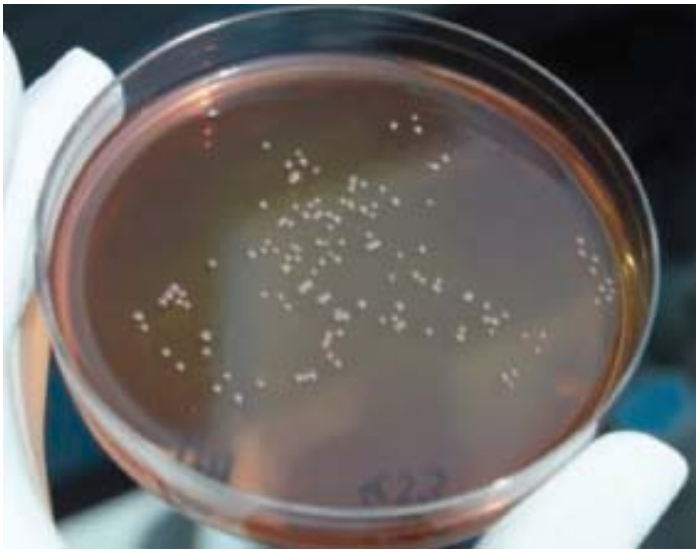


Рис. 4. **Рост *P. aeruginosa* 453 на агаре Плоскирева-ГРМ ФБУН ГНЦ ПМБ.**

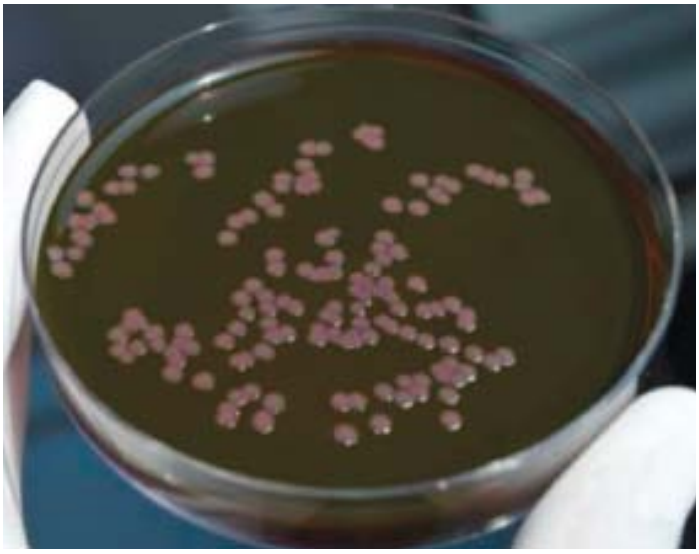
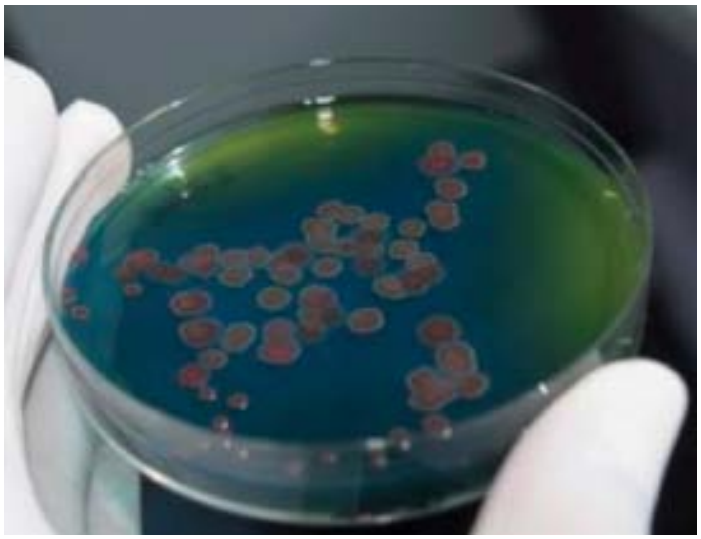


Рис. 5. **Рост *P. aeruginosa* 27/99 на среде Левина-ГРМ ФБУН ГНЦ ПМБ.**

Рис. 6. **Рост *P. aeruginosa* 27/99 на агаре Эндо-ГРМ ФБУН ГНЦ ПМБ.**

Рис. 7. **Рост *P. aeruginosa* 453 на Хромагаре ФБУН ГНЦ ПМБ.**



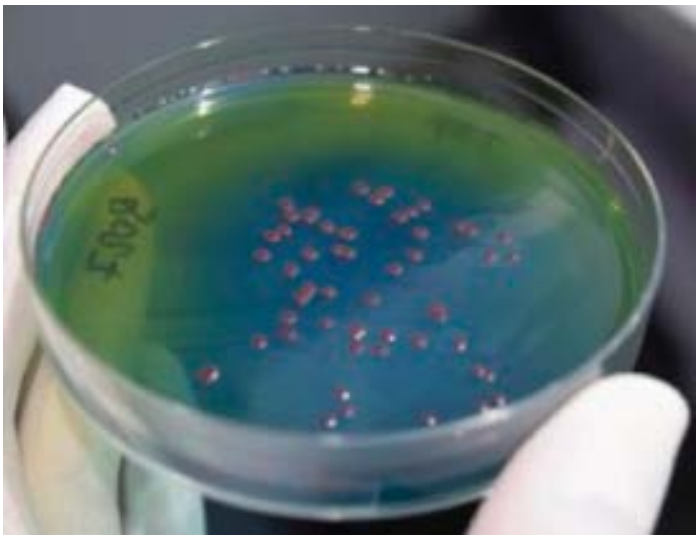


Рис. 8. **Рост *P. aeruginosa* 27/99 и *P. aeruginosa* АТСС 9027 на лактозном ТТХ агаре с тергитолом 7 ФБУН ГНЦ ПМБ.**

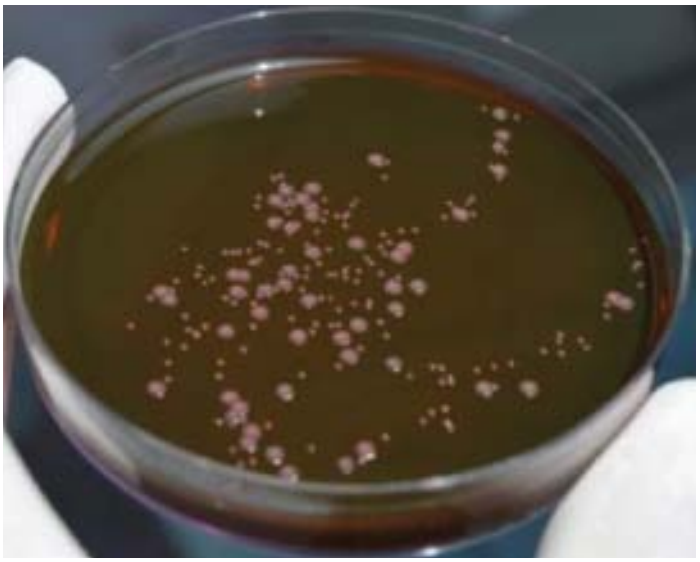


Рис. 9. **Рост *P. aeruginosa* 453 на кровяном агаре и среде Левина-ГРМ.**

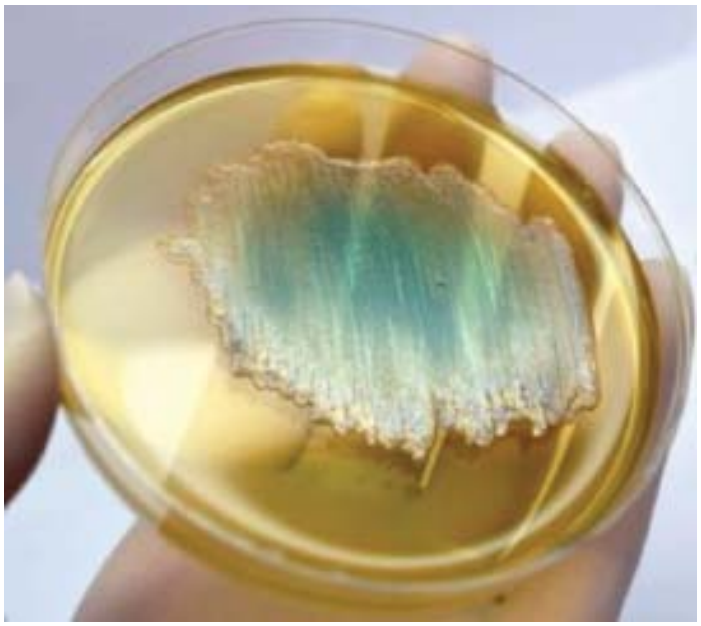


Рис. 10. **Феномен радужного лизиса *P. aeruginosa.***

P. aeruginosa 27/99 образует крупные розового цвета колонии (рис. 4, 5).

2. На среде Эндо тест-штамм *P. aeruginosa* 27/99 и на Хромагаре тест-штамм *P. aeruginosa* 453 соответственно образуют бесцветные непрозрачные в R- и S-форме колонии (рис. 6, 7).

3. На лактозном ТТХ агаре с тергитолом 7 тест-штамм *P. aeruginosa* 27/99 образует крупные красно-коричневого цвета с неровным краем и с синей зоной колонии, а тест-штамм *P. aeruginosa* АТСС 9027 растет в виде мелких круглых, красно-коричневого цвета с синей зоной колоний (рис. 8).

Диссоциация бактериальных клеток *P. aeruginosa*, возникающая спонтанно и характеризующаяся образованием отличающихся друг от друга колоний, наблюдается на различных плотных дифференциально-диагностических средах. Так, *P. aeruginosa* 453 на плотных средах формирует типы колоний R, S и M-формы (рис. 9).

На плотных средах у синегнойной палочки может наблюдаться феномен радужного лизиса – появление на поверхности колоний пленки, переливающейся всеми цветами радуги в отраженном свете (рис. 10) [7].

В бактериологической практике выделение типичных колоний и подтверждение их принадлежности к бактериям вида *P. aeruginosa* на агаризованной селективно-диагностической питательной среде проводят после предварительного обогащения исследуемого материала в неселективной среде с последующим подтверждением по отношению к окраске по Граму, образованию пигментов, наличию специфического запаха и по биохимическим признакам [8]. Это прежде всего положительный цитохромоксидазный тест, способность окислять глюкозу на среде Хью-Лейфсона в аэробных условиях, тест на подвижность, редукция нитратов, а также выявление термофильности (рост при 42°С и его отсутствие при 5°С).

В качестве селективных питательных сред чаще используют среды с ингибиторами: цетримидом и триклозаном.

Во ФБУН ГНЦ ПМБ разработана Селективная питательная среда с цетримидом (Цетримидный агар) для выделения *P. aeruginosa* из клинического материала, объектов внешней среды, пищевых продуктов и др. [9]. Питательная среда обеспечивает рост *P. aeruginosa* с соответствующим пигментом. Рост сопутствующих грамположительных и грамотрицательных бактерий в значительной степени ингибируется.

Ведущими зарубежными фирмами выпускаются питательные среды с цетримидом на основе желатина, мясного пептона и лактозы, а также содержащие калий сернокислый, магний хлористый, цетримид, агар, налидиксовую кислоту и глицерин. В цетримидном агаре в качестве белковой основы используется панкреатический гидролизат казеина, выпускаемый в НПО ПС, а дополнительно внесенный дрожжевой экстракт в состав питательной среды, содержащий витамины группы В, стимулирует оптимальные условия роста псевдомонад.

При разработке цетримидного агара магний хлористый заменен на магний сернокислый, что в присутствии фосфатов калия приводит к усилению образования пигмента (рис. 11). Кроме того, замена калия сернокислого на одно- и двухзамещенные фосфаты калия улучшает дифференцирующие свойства за счет поддержания буферной емкости среды.

Рис. 11. **Рост *P. aeruginosa* 27/99 на селективной питательной среде для выделения псевдомонад (Цетримидный агар) ФБУН ГНЦ ПМБ.**

Рис. 12. **Слева направо: рост тест-штамма *P. aeruginosa* 453 на питательной среде для контроля микробной загрязненности (Питательная среда № 13 ГРМ) ФБУН ГНЦ ПМБ, контроль (незасеянная пробирка).**

Для усиления ингибирующего эффекта в отношении сопутствующей микрофлоры в состав питательной среды дополнительно внесена налидиксовая кислота.

Ввиду того, что синегнойная палочка является значимым патогеном для человека и способна занимать различные экологические ниши, при разработке питательных сред для выделения и идентификации микроорганизмов, *P. aeruginosa* используется как один из важных контрольных тест-штаммов.

Синегнойная палочка обладает низкой сахаролитической активностью, она не ферментирует глюкозу и другие углеводы, но способна их окислять для получения энергии.

Тест-штамм *P. aeruginosa* 453 не ферментирует углеводы, не выделяет сероводород, поэтому на трехсахарном агаре с солями железа – питательной среде для выявления сероводорода и определения ферментации лактозы, глюкозы, сахарозы (питательная среда №13 ГРМ), рост сопровождается образованием пигмента в виде серого налета на поверхности скошенной части среды без изменения цвета среды (рис. 12).

Лечение синегнойной инфекции проводится антибактериальными препаратами после определения чувствительности к ним возбудителя.

С целью определения терапевтической схемы лечения инфекционных болезней и характеристики штаммов используется агар Мюллера-Хинтон или питательная среда для определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам (рис. 13).

Диаметры зон задержки роста вокруг дисков с антибактериальными препаратами удовлетворяют требованиям клинических рекомендаций по определению чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам 2014 г и EUCAST.

Таким образом, ФБУН ГНЦ ПМБ производит полный набор питательных сред для выявления бактерий *P. aeruginosa* методом бактериологического исследования, изучения культуральных и морфологических признаков, а также пигментообразования и определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам.

Использование вышеуказанных питательных сред позволит решить задачу не только успешного выявления синегнойной инфекции, но и своевременного и эффективного назначения антибактериальной терапии.

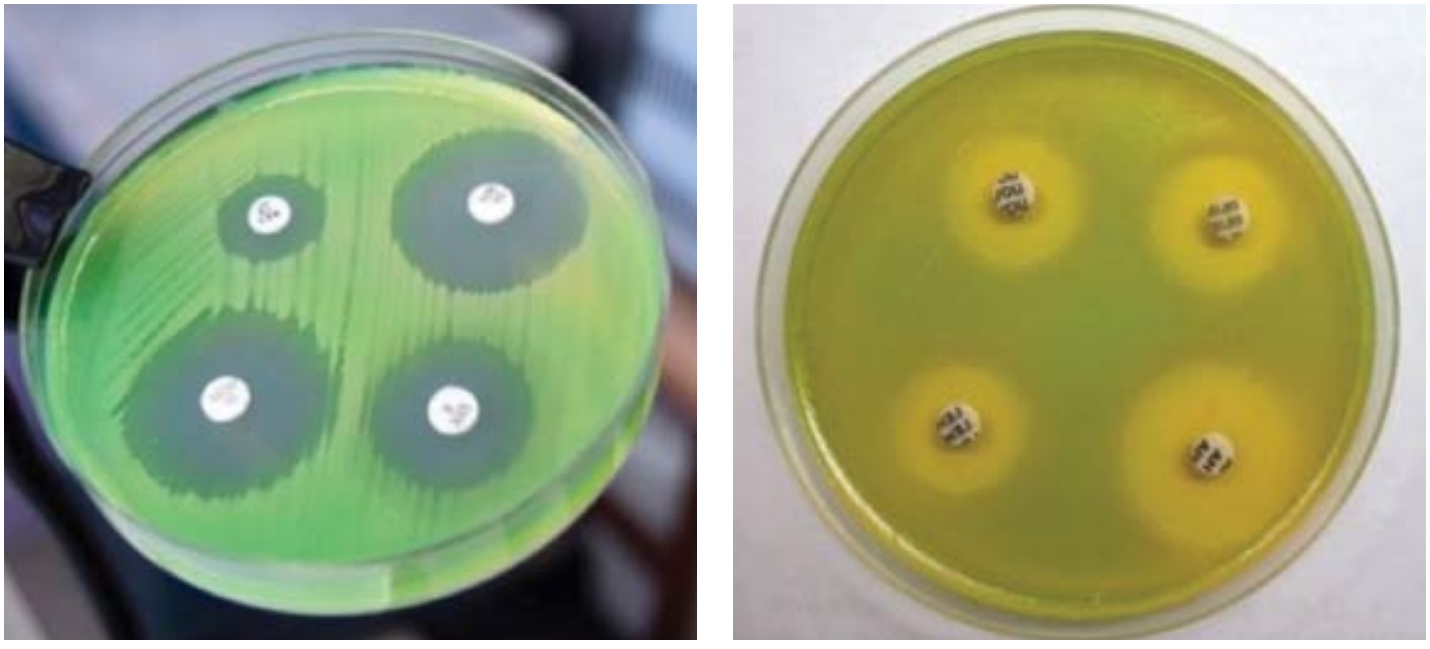


Рис. 13. **Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам диско-диффузионным методом, слева направо: Агар Мюллер-Хинтон, питательная среда для определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам производства ФБУН ГНЦ ПМБ.**

Литература

1. Илюкевич ГВ. Синегнойная инфекция: в новый век со старой проблемой. Медицинские новости. 2004;12:3-8.
2. МР Методические рекомендации по бактериологической диагностике синегнойной инфекции. М., 1984, с. 5.
3. Быкова НИ. Синегнойная палочка (синегнойная инфекция). [Электронный ресурс]. Доступно по: http://www.medicalj.ru
4. Синегнойная палочка: как передается, чем опасна, клиника. [Электронный ресурс]. Доступно по: http://uhonos.ru/infekcii/vnutribolnichnaya
5. Сидоренко СВ, Резван СП, Стерхова ГА, Грудинина СА. Госпитальные инфекции, вызванные Pseudomonas aeruginosa. Распространение и клиническое значение антибиотикорезистентности. Антибиотики и химиотерапия. 1999; 3:25-34.
6. МУК 4.2.2942-11. Методы санитарно-бактериологических исследований объектов окружающей среды, воздуха и контроля стерильности в лечебных организациях.
7. Псевдомонады. Род Pseudomonas. Синегнойная палочка. Эпидемиология синегнойной палочки. Распространенность синегнойной палочки. [Электронный ресурс]. Доступно по: http://meduniver.com/Medical/Microbiology/MedUniver
8. ГОСТ Р 54755-2011. Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества бактерий вида Pseudomonas aeruginosa
9. Патент: RU 2530549 Федеральное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии (ФБУН ГНЦ ПМБ). Храмов Михаил Владимирович, Шепелин Анатолий Прокопьевич, Полосенко Ольга Вадимовна, Марчихина Ирина Ивановна, Шолохова Любовь Петровна, Мартовецкий Михаил Николаевич.

References

1. Ilyukevich GV. Sinegnoinaya infektsiya: v novyi vek so staroi problemoi. Meditsinskie novosti. 2004;12:3-8. (In Russian).
2. Methodical recommendations on the bacteriological diagnosis of Pseudomonas infection. Moscow, 1984, p. 5. (In Russian).
3. Bykova NI. Sinegnoinaya palochka (sinegnoinaya infektsiya). [Internet]. Available at: http://www.medicalj.ru (In Russian).
4. Sinegnoinaya palochka: kak peredaetsya, chem opasna, klinika. [Internet]. Available at: http://uhonos.ru/infekcii/vnutribolnichnaya (In Russian).
5. Sidorenko SV, Rezvan SP, Sterkhova GA, Grudinina SA. Gospital'nye infektsii, vyzvannye Pseudomonas aeruginosa. Rasprostranenie i klinicheskoe znachenie antibiotikorezistentnosti. Antibiotics and Chemotherapy. 1999;3:25-34. (In Russian).
6. MUK 4.2.2942-11. Metody sanitarno-bakteriologicheskikh issledovanii ob"ektov okruzhayushchei sredy, vozdukha i kontrolya steril'nosti v lechebnykh organizatsiyakh [Methods of sanitary-bacteriological researches of objects of environment, air quality and sterility control in health organizations]. (In Russian).
7. Psevdomonady. Rod Pseudomonas. Sinegnoinaya palochka. Epidemiologiya sinegnoinoi palochki. Rasprostranennost' sinegnoinoi palochki. [Internet]. Available at: http://meduniver.com/Medical/Microbiology/ MedUniver (In Russian).
8. GOST R 54755-2011. Produkty pishchevye. Metody vyyavleniya i opredeleniya kolichestva bakterii vida Pseudomonas aeruginosa [Food. Methods of detecting and quantifying bacteria of the species Pseudomonas aeruginosa] (In Russian).
9. Patent: RU 2530549 Federal budget institution of science State research center for applied Microbiology and biotechnology (FBSI SSC MBP). Khramov MV, Shepelin AP, Polosenko OV, Marchikhina II, Sholokhova LP, Martovetskii MN.

Информация о авторах:

Сергеева Анна Борисовна, инженер-микробиолог
ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Россия, Московская область, Серпуховский район, п. Оболенск ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: +7 (4967) 36-0017
E-mail: Shadowwrite@mail.ru

Полосенко Ольга Вадимовна, кандидат биологических наук, заведующая сектором микробиологических исследований
ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279 Россия, Московская область, Серпуховский район, п. Оболенск ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: +7 (4967) 36-0017
E-mail: polosenko@obolensk.org

Information about authors:

Anna B. Sergeeva, engineer-microbiologist, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: 142279 Obolensk, Serpukhov District, Moscow Region, Russia
Phone: +7 (4967) 36-0017
E-mail: Shadowwrite@mail.ru

Olga V. Polosenko. Ph.D., Chief of Microbiological Research Department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: 142279 Obolensk, Serpukhov District, Moscow Region, Russia
Phone: +7 (4967) 36-0017
E-mail: polosenko@obolensk.org

НОВОСТИ НАУКИ

Появление микроба, похожего на возбудитель сибирской язвы

Новая родственная *Bacillus anthracis* бактерия была открыта исследователями из Института Роберта Коха в Германии. Она, по-видимому, симулирует симптомы сибирской язвы у различных млекопитающих в Африке. Этот новый патоген генетически более похож на *Bacillus cereus*, другую родственную бактерию, которая может вызвать пищевое отравление, но содержит две секции генетического материала, который наблюдали только для случаев *B. anthracis*. Это дополнение описывает поведение нового вида как более близкого к поведению микробов, вызывающих сибирскую язву, несмотря на их эволюционирование от штаммов *B. cereus*. Эти результаты показывают, что для понимания влияния этого нового микроба на здоровье животных и человека необходим надзор за новой инфекцией.

Antonation K.S., Grützmacher K., Dupke S., Mabon P., Zimmermann F., Lankester F., et al. Bacillus cereus Biovar Anthracis Causing Anthrax in Sub-Saharan Africa – Chromosomal Monophyly and Broad Geographic Distribution. PLOS Neglected Tropical Diseases. 2016; 10(9): e0004923. doi:10.1371/journal.pntd.0004923