

УДК 543.38+579.841

Е.А. Киприанова, Л.В. Ярошенко, Л.В. Авдеева

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины

ул. Академика Заболотного 154, Киев, ГСП, Д03680, Украина

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ШТАММОВ БАКТЕРИЙ РОДА *PSEUDOMONAS* ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АССИМИЛИРУЕМОГО УГЛЕРОДА ВОДЫ*

Исследована способность к росту в водопроводной воде 12 штаммов *Pseudomonas putida* и *Pseudomonas fluorescens*. При инокуляме 500 колоний-образующих единиц – КОЕ – в мл все они хорошо размножились в пастеризованной воде из киевского водопровода, достигая за 10 суток максимальной концентрации $1,7 \cdot 10^4 - 4,6 \cdot 10^6$ КОЕ/мл. Наиболее высокие показатели роста отмечены у штамма *P. putida* УКМ В-143, способного к ассимиляции 84 различных источников углеродного питания. На деионизированной воде с добавлением необходимых минеральных солей установлена линейная зависимость роста штамма В-143 от внесенных концентраций углерода ацетата в интервале от 10 до 60 мкг/л, а его прирост составлял $4,5 \cdot 10^6$ КОЕ на 1 мкг ассимилируемого углерода ацетата. Определение стандартными методами ассимилируемого органического углерода воды (АОС) с помощью стандартного штамма *P. fluorescens* УКМ В-385 (Р17, АТСС 49642) и отобранного штамма-индикатора *P. putida* В-143 дало сходные значения содержания в водопроводной воде г. Киева (536 и 600 мкг АОС в 1 л соответственно). Однако жизнеспособность штамма В-143, выращенного на артезианской воде, снижалась при хранении значительно быстрее, чем у стандартного, что по-видимому связано с происхождением обеих культур: штамм В-143 выделен из ризосферы пшеницы, штамм Р17 – из питьевой воды.

Ключевые слова: ассимилируемый органический углерод воды, штамм-индикатор, бактерии рода *Pseudomonas*.

Проблема качества воды является одной из наиболее актуальных проблем XXI века для многих стран мира. Особое место среди характеристик питьевой воды занимает ассимилируемый органический углерод – АОС (*assimilable organic carbon*) – комплексное понятие, объединяющее различные по структуре классы органических соединений, способные служить источником углеродного питания для обитающих в воде микроорганизмов. Высокие уровни АОС в системе водораспределения обеспечивают вторичный рост микроорганизмов (синегнойных бактерий, клебсиелл, легионелл и др.), что чревато вспышками инфекционных заболеваний, распространяемых через питьевую воду. Химические методы дезинфекции – хлорирование, озонирование – обеззараживают воду, однако увеличивают содержание в ней ассимилируемого углерода, а следовательно – и риск вторичного роста. Поэтому определение АОС является важным элементом в системе эффективных методов контроля над качеством питьевой воды.

Для определения ассимилируемого органического углерода было предложено несколько штаммов микроорганизмов, среди которых наиболее широко используется *Pseudomonas fluorescens* Р17, изолированный в Голландии из питьевой воды [4] и включенный в стандартные методы оценки качества воды, используемые в развитых странах [3]. Позже были предложены и другие штаммы-индикаторы, например *P. fluorescens* PF-1, выделенный из артезианской воды в Норвегии [2]. В Украине эти штаммы и методы не применяются, а содержание в питьевой воде ассимилируемого углерода не контролируется.

Поскольку ассимилируемый углерод воды – понятие интегральное, нам представлялось, что чем больше веществ способен усваивать штамм-индикатор, тем более подходящим он является для анализа качества воды. Целью настоящей работы были поиски штамма-индикатора с более широким, чем у штамма Р17, спектром потребляемых С-источников и выяснение возможностей его применения для анализа АОС воды по сравнению с эталонным штаммом.

*Работа выполнена при частичном финансировании за счет бюджетных средств для поддержки объекта национального достояния – «Коллекции микроорганизмов Института микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины».

Материалы и методы. Эталонный штамм-индикатор ассимилируемого углерода воды *Pseudomonas fluorescens* P17 (ATCC 49642, NCIMB 13503) был получен Институтом коллоидной химии и химии воды НАН Украины из Национальной Коллекции Промышленных и Морских Бактерий (NCIMB, Англия) и передан для исследований в Институт микробиологии и вирусологии НАНУ. Штамм-индикатор, получивший № УКМ В-385, хранили в лиофилизированном состоянии в холодильнике при температуре +8°C, а также на скошенном мясопептонном агаре (МПА) при комнатной температуре с пересевом один раз в 2–3 месяца.

Объектами исследования служили 6 штаммов биовара В *P. putida* (№№ УКМ В-122, В-143, В-380, В-141, В-137, В-375), отобранных нами среди бактерий рода *Pseudomonas*, поддерживаемых в коллекции отдела антибиотиков ИМВ, на основании их способности к усвоению максимального количества С-источников среди испытанных 110 веществ различного химического строения: аминокислот, карбоновых кислот, спиртов, углеводов, ароматических соединений и др. [1]. Для сравнения были взяты 6 штаммов биоваров III и Y *P. fluorescens* (№№ УКМ В-379, В-376, В-377, В-378, В-58 и В-61), усваивающие более ограниченное количество субстратов (табл. 1).

Приготовление реактивов и посуды, свободной от углерода, постановка экспериментов, посев и инкубация культур, учет опытов и расчет содержания в пробах воды АОС проводили согласно упомянутым выше Стандартным методам исследования воды [3] с некоторыми модификациями. Так, для микробиологического определения АОС в пробах воды развитых стран используется штамм *P. fluorescens* P17, выращенный на водопроводной воде, поскольку эта вода бедна органическими веществами (лимитирована по углероду). В Украине водопроводная вода может содержать большие количества углерода, и для приготовления посевного материала может оказаться непригодной. Поэтому была предпринята попытка использовать для этой цели артезианскую воду.

Постановка экспериментов требовала приготовления посуды, свободной от углерода. Для этой цели использовали различную химическую посуду на шлифах, а также флаконы темного стекла на 40–50 мл, завинчивающиеся алюминиевыми пробками. Всю эту посуду обрабатывали детергентами, промывали горячей водой, 0,1 Н соляной кислотой и трижды – деионизированной водой, после чего стерилизовали.

Артезианскую воду кипятили, фильтровали через фильтровальную бумагу, разливали по 40 мл во флаконы и стерилизовали. На деионизированной воде готовили раствор ацетата натрия, содержащий 400 мг углерода ($2,267 \text{ г } \text{CH}_3\text{COONa} \times 3 \text{ H}_2\text{O}$) в 1 л, стерилизовали, перед опытом разводили деионизированной водой в 10 раз, и 100 мкл этого рабочего раствора вносили в 40 мл артезианской воды во флаконе. Т.о. содержание углерода, входящего в состав ацетата, составляло во флаконах 100 мкг/л. Контрольные флаконы содержали артезианскую воду без ацетата. В специальной серии опытов нами было установлено, что МПА и рекомендуемая Стандартами среда R2А обеспечивают одинаковый рост и число колоний штамма-индикатора. Из суточной культуры штамма P17, выращенного на МПА, готовили на стерильной артезианской воде суспензию, содержащую 500 млн. микробных тел в мл по стандарту Мак-Ферлайна. Из последней путем серийных разведений готовили взвесь, содержащую 200 000 клеток в мл. По 100 мкл такой суспензии вносили во флаконы, получая концентрацию 500 колоний-образующих единиц (КОЕ) в мл. Флаконы инкубировали 10 суток при температуре 23 °С, после чего проводили высевы по 0,1 мл из соответствующих разведений (обычно из 10^{-3} и 10^{-4}) на МПА в чашках Петри. Каждую пробу высевали не менее чем на 6-8 чашек. Последние инкубировали при 26 °С 48 часов, после чего подсчитывали число выросших колоний, а отсюда – количество жизнеспособных клеток штамма P17 в исследуемых пробах воды.

10-суточную культуру штамма-индикатора, выращенного таким образом на артезианской воде с ацетатом, хранили в холодильнике при +8 °С и использовали в качестве посевного материала при определении АОС по описанной выше методике.

Прирост штамма на ацетате и содержание АОС в пробах воды рассчитывали по формулам, приведенным в Стандартных методах [3]. Обработку исследуемых образцов и реактивы для контроля качества также проводили и готовили в соответствии с упомянутыми рекомендациями.

Результаты и их обсуждение. На первом этапе исследований мы поставили перед собой задачу выяснить, размножаются ли отобранные нами штаммы бактерий рода *Pseudomonas* в стерильной водопроводной воде и существует ли корреляция между их способностью к росту в этих условиях и шириной спектра потребляемых источников углерода. Выяснилось, что все отобранные нами штаммы (независимо от ширины их спектров углеродного питания) развивались в водопроводной воде. Мы не наблюдали связи между числом усваиваемых С-источников и интенсивностью роста (табл. 1).

Как видно из таблицы, у части штаммов к 10-му дню инкубации число жизнеспособных клеток снижалось, у части штаммов – достигало максимума уже через 5 суток и далее оставалось неизменным. Штаммы В-379 и В-143 достигали максимума роста к 10-му дню инкубации.

Наиболее высокие показатели роста мы наблюдали у штамма *P. putida* УКМ В-143, который и был отобран для дальнейших исследований. При небольшом инокуле – 500 КОЕ / мл – эти бактерии хорошо размножались в воде из киевского водопровода, достигая за 10 суток максимального титра $4,6 \times 10^6$ КОЕ/мл. Содержащиеся в воде органические вещества в полной мере удовлетворяли их потребность в углероде и обеспечивали хороший рост. Заметим, что штамм В-143 был способен к ассимиляции 84 веществ различного химического строения (в то время как используемый для анализов АОС штамм-индикатор *P. fluorescens* Р17 метаболизирует 67 соединений из 95 испытанных [2]).

На деионизированной воде с добавлением необходимых минеральных солей мы наблюдали линейную зависимость роста штамма В-143 от внесенных концентраций углерода (в составе ацетата натрия) – в интервале от 10 до 60 мкг АОС в 1 л.

Рассчитанный на основании полученных данных прирост штамма *P. putida* В-143 составлял $4,5 \times 10^6$ КОЕ на 1 мкг ассимилируемого углерода ацетата. Используя этот показатель, мы получили предварительные данные о содержании ассимилируемого углерода в пробе водопроводной воды г. Киева. Они составили 600 мкг АОС в 1 л.

Таблица 1

Рост изученных штаммов бактерий рода *Pseudomonas* в водопроводной воде

Вид	N штамма В УКМ	Число ассимилируемых источников углерода	Интенсивность роста в КОЕ/мл через		
			72 час.	120 час.	240 час.
<i>P. fluorescens</i>	В-379	61	$6,7 \cdot 10^4$	$4,3 \cdot 10^5$	$4,0 \cdot 10^6$
	В-376	68	$1,1 \cdot 10^5$	$4,3 \cdot 10^4$	$1,7 \cdot 10^4$
	В-377	59	$2,3 \cdot 10^5$	$5,0 \cdot 10^6$	$1,1 \cdot 10^6$
	В-58	45	$7,7 \cdot 10^4$	$1,0 \cdot 10^6$	$3,3 \cdot 10^5$
	В-61	40	$4,3 \cdot 10^2$	- *	-*
	В-378	62	$2,3 \cdot 10^5$	$1,0 \cdot 10^6$	$1,0 \cdot 10^6$
<i>P. putida</i>	В-380	90	$1,6 \cdot 10^5$	$2,6 \cdot 10^5$	$1,2 \cdot 10^5$
	В-141	69	$3,6 \cdot 10^5$	$1,6 \cdot 10^6$	$1,3 \cdot 10^6$
	В-143	84	$1,3 \cdot 10^5$	$1,6 \cdot 10^6$	$4,6 \cdot 10^6$
	В-122	85	$1,3 \cdot 10^6$	$3,0 \cdot 10^6$	$6,0 \cdot 10^4$
	В-137	76	$1,0 \cdot 10^5$	$8,3 \cdot 10^4$	$2,3 \cdot 10^4$
	В-375	70	$1,0 \cdot 10^5$	$2,3 \cdot 10^5$	$1,3 \cdot 10^5$

Примечание: -* бактерии в пробах не обнаружены.

Полученный для штамма *P. putida* В-143 показатель прироста на углероде близок таковому у штамма *P. fluorescens* Р17, составляющему по данным литературы $4,1 \times 10^6$ КОЕ на 1 мкг углерода ацетата [4].

Поскольку задачей настоящей работы было прежде всего освоение метода определения АОС и сравнение отобранного нами штамма с уже используемой для этих целей индикаторной культурой, в дальнейшем мы более детально исследовали рост штамма *P. fluorescens* Р17 на различных пробах воды. С другой стороны эти исследования были продиктованы необходимостью поисков наиболее подходящей воды для выращивания штамма-индикатора и получения посевного материала.

Максимальные показатели роста бактерий в пробах артезианской воды (бювет) колебались в пределах $1,1 \times 10^5 - 3,75 \times 10^5$ КОЕ/мл, деионизированной воды с солями $2,5 \times 10^4 - 4,5 \times 10^4$ КОЕ/мл, бутылированных минеральных вод «Ордана», «Прозора» $1,1 \times 10^5 - 3,4 \times 10^5$ КОЕ/мл, воды из Киевского водопровода – $2,0 \times 10^6 - 2,5 \times 10^6$ КОЕ/мл. Большинство этих показателей по крайней мере на порядок выше характеристик артезианской и водопроводной воды в странах Европы [2, 4]. Соответственно в наших опытах прирост штамма P17 не был стабильным и отличался от опыта к опыту, составляя $3,5 \times 10^6 - 3,87 \times 10^6$ КОЕ (в пробах воды из бювета), $4,9 \times 10^6$ КОЕ (в минеральной воде «Ордана»), $4,75 \times 10^6$ КОЕ (в минеральной воде «Прозора») на 1 мкг углерода ацетата.

Предварительные результаты определения ассимилируемого углерода в одной из проб водопроводной воды г. Киева с помощью штамма *P. fluorescens* P17 составляли 536 мкг АОС в 1 л, что также близко значениям, полученным нами с помощью штамма *P. putida* В-143.

Как упоминалось выше, флаконы с обеими культурами, выращенными на артезианской воде, хранили в холодильнике, используя их в качестве посевного материала. При этом количество жизнеспособных клеток в них постепенно снижалось (рис. 2). В наших опытах посевной материал штамма P17 был пригоден для работы в течение 3 месяцев (а не шести, как это рекомендуется международными стандартами), после чего количество в нем бактерий существенно падало. Штамм В-143 значительно снижал свою жизнеспособность уже на протяжении 1 месяца хранения. Возможно эта особенность связана с происхождением культуры: штамм P17 выделен голландскими авторами из питьевой воды, в то время как источником выделения штамма В-143 является ризосфера пшеницы. Быстрое падение титра этого штамма-индикатора при хранении в артезианской воде ограничивает возможности его применения для массовых анализов АОС. Исходя из этих результатов, можно сделать вывод, что широкий набор потребляемых С-источников не является достаточным условием для успешного использования штамма-индикатора ассимилируемого углерода воды; не меньшую роль играет источник выделения этой культуры, а возможно, и другие ее особенности.

Таким образом, с помощью эталонного штамма *P. fluorescens* P17 и отобранного нами штамма-индикатора *P. putida* В-143 нами были получены близкие значения содержания ассимилируемого углерода воды АОС в водопроводной воде г. Киева. Недостатком метода (в нашей модификации) остается разброс получаемых результатов, что возможно связано как с нестабильным составом артезианской воды, используемой для подготовки посевного материала, так и с трудностями освобождения применяемой для анализов лабораторной посуды от углерода.

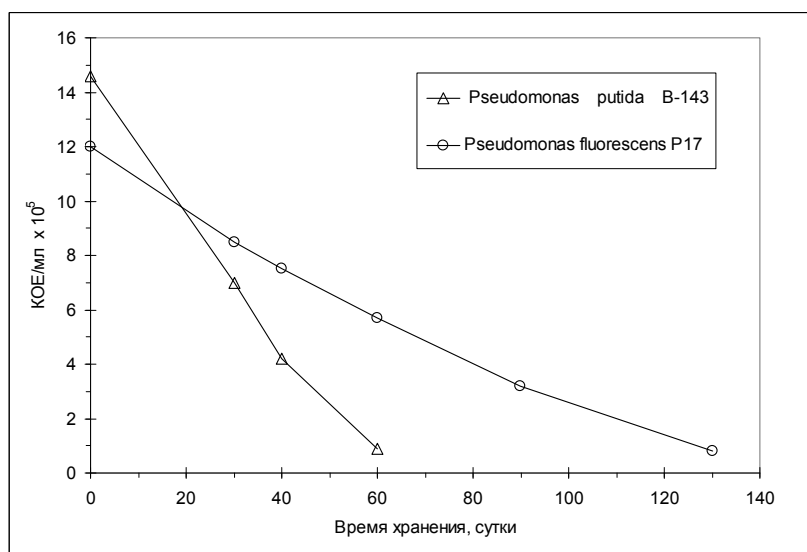


Рис. 1. Количество жизнеспособных клеток штаммов *Pseudomonas fluorescens* P17 и *Pseudomonas putida* В-143 в посевном материале на артезианской воде при их хранении

ВИКОРИСТАННЯ ШТАМІВ БАКТЕРІЙ РОДУ *PSEUDOMONAS* ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ АСИМІЛЬОВАНОГО ВУГЛЕЦЮ ВОДИ

Резюме

Досліджено здатність до росту у водопровідній воді 12 штамів *Pseudomonas putida* і *Pseudomonas fluorescens*. При інокуляції 500 колоній-утворюючих одиниць – КУО – в мл всі вони добре розмножувались у пастеризованій воді з київського водопроводу, досягаючи за 10 діб максимального титру $1,7 \cdot 10^4$ - $4,6 \cdot 10^6$ КУО/мл. Найвищі показники росту встановлені у штама *P. putida* УКМ В-143, здатного до асиміляції 84 різних джерел вуглецевого живлення. На деіонізованій воді з додаванням необхідних мінеральних солей спостерігалась лінійна залежність росту штаму В-143 від внесених концентрацій вуглецю ацетату в інтервалі від 10 до 60 мкг/л, а його приріст на ацетаті становив $4,5 \times 10^6$ КУО на 1 мкг асимільованого вуглецю ацетату. Визначення стандартними методами асимільованого органічного вуглецю води (АОС) за допомогою стандартного штаму *P. fluorescens* УКМ В-385 (P17, ATCC 49642) та відібраного штаму-індикатора *P. putida* В-143 дало подібні показники вмісту в водопровідній воді м. Києва (536 і 600 мкг АОС в 1 л відповідно). Життєздатність штаму В-143, вирощеного на артезіанській воді, знижувалась при зберіганні значно швидше, ніж у стандартного, що очевидно пов'язане з походженням обох культур: штаму В-143 ізольований з ризосфери пшениці, штаму P17 – з питної води.

Ключові слова: асимільований органічний вуглець води, штаму-індикатор, бактерії роду *Pseudomonas*.

E.A. Kiprianova, L.V. Yaroshenko, L.V. Avdeeva

*Zabolotny Institute of Microbiology and Virology,
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv*

USE OF *PSEUDOMONAS* BACTERIA STRAINS FOR DETERMINING WATER- ASSIMILABLE CARBON

S u m m a r y

The ability of 12 *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens* strains for growth in the tap water has been studied. All of them grew well in pasteurized Kyiv tap water at 500 colony-forming units – CFU/ml inoculum reaching the maximal titre $1.7 \cdot 10^4$ – $4.6 \cdot 10^6$ CFU/ml after 240 hours of incubation. The most intensive growth was observed in strain *P.putida* UCM B-143, capable to assimilation of 84 different sources of carbon nutrition. The linear dependence between strain 143 growth and acetate carbon concentration in the interval of 10 to 60 $\mu\text{g/l}$ has been demonstrated in deionized water with addition of necessary mineral salts; its yield was $4.5 \cdot 10^6$ CFU/ μg of assimilable acetate carbon (AOC). Determination of AOC of water using standard methods, standard strain *P.fluorescens* UCM B-385 (P17, ATCC 49642) and selected strain *P.putida* B-143 gave the similar values of AOC quantities in the Kyiv tap water (536 and 600 μg of AOC in 1l, accordingly). Viability of strain 143 grown in the artesian water decreased more quickly than that of the standard strain which is possibly connected with origin of both cultures: strain 143 was isolated from wheat rhizosphere while strain P17 – from the drinking water.

The paper is presented in Russian.

Key words: water-assimilable organic carbon, strains-indicators, bacteria of *Pseudomonas* genus.

The authors address: *Kiprianova E.* Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D03680, Ukraine.

1. Смирнов В.В., Кіпріанова Е.А. Бактерии рода *Pseudomonas*. – Киев: Наукова Думка, 1990. – 264 с.
2. Charnock C., Kjonno O. Assimilable organic carbon and biodegradable dissolved organic carbon in Norwegian raw and drinking waters // Wat. Res. – 2000. – 34. – P. 2629–2642.
3. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 18th ed. – Washington: American Public Health Association, 1992. – P. 40–44.
4. Van Der Kooij D. The occurrence of *Pseudomonas* species in surface water and in tap water as determined in citrate media // Antonie van Leeuwenhoek – 1977. – 43. – P. 187–192.

Отримано 18.06.2009