

УДК 579.69

ФЕНОТИПИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ БАКТЕРИЙ ПСЕВДОМОНАДНОГО КОМПЛЕКСА, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ОРГАНИЗМА *PARASALMO MYKISS* Walb., ПО ФАКТОРАМ ИНВАЗИЙНОСТИ

А. И. Савушкин, Н. А. Сидорова

ФГБОУ ВО "Петрозаводский государственный университет"
185910 Республика Карелия, г. Петрозаводск, e.mail: fagafon@yandex.ru
Поступила в редакцию 29.01.2022

В статье представлены результаты исследований фенотипических свойств бактерий группы псевдомонадного комплекса, выделенных из микрофлоры 57 особей радужной форели *Parasalmo mykiss* Walbaum, 1792 в возрасте 1+ и 2+, отобранных для планового исследования из водоемов рыбохозяйственного значения, расположенных на территории Карелии. Акцент на фенотипических свойствах выделенных микроорганизмов связан с возрастающей эпизоотической ролью вирулентных штаммов *Pseudomonas aureofaciens*, *Ps. chlororaphis*, *Ps. fluorescens*, *Ps. putida* и других в развитии инфекционных заболеваний лососевых видов рыб. Выделение, идентификацию и изучение фенотипических признаков выделенных культур псевдомонад выполняли согласно рекомендациям по лабораторной диагностике псевдомнозов рыб. Параллельно, для анализа степени инвазийности, оценивали гемолитическую активность (ГА), а также способность к биопленкообразованию (БПО) и антилизоцимную активность (АЛА) бактерий. Обнаружено, что выделенные фенотипические варианты бактерий псевдомонадного комплекса обладают выраженной инвазийностью, которая в большей степени проявляется в виде гемолитической и антилизоцимной активности.

Ключевые слова: псевдомонады, фенотипическое разнообразие, инвазийность, микрофлора радужной форели.

DOI: 10.47021/0320-3557-2022-50-57

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время, согласно парадигме изучения оппортунистических инфекций, среди ихтиопатологов все чаще возникает вопрос о причинах роста эпизоотического значения в распространении возбудителей бактериозов рыб, к которым относятся и представители рода *Pseudomonas* spp. В соответствии с классификацией LPSN "List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature" псевдомонады включены в тип Proteobacteria, класс Gammaproteobacteria, отряд Pseudomonadales, семейство Pseudomonadaceae и являются гетерогенной группой прокариот, которая состоит как из сапрофитных, так и условно-патогенных и патогенных видов. Первоначально *Pseudomonas* sp. были описаны как этиологические агенты болезни красной пятнистости или "Sekiten-bio", которая вызывала массовую гибель японского угря, выращиваемого в прудах [Wakabayashi and Egusa, 1972]. Позже *Ps. anguilliseptica* [Wakabayashi, Egusa, 1972], *Ps. chlororaphis* [Hatai et al., 1975], *Ps. putida* [Altinok et al., 2006], *Ps. luteola* [Altinok et al., 2007], *Ps. alcaligenes* и *Ps. cichorii* [Сидорова, Обухова, 2013 (Sidorova, Obuhova et al., 2013)] определены, как возбудители оппортунистических инфекций у многих видов рыб. Отмечено распространение псевдомоноза у сеголеток, годовиков и двухлеток карпа, гибрида карпа

с амурским сазаном, пестрого толстолобика, белого толстолобика, карася. В работе Басанкиной В.М. [2020 (Basankina, 2020)] изучены псевдомонозы лососевых видов рыб, вызванные *Ps. fluorescens* и *Ps. chlororaphis*. Как правило, при псевдомонозах заражение происходит контактным путем через поврежденную кожу и жабры. Эпизоотии возникают при нарушении ветеринарно-санитарных и биотехнических нормативов [Нижелская и др., 2019 (Nizhelskaya et al., 2019); Басанкина, 2020 (Basankina, 2020)]. Характерно, что у рыб псевдомонады могут вызвать инфекционное заболевание, как самостоятельно, так и в ассоциациях с другими видами микроорганизмов в пределах рода или с более отдаленными таксонами. В исследовании Жезмер В.Ю. с соавторами [1991 (Zhezmer et al., 1991)] и в работе Гинятова Н.С. [2018 (Ginayatov, 2018)] *Pseudomonas* sp. обнаружены в составе условно-патогенной микрофлоры воды и рыбы. В работе Сердюк А.В. [1989 (Serdyuk, 1989)] при изучении бактериоза лососей *Ps. fluorescens*, *Ps. nonliquefaciens*, *Ps. putida* были выделены в чистую культуру из ассоциации с *Vibrio* sp., *A. hydrophila*, *Flexibacter* sp., *Flavobacter* sp., *Streptococcus* sp.

Считается, что одна из причин широкого распространения псевдомонад в составе мик-

рофлоры воды естественных и искусственных водоемов кроется в их биологических особенностях: способности усваивать многообразные питательные субстраты в качестве источников углерода и энергии [Rojo, 2010; Palleroni, 2010], быстро адаптироваться к изменению абиотических и биотических факторов окружающей среды за счет синтеза большого спектра вторичных метаболитов [Puchalka et al., 2008; Spiers et al., 2000], образовывать биопленки, синтезировать антибиотикоподобные соединения и формировать полирезистентность к широкому перечню антибиотиков. Особенно важным является обнаруженная у *Pseudomonas* sp. возможность переноса детерминант резистентности к бактериям, обитающим в кишечнике человека. Гены устойчивости к антибиотикам, выявленные у рыб, оказались общими с выявленными у человека патогенами [Finck-Barbancon et al., 1997; Rhodes et al., 2000; Sorum, 2006; Furushita et al., 2003]. Согласно большинству выполненных исследо-

ваний, посвященных биологическим свойствам бактерий рода *Pseudomonas*, включая факторы вирулентности, последние изучены недостаточно и на сегодняшний день нет однозначной информации по эпизоотической ситуации по псевдомонозу, что свидетельствует об актуальности всестороннего исследования фенотипического разнообразия бактерий псевдомонадного комплекса. Цель выполненной работы заключалась в изучении фенотипического разнообразия псевдомонад, выделенных из организма радужной форели, по факторам инвазивности. Для реализации поставленной цели выдвинуты задачи: 1) из клинического материала выделить и идентифицировать представителей рода *Pseudomonas* spp.; 2) оценить особенности инвазивности выделенных культур по гемолитической активности; 3) изучить способность выделенных культур к биопленкообразованию и антилизоцимной активности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Все исследования по выделению, идентификации и изучению биологических свойств псевдомонад проводили на базе лаборатории микробиологии НИЦ по аквакультуре Института биологии, экологии и агротехнологий Петрозаводского госуниверситета с привлечением ресурсов малого предприятия инновационного сектора Петрозаводского госуниверситета “Микробиом”. Методологический принцип исследовательской работы заключался в комплексном подходе по оценке распространения, структуры, особенностей культивирования и идентификации псевдомонад, выделенных из клинического материала 57 особей *Parasalmo mykiss* в возрасте 1+ и 2+, отобранных из водоемов, расположенных на территории Карелии. Для исследования брали только живую больную рыбу, не менее 5 экз. с признаками болезни. Накопительные культуры бактерий получали из пораженных участков кожи, асцитной жидкости внутренних органов (печени, почек, селезенки) и крови при выраженном сепсисе. Идентификацию выполняли до рода по комплексу морфологических, тинкториальных, культуральных и биохимических признаков, регламентированных в Определителе бактерий Берджи (1997) и в соответствии с действующими Методическими указаниями по лабораторной диагностике псевдомонозов рыб [1998 (Metodicheskie ukazaniya..., 1998)].

К маркерам фенотипического полиморфизма относили факторы инвазивности, характеризующие гемолитическую активность, а также способность к биопленкообразованию и

антилизоцимную активность бактерий. Гемолитическую активность (ГА) изучали на кровяном агаре следующего состава: МПА – 100 мл, раствор глюкозы 200 г/дм³ – 10 мл, стерильная дефибрированная кровь – 5 мл. Результат учитывали через 48 ч по появлению зон гемолиза вокруг колоний. Количественно, гемолитическую активность оценивали с использованием коэффициента “К”, который рассчитывали, как отношение диаметра зоны гемолиза к диаметру колонии исследуемого штамма. Интенсивность биопленкообразования (БПО) оценивали с использованием метода культивирования статистических биопленок в многолуночном полистероловом планшете “microtiter plate test” [Марданова и др., 2016 (Mardanov et al., 2016)] с последующим окрашиванием биопленок генцианом фиолетовым (crystal violet) [O’Toole and Kolter, 1998]. Для анализа активности формирования биопленки и стимуляции развития внеклеточного матрикса исследуемые штаммы предварительно засеивали на питательный агар с 1% глюкозой и термостатировали при 37±0.5°C в течение 24 ч. Результат оценивали спектрофотометрически в соответствии с изменением оптической плотности (OD) окрашенного растворителя [Stepanovic et al., 2007]. Антилизоцимную активность (АЛА) выделенных штаммов изучали по методу Бухарина О.В. с соавторами [1984 (Buharin, 1984)]. Для определения АЛА использовали спектрофотометрическое измерение реакционной смеси в диапазоне концентрации лизоцима от 1 до 10 мкг/мл. В качестве тест-

культуры использовали типовой штамм *Micrococcus lysodeikticus* (штамм N 2665 ГИСК им. Л.А. Тарасевича), обработанный трилоном Б [Комкова и др., 2016 (Komkova et al., 2016)].

Статистическую обработку данных выполняли с использованием программы Microsoft Excel 2020 для работы с электронными таблицами, визуализации и анализа данных.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В результате выполненного исследования в чистую культуру из организма исследуемых экземпляров радужной по типовым признакам (таблица) выделено 102 штамма *Pseudomonas* spp., в том числе из язвенных поражений кожи – 55 штаммов, из паренхиматозных органов – 21 штамм и из крови – 26 штаммов. Выделенные культуры обладали

оксидантной активностью. На среде Хью-Лейфсона при проведении теста окисления-ферментации (О/Ф) бактерии вызвали окисление глюкозы в аэробных условиях без ферментации, а на среде Меллера с аминокислотами лизином, орнитином и аргинином – декрбоксилировали только аргинин.

Типовые признаки рода *Pseudomonas* spp. и сходных с ними родов бактерий [Сб. инструкций по борьбе с болезнями рыб, 1998]

Type characters of the genus *Pseudomonas* spp. and similar genera of bacteria [Sb. instrukcij po bor'be s boleznymi ryb, 1998]

Признак / Sign	<i>Pseudomonas</i>	<i>Vibrio</i>	<i>Aeromonas</i>	<i>Plesiomonas</i>
Оксидаза / Oxidase	+	+	+	+
Расщепление глюкозы на среде Хью-Лейфсона Glucose digestion in Hugh-Leifson medium	О/–	О/Ф	О/Ф	–/Ф
Лизин-декарбоксилаза Lysine decarboxylase	–	+	–	+
Орнитин-декарбоксилаза Ornithine decarboxylase	–	+	–	+
Аргинин-декарбоксилаза Arginine decarboxylase	+	–	–	+

Поскольку псевдомонады рыб часто характеризуются септическим течением, то в посевах из крови и паренхиматозных органов обнаруживали обильный рост возбудителя. На агаризованных средах выделенные культуры *Pseudomonas* spp. имели выраженный внутриклеточный диморфизм. Изоляты первичного мукоидного типа формировали вторичную немуконидную форму. Из выделенных культур, наибольшее количество штаммов (53.9%) было изолировано из некротических очагов с поверхности кожи, местами переходящих в язвенные поражения. Для данных изолятов доля штаммов с гемолитической активностью составила 40.2%, с биопленкообразующей активностью – 23.6% и с антилизоцимной активностью – 43.6%. Доля штаммов *Pseudomonas* spp., выделенных из паренхиматозных органов составила 20.5%, из них на штаммы с гемолитической активностью пришлось 85.7%, а на штаммы с антилизоцимной активностью – 76.2%. *Pseudomonas* spp., изолированные из паренхиматозных органов, биопленкообразующей активностью не обладали. Доля штаммов псевдомонад, выделенных из крови радужной форели составила 25.5%, из них на штаммы с антилизоцимной активностью

пришлось 73.1%, на штаммы с биопленкообразующей активностью – 61.5%, с гемолитической активностью – 80.8% общего числа выделенных бактерий псевдомонадного комплекса.

Значения α -гемолитической активности штаммов псевдомонад, выделенных с поверхности кожи, селезенки и крови радужной форели отображены на нормированной линейчатой диаграмме (рис. 1). Рассчитанные значения гемолитической активности или коэффициента “К”, как отношения диаметра зоны гемолиза к диаметру колонии исследуемого штамма позволили выделить высокоактивные штаммы, у которых величина “К” соответствовала 3 см и >, штаммы со средней активностью, для которых величина “К” находилась в диапазоне 2–3 см и штаммы с низкой гемолитической активностью и величиной “К” ≥ 2 см. Из 22 штаммов псевдомонад с α -гемолитической активностью, выделенных из кожи, проявляли среднюю α -гемолитическую активность 5 (22.72%) штаммов и низкую α -гемолитическую активностью 17 (77.28%) штаммов. Среди 18 гемолитически активных штаммов *Pseudomonas* spp., которые были выделены из селезенки, 2 (11.1%) проявляли высокую

α -гемолитическую активность, 4 (22.22%) – среднюю и 12 (66.68%) – низкую α -гемолитическую активность. Из 21 штамма гемолитически активных псевдомонад, выделен-

ных из крови, было обнаружено 7 (33.33%) высокоактивных штаммов, 13 (61.91%) штаммов со средней активностью и один штамм (4.77%) с низкой α -гемолитической активностью.

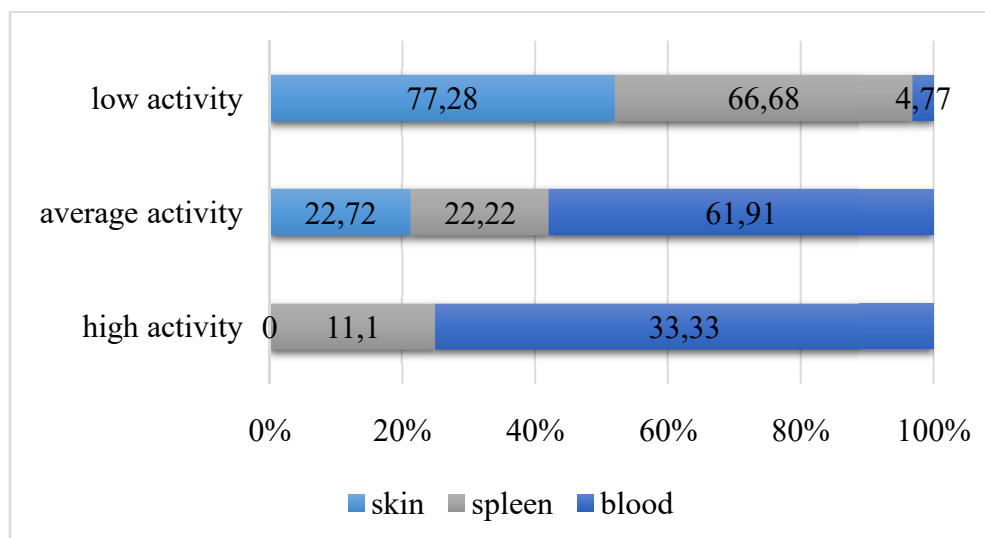


Рис. 1. Гемолитическая активность выделенных штаммов псевдомонад, %.

Fig. 1. Hemolytic activity of isolated *Pseudomonas* spp. strains, %.

Активность выделенных штаммов псевдомонад в отношении способности формировать биопленки отображена на рис. 2. По показателю БПО, если оптическая плотность (OD) культурального раствора соответствовала диапазону 0.600–0.900 е.о.п. и > – штаммы считались высокоактивными, при OD 0.300–0.600 е.о.п. – псевдомонады относились к группе штаммов со средней активностью и при OD 0.100–0.300 е.о.п. – штаммы считались низкоактивными в отношении биопленкообразова-

ния. Из 13 штаммов псевдомонад с биопленкообразующей активностью, выделенных из кожи, высокую активность проявил 1 (7.69%) штамм, среднюю активность выявили у 7 (53.84%) штаммов и низкую активность – у 5 (38.46%) штаммов. Из 16 штаммов *Pseudomonas* spp. с БПО, выделенных из крови, высокую активность проявило 10 (62.5%) штаммов, среднюю активность – 5 (31.25%) штаммов и низкую активность – 1 (6.25%) штамм.

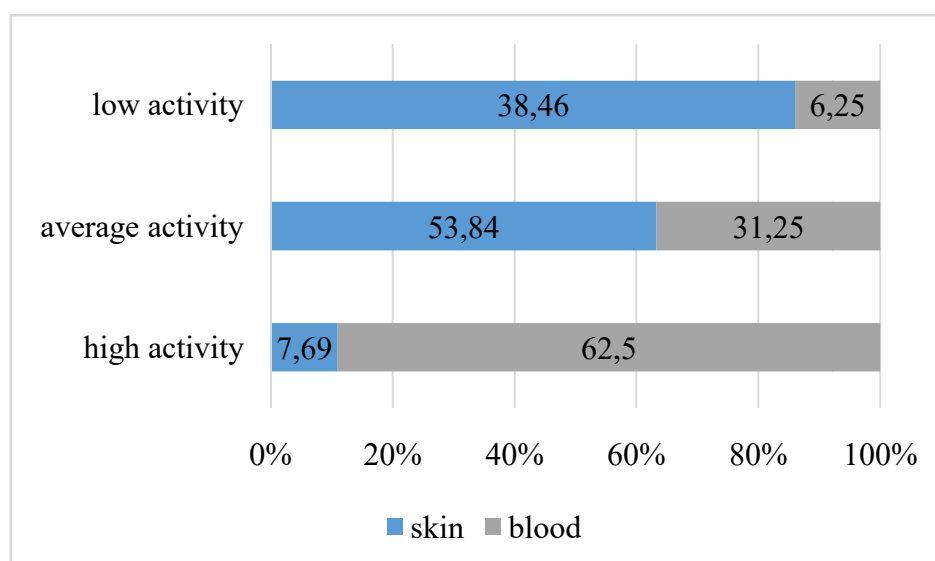


Рис. 2. Биопленкообразующая активность выделенных штаммов псевдомонад, %.

Fig. 2. Biofilm-forming activity of isolated *Pseudomonas* spp. strains, %.

Показатели антилизосимной активности *Pseudomonas* spp., выделенные из организма радужной форели, отображены на диаграмме (рис. 3). По показателю АЛА при оптической плотности (OD) культурального раствора в диапазоне 0.300–0.450 е.о.п. – штаммы приравнивались к высокоактивным, при OD 0.150–0.300 е.о.п. – к группе штаммов со средней активностью и при OD ≥ 0.150 – штаммы считались принадлежащие к группе с низкой антилизосимной активностью. Из 24 штаммов псевдомонад с антилизосимной активностью, выделенных из кожи, высоко-

кий уровень АЛА был выявлен у 13 (54.16%) штаммов, средние значения АЛА обнаружены у 6 (25.01%) штаммов и низкие – у 5 (20.83%) штаммов. Среди *Pseudomonas* spp. с АЛА, выделенных из селезенки, обнаружено 2 (14.29%) штамма со средней активностью и 14 (85.71%) штаммов с низкой антилизосимной активностью. Из 19 штаммов псевдомонад с АЛА, выделенных из крови, выявлено 12 (63.16%) высокоактивных штаммов, 6 (31.58%) штаммов со средней активностью и один штамм (5.26%) с низкой антилизосимной активностью.

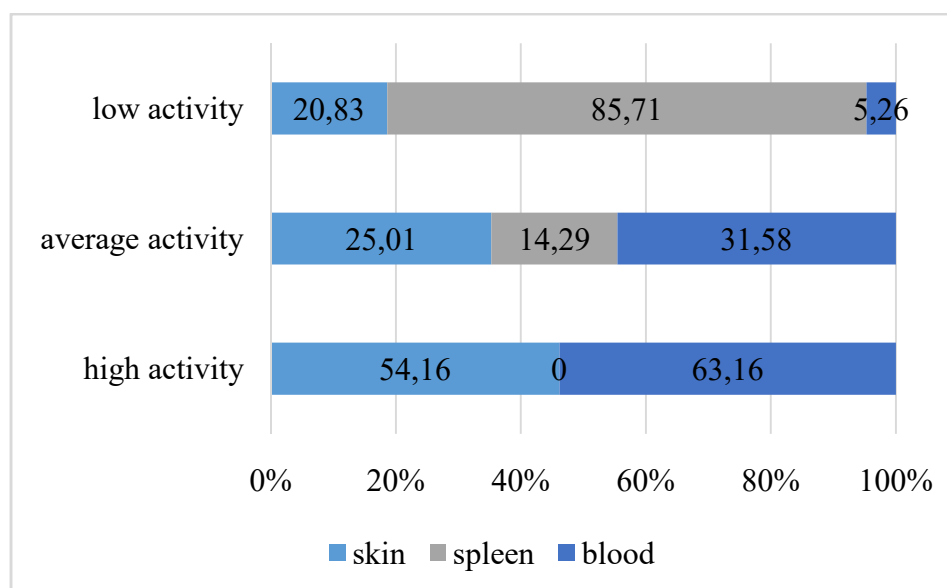


Рис. 3. Антилизосимная активность выделенных штаммов псевдомонад, %.

Fig. 3. Antilysozyme activity of isolated *Pseudomonas* spp. strains, %.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате выполненного исследования проведена комплексная оценка разнообразия фенотипов *Pseudomonas* spp., обнаруженных в составе контаминирующей микрофлоры *Parasalmo mykiss*. Установлено, что выделенные фенотипические варианты бактерий псевдомонадного комплекса обладают выраженной инвазийностью, которая в большей степени проявляется в виде антилизосимной и гемолитической активности. Необходимо отметить высокую долю бактерий, способных формировать биопленки. У биопленкообразующих форм, по сравнению с планктонными, развивается целый пул специфических физиологических процессов, как ответ на изменение условий окружающей среды. Это обеспечивает физиологическую и функциональную пластич-

ность многим бактериальным патогенам, выживание, а также устойчивости к широкому спектру антибактериальных препаратов, что может сильно препятствовать рациональной антибиотикотерапии псевдомонозов рыб. Выделенные фенотипы псевдомонад, в основном, поражают кожу и за счет местной инвазии проникают в кровь и вызывают сепсис. При вскрытии зараженной рыбы регистрируется бледная, увеличенная печень с участками кровоизлияний и сильно увеличенная селезенка тёмно-красного цвета. Полученные данные могут быть использованы для мониторинга возбудителей инфекций бактериальной этиологии у радужной форели, а также для разработки эффективных способов их индикации и диагностики.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Басанкина В.М. Эпизоотические особенности аэромоноза рыб в условиях региона Северного Кавказа. Автореф. дисс ... канд. вет. наук. Краснодар: ФГБОУ ВО “Кубанский государственный аграрный университет имени И. Т. Трубилина”, 2020. 23 с.
- Бухарин О.В., Усвятцов Б.Я., Малышкин А.П., Немцева Н.В. Метод определения антилизоцимной активности микроорганизмов // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 1984. № 2. С. 27–28.
- Гинаяттов Н.С. Клинико-патоморфологическая характеристика псевдомоноза осетровых рыб, выращиваемых в установках замкнутого водоснабжения. Автореф. дисс ... канд. вет. наук. Краснодар: ФГБОУ ВО “Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана”, 2018. 23 с.
- Жезмер В.Ю., Галдина Е.А., Кутищева К.В., Лаврова Н.С. Контроль санитарно-бактериологического состояния водной среды в УЗВ // Сб. науч. тр. ВНИИПРХ. Индустриальное рыбоводство в замкнутых системах. М.: ВНИИПРХ, 1991. № 64. С. 14–15.
- Комкова О.П., Образцова А.М., Сидорова Н.А. Антилизоцимная активность *Escherichia coli*, выделенной на разных этапах естественной циркуляции вида // Ученые записки Петрозаводского государственного университета. 2016. 2, 110–113.
- Методические указания по лабораторной диагностике псевдомнозов рыб / Сб. инструкций по борьбе с болезнями рыб. М.: Отдел маркетинга АМБ-агро. 1998. С. 152–160.
- Маннапова Р.Т. Практикум для выполнения лабораторно-практических работ: учебник. М.: Проспект, 2021. 440 с.
- Марданова А.М., Кабанов Д.А., Рудакова Н.Л., Шарипова М.Р. Биопленки: основные принципы организации и методы исследования. - Казань: К(П)ФУ, 2016. 42 с.
- Нижельская Е.И., Полозюк О.Н., Войтенко Л.Г. Диагностика и лечебно-профилактические мероприятия при болезнях рыб: учебное пособие для студентов факультета ветеринарной медицины. Персиановский: Донской ГАУ, 2019. 162 с.
- Определитель бактерий Берджи. М.: Мир, 1997. 1250 с.
- Сердюк А.В. Результаты предварительной оценки угрозы инфекционных заболеваний в полярной аквакультуре лососевых // Науч.-техн. пробл. марикультуры в стране: Тез. докл. Всес. конф., 16–20 мая, 1990. Владивосток. 1989. С. 186–187.
- Сидорова Н.А., Обухова Е.С. Антагонистическая активность оригинальных штаммов *Pseudomonas alcaligenes* и *Pseudomonas cichorii* // Материалы Всероссийской научно-практической конференции “От микроскопа до нанотехнологий”. Санкт-Петербург: ВМедА, 2013. С. 61–62.
- Altinok I., Kayis S., Capkin, E. *Pseudomonas putida* infection in rainbow trout // *Aquaculture*. 2006. № 261. P. 850–855.
- Altinok I., Baltab F., Capkin E., Kayis S. Disease of rainbow trout caused by *Pseudomonas luteola* // *Aquaculture*. 2007. № 273. P. 393–397.
- Finck-Barbançon V., Goranson J., Zhu L., Sawa T., Wiener-Kronish J.P. et al. ExoU expression by *Pseudomonas aeruginosa* correlates with acute cytotoxicity and epithelial injury // *Mol. Microbiol.* 1997. № 25. P. 547–557.
- Furushita M., Shiba T., Maeda T., Yahata M., Kaneoka A. et al. Similarity of tetracycline resistance genes isolated from fish farm bacteria to those from clinical isolates // *Appl. Environ. Microbiol.* 2003. № 69. P. 5336–5342.
- Hatai K., Egusa S., Nakajima M., Chikahata H. *Pseudomonas chlororaphis* as a fish pathogen // Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries. 1975. № 41(11). P. 1203.
- LPSN “List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature” at. <https://lpsn.dsmz.de>.
- O'Toole G.A., Kolter R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. // *Mol Microbiol.* 1998. Vol. 28. № 3. P. 449–461.
- Rojo E. Carbon catabolite repression in *Pseudomonas*: optimizing metabolic versatility and interactions with the environment // *FEMS Microbiol. Rev.* 2010. Vol. 34. № 5. P. 658–684.
- Palleroni N.J. The *Pseudomonas* story // *Environ Microbiol.* 2010. Vol. 12. № 6. P. 1377–1383.
- Puchalka J., Oberhardt M.A., Godinho M., et al. Genome-scale reconstruction and analysis of the *Pseudomonas putida* KT2440 metabolic network facilitates applications in biotechnology // *PLoS Comput Biol.* 2008. Vol. 4. № 10. P. 100–121.
- Rhodes G., Swings J., McGann P., Hiney M., Smith P. Distribution of oxytetracycline resistance plasmids between *Aeromonads* in hospital and aquaculture environments: Implication of Tn1721 in dissemination of the tetracycline resistance determinant Tet A // *Appl. Environ. Microbiol.* 2000. № 66. P. 3883–3890.
- Spiers A.J., Buckling A., Rainey P.B. The causes of *Pseudomonas* diversity // *Microbiology*. 2000. 146, 2345–2350.
- Stepanovic S., Vukovi D., Hola V. Quantification of biofilm in microtiterplates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by *Staphylococci* // *APMIS*. 2007. № 115. P. 891–899.
- Sorum H. Antimicrobial drug resistance in fish pathogens // Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin; Aarestrup, F.M., Ed.; ASM Press: Washington, DC, USA. 2006. P. 213–238.
- Wakabayashi H., Egusa S. Characteristics of *Pseudomonas* sp. From an epizootic of pond-cultured eels (*A. japonica*) // *Bull. Japan Soc. Scient. Fish.* 1972. № 38. P. 577–587.

REFERENCES

- Altinok I., Baltab F., Capkin E., Kayis S. Disease of rainbow trout caused by *Pseudomonas luteola*. *Aquaculture*, 2007, no. 273, pp. 393–397.
- Altinok I., Kayis S., Capkin E. *Pseudomonas putida* infection in rainbow trout. *Aquaculture*, 2006, no. 261, pp. 850–855.
- Basankina V.M. Epizooticheskie osobennosti aeromonozov ryb v usloviyakh regiona Severnogo Kavkaza [Epizootic features of aeromonosis of fish in the conditions of the North Caucasus region]. *Avtoref. diss ... kand. vet. nauk.* Krasnodar, 2020. 23 p. (In Russian)
- Buharin O.V., Usvyacov B.Ya., Malyshev A.P., Nemceva N.V. Metod opredeleniya antilizocimnoj aktivnosti mikroorganizmov [Method for determining the antilysoczyme activity of microorganisms]. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunologii*, 1984, no. 2, pp. 27–28. (In Russian)
- Finck-Barbançon V., Goranson J., Zhu L., Sawa T., Wiener-Kronish J.P. et al. ExoU expression by *Pseudomonas aeruginosa* correlates with acute cytotoxicity and epithelial injury. *Mol. Microbiol.* 1997, no. 25, pp. 547–557.
- Furushita M., Shiba T., Maeda T., Yahata M., Kaneoka A. et al. Similarity of tetracycline resistance genes isolated from fish farm bacteria to those from clinical isolates. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003, no. 69, pp. 5336–5342.
- Ginaytov N.S. Kliniko-patomorfologicheskaya harakteristika psevdomonozov osetrovyh ryb, vyrashchivaemyh v ustanovkah zamknutogo vodosnabzheniya [Clinical and pathological characteristics of pseudomonosis of sturgeon fish grown in closed water supply installations]. *Avtoref. diss ... kand. vet. nauk.* Krasnodar, 2018. 23 p. (In Russian)
- Hatai K., Egusa S., Nakajima M., Chikahata H. *Pseudomonas chlororaphis* as a fish pathogen. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 1975, no. 41(11), p. 1203.
- Komkova O.P., Obrazcova A.M., Sidorova N.A. Antilizocimnaya aktivnost' *Escherichia coli*, vydelennoj na raznyh etapah estestvennoj cirkulyacii vida [Antilysoczyme activity of *Escherichia coli* isolated at different stages of natural circulation of the species]. *Uchenye zapiski Petrozavodskogo gosudarstvennogo universiteta*, 2016, no. 2(155), pp. 110–113. (In Russian)
- Mannapova R.T. Praktikum dlya vypolneniya laboratorno-prakticheskikh rabot [Workshop to perform laboratory and practical work]. M., Prospekt, 2021, 440 p. (In Russian)
- Mardanov A.M., Kabanov D.A., Rudakova N.L., Sharipova M.R. Bioplenki: osnovnye principy organizacii i metody issledovaniya [Bioplenki: Basic principles of organization and research methods] Kazan', K(P)FU, 2016, 42 p. (in Russian)
- Metodicheskie ukazaniya po laboratornoj diagnostike psevdomonozov ryb [Methodical guidelines for laboratory diagnostics of fish pseudomonosis]. *Sb. instrukcij po bor'be s boleznyami ryb.* M., Otdel marketinga AMB-agro, 1998, pp. 152–160. (In Russian)
- Nizhel'skaya E.I., Polozyuk O.N., Vojtenko L.G. Diagnostika i lechebno-profilakticheskie meropriyatiya pri boleznyah ryb: uchebnoe posobie dlya studentov fakul'teta veterinarnoj mediciny [Diagnosis and medical and preventive measures for fish diseases: Tutorial for students of the faculty of veterinary medicine] Persiansovskij, Donskoj GAU, 2019, 162 p. (In Russian)
- O'Toole G.A., Kolter R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol. Microbiol.*, 1998, vol. 28, no. 3, pp. 449–461.
- Palleroni N.J. The *Pseudomonas* story. *Environ. Microbiol.*, 2010, vol. 12, no. 6, pp. 1377–1383.
- Puchalka J., Oberhardt M.A., Godinho M., et al. Genome-scale reconstruction and analysis of the *Pseudomonas putida* KT2440 metabolic network facilitates applications in biotechnology. *PLoS Comput. Biol.*, 2008, vol. 4, no. 10, pp. 100–121.
- Rhodes G., Huys G., Swings J., McGann P., Hiney M., Smith P. Distribution of oxytetracycline resistance plasmids between *Aeromonads* in hospital and aquaculture environments: Implication of Tn1721 in dissemination of the tetracycline resistance determinant Tet A. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, no. 66, pp. 3883–3890.
- Rojas E. Carbon catabolite repression in *Pseudomonas*: optimizing metabolic versatility and interactions with the environment. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2010, vol. 34, no. 5, pp. 658–684.
- Serdyuk A.V. Rezul'taty predvaritel'noj ocenki ugrozy infekcionnyh zabolevanij v polyarnoj akvakul'ture lososevyh [Results of preliminary assessment of the threat of infectious diseases in the polar aquaculture of salmon] *Nauch.-tekhn. probl. marikul'tury v strane: Tez. dokl. Vses. konf., 16–20 maya, 1990.* Vladivostok, 1990, pp. 186–187. (In Russian)
- Sidorova N.A., Obuhova E.S. Antagonisticheskaya aktivnost' original'nyh shtamov *Pseudomonas alcaligenes* i *Pseudomonas cichorii* [Antagonistic activity of original strains *Pseudomonas alcaligenes* and *Pseudomonas cichorii*]. *Materialy Vserossijskoj nauchno-prakticheskoy konferencii "Ot mikroskopa do nanotekhnologii"*. Sankt-Peterburg: VMedA, 2013, pp. 61–62. (In Russian)
- Spier A.J., Buckling A., Rainey P.B. The causes of *Pseudomonas* diversity. *Microbiology*, 2000, vol. 146, pp. 2345–2350.
- Stepanovic S., Vukovi D., Hola V. Quantification of biofilm in microtiterplates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by *Staphylococci*. *APMIS*, 2007, no. 115, pp. 891–899.
- Sorum H. Antimicrobial drug resistance in fish pathogens. *Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin*. Washington, ASM Press. 2006, pp. 213–238.

- Wakabayashi H. Egusa S. Characteristics of *Pseudomonas* sp. From an epizootic of pond-cultured eels (*A. japonica*). *Bull. Japan Soc. Scient. Fish.*, 1972, no. 38, pp. 577–587.
- Zhezmer V.Yu, Galdina E.A., Kutishcheva K.V., Lavrova N.S. Kontrol' sanitarno-bakteriologicheskogo sostoyaniya vodnoj sredy v UZV [Control of the sanitary and bacteriological state of the aquatic environment in the RWI]. *Sb. nauch. tr. VNIIPRH. Industrial'noe rybovodstvo v zamknutyh sistemah*, M., VNIIPRH, no. 64, pp. 14–15. (In Russian)

PHENOTYPIC DIVERSITY OF BACTERIA OF THE PSEUDOMONAS COMPLEX, ISOLATED FROM *PARASALMO MYKISS* Walb., ACCORDING TO THE FACTORS OF INVASIVENESS

A. I. Savushkin, N. A. Sidorova

Petrozavodsk State University

185910 Petrozavodsk, Republic of Karelia, Russia, e-mail: fagafon@yandex.ru

The article presents the results of studies of the phenotypic properties of bacteria of the pseudomonas complex group isolated from the microflora of 57 individuals of rainbow trout *Parasalmo mykiss* Walbaum, 1792, aged 1+ and 2+, selected for a planned study from reservoirs of fishery importance located in Karelia. The emphasis on the phenotypic properties of isolated microorganisms is associated with the increasing epizootic role of virulent strains of *Pseudomonas aureofaciens*, *Ps. chlororaphis*, *Ps. fluorescens*, *Ps. putida* and others in the development of infectious diseases of salmon fish species. Isolation, identification and study of phenotypic features of isolated pseudomonas cultures were performed according to the recommendations for laboratory diagnostics of *Pseudomonas* for fish. In parallel, to analyze the degree of invasiveness, the hemolytic activity (HA), as well as the ability to biofilm formation (BPO) and the antilysozyme activity (ALA) of bacteria were evaluated. It was found that the isolated phenotypic variants of pseudomonas bacteria have a pronounced invasiveness, which is more manifested in the form of hemolytic and anti-lysozyme activity.

Keywords: pseudomonads, phenotypic diversity, invasiveness, rainbow trout microflora