

инокулированных препаратами плазмид проводили методом непрямого твердо-фазного ИФА. Результаты оценивали спектрофотометрическим методом с помощью Multiskan MCC 340 (Labsystems, Finland) при $\lambda = 405$ нм.

Выводы.

Использование описанного выше метода доставки генетического материала с использованием микросфер в ветеринарной медицине позволит не только эффективно доставлять биологически активные молекулы сквозь различные барьеры организма, которые они не способны преодолевать самостоятельно (ферментные системы макроорганизма), но и существенно снижать эффективную дозу вводимого препарата.

Литература:

1. A. Bartkowiak, W. Brylak, , Polimery 51 (7-8), (2006), 547-554
2. Bartkowiak A., Wandrey Ch., Hunkelelr D. // Abstract Book of second International Symposium on Polyelectrolytes, Trondheim, Norway 1998, P. 14.
3. Mahato R. I., Takakura Y., Hashida M. (1997). J. Drug Targeting. 4, 337-357
4. Petrov A.I., Volodkin D.V., Sukhorukov G.B. (2005) Biotechnol. Prog., 21, 918-925.
5. В.И. Балышева, Н.Н. Власова, О.Е. Селина, С.Б. Белов, Е.А. Марквичева, Г.Б. Сухоруков, Российский ветеринарный журнал. 2007. №1, стр. 25-26.
6. О.Е. Селина, С. Ю. Белов, Н.Н. Власова, В.И. Балышева и др., Биорганическая химия, Vol 35, № 1, 2009 P. 113-115

РАЗРАБОТКА СИСТЕМЫ ТЕСТОВ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИИ PSEUDOMONAS PUTIDA

Викторов Д.А., Богданов И.И., Шестаков А.Г., Васильев Д.А.

*Working out of the scheme of allocation and system of tests for identification
Pseudomonas putida.*

Pseudomonas putida – важный в научном и практическом отношении микроорганизм, широко населяющий биосферу и принимающий активное участие в её процессах. Штаммы данной бактерии крайне гетерогенны в отношении источников углеродного питания, ассимилируют от 32 до 84 различных субстратов, благодаря чему *Pseudomonas putida* используют для очистки воды и почвы от нефти и нефтепродуктов. **Pseudomonas putida является возбудителем псевдомоноза у прудовых рыб, сопровождающееся массовой гибелью рыбы, а также причиной возникновения язвенных и гнойных ран кожи у морских млекопитающих.** В ряде случаев вызывает гнойно-воспалительные процессы у человека и животных, приводя к таким заболеваниям как инфекции нижних дыхательных путей, абсцессы, бактериемию, раневую инфекцию, инфекции мочевыводящих путей. (Vincent JL, 1995) Кроме того, **Pseudomonas putida является фитопатогеном, поражающим различные растения** (Беляков, Япис, 1988; Szolnoki, 1991 и др.) Однако, в других случаях, широко населяя ризосферу, играет важную роль

в защите растений от бактериальных и грибных заболеваний, что позволяет использовать их в качестве средств биологической борьбы с вредителями сельского хозяйства, а так же для стимуляции роста растений.

Выше перечисленные причины, наряду с отсутствием достоверных методов лабораторной идентификации псевдомонад, обуславливают научный и практический интерес к *Pseudomonas putida*.

Целью исследования является разработка схемы выделения и системы тестов для идентификации *Pseudomonas putida*. **Выделение данного микроорганизма** из объектов окружающей среды с использованием разработанной схемы.

В качестве образцов для исследования использовали сточные воды города Ульяновска.

Первоначальным этапом схемы выделения являлся посев 1 мл исследуемого субстрата на 5 мл синтетической среды – бульон с сукцинатом натрия и солями следующего состава:

Сукцинат натрия – 4 г,

Нитрат калия – 0,5 г,

Фосфат калия двузамещённый – 0,5 г,

Сульфат магния – 0,2 г,

Хлорид кальция – 0,1 г,

Вода дистиллированная – 1 л.

Сукцинат натрия в данной среде служит единственным источником углерода и доступен в качестве питательного субстрата для бактерий неферментирующей группы. Нитрат калия служит источником азота, фосфат калия двузамещённый, сульфат магния и хлорид кальция необходимы для обеспечения биохимических процессов в клетках *Pseudomonas putida*.

После 48-72 часов культивирования при оптимальной для *Pseudomonas putida* температуре (23-25°C), наблюдалось помутнение прозрачного бульона, образование поверхностной плёнки, осадка, в некоторых случаях окраска среды в желтовато-зеленоватый цвет, очевидно, за счёт выделяемых бактерией пигментов.

Из бульона с сукцинатом натрия и солями производили посев по методу Дригальского на чашки Петри с средой Хью-Лейвсена, в которую добавляли фурадонин в качестве ингибирующего агента, подавляющего рост грамположительных палочек и кокков и грамотрицательных палочек семейства *Enterobacteriaceae*. (Афонин Э.А., 1999) После культивирования на данной среде с её поверхности отщипывали колонии различной морфологии, но дающие положительную реакцию, то есть, утилизирующие глюкозу путём окисления.

На этом этапе, при использовании разработанной нами схемы выделения и питательных сред, было выделено 65 штаммов, относящихся к бактериям неферментирующей группы.

После получения чистых культур, проводилось исследование их биохимических свойств по предлагаемым нами тестам:

- тест на оксидазу,
- тест на каталазу,
- рост на агаре с 0,2% хлоридом бария,
- окраска по Граму и микроскопия,
- тест на подвижность,

- рост при 4°C,
- рост при 41°C,
- рост на бульоне с ацетамидом,
- тест на желатиназу.

Все 65 культур, были способны использовать сукцинат натрия в качестве источника углерода, давали положительную реакцию на среде Хью-Лейвсена, являлись оксидазо- и каталазоположительными. Для постановки теста на оксидазу использовался 1% раствор 2-N-диметилпарафенилендиамин, теста на каталазу – 3% раствор перекиси водорода, которые наносили на колонии бактерий на мясопептонном агаре. Способность к росту на агаре с 0,2% хлоридом бария проверялась, наряду с окраской по Граму и тестом на подвижность, с целью выявления родовой принадлежности исследуемых штаммов: большинство видов рода *Pseudomonas* не устойчивы к солям двухвалентного бария. Все псевдомонады при окраске по Граму выявляются как грамотрицательные палочки, большинство видов, в том числе и *Pseudomonas putida*, подвижны благодаря наличию полярных жгутиков.

Способность утилизировать ацетамид исследовалась для выявления вида *Pseudomonas aeruginosa*, большинство штаммов которого способны к его утилизации, в отличие от штаммов *Pseudomonas putida*, ни один из которых не способен утилизировать ацетамид.

Pseudomonas putida растёт в интервале температур от 4 до 28°C (Смирнов, Киприанова, 1990), в связи с этим, все этапы культивирования проводили при температуре 23-25°C. Способность к росту при 4°C и 41°C, а так же способность разжижать желатин, исследовались для дифференцирования *Pseudomonas putida* от штаммов других псевдомонад, отличающихся по этим признакам, в частности, от 29 видов: *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas alcaligenes*, *Pseudomonas caryophylli*, *Pseudomonas cepacia*, *Pseudomonas chlororaphis*, *Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas diminuta*, *Pseudomonas facilis*, *Pseudomonas gladioli*, *Pseudomonas mallei*, *Pseudomonas mendocina*, *Pseudomonas pickettii*, *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, *Pseudomonas pseudomallei*, *Pseudomonas saccharophila*, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas vesicularis*, *Pseudomonas viridiflava*.

Оценка способности к росту при 4°C и 41°C проводилась культивированием в питательном бульоне при соответствующей температуре в течении 120 часов. Если спустя указанное время питательный бульон с внесённой культурой не приобретал характерного помутнения, результат теста считался отрицательным. Определение фермента желатиназы (тест на разжижение желатина) проводили по стандартной методике – путём засева чистой культуры уколом в столбик застывшего 15%-ного раствора желатина в питательном бульоне с последующей инкубацией при оптимальной для исследуемой культуры температуре. (Сидоров М.А., 1995)

После выполнения всех вышеперечисленных тестов нами были получены результаты, приведённые в таблице 1.

Таблица 1. Результаты тестов, проведённых на 65 выделенных штаммах

Тест	Количество штаммов с положительными для <i>Pseudomonas putida</i> результатами	Процент штаммов с положительными для <i>Pseudomonas putida</i> результатами
Рост на бульоне с сукцинатом натрия	65	100
Реакция на среде Хью-Лейвсена	65	100
Оксидаза	65	100
Каталаза	65	100
Рост на агаре с 0,2% хлоридом бария	65	100
Окраска по Граму	65	100
Подвижность	64	98,5
Рост при 4°C	65	100
Рост при 41°C	64	98,5
Рост на бульоне с ацетамидом	64	98,5
Тест на желатиназу	35	53,8

По данным определителя бактерий Берджи (1997), для вида *Pseudomonas putida* характерны следующие результаты по указанным тестам:

Тест	Реакция, характерная для вида <i>Pseudomonas putida</i>
Способность утилизировать сукцинат натрия	+
Реакция на среде Хью-Лейвсена	+
Оксидаза	+
Каталаза	+
Рост на агаре с 0,2% хлоридом бария	-
Окраска по Граму	-
Подвижность	+
Рост при 4°C	+
Рост при 41°C	-
Способность утилизировать ацетамид	-
Тест на желатиназу	-

Исходя из этих данных, нами был сделан вывод, что из 65 выделенных

культур, 32 штамма (49,2%) проявляют аналогичные свойства, что позволяет отнести их к виду *Pseudomonas putida*.

Таким образом, разработанная нами схема позволяет дифференцировать *Pseudomonas putida* от других видов бактерий и выделять данный микроорганизм из объектов окружающей среды.

Литература:

1. Беляков В.Д., Ряпис Л.А. Сапрофиты медицинского значения и природа их патогенности на примере псевдомонад // Экология возбудителей сапронозов. М., 1988. С.7-20.

2. Бухарин О.В., Литвин В.Ю. Патогенные бактерии в природных экосистемах. Екатеринбург: УрО РАН, 1997. 277 с.

3. Определитель Берджи. В 2-х т.Т.1: Пер. с англ./Под ред. Дж.Хоулта, Н.Крига, П.Снита, Дж.Стейли, С.Уильямса. – М.: Мир, 1997. – 432с.: ил.

4. Рубан Е.Л. Физиология и биохимия представителей рода *Pseudomonas*. М.: Наука, 1986.

5. Сидоров М. А., Скородумов Д. И., Федотов В. Б Определитель зоопатогенных микроорганизмов. М.: Колос, 1995. – 391с.: ил.

6. Смирнов В.В., Киприанова Е.А. Бактерии рода *Pseudomonas*. Киев. Наукова думка, 1990, с. 176-187.

7. Campanella L., Russo M.V. Prevention by *Pseudomonas putida* of the benzene accumulation in tumor and normal tissues (pilot study). Exp Oncology 2002; **24**: 231-233.

8. Luna CM, Vujacich P, Niederman MS et al. Impact of BAL data in the therapy and outcome of ventilator-associated pneumonia. Chest. 1997; **111**(3): 677-85.

9. Szolnoki Z. Numerikal analysis of *Pseudomonas fluorescens-putida* rhizoplane and tuber surface population of the potato cultivar Hungarian Rosa (Contribution to the bacteriology of Potato) // Acta Phytorathol. et Entomol. Hung., 1991. V.26. N.3-4. P.3-4.

10. Vincent JL, Binari DJ, Suter PM et al. The prevalence of nosocomial infection in intensive care in Europe. Results of the European prevalence of infection in intensive care (EPIC) study. JAMA; 1995; **274**(8): 639-44.
