

- разжижение желатина,  
- отсутствие ферментации маннита, лактозы, сорбита, адонита, арабинозы.

Однозначной зависимости между источником выделения *Bacillus cereus* и принадлежностью их к определенному биохимическому не наблюдали.

Литература:

1. Буравцева Н.П., Лопаткин О.Н. Достижения и перспективы борьбы с сибирской язвой в СССР // Матер. X Пленарного заседания междуведомственной комиссии по борьбе с сибирской язвой. – М., 1983. – С.105-107.

2. Груз Е.В. Изучение и рационализация некоторых лабораторных методов индикации и идентификации *Bac.anthraxis*. // Автореф. дис. канд. мед. наук. – Одесса. – 1965. – 19 с.

3. Иванова С.П. // Журн. микробиол. – 1957. - № 1. – С.75-79.

4. Мелихов А.Д. // Сб. науч. тр. Московск. вет.акад. – М., 1957. – Т.19. – В.2. – Ч.1. – С.86-88.

5. Полховский В.А. Биохимические типы *Bacillus cereus*, выделенных из различных природных источников // Журн. микробиол. – 1970. - № 2. – С.82-86.

6. Bergey's manual of determinative bacteriology. – 8<sup>th</sup> ed. – Baltimore: Williams and Wilkins Co. 1993. – 1258 p.

7. Ivanovics G., Fuldes J. // Acta microbial. Acad. Sci. Hng. – 1958. – V.5. - № 1. – P.89-109.

8. Kundrat W. Zur Differenzierung aerober sporenbildner (Genus Bacillus Cohn). – Zbl. Veterinarmed, 1963. – B.10. – N 5. – S.418-426.

9. Morris E.J. // J. gen. Microbiol. – 1955. – V.13. - № 3. – P.456-460.

10. Ottow J.C.G. Pectinolytic-, ureolytic- and lecithinolytic activity as a diagnostic aid in the identification of species classified in the genus Bacillus cohn. // Zbl. Bakteriол. Parasitenk., Infektionskrankh. und Hyg., 1972, Abt.2. – 127. – N 4. – P.301-312.

11. Seidel G., Strassmann R. // Arch. Exe. Vet. Med. – 1956. – B.10. – H.3. – S.325-327.

---

УДК 619:579

## РЕЗУЛЬТАТЫ РАЗРАБОТКИ СХЕМЫ ВЫДЕЛЕНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИИ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

**Шестаков А. Г. Богданов И. И. Васильев Д. А.**  
**Научно-исследовательский инновационный центр**  
**микробиологии и биотехнологии**  
**ФГОУ ВПО «Ульяновская государственная**  
**сельскохозяйственная академия»**

*Results of working out of the scheme of allocation and identification of bacteria of kind Pseudomonas aeruginosa are described. The presented scheme of allocation allows to define in a current 72-96 hours bacteria of this kind.*

*Описаны результаты разработки схемы выделения и идентификации бактерий вида *Pseudomonas aeruginosa*. Представленная схема выделения позволяет в течение 72ч.-96ч. типировать бактерии этого вида.*

Необходимость в разработке схемы выделения и идентификации штаммов бактерий *Pseudomonas aeruginosa* в объектах внешней среды, вызвана трудностями дифференциации беспиgmentных штаммов *Pseudomonas aeruginosa* от штаммов других близких по культуральным свойствам родов.

Представленная нами 3-х этапная схема выделения штаммов бактерий *Pseudomonas aeruginosa* позволяет в течение 72ч.-96ч. типировать бактерии этого вида.

Этап №1. Производится посев исследуемой жидкости, пробы пищевых продуктов или смыва с обследуемой поверхности в среду накопления.

Состав среды накопления г/л:

Сукцинат натрия	20
L-аргинин	2
Хлорид натрия	5
Сульфат магния	0,5
Гидрофосфат калия	1,39
Дигидрофосфат калия	0,73
Фурадонин	0,15

Все компоненты среды, кроме фурадонина растворяют в 1л. деионизированной воды затем автоклавируют при 0,5 атм. Асептически, в остывшую до 45 °С среду вносят навеску фурадонина, перемешивают и разливают по пробиркам. Готовая среда прозрачна, слегка окрашивается в желтоватый оттенок фурадонина. Сукцинат натрия в среде является источником углерода, L-аргинин является источником азота, хлорид натрия обеспечивает осмотическое давление в микробной клетке, соли калия и магния в указанной концентрации необходимы для обеспечения биохимических процессов в клетках *Pseudomonas aeruginosa*. Фурадонин является ингибирующим агентом в среде накопления, не влияющим на развитие клеток *Pseudomonas aeruginosa*.

Инкубирование продолжается 24 часа при 36 °С. Среда, за счет содержания фурадонина избирательно ингибирует грамположительные палочки и кокки, а так же грамотрицательные палочки семейства *Enterobacteriaceae*, способствуя накоплению клеток *Pseudomonas aeruginosa*. Рост на среде с сукцинатом характеризуется помутнением среды, образованием поверхностной пленки, придонного осадка и в некоторых случаях изменением консистенции с жидкой на желеобразную за счет накопления слизистых веществ, продуцируемых муконидными штаммами *Pseudomonas aeruginosa*.

Этап №2. Из среды накопления бактериальной петлей производится посев по методу Дригальского на плотную селективную среду с цетримидом. Среда содержит следующие ингредиенты г/л:

агар-агар	20
питательный бульон для культивирования микроорганизмов (сухой)	15
цетримид	0,3

Компоненты среды смешиваются в 1л. деионизированной воды и автоклавируются при 1,5 атм. 15мин.

Ингибирующий агент цетримид – катионный детергент добавляется в

среду после автоклавирования. Среда обеспечивает клетки *Pseudomonas aeruginosa* питательными веществами, необходимыми для роста. Время инкубирования 24ч. при 36 °С. Цетримид, как ингибитор роста, активен в отношении грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов, за исключением *Pseudomonas aeruginosa*, некоторых других видов рода *Pseudomonas* и неферментирующих родов бактерий. Колонии штаммов *Pseudomonas aeruginosa* обладающие пигментом, на среде с цетримидом имеют типичную форму колоний («глазунья»), выделяют триметиламин придающий сладковатый запах. Колонии непигментирующих штаммов по морфологии сходны, но обладают неприятным запахом и не окрашивают среду. В УФ лучах, при интенсивном росте пигментообразующих бактерий *Pseudomonas aeruginosa* наблюдается флюоресценция от желто-салатового до желто-зеленого цвета, в зависимости от выделяемого штаммами пигмента. Сразу на поверхности среды возможна постановка оксидазной (с применением 1 % раствора 2-N-диметилпарафенилендиамина) и каталазной пробы, а также бактериальная окраска по Граму. На втором этапе при наличии пигментов пиоцианина, пиорубина, пиомеланина, УФ флюоресценции, грамотрицательной окраске, положительных оксидазной и каталазной пробах возможно заключение, о том, что выросшие на селективной среде штаммы – *Pseudomonas aeruginosa*, так как близкородственные виды не способны к выработке пиоцианина. В любом сомнительном случае, а также при росте непигментирующих штаммов, рекомендуем постановку тестов (см. этап №3) для окончательной идентификации.

Этап №3. Нами разработана тест система для идентификации бактерий *Pseudomonas aeruginosa*, выросших на агаре с цетримидом. Предлагаемая тест система включает 4 теста (А, В, С, D) **воспроизводимые пробирочным методом.**

Тест А основан на способности *Pseudomonas aeruginosa* к денитрификации в анаэробных условиях и на утилизации ацетамида. Состав среды г/л:

агар-агар	3
ацетамид	10
хлорид натрия	5
сульфат магния	0,5
гидрофосфат калия	1,39
дигидрофосфат калия	0,73
нитрат калия	2
индикатор феноловый красный	0,012

Ацетамид служит единственным источником углерода в среде, усваиваемый бактериями *Pseudomonas aeruginosa*, нитрат калия является акцептором электронов для клеток *Pseudomonas aeruginosa* в анаэробных условиях, а также источником минерального азота. Хлорид натрия обеспечивает осмотическое давление в клетке, а соли калия и магния клеточный метаболизм.

Все компоненты среды смешиваются в 1л. деионизированной воды и нагреваются до полного растворения компонентов.

После стерилизации при 0,5 атм. в пробирки с горячей средой наслаивается стерильное вазелиновое масло. Затем пробирки подвергаются резкому охлаждению под струей холодной воды, с целью уменьшения в среде парциального давления кислорода. Часть исследуемой колонии с селективной среды захватывается бактериологической петлей и уколком вносится в нитратно-ацетамидную среду. Инкубация проводится в термостате при 36 °С 24ч. Положительной реак-

цией считается изменение окраски среды с желтой на красную или малиновую, а также возможное образование пузырьков  $N_2$  в толще среды или разрывов среды. В случае отрицательной реакции инкубирование продолжают до 48ч.

Тест В основан на ингибировании роста *Pseudomonas aeruginosa* солями бария. Стерильный 2 % МПА с добавлением 2г/л хлорида бария разливают по пробиркам и дают застыть в наклонном положении для формирования скоса. На поверхность косяка бактериологической петлей засевают исследуемую колонию с селективной среды с цетримидом. Инкубируют при 42 °С 24ч. Положительным тестом на *Pseudomonas aeruginosa* является отсутствие роста бактерий на агаре с хлоридом бария.

Тест С на окисление глюкозы предназначен для дифференциации *Pseudomonas aeruginosa* от бактерий не способных к окислению глюкозы, либо зашелачивающих ее (род *Alcaligenes* и др.). Состав среды г/л:

агар-агар	20
глюкоза	10
пептон	2
хлорид натрия	5
сульфат магния	0,5
гидрофосфат калия	1,39
дигидрофосфат калия	0,73
бромтимоловый голубой	0,03

Среду разливают по пробиркам и дают застыть для формирования скоса. Посев производят с селективной среды с цетримидом бактериологической петлей на поверхность косяка. Положительной реакцией считается изменение цвета индикатора с зеленого на желтый на поверхности скоса и в верхней части столбика.

Тест Д определяет наличие у микроорганизма выросшего на селективной среде с цетримидом ферментов желатиназ. К МПБ добавляется желатин до концентрации 15 %. После стерилизации среда с желатином разливается в пробирки, засеваются исследуемым штаммом бактерий и помещается в термостат при 36 °С на 24ч. *Pseudomonas aeruginosa* проявляет выраженные протеолитические свойства. Положительной реакцией считается отсутствие застудневания желатина в пробирке с исследуемым штаммом при 0 °С – 4 °С в течении 15 мин. Большинство близкородственных *Pseudomonas aeruginosa* бактерий не способны разжижать желатин.

Разработанная нами схема выделения и идентификации *Pseudomonas aeruginosa* позволяет не только повысить эффективность выявления пигментообразующих штаммов *Pseudomonas aeruginosa*, но и увеличить процент дифференциации безпигментных штаммов бактерий этого вида. В целом, если анализировать предложенную схему выделения и идентификации, то она укладывается в меньшее количество тестов, не понижая результативность исследования.

Предлагаемая схема проверена на 3 референс штаммах *Pseudomonas aeruginosa* №1677, №128, №381 полученных из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ, 4 «полевых» штаммах полученных из Саратовского государственного медицинского университета, а также 23 «полевых» штаммах выделенных нами ранее. По разработанной схеме из сточных вод г. Ульяновска и пищевых продуктов выделено 5 штаммов *Pseudomonas aeruginosa*.