

- 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. – 8th 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 безпигментных 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 защелачивающих 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*.