

Diego, 2000. – P. 159-165.

4. General morphology and capsid fine structure of african swine fever virus particles/ J.L. Carrascosa, J.M. Carazo, A.L. Carrascosa et al.// *Virology*. – 1984. - № 132. – P. 160-172.

5. *Molecular Cloning. A laboratory Manual*/ T. Maniatis, E.F. Fritsch, S. Sambrooks// Cold Spring Harbor Laboratory. – Cold Spring Harbor, New York, 2006.

УДК 619:579

## ВЫДЕЛЕНИЕ И ТИПИРОВАНИЕ БАКТЕРИИ *PSEUDOMONAS FLUARESCENS*.

**Викторов Д.А., аспирант кафедры МВЭиВСЭ УГСХА**

**Артамонов А.М. соискатель кафедры МВЭиВСЭ УГСХА,**

**Богданов И.И. к в н, доцент УГСХА**

**Научно-исследовательский инновационный центр микробиологии и биотехнологии УГСХА, г. Ульяновск.**

*Pseudomonas fluorescens* выделяют главным образом из недоброкачественных пищевых продуктов (яйца, мясо, рыба, молоко), что указывает на роль данных бактерий в порче пищевых продовольственных товаров и сырья. Могут быть выделены из клинического материала (Сидоров М.А., 1995). Является возбудителем псевдомоноза и лепидортоза прудовых рыб.

Наряду с другими видами бактерий неферментирующей группы, способны к биодegradации различных углеводов, что придаёт *Pseudomonas fluorescens* важное практическое значение при очистке почвы, воды и сточных вод промышленных предприятий от загрязнений нефтепродуктами. Особенно актуально применение психрофильной бактерии *Pseudomonas fluorescens* с этой целью в северных регионах страны при температуре 3-15°C (Биттеева М.Б., 1998).

Широко населяет ризосферу и способствует значительному улучшению роста и развития растений, являясь потенциальным объектом агробиотехнологии для разработки на их основе биологических средств защиты растений от фитопатогенов, а так же биопрепаратов, стимулирующих рост и повышающих продуктивность растений (Schroth M.N., 1982).

Целью исследования является разработка схемы выделения и системы тестов для идентификации *Pseudomonas fluorescens*. Данная цель достигалась путём предварительного изучения биологических свойств референс-штаммов *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 13525 IV-96), *Pseudomonas putida* (№901 VI-89; ATCC 12633 IV-87), *Pseudomonas aeruginosa* (128, 1677) полученных из музея кафедры микробиологии УГСХА, подбора имеющихся тестов и конструирования оригинальных питательных сред.

Результаты тестов, характерные для исследованных референс-штаммов бактерий рода *Pseudomonas* приведены в таблице 1.

**Таблица 1. - Результаты тестов, характерные для референс-штаммов бактерий рода *Pseudomonas***

Тест	Ps.fluo-rescens 13525	Ps.putida №901	Ps.putida 12633	Ps.aerugi-nosa 128	Ps.aerugi-nosa 1677
Рост на бульоне с сукцинатом натрия	+	+	+	+	+
Реакция на элективной среде с глюкозой и фурадоном	+	+	+	+	+
Оксидаза	+	+	+	+	+
Каталаза	+	+	+	+	+
Рост на агаре с 0,2% хлоридом бария	-	-	-	-	-

Окраска по Граму	-	-	-	-	-
Подвижность	+	+	+	+	+
Рост при 4°C	+	+	+	-	-
Рост при 41°C	-	-	-	+	+
Тест на желатиназу	+	-	-	+	+

В дальнейшем образцами для исследования являлись сточные воды города Ульяновска. Первоначальным этапом схемы выделения мы предлагаем посев 1 мл исследуемого субстрата на 5 мл предложенной нами синтетической среды – бульон с сукцинатом натрия и солями следующего состава: сукцинат натрия – 4,0 г, нитрат калия – 0,5 г, фосфат калия двузамещённый – 0,5 г, фосфат калия однозамещённый – 0,1 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, фосфат калия однозамещённый, сульфат магния и хлорид кальция необходимы для обеспечения биохимических процессов в клетках *Pseudomonas fluorescens*. После 24 часов культивирования при 28°C, наблюдалось образование взвеси бактериальной массы, в некоторых случаях окраска среды в желтовато-зеленоватый цвет за счёт выделяемых бактерией пигментов. Рост бактерий на данной среде указывает на их способность использовать сукцинат натрия в качестве единственного источника углеродного питания.

Из бульона с сукцинатом натрия и солями осуществляли посев на чашки Петри с предлагаемой нами селективной средой следующего состава: фурадонин – 160,0 мг, глюкоза 10,0 г, пептон – 2,0 г, калий фосфорнокислый двузамещённый – 0,05 г, магний сернокислый – 0,1 г, бромтимоловый синий – 0,03 г, агар-агар – 15,0 г, вода дистиллированная – 1 л. Фурадонин в данной среде присутствует в качестве ингибирующего агента, подавляющего рост грамположительных палочек и кокков и грамотрицательных палочек семейства Enterobacteriaceae. Пептон является источником аминокислот, калий фосфорнокислый двузамещённый и магний сернокислый обеспечивают электролитный состав среды, необходимый для биохимических процессов. Бромтимоловый синий присутствует в среде для индикации повышения кислотности за счёт окисления глюкозы. После культивирования на данной среде в течение 24 часов при 28°C, с её поверхности отвивали колонии различной морфологии, но дающие положительную реакцию, то есть, утилизирующие глюкозу путём окисления. Положительная реакция при этом характеризуется изменением цвета индикатора бромтимолового синего с зеленоватого цвета до жёлтого, что вызвано снижением pH среды за счёт окисления глюкозы.

После получения чистых культур микроорганизмов, проводилось исследование их биохимических свойств по предлагаемым нами тестам: тест на оксидазу, тест на каталазу, рост на агаре с 0,2% хлоридом бария, изучение тинкториальных свойств, тест на подвижность, рост при 4°C, рост при 41°C, тест на желатиназу.

Все 65 выделенных культур являлись оксидазо- и каталазоположительными. Для постановки теста на оксидазу использовался 1% раствор 2-N-диметилпарафенилендиамина, теста на каталазу – 3% раствор перекиси водорода, которые наносили на колонии 24-часовой культуры бактерий на мясопептонном агаре. Устойчивость бактерий к солям двухвалентного бария проверялась методом посева бактериальных культур на пробирки со скошенным мясопептонным агаром с добавлением 0,2% хлорида бария и последующей 24-часовой выдержкой при 28°C. Положительная реакция, характерная для бактерий рода *Pseudomonas*, проявлялась в отсутствии роста на данной среде.

Все псевдомонады при окраске по Граму выявляются как грамотрицательные палочки, подвижные благодаря наличию полярных жгутиков. Подвижность выявлялась методом микроскопии бактериальной взвеси в препарате раздавленная капля.

Способность к росту при 4°C и 41°C, а так же способность разжижать желатин, исследовались для дифференцирования *Pseudomonas fluorescens* от штаммов других псевдомонад, отличающихся по этим признакам. Оценка способности к росту при 4°C и 41°C проводилась культивированием в питательном бульоне при соответствующей температуре в течение 72 часов. Для *Pseudomonas fluorescens* характерна способность к росту при 4°C и отсутствие роста при 41°C. Определение фермента желатиназы проводили путём засева чистой культуры уколом в столбик застывшего 15%-ного раствора

желатина в питательном бульоне с последующей инкубацией при 28°C в течение 24 часов. Результат данного теста для *Pseudomonas fluorescens*, по нашим данным, положительный, то есть бактерия *Pseudomonas fluorescens* содержит фермента желатиназу и способна к разжижению желатина.

Исходя из этих данных, нами был сделан вывод, что из 65 выделенных культур, 27 штаммов проявляют свойства аналогичные *Pseudomonas fluorescens* (таблица 1), что позволяет отнести их к данному виду бактерий.

Таким образом, разработанная нами схема позволяет дифференцировать *Pseudomonas fluorescens* 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. Вейант Р., Мосс У., Уивер Р., Холлис Д., Джордан Дж., Кук Э., Дейншвар М. Определитель нетривиальных патогенных грамотрицательных бактерий (анаэробных и факультативно анаэробных). Пер. с англ. – М.: Мир, 1999. – 791 с., илл.
3. Викторов Д.А., Богданов И.И., Шестаков А.Г., Васильев Д.А. Разработка системы тестов для выделения и идентификации *Pseudomonas putida*. Материалы международной научно-практической конференции «Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения», Ульяновск., ГСХА, т. 4, 2009.
4. Определитель Берджи. В 2-х т.Т.1: Пер. с англ./Под ред. Дж.Хоулта, Н.Крига, П.Снита, Дж.Стейли, С.Уилльямса. – М.: Мир, 1997. – 432с.: ил.
5. Рубан Е.Л. Физиология и биохимия представителей рода *Pseudomonas*. М.: Наука, 1986.
6. Сидоров М. А., Скородумов Д. И., Федотов В. Б Определитель зоопатогенных микроорганизмов. М.: Колос, 1995. – 391с.: ил.
7. Смирнов В.В., Киприанова Е.А. Бактерии рода *Pseudomonas*. Киев. Наукова думка, 1990, с. 176-187.
8. Judicial Commission. 1970 Opinion 37. Designation of strain ATCC 13525 as the neotype strain of *Pseudomonas fluorescens* Migula. Int. J. Syst. Bacteriol. 20: 18.
9. Rhodes M.E. 1959. The characterization of *Pseudomonas fluorescens*. J. Gen. Microbiol. 21: 221-263.
10. Schroth M.N., Hancock J.G. Disease - Suppressing Soil and Root-Colonizing Bacteria // Science. 1982. Vol. 216. P. 1376-1381.
11. Szolnoki Z. Numerical analysis of *Pseudomonas fluorescens-putida* rhizosphere and tuber surface population of the potato cultivar Hungarian Rosa (Contribution to the bacteriology of Potato) // Acta Phytotaxol. et Entomol. Hung., 1991. V.26. N.3-4.P.3-4.

### РОЛЬ PSEUDOMONAS FLUORESCENS ДЛЯ НАУКИ И ПРАКТИКИ.

**Д.А. Викторов, соискатель кафедры МВЭиВСЭ УГСХА**

**А.М Артамонов, соискатель кафедры МВЭиВСЭ УГСХА**

**И.И. Богданов к в н, доцент УГСХА**

Бактерии рода *Pseudomonas* – гетерогенная группа микроорганизмов, широко распространённых в природе и принимающих активное участие в процессах минерализации органических соединений, очистке окружающей среды от загрязнения.

Среди псевдомонад имеются возбудители особо опасных инфекций – сапа, вызываемого бактерией *Pseudomonas mallei*, и мелиоидоза, вызываемого *Pseudomonas pseudomallei*. Наряду с *Pseudomonas aeruginosa* (синегнойной палочкой) многие псевдомонады приобретают в последнее время всё более широкое распространение в клинике как возбудители оппортунистических инфекций (Bergan T., 1981, Von Graevenitz A., 1985). Отдельные виды вызывают псевдомонозы рыб. Некоторые псевдомо-