

6. Покровский В.И., Поздеев О.К. Медицинская микробиология – М.: ГЭОТАР МЕДИЦИНА, 1998. – 1200с.: ил.
7. Рубан Е.Л. Физиология и биохимия представителей рода *Pseudomonas*. - М.: Наука, 1986.
8. Терещенко Н.Н., Лушников С.В. К вопросу о рациональном применении минеральных удобрений для ускорения микробиологической деструкции нефтяных углеводородов в почве. IV Международный симпозиум “Контроль и реабилитация окружающей среды”. Материалы симпозиума.- Томск, 2004.- с.117-119

УДК 619:579

ВЫДЕЛЕНИЕ БАКТЕРИЙ-НЕФТЕДЕСТРУКТОРОВ РОДА *PSEUDOMONAS*.

Викторов Д.А., соискатель кафедры МВЭиВСЭ УГСХА

Артамонов А.М. соискатель кафедры МВЭиВСЭ УГСХА

Сидорова М.М., студент кафедры МВЭиВСЭ УГСХА

Богданов И.И. к в н доцент УГСХА

Васильев Д.А. д.б.н., профессор кафедры МВЭиВСЭ УГСХА

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

новск.

Актуальность.

Нефть относится к наиболее интенсивно используемым природным полезным ископаемым. Процессы добычи, транспортировки, переработки нефти и использования нефтепродуктов часто сопровождаются технологическими и аварийными выбросами их во внешнюю среду, что приводит к загрязнению и нарушению экосистем различной интенсивности, вплоть до экологических катастроф. Площади нефтезагрязненных земель и водоемов с каждым годом увеличиваются, поэтому продолжает оставаться актуальной проблема разработки новых и совершенствования существующих технологий ликвидации последствий техногенных контаминаций нефтью и нефтепродуктами и восстановления биопотенциала нарушенных экосистем.

Наиболее перспективным, экологически чистым и часто единственно возможным способом утилизации нефтяных загрязнений является применение биологических технологий, основанных на использовании микробных биопрепаратов.

Целью наших исследований явилось выделение бактерий-нефтедеструкторов рода *Pseudomonas* из объектов окружающей среды.

Ход исследования.

В качестве объектов, из которых проводилось выделение штаммов бактерий, использовалось 70 образцов воды и почвы, подвергнутых длительному воздействию загрязнения нефтепродуктами в условиях окружающей среды.

В асептических условиях брали 1 мл исследуемого материала и вносили в пробирки с 5 мл стерильного питательного бульона с сукцинатом натрия и солями следующего состава:

Сукцинат натрия – 4 г,

Нитрат калия – 0,5 г,

Фосфат калия двузамещенный – 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 и слабоферментирующей групп. Ни-

трат калия служит источником азота, фосфат калия двузамещённый, сульфат магния и хлорид кальция необходимы для обеспечения биохимических процессов в бактериальных клетках.

После 24 часов культивирования при температуре 28°C, наблюдалось помутнение прозрачного бульона, образование поверхностной плёнки, осадка, в некоторых случаях окраска среды в желтовато-зеленоватый цвет, очевидно, за счёт выделяемого бактериями пигмента, обладающего флуоресцентными свойствами.

Из бульона с сукцинатом натрия и солями производили посев по методу Дригальского на чашки Петри с мясопептонным агаром, с последующим культивированием в течение 24 часов при температуре 28°C. На поверхности агара наблюдался рост бактериальных колоний различного характера. Наиболее распространённые из полученных колоний имели округлую форму, диаметр 2-4 мм, край ровный, поверхность блестящая, консистенция вязкая, цвет молочно-белый, желтоватый, зеленоватый или светло-серый.

Поскольку целью исследования обусловлен интерес к бактериям рода *Pseudomonas*, для первичной идентификации данного рода бактерий использовался тест на оксидазу, который проводился по следующей методике: 1% раствор 2-N-диметилпарафенилендиамина наносили на колонии бактерий на мясопептонном агаре. Колонии оксидазоположительных штаммов бактерий в течение нескольких секунд (до 1 минуты) приобретали розовую окраску, колонии оксидазоотрицательных штаммов бактерий не меняли своей окраски. Результаты опыта учитывали не позднее чем через 5 минут после нанесения 1% раствора 2-N-диметилпарафенилендиамина, поскольку дальнейшая экспозиция может выдать ложноположительную реакцию. Так как бактерии рода *Pseudomonas* являются оксидазоположительными, для дальнейшего исследования были отобраны колонии бактерий, дающие положительную реакцию теста на оксидазу. В результате из 70 исходных образцов были отобраны 65 штаммов, колонии которых имели типичные для псевдомонад форму, размер и цвет, и являлись оксидазоположительными. Данные колонии пересевали бактериальной петлёй в пробирки со стерильным мясопептонным бульоном и культивировали в течение 24 часов при температуре 28°C, после чего снова проводили посев по методу Дригальского на чашки Петри с мясопептонным агаром, после 24 часового культивирования при температуре 28°C, отивали наиболее типичные бактериальные колонии и снова переносили в пробирки со стерильным мясопептонным бульоном. Такие пересевы проводили 5-7 раз до получения однородного роста бактериальных колоний на мясопептонном агаре.

Затем производили окраску мазков по Граму и микроскопию. Все 65 штаммов являлись грам-отрицательными палочками с закруглёнными концами.

Особенности сахаролитической активности определяли на окислительно-ферментативной (ОФ) среде Хью-Лейфсона с глюкозой следующего состава:

Пептон - 2 г;

D-глюкоза - 10 г;

агар - 2,5 г;

бромтимоловый синий (индикатор) - 0,03 г;

Хлорид натрия (NaCl) - 5 г;

калия фосфат двузамещённый (K_2HPO_4) - 0,3 г;

дистиллированная вода - 1000 мл.

Окончательный pH 7,1 (среда зеленого цвета)

Для каждой исследуемой культуры использовали две пробирки с ОФ-средой. Исследуемые культуры брали бактериологической петлёй с поверхности полужидкого агара и засеивали каждую культуру путем укола в две пробирки с ОФ-средой на глубину половины столбика агара. Содержимое одной из пробирок заливали стерильным вазелиновым маслом слоем в 1 см. Инкубировали при 28°C 24 ч.

Образование кислоты в обеих пробирках свидетельствует об анаэробном пути расщепления углевода (ферментация), наличие кислотообразования только в открытой пробирке указывает на аэробное расщепление (окисление); цвет среды не изменяется, если бактерии не обладают окисляющей активностью.

Из 56 штаммов только одна исследуемая культура (№26) проявила способность расщеплять глюкозу в анаэробных условиях (ферментировать). Остальные 64 культуры расщепляли глюкозу только в аэробных условиях (окисляли) и не были способны к анаэробному её расщеплению (ферментации). Такая особенность расщепления глюкозы характерна для бактерий рода *Pseudomonas*.

Тест на подвижность бактериальных клеток проводился методом микроскопии препарата «раздавленная капля», который готовили для каждой из 64 культур следующим образом: суточные культуры бактерий наносили бактериологической петлёй на поверхность обезжиренных спиртом предметных стекол. Образовавшуюся каплю диаметром 2-3 мм сразу накрывали покровным стеклом и микроскопировали. У всех 64 культур наблюдалась подвижность, характер которой указывал на монотрихальное расположение жгутиков.

Способность к образованию специфических пигментов исследовалась на среде Кинг В следующего состава:

- Пептон – 20 г;
- Глицерин – 10 г;
- Калия фосфат двузамещённый (K_2HPO_4) – 1,5 г;
- Магния сульфат ($MgSO_4$) – 1,5 г;
- Агар-агар – 16 г;
- Дистиллированная вода – 1000 мл.

Посевы на чашках Петри со средой Кинг В культивировали при 28°C 24 часа. Результаты теста оценивались при облучении лампой ультрафиолетового света.

57 штаммов образовывали жёлто-зелёный флуоресцирующий пигмент (пиовердин) на среде Кинг В.

Для постановки теста на каталазу использовался 3% раствор перекиси водорода, каплю которого наносили на колонии 24-часовой агаровой культуры бактерий. Положительная реакция теста на каталазу характеризовалась вспениванием капли перекиси водорода, нанесённой на бактериальные колонии за счёт образования пузырьков кислорода.

Устойчивость бактерий к солям двухвалентного бария проверялась методом посева бактериальных культур на поверхность скошенного мясопептонного агара с добавлением 0,2% хлорида бария в пробирках и последующей 24-часовой выдержкой при 28°C. Положительная реакция, характерная для бактерий рода *Pseudomonas*, проявлялась в отсутствии роста на данной среде.

Оценка способности к росту при 4°C и 41°C проводилась культивированием в питательном бульоне при соответствующей температуре в течение 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 30°C в течение 48 часов.

Параллельно с исследованиями биохимических свойств выделенных нами штаммов бактерий, проводились исследования биохимических свойств следующих референс-штаммов: *Pseudomonas aeruginosa* 128, *Pseudomonas aeruginosa* 381, *Pseudomonas aeruginosa* 1677, *Pseudomonas putida* 901, *Pseudomonas putida* 12633, *Pseudomonas fluorescens* 13525 по вышеперечисленным тестам.

Все исследованные референс-штаммы бактерий *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida* и *Pseudomonas fluorescens* способны к утилизации сукцината натрия, оксидаза- и каталазаположительные, подвижные грам-отрицательные палочки, с окислительным типом обмена веществ, не устойчивые к солям двухвалентного бария, что является их родовой характеристикой.

Отличительной особенностью штаммов *Pseudomonas aeruginosa* является, в отличие от остальных исследованных референс-штаммов, способность к росту при температуре 41°C, к отсутствию роста при 4°C. Так же, все исследуемые штаммы *Pseudomonas aeruginosa* проявили положительную реакцию теста на желатиназу.

Штаммы *Pseudomonas fluorescens* 13525, *Pseudomonas putida* 901 и *Pseudomonas putida* 12633 проявили схожие признаки: формирование на среде Кинг В флюоресцирующей жёлто-зелёной пигментации, выявляемой при облучении ультрафиолетовой лампой, способность к росту при температуре 4°C и отсутствие роста при 41°C. Отличие *Pseudomonas putida* от *Pseudomonas fluorescens* заключается лишь в реакции на желатиназу. Для бактерии *Pseudomonas fluorescens* характерна положительная реакция на желатиназу, а для *Pseudomonas putida* – отрицательная.

Результаты тестов, характерные для бактерии *Pseudomonas aeruginosa*, наблюдаются у штамма №39 и 50;

Pseudomonas fluorescens – штаммы № 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 16, 23, 29, 32, 33, 35, 36, 47, 48, 49, 53, 58, 59, 60, 63, 64;

Pseudomonas putida – штаммы № 5, 10, 14, 15, 17, 18, 20, 21, 22, 24, 25, 27, 28, 30, 31, 34, 37, 38, 40, 41, 42, 43, 45, 46, 51, 52, 54, 55, 56, 57, 61, 62, 65;

Так же, выявлены штаммы, результаты тестов которых не соответствуют ни одному из шести исследованных референс-штаммов: № 19, 26, 44. Очевидно, что данные штаммы относятся к бактериям других видов рода *Pseudomonas*, реже встречающихся в окружающей среде.

Вывод: В результате исследований из 70 образцов воды и почвы, подвергнутых длительному воздействию загрязнения нефтепродуктами, нами было выделено 2 штамма *Pseudomonas aeruginosa*, 27 штаммов *Pseudomonas fluorescens* и 33 штамма *Pseudomonas putida*. Выделенные культуры бактерий рода *Pseudomonas* перспективно использовать для конструирования на их основе биопрепарата для микробиологической нефтедеструкции.

Список литературы:

1. Берджи. Определитель бактерий 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.
2. 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, 2009, т. 4.
3. Киреева Н. А. Биодеструкция нефти в почве культурами углеводородокисляющих микроорганизмов // Биотехнология. - 1996. - № 1. - 51-54.
4. Коритаев А.И., Бабичев С.А. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология: Учебник для мед.вузов. – СПб.: СпецЛит, 2002. – 591 с.: ил.
5. Рубан Е.Л. Физиология и биохимия представителей рода *Pseudomonas*. - М.: Наука, 1986.
6. Смирнов В.В., Киприанова Е.А. Бактерии рода *Pseudomonas*.- Киев. Наукова думка, 1990. - С. 176-187.

УДК 619:616.98:578.842.1:577.2

КОНСТРУИРОВАНИЕ ПОЛОЖИТЕЛЬНОГО КОНТРОЛЯ (ПК) К ТЕСТ-СИСТЕМЕ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ДНК ВИРУСА АЧС МЕТОДОМ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

И.Х. Газзев, аспирант, А.А. Елсукова, младший научный сотрудник, А.С. Малоголовкин, кандидат биологических наук, С.Ж. Цыбанов доктор биологических наук, профессор

ГНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной вирусологии и микробиологии» РАСХН, Тел./факс: (49243) 6-21-25;

6-10-56 VNIIVViM@niiv.petush.elcom.ru

Ключевые слова: Африканская чума свиней, ПЦР в реальном времени, положительный кон-