

СХЕМА ВЫДЕЛЕНИЯ PSEUDOMONAS CHLORORAPHIS ИЗ ОБЪЕКТОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Т.А. ГРИНЕВА, Д.А. ВИКТОРОВ, Д.А. ВАСИЛЬЕВ

ГРИНЕВА Татьяна Алексеевна - соискатель, «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина»

ВИКТОРОВ Денис Александрович - старший научный сотрудник Научно-исследовательского инновационного центра микробиологии и биотехнологии ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина», кандидат биологических наук

ВАСИЛЬЕВ Дмитрий Аркадьевич - профессор, заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина», доктор биологических наук

Адрес: бульвар Новый Венец, д.1, г. Ульяновск, РФ, 432063. Тел. (+7)903-320-14-10. E-mail: tag78@mail.ru

Ключевые слова: Pseudomonas chlororaphis, фенотипирование, окружающая среда

В ходе экспериментальной работы выделены и фенотипически идентифицированы бактерии Pseudomonas chlororaphis из сточных вод, образцов почвы и прудовой воды. Табл. 1. Рис. 1. Библ. 4.

Бактерии рода Pseudomonas в окружающей среде распространены повсеместно. Некоторые виды являются патогенами растений (*P. syringae*) и оппортунистическими патогенами человека (*P. aeruginosa*). Другие виды, находясь в синантропных отношениях с растениями, защищают их от заражения патогенными организмами. Pseudomonas chlororaphis (*P. chlororaphis*) используется в коммерческих целях для биоконтроля за грибковыми инфекциями, поражающими ризосферу растений [4]. *P. chlororaphis* способны вызывать заболевания промысловой рыбы (форели, лосося).

Непатогенные виды *P. chlororaphis* способны производить рамнолипиды, которые по эффективности к эмульгированию не уступают синтетическим сурфактантам [3], и обладают такими преимуществами, как биodeградебельность, отсутствие токсичности, получение из возобновляемых источников, что делает их перспективными для использования в нефтедобывающей, горнодобывающей, химической, фармацевтической и пищевой промышленности, сельском хозяйстве для очистки окружающей среды от углеводов, тяжелых металлов и других поллютантов [2].

P. chlororaphis является перспективным объектом для изучения и биотехнологического использования.

Целью исследования является разработка схемы выделения и системы тестов для идентификации *P. chlororaphis*.

Материалы и методы исследования. Образцами для исследования являлись сточные воды, образцы почвы и прудовой воды. Первоначальным этапом являлся посев 1 мл исследуемого субстрата на 5 мл разработанной ранее накопительной среды Psp-A-УГСХА с сукцинатом натрия для культивирования псевдомонад [1].

Суточную бульонную культуру пересевали на чашки Петри с селективной средой Psp-S-УГСХА с глюкозой и фурадоном [1]. После культивирования на данной среде в течение 24 часов при 28 °С, с её поверхности отбирали колонии различной морфологии утилизирующие глюкозу путём окисления (изменение цвета среды с зеленого на желтый).

Штаммы чистых культур последовательно изучались по следующим признакам: оксидазная, каталазная, желатиназная, нитратредуктазная активность, подвижность, рост при 4 °С и 41 °С, рост на агаре с хлоридом бария, способность образовывать леван из сахарозы, пигментообразование, а также тинкториальные свойства.

Рост на мясопептонном агаре (МПА) с добавлением 0,2%-ного хлорида бария, желатиназная активность, образование флюоресцеина на среде Кинг В и пиоцианина на среде Кинг А учитывались после 24 часов культивирования при 28°С на соответствующих питательных средах.

Оценку способности к росту при 4°С и 41°С проводили культивированием в питательном бульоне при соответствующей температуре в течение 72 часов.

Тест на денитрификацию проводили после инкубации исследуемой культуры в МПБ с 0,2% KNO₃ в течение 48 ч.

Определение продукции левана из сахарозы и производство водонерастворимого пигмента хлорографина оценивались после 5 суток инкубации при 28°C.

Результаты исследования представлены в таблице 1.

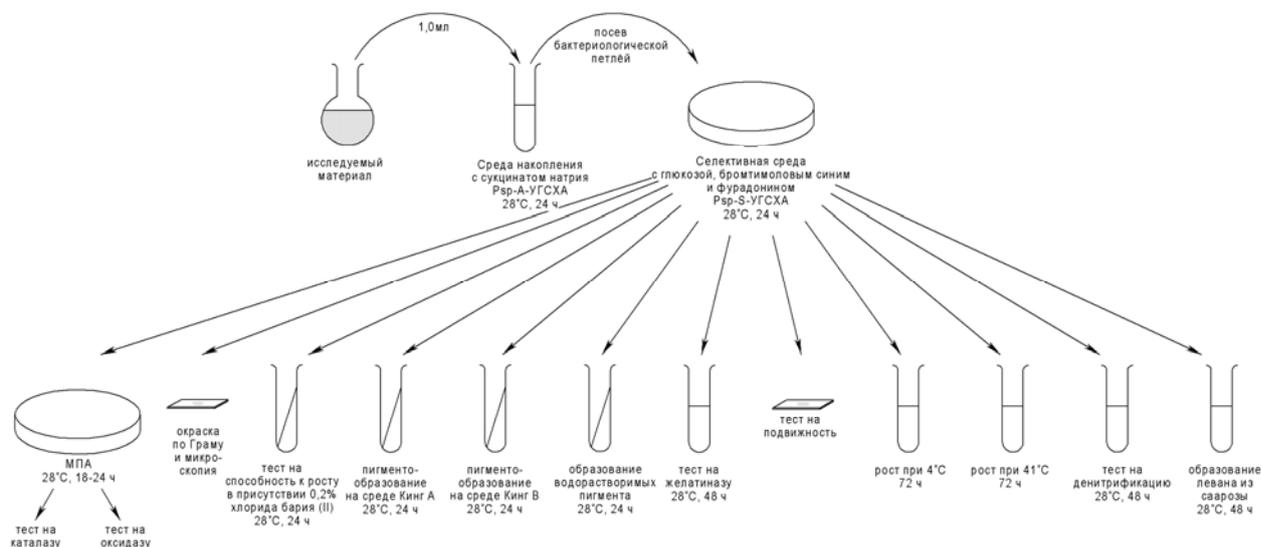
Таблица 1 - Результаты изучения биологических свойств 65 выделенных штаммов

Тест (в скобках указаны результаты, характерные для <i>P. chlororaphis</i>)	Количество штаммов с положительными для <i>P. chlororaphis</i> результатами
Рост на бульоне с сукцинатом натрия (+)	65
Окисление глюкозы (+)	65
Оксидаза (+)	65
Каталаза (+)	65
Рост на агаре с 0,2% хлоридом бария (-)	49
Окраска по Граму (-)	47
Подвижность (+)	37
Рост при 4 °С (+)	27
Рост при 41 °С (-)	28
Тест на желатиназу (+)	34
Тест на денитрификацию (+)	15
Образование левана из сахарозы (+)	10
Флюоресцеин (+)	23
Пиоцианин (-)	28
Хлорографин (+)	5

Выводы: из 65 выделенных штаммов 5 штаммов (7,6 %) проявляли свойства, характерные для *P. chlororaphis*.

Таким образом, нами была разработана схема выделения и идентификации бактерий *P. chlororaphis* (рисунок 1).

Рисунок 1. Схема выделения и идентификации бактерий *P. chlororaphis***Выводы:** характерные для *P. chlororaphis*, что позволяет отнести их к данному виду.



ЛИТЕРАТУРА. 1. Викторов, Д.А. Выделение и типирование бактерии *Pseudomonas putida* / Д.А. Васильев, Д.А. Викторов, И.И. Богданов, А.Г. Шестаков // Вестник Ульяновской ГСХА. – 2009. – №9(10) декабрь. – С. 58-60. 2. Сизова О. И., Кочетков В. В., Боронин А. М. Ризосферные бактерии *Pseudomonas aureofaciens* и *Pseudomonas chlororaphis*, окисляющие нафталин в присутствии мышьяка // Прикладная биохимия и микробиология, 2010, том 46, № 1, с. 45–50 3. Gunther Nereus W., IV, Nuñez Alberto, Fett William, Solaiman Daniel K. Y.. Production of Rhamnolipids by *Pseudomonas chlororaphis*, a Nonpathogenic Bacterium// Appl Environ Microbiol. 2005 May; 71(5): 2288–2293 4. Tombolini Riccardo, Gaag Dirk Jan Gerhardson, Berndt and Jansson Janet. Colonization Pattern of the Biocontrol Strain *Pseudomonas chlororaphis* MA 342 on Barley Seeds Visualized by Using Green Fluorescent Protein// Applied and Environmental Microbiology. Aug. 1999. 3674-3680.

DEVELOPMENT AND APPROBATION EXTRACTION CIRCUIT PSEUDOMONAS CHLORORAPHIS FROM ENVIRONMENTAL

GRINEVA Tatiana A., applicant of the Research Innovation Center of Microbiology and Biotechnology Ulyanovsk State Agricultural Academy. P.A. Stolypin, Ph.D.

Address: app.3, 62 a, Vodoprovodnaia Street, Ulyanovsk, Russia, 432063. Tel 89033201410, e-mail: tag78@mail.ru

VICTOROV Denis A. - Senior Research Fellow of the Research Innovation Center of Microbiology and Biotechnology Ulyanovsk State Agricultural Academy. P.A. Stolypin, Ph.D.

Address: 432073, Ulyanovsk, str. Otradnaya, 8 – 175

VASILYEV Dmitry A. - Professor, Head of Department of Microbiology, Virology, epizootiology and ICE Ulyanovsk State Agricultural Academy. P.A. Stolypin, Doctor of Biological Sciences.

Keywords: Pseudomonas chlororaphis, phenotyping, environment

Summary. During the experimental work allocated and phenotypically identified bacterium Pseudomonas chlororaphis from wastewater, soil samples and pond water.

BIBLIOGRAPHIC REFERENCES. 1. Viktorov, D.A. Vydelenie i tipirovanie bakterii Pseudomonas putida / D.A. Vasil'ev, D.A. Viktorov, I.I. Bogdanov, A.G. Shestakov // Nauchno-teoreticheskij zhurnal Vestnik Ul'janovskoj gosudarstvennoj sel'skhozjajstvennoj akademii. – 2009. – №9(10) dekabrl'. – S. 58-60. 2. Sizova O. I., Kochetkov V. V., Boronin A. M. Rizosfernye bakterii Pseudomonas aureofaciens i Pseudomonas chlororaphis, oksisljajuwie naftalin v prisutstvii mysh'jaka // Prikladnaja biohimija i mikrobiologija, 2010, tom 46, № 1, s. 45–50. 3. Gunther Nereus W., IV, Nuñez Alberto, Fett William, Solaiman Daniel K. Y.. Production of Rhamnolipids by Pseudomonas chlororaphis, a Nonpathogenic Bacterium// Appl Environ Microbiol. 2005 May; 71(5): 2288–2293. 4. Tombolini Riccardo, Gaag Dirk Jan Gerhardson, Berndt and Jansson Janet. Colonization Pattern of the Biocontrol Strain Pseudomonas chlororaphis MA 342 on Barley Seeds Visualized by Using Green Fluorescent Protein// Applied and Environmental Microbiology. Aug. 1999. 3674-3680.