

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРИЙ РОДА PSEUDOMONAS ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ НА ИСКУССТВЕННЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ

И. Б. Бороздина

Ставропольский государственный университет

Поступила в редакцию 20.10.2010 г.

Аннотация. В ходе экспериментальной работы выделены, идентифицированы и изучены морфологические, культуральные, тинкториальные и биохимические свойства видов рода *Pseudomonas*, высеянных с поверхности филлоплана растений семейства Кленовые (*Aceraceae*), семейства Липовые (*Tiliaceae*), семейства Маслиновые (*Oleaceae*). Дана сравнительная характеристика биологических свойств микроорганизмов рода *Pseudomonas* при культивировании на искусственных питательных средах.

Ключевые слова: идентифицированы, филлоплан, *Pseudomonas*, семейства Кленовые (*Aceraceae*), семейства Липовые (*Tiliaceae*), семейства Маслиновые (*Oleaceae*).

Abstract. During experimental work are allocated, identification and families Lime (*Tiliaceae*), families Maslinovye (*Oleaceae*) are studied morphological, cultural tynctorial and biochemicals properties of kinds of sort *Pseudomonas*, identification from a surface of the filloplan, of plants of family Maple (*Aceraceae*). The comparative characteristic biological properties of microorganisms of sort *Pseudomonas* is given at cultivation on artificial nutrient mediums.

Keywords: identified, sheet plant, *Pseudomonas*, families Lime (*Tiliaceae*), families Maslinovye (*Oleaceae*), family Maple (*Aceraceae*).

ВВЕДЕНИЕ

Изучение микробно-растительных взаимодействий — одно из быстро развивающихся направлений современной микробиологии. В настоящее время установлены биотические отношения между микроорганизмами и растениями, которые носят либо антагонистический характер, либо характер ассоциативного симбиотического отношения [8].

Современные проблемы растениеводства направлены на изучение микроорганизмов, повышающих иммунную защиту растений, в связи с чем активно изучается биоразнообразие эпифитной микрофлоры растений, в частности, *Pseudomonas* [4].

Среди большого числа бактерий, входящих в род *Pseudomonas* на поверхности филлосферы часто обитают сапрофитные, условно-патогенные и патогенные бактерии, вызывающие заболевания растений, животных и человека.

Поэтому идентификация различных представителей рода *Pseudomonas* и изучение их биологических свойств является актуальной проблемой современности.

Цель: выделить, идентифицировать и изучить морфологические, тинкториальные, культуральные и биохимические свойства видов рода *Pseudomo-*

nas, высеянных с верхней и нижней поверхностей филлоплана растений семейства Кленовые (*Aceraceae*), семейства Липовые (*Tiliaceae*), семейства Маслиновые (*Oleaceae*).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Изучение микрофлоры филлоплана проводили в весенне-летний период 2008—2009 гг. на базе бактериологической лаборатории ГУЗИБ № 4 г. Армавира путем отбора проб с верхней и нижней поверхностей филлоплана клена остролистного (*Acer platanoides*), липы сердцевидной (*Tilia cordata* Mill), сирени обыкновенной (*Syringa vulgaris* L.), жасмина (*Jasminum* L.).

В начале для выявления представителей рода *Pseudomonas*, культуры микроорганизмов, полученные методом отпечатков, высевали на плотные питательные среды (5 % кровяной агар, ЦПХ — агар, МПА с 2 % глицерином, Эндо), а затем на дифференциально — диагностические среды (Кинг — Б, Хью — Лейфсона, ацетамидный агар, 0,3 % агаровую среду) и использовали системы индикаторные бумажные (СИБ) [7].

Все засеянные среды инкубировали в течение 24 часов при температуре 37 °С.

Для определения максимальных и минимальных температур роста колоний посева инкубиро-

вали в термостате при оптимальной $t=37\text{ }^{\circ}\text{C}$, а так же в холодильнике при $t=5\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 18—24 ч. и pH среды 7,2—7,4.

Ps. aeruginosa выращивали при $t=42\text{ }^{\circ}\text{C}$ [5].

Среда Кинг — Б используется для усиления способности псевдомонад продуцировать синезеленый пигмент пиоцианин, ярко-красный — пиорубин и бурый — пиовердин. *Ps. aeruginosa* образует зеленовато-желтый пигмент — флюоресцеин, флюоресцирующий в проходящем свете в УФ-лучах [6].

Среду Хью — Лейфсена с глюкозой применяют для определения способности псевдомонад окислять глюкозу до глюконовой кислоты в аэробных условиях. Посев производили уколом в 2 столбика агара, один из которых заливали 1 мл стерильного вазелинового масла. Посевы инкубировали в термостате в течение 24 часов при температуре $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ [2].

Ацетамидный агар является дифференциальной средой для синегнойной палочки, поскольку она обладает способностью использовать ацетамид в качестве единственного источника азота и углерода.

Морфологические и тинкториальные свойства клеток (формы, размеры, их подвижность) изучали с помощью окраски мазков по Граму, Синеву, а так же микроскопировали нативные препараты. Окраску жгутиков производили по методу Леффлера в модификации Пешкова [1].

Гемолитическую активность определяли при просмотре через 24 часа колонии, выросшие на 5 % кровяном агаре. Наличие зон просветления вокруг колонии указывает на наличие в культуре гемолиза.

Для изучения продукции каталазы на предметное стекло наносили каплю 3 % раствора перекиси водорода и петлей вносили исследуемую суточную культуру. Образование пузырьков газа подтверждало положительную каталазную активность.

С помощью индикаторной бумаги СИБ определяли способность колоний образовывать цитохромоксидазу. Исследуемую культуру наносили на смоченную физиологическим раствором индикаторную бумагу. При положительной реакции на месте нанесения культуры появляется синее окрашивание бумаги в течение 30 секунд [13].

Гидролиз крахмала определяли путем обработки агаровой пластинки раствором Люголя. Для этого на поверхность среды наливали 3—5 мл раствора Люголя. Среда, содержащая крахмал, окра-

шивается в синий цвет, а зона гидролиза остается бесцветной.

Остальные биохимические тесты определяли с помощью СИБ.

Идентификацию микроорганизмов проводили на основании изучения морфологических, тинкториальных, биохимических свойств в соответствии с Определителем бактерий Берджи [14].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В ходе экспериментальной работы с поверхности филоплана изучаемых растений выделены следующие виды бактерий рода *Pseudomonas*: *Ps. aeruginosa*, *Ps. putida*, *Ps. fluorescens*, *Ps. chlororaphis*.

Псевдомонады наименее прихотливы к факторам роста. Они нуждаются в сложных органических веществах и легкоусвояемых углеводородах. Важным диагностическим признаком бактерий является их способность утилизировать углеводы в качестве источника питания и энергии. Базовым углеводородным субстратом служит глюкоза [9].

Выделенные культуры на плотных питательных средах (МПА, Эндо) были представлены 5 морфологическими типами колоний:

- плоские колонии неправильной формы,
- крупные выпуклые блестящие колонии;
- слизистые;
- карликовые или точечные;
- складчатые колонии.

Для диагностики *Ps. aeruginosa* использовали 2 селективные среды:

1. Ацетамидный агар, где включение ацетамида как составной части среды обусловлено тем, что в отличие от других видов рода *Pseudomonas*, синегнойная палочка обладает способностью использовать это соединение в качестве единственного источника азота и углерода.

Ацетамидный агар, содержащий неорганические соли (калий гидрофосфат, калий дигидрофосфат, магний сульфат) и ацетамид в качестве единственного источника углерода и азота. Эти соединения необходимы для дифференциальной диагностики *Ps. aeruginosa*. Растущие на среде микроорганизмы дезаминируют ацетамид (проявляя ациламидазную активность). В результате дезаминирования ацетамида образуется аммиак, сдвигающий pH в щелочную сторону ($\text{pH}=8,5$). Среда меняет цвет с желто-оранжевого на лилово-красный.

2. Тип среды, в состав которой входят химические вещества, обладающие антимикробным действием в отношении бактерий — возможных ассо-

циантов синегнойной палочки, а в качестве селективного агента добавляли цетилтриметиламмоний бромид (цетримид — агар), который подавлял рост на среде сопутствующих бактерий, а *Ps. aeruginosa* давала обильный рост.

Способность расти на ацетамидном агаре при $t=42\text{ }^{\circ}\text{C}$ и отсутствие роста при $t=5\text{ }^{\circ}\text{C}$, позволили отнести выделенную культуру к виду *Ps. aeruginosa*.

Культуры, выросшие на ацетамидном агаре, растущие при $t=5\text{ }^{\circ}\text{C}$, но не выросшие при $t=42\text{ }^{\circ}\text{C}$, относятся к видам *Ps. putida* и *Ps. fluorescens*, и характеризуются неспособностью утилизировать ацетамид.

Клетки *Ps. aeruginosa* представляют собой мелкие граммотрицательные палочки $0,3\text{—}0,6\text{ }\mu\text{m}$, одиночные или соединенные парами, имеют 1—2 полярно расположенных жгутика.

Культуры образуют синий флуоресцирующий пигмент, в состав которого входит пиоцианин. В состав пигмента входят соединения феназинового ряда, а также флуоресцеин, дающий желто-зеленое окрашивание.

Бактерии *Ps. aeruginosa* желатин и молоко не свертывают, не пептонизируют, нитраты восстанавливают до нитритов, используют углеводы с образованием кислоты. Аэробы. Являются окислителями углеводов, сахаров, органических кислот, углеводородов.

На среде Эндо *Ps. aeruginosa* образует мелкие розовые колонии. Запах жасмина является специфическим для *Ps. aeruginosa*.

Ps. fluorescens — короткие одиночные палочки $0,1\text{—}0,4\text{ }\mu\text{m}$, аэробы, подвижны, имеют 2—4 полярных жгутика. Культуры бактерий образуют зеленовато-желтый флуоресцирующий пигмент, диффундирующий в среду.

Характерной особенностью этого вида является внешняя микроструктура колоний: при малом увеличении микроскопа поверхность колонии имеет сетчатое или ячеистое строение.

Желатин разжижают, молоко не свертывают, нитраты восстанавливают до нитритов.

На МПА с 2 % глицерином *Ps. fluorescens* отмечается диссоциация на 3 колониальных типа:

Серые или желтовато-серые, слабо выпуклые, маслянистой консистенции.

Слизистые, выпуклые, розовые, крупные.

Розовые, более плотные, мелкие.

Ps. putida — граммотрицательные подвижные палочки, расположенные попарно, $0,2\text{—}0,6\text{ }\mu\text{m}$, аэроб, вырабатывает пигмент пиовердин. Споры не образуют.

Колонии *Ps. putida* на МПА образует круглые, гладкие, с блестящей поверхностью, желтоватые прозрачные колонии.

Ps. chlororaphis — мелкие подвижные граммотрицательные палочки, подвижны, аэробы. Спор не образуют. Вырабатывают пигмент хлорорафин, окисляющийся в оксихлорорафин.

На МПА *Ps. chlororaphis* образует круглые полупрозрачные слизистые колонии с розоватым оттенком.

Все идентифицированные представители рода *Pseudomonas* каталазоположительны, дают отрицательные реакции на индол, не реагируют с метиловым красным и не образуют ацетилметилкарбинола.

На 5 % кровяном агаре выделенные представители рода *Pseudomonas* образуют гладкие или шероховатые колонии, отличающиеся по консистенции, пигментообразованию, наличию зон гемолиза.

Данные исследования представлены в табл. 1.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты экспериментальных исследований показали, что все идентифицированные представители рода *Pseudomonas*: *Ps. fluorescens*, *Ps. putida*, *Ps. chlororaphis*, *Ps. aeruginosa*, выделенные с поверхности листовых пластинок клена остролистного (*Acer platanoides*), липы сердцевидной (*Tilia cordata* Mill), сирени обыкновенной (*Syringa vulgaris* L.), жасмина (*Jasminum* L.), являются граммотрицательными, подвижными, неспорообразующими палочками, располагающиеся одиночно, парами или короткими цепочками; аэробы, каталазоположительны. Хорошо растут в диапазоне температур ($5\text{—}37\text{ }^{\circ}\text{C}$), за исключением *Ps. aeruginosa* ($42\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Исследование биохимических свойств позволило установить, что все представленные виды рода *Pseudomonas* способны образовывать цитохромоксидазу.

Ps. fluorescens, *Ps. putida*, и *Ps. aeruginosa* являются флуоресцирующими бактериями, продуцирующими флуоресцин, а *Ps. chlororaphis* — не флуоресцирующим.

Все выделенные виды рода *Pseudomonas* вырабатывают пигмент и в зависимости от типа среды, изменяют цвет среды и колоний от беловато-сероватого до зеленовато-желтоватого и розоватого оттенков.

В ходе экспериментальной работы проведена сравнительная характеристика морфологических, культуральных, тинкториальных, биохимических

Таблица 1
Сравнительная характеристика морфологических, тинкториальных, культуральных и биохимических свойств видов рода *Pseudomonas*, выделенных с поверхности филопана.

Виды	Свойства													
	Морфология клеток	Вид колоний (на МПА)	Условия роста	Т роста, °С	Подвижность	Флуоресценция	Пигмент	Споры	Глюкоза	Каталаза	Оксидаза	Гидролиз крахмала	Маннит	Цитохромоксидаза
<i>Ps. aeruginosa</i>	Гр (-) палочка, 1,5—3,0 × 0,4—0,6 мкм	Зеленоватые слизистые колонии	Аэроб	42	+	+	Пиоцианин, пиовердин, пиорубин	-	+	+	+	-	-	+
<i>Ps. putida</i>	Гр (-) палочки, расположенные парно 0,2—0,6 / 0,7 мкм	Круглые, гладкие, с блестящей поверхностью, желтоватые, прозрачные	Аэроб	40 / 5	+	+	Пиовердин	-	+	+	+	-	-	+
<i>Ps. fluorescens</i>	Гр (-) короткие одиночные палочки 0,1—0,4 / 0,6—0,7	Гладкие, слабо выпуклые, бесцветные	Аэроб	34 / 5	+	+	Пиовердин	-	+	+	+	-	-	+
<i>Ps. chlororaphis</i>	Гр (-) палочки	Круглые, полупрозрачные, слизистые колонии со слабо розовым оттенком	Аэроб	34 / 5	+	±	Хлороофин, оксислющийся в оксислороофин	-	+	+	+	-	-	+

свойств идентифицированных видов рода *Pseudomonas*, играющих большую роль в установлении биотических отношений между микроорганизмами и растениями.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Биргер М. О. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования. — М.: Медицина, 1982. — 440 с.
2. Быков А. С., Воробьев А. А., Кривошеин Ю. С. Основы микробиологии, вирусологии и иммунологии. — М.: АСАДЕМІА, 2001. — 85 с.
3. Дрегваль О. А., Четвертюк О. В., Черевач Н. В. Микробиологический журнал. — 2003. — Т.65. — №3. — С. 14—20.
4. Заикина И. А. Эпифитная микрофлора здоровых растений. — Пенза: РИО ПГСХА, 2007. — ч. 2. — С. 40—44.
5. Коротяев А. И. Бабичев С. А. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология. — Снкт.-Пит.: Спец Лит., 2000. — 349 с.
6. Леванова Г. Ф., Парфенова О. В., Кашиников С. Ю. Молекулярно-биологические способы идентификации и дифференциации бактерий. — М.: АСАДЕМІА, 1995. — 158 с.
7. Межидов М. М. Справочник по микробиологическим питательным средам. — М.: Медицина, 2003. — 306 с.
8. Новикова Н. С. Бактериальная флора надземных органов растений. — Киев: Наука Думка, 1983. — 86 с.
9. Пиотрович В. А. Разработка питательных сред для культивирования клеток: автореф. дис. канд. мед. наук. — Киев, 2002. — 18 с.
10. Ушакова Н. А., Котенкова Е. В., Козлова А. А., Нифатов А. В. Прикладная биохимия и микробиология. — М.: Наука, 2006. — Т. 52. — 322 с.
11. Хоулт Дж., Криг Н., Снит П. Определитель бактерий Берджи. — М., 1997. — 652 с.

Бороздина Ирина Борисовна — аспирантка кафедры Общей биологии Ставропольского государственного университета; e-mail: borozdina.ir@yandex.ru

Borozdina Irina B. — post-graduate student of chair of the General biology The Stavropol state university; e-mail: borozdina.ir@yandex.ru