

Библиографический список

1. Правдин Л.Ф. Сосна обыкновенная / Л.Ф. Правдин. – М.: Наука, 1964. 192 с.
2. Ткаченко А.Н. Репродуктивная способность клонов сосны на лесосеменной плантации Брянской области / А.Н. Тка-

ченко // Лесное хозяйство – 2001. – № 1. – С. 38-39.

3. Ананьев М.Е. Влияние класса роста деревьев сосны на качество семян / М.Е. Ананьев, Е.Г. Парамонов // Вестник АГАУ. – 2009. – № 7 (57). – С. 19-23.



УДК 579.246.2

И.Б. Бороздина

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ *Ps. AERUGINOSA* С ПОВЕРХНОСТИ ФИЛЛОПЛАНА

Ключевые слова: питательная среда, свекловичный отвар, культивирование, *Pseudomonas aeruginosa*.

Введение

Синегнойная палочка является одной из главных этиологических факторов (более чем 70% случаев) гнойно-септических заболеваний. Питательная среда имеет большое значение для выделения и идентификации *Ps. aeruginosa*.

Задачи, стоящие перед микробиологией, тесно связаны с бактериологической диагностикой *Ps. aeruginosa*. Поэтому правильный подбор состава питательной среды обеспечивает возможность выделения микроорганизмов, их идентификацию, получение чистых культур и изучение их биологических свойств.

В последнее время для повышения биосинтетической активности микроорганизмов всё чаще используются дешевые полноценные и сбалансированные среды растительного происхождения, на основе которых разрабатываются совершенные технологии в целях повышения продуктивности бактериальных культур [1]. Поэтому в настоящее время **актуальными** остаются работы по созданию эффективных новых, а также модификации питательных сред в бактериологической практике.

Цель – сравнить морфофизиологические, тинкториальные, культуральные, биохимические свойства чистых культур *Ps. aeruginosa* при культивировании на стандартных питательных средах промышленного производства и на экспериментальной питательной среде, приготовленной на основе свекловичного отвара.

Объект исследования – чистые культуры *Ps. aeruginosa*, выделенные с поверхности филлоплана.

Задачи:

1) дать оценку качественных и количественных показателей роста *Ps. aeruginosa* на стандартных средах и экспериментальной питательной среде;

2) изучить основные морфологические, культуральные, физико-химические, тинкториальные свойства *Ps. aeruginosa* при культивировании на искусственных питательных средах.

Материалы и методы

Экспериментальные исследования проводили на базе бактериологической лаборатории ГУБИБ № 4 г. Армавира.

Псевдомонады не прихотливы к факторам роста.

Базовым углеводородным субстратом является глюкоза.

Чистые культуры *Ps. aeruginosa* высевали на следующие питательные среды промышленного производства: МПА, МПБ, Эндо; селективные питательные среды – ацетамидный агар, ЦПХ-агар и экспериментальную питательную среду, приготовленную на основе свекловичного отвара (СПС).

Было проделано 30 опытов.

Приготовление экспериментальной питательной среды (СПС) происходит в 2 этапа:

1-й этап. Приготовление свекловичного отвара.

За основу берут **свекловичный отвар**, приготовленный следующим способом (г/л): 200 г очищенной и промытой свек-

лы нарезают ломтиками, заливают 1 л водопроводной воды и варят 30 мин. Отвар фильтруют через ватно-марлевый фильтр и доводят до первоначального объёма. Полученный отвар кипятят и устанавливают рН среды 7,2.

2-й этап. К полученному свекловичному отвару добавляют (согласно прописи сред) пептон ферментативный и агар микробиологический. Полученные питательные среды доводят до кипения, устанавливают рН 7,2, разливают в мерные флаконы, охлаждают до 50°C и стерилизуют при 1 атм. 20 мин.

Образуется среда, соответствующая по плотности 1,5%-ному агаровому гелю.

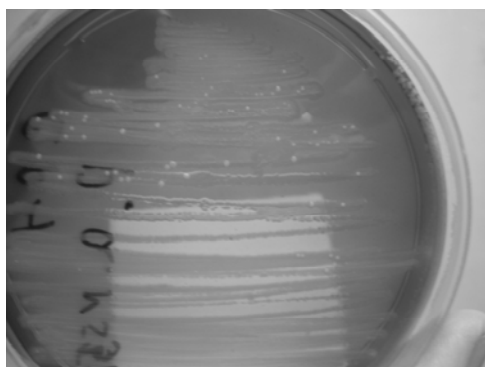
Готовая среда годна к применению в течение месяца со дня приготовления при условии хранения её при $t = 2-5^{\circ}\text{C}$.

Состав питательной среды СПС:

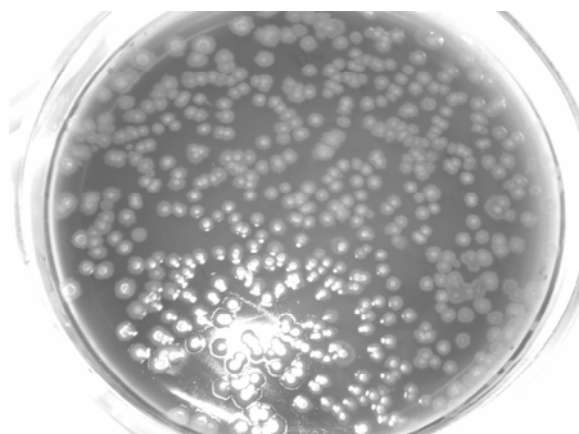
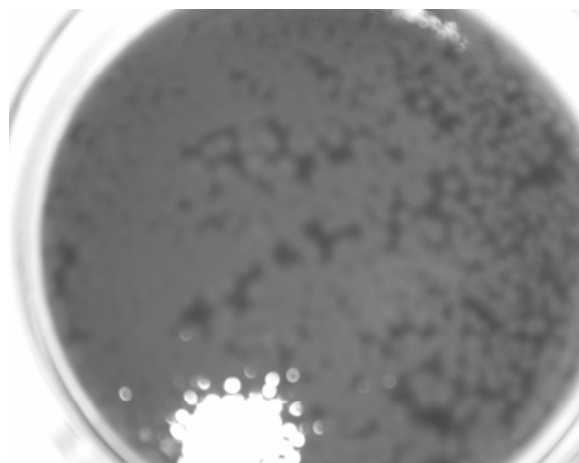
Компоненты, входящие в состав среды	м, г
1. Свекловичный отвар	до 1 л
2. Пептон ферментативный	200,0
3. Агар микробиологический	20,0

Для приготовления свекловичного отвара необходимо брать среднеспелые высокоурожайные сорта свёклы с тёмным цветом мякоти (например, Багровый шар, Бордо и др.), которые подвергаются длительному хранению и содержат большой набор питательных веществ, необходимых для *Ps. aeruginosa*.

3-й этап. Производили посев чистой культуры *Ps. aeruginosa* на среду СПС, культивирование микроорганизмов – в термостате при температуре 37°C.



Через 24 ч после посева *Ps. aeruginosa* наблюдалось появление сине-зелёных колоний с чёткими краями и характерным запахом жасмина, через 48 ч – диффузирование пигмента в питательную среду и окрашивание её в сине-зелёный цвет.



Исследование *Ps. aeruginosa* показало, что культуральные и морфо-физиологические свойства данного микроорганизма не меняются.

Питательная среда обеспечивает типичный рост *Ps. aeruginosa*, стабильность сохранения её биологических свойств и может быть использована при культивировании данного микроорганизма.

Данная питательная среда позволяет также выделять некоторых представителей родов *Klebsiella spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Escherichia spp.*, *Candida spp.*

Физико-химические показатели экспериментальной среды. Исследуемые плотные питательные среды представляли собой непрозрачный студень, без осадка, от светло-коричневого до тёмно-бордового цвета.

Прозрачность и цветность питательных сред определяли визуально в проходящем свете.

Оптимальным подходом к получению питательных основ из свекольного отвара являются накопление аминного азота, физико-химические свойства питательной среды и биологические свойства *Ps. aeruginosa*.

Главный критерий качества питательной среды – концентрация аминного азота,

составляющая 100-120 мг/%, что соответствует показателям стандартизированных сред.

Качество приготовленных сред оценивали с помощью физико-химических методов контроля в соответствии с «Методическими указаниями по применению физико-химических методов контроля питательных сред» (1977 г.) и МУК 4.2.2316-08 по следующим показателям: внешний вид, pH, аминный азот, сухой остаток, температура застудневания, прозрачность студня, продолжительность плавления, стерильность [2].

После автоклавирования экспериментальные среды осветляли активированным углём, фильтровали и определяли концентрацию аминного азота по методу Зеренсена в модификации Гаврилова, а также M – среднее значение показателя аминного азота и m – стандартное отклонение.

Качественное определение белка проводили визуально с использованием трихлоруксусной кислоты (CCl_3COOH) для его осаждения.

Данные отражены в таблице 1, откуда следует, что экспериментальная питательная среда характеризуется достаточным содержанием аминного азота по сравнению со стандартными средами (МПА, МПБ, Эндо) и селективными средами (ацетамидный агар, ЦПХ-агар).

В свекловичном отваре содержание белка незначительное, а в средах МПА, МПБ, Эндо, приготовленных на основе животного сырья, – выше.

Важным диагностическим признаком *Ps. aeruginosa* является её способность утилизировать источники углеводов в качестве источника питания и энергии. Базовым углеводородным субстратом является глюкоза, содержащаяся в свекловичном отваре в концентрации 15,1 г/л.

Основными биополимерами свекловичного отвара являются легкоусвояемые углеводы – моносахариды (глюкоза, фрук-

тоза, галактоза, арабиноза), дисахариды (сахароза, мальтоза), трисахариды (рафиноза), полисахариды (крахмал, целлюлоза, гемицеллюлоза) и незначительная доля белков. В состав свекловичного отвара входят витамины группы В, РР, С, Е, а также микроэлементы: Ca, Mg, Fe, Na, K, P.

Биологическая ценность питательной среды, приготовленной на основе свекловичного отвара, состоит в наличии углеводов, аминокислот, биологически активных веществ, витаминов, микроэлементов. Существенным плюсом предлагаемого сырья являются его доступность и удобство применения.

Кроме изучения биологических свойств микроорганизма на экспериментальной питательной среде, проводили изучение этих свойств на средах МПА, МПБ, Эндо, а также использовали селективные среды – ацетамидный агар, ЦПХ-агар [3].

Оптимальная температура роста *Ps. aeruginosa* – 37°C, pH среды – 7,2-7,4, но также хорошо растёт при 42°C.

При выращивании в МПБ в течение суток *Ps. aeruginosa* образует равномерное помутнение с сероватой плёнкой на поверхности и осадком на дне.

На МПА через сутки образуются довольно крупные (3-5 мм) полупрозрачные колонии сероватого цвета с перламутровым оттенком. Цвет колоний более тёмный, чем периферия. Края ровные, чёткие.

На скошенном агаре культура *Ps. aeruginosa* даёт тонкий блестящий налёт. Она имеет специфический запах жасмина.

Характерным свойством её является появление уже к концу первых суток сине-зелёного окрашивания культуры с последующим проникновением пигмента (пиоцианина) в питательную среду.

Таблица 1

Концентрация аминного азота и качественное содержание белка в составе экспериментальных питательных сред на основе свекловичного отвара ($M \pm m$)

Наименование питательной среды	Концентрация аминного азота, мг/%	Качественное содержание белка в питательных средах
Экспериментальная среда	129,1 ± 10,2	+
МПА	95,8 ± 12,5	++
МПБ	85,7 ± 10,2	++
Эндо	107,6 ± 5,3	++
ЦПХ-агар	113,4 ± 6,8	+
Ацетамидный агар	112,7 ± 5,6	+

Синегнойная палочка обладает слабой сахаролитической активностью: она обычно расщепляет только глюкозу с образованием кислоты без газа. Более выражена протеолитическая активность: разжижает желатин и свернутую кровяную сыворотку. Гидролизует казеин. Свертывает лакмусовое молоко, а затем расщепляет сгусток. Восстанавливает нитраты в нитриты и далее до азота. Не образует индола и H_2S . Даёт отрицательную реакцию Фогеса – Проскауэра. Проба на оксидазу положительная.

На среде Эндо *Ps. aeruginosa* образует мелкие розовые колонии, дающие специфический запах жасмина.

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

- 1) плоские колонии неправильной формы;
- 2) крупные выпуклые блестящие колонии;
- 3) слизистые;
- 4) карликовые, или точечные;
- 5) складчатые колонии.

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

- 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.

Ацетамидные агар содержит 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) [4].

В результате дезаминирования ацетамида образуется аммиак, сдвигающий pH в щелочную сторону (pH = 8,5). Среда меняет цвет с жёлто-оранжевого на лилово-красный.

- ЦПХ-агар – это тип среды, в состав которой входят химические вещества, обладающие антимикробным действием в отношении бактерий – возможных ассоциантов синегнойной палочки, а в качестве селективного агента добавляли цетилтриметиламмоний бромид (цетримид – агар), который подавляет рост на среде сопут-

ствующих бактерий, а *Ps. aeruginosa* даёт обильный рост.

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

Просматривая результаты посева 12 опытных образцов через 24 ч, было отмечено наличие беспигментных колоний, выросших как на контрольных, так и на экспериментальных средах.

Культуры, подозрительные на колонии синегнойной палочки, исследовали на способность образовывать цитохромоксидазу, используя индикаторные бумаги (СИБ). Беспигментные колонии, дающие положительный цитохромоксидазный тест, отбирали и суспензировали в 0,5 мл физиологического раствора, а затем отсеивали на следующие питательные среды:

- **среду Кинг Б**, используемую для усиления способности синегнойной палочки продуцировать сине-зелёный пигмент пиоцианин или другой пигмент – пиорубин, дающий красное окрашивание;

- **среду Хью-Лейфсона** с глюкозой – для определения способности псевдомонад окислять глюкозу до глюконовой кислоты в аэробных условиях. Посев производили методом укола в столбик питательной среды;

- **ацетамидный агар**, являющийся дифференциальной средой для *Ps. aeruginosa*;

- **косяки с экспериментальными питательными агарами** – для определения способности культур к росту при 42 и 5°C.

Засеянные культуры ставили в термостат при 42°C и в холодильник при 5°C.

На 3-й день, просматривая результаты посевов второго дня, установили, что на среде Кинг Б вокруг выросших колоний можно видеть сине-зелёное окрашивание за счёт продуцирования пигмента пиоцианина.

На среде Хью-Лейфсона с глюкозой отмечалось порозовение среды.

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

Считаю, что беспигментные колонии были получены в результате пересева чистой культуры *Ps. aeruginosa* на экспериментальные питательные среды.

Сравнительная характеристика роста *Pseudomonas aeruginosa* на экспериментальных и контрольных средах ($M \pm m$)

Питательные среды	KOE x 10 ⁶ /г	Характер роста	Морфология колоний	Морфология клеток	Цитохромоксидаза
Экспериментальная среда	129,0±0,2	Хороший	Зеленоватые слизистые колонии 0,2±0,05 мм	Гр (-) палочка, 1,5-3,0±0,4 мкм, расположенная одиночно, парами, короткими цепочками	+
Эндо	116,0±0,5	Хороший	Мелкие розовые колонии		+
МГБ	172,0±0,1	Обильный	Равномерное помутнение с сероватой плёнкой на поверхности и осадком на дне		+
Ацетамидный агар	156,0±0,3	Обильный	Зеленовато-синие слизистые колонии 0,2±0,05 мм		+
ЦПХ-агар	154,0±0,6	Обильный	Зеленоватые слизистые колонии 0,2±0,05 мм		+
МПА	148,0±0,2	Хороший	Сероватые полупрозрачные крупные колонии 3-5 мм		+

Для исследования ростовых качеств *Ps. aeruginosa* использовали метод посева (после 10⁶-кратного разведения) на экспериментальные и контрольные питательные среды.

При культивировании бактерии учитывали морфологию колоний (размер, пигментообразование, цвет, структуру).

Для изучения морфофизиологических, культуральных, тинкториальных свойств выделенного микроорганизма из полученных колоний делали мазки, окрашивали их по Синёву и Граму и микроскопировали [5].

Данные представлены в таблице 2.

Характерной особенностью *Ps. aeruginosa* является положительный тест на образование цитохромоксидазы, флуоресцирующих пигментов, проникающих в субстраты, и специфического запаха жасмина.

Ps. aeruginosa является каталазоположительной, даёт отрицательную реакцию на индол, не реагирует с метиленовым красным и не образует ацетилметилкарбинола.

Культуры синегнойной палочки образуют пигменты различного цвета (сине-зелёного, зеленовато-жёлтого, фиолетового, красного и др.).

Цвет колоний зависит от рН среды, например, сине-зелёный в нейтральной или щелочной, красный – в кислой среде.

На всех типах питательных сред биологические свойства *Ps. aeruginosa* однотипны.

Исследования по учёту выросших колоний показали, что на всех экспериментальных средах (по сравнению с

контрольными) отмечался хороший рост *Ps. aeruginosa*.

Ростовые качества бактерии на экспериментальной питательной среде и на стандартизированных средах промышленного производства практически однотипны.

Выводы

1. Впервые разработаны рецептура и методики приготовления питательной среды, предназначенной для культивирования синегнойной палочки, в качестве базовой основы которой явился свекловичный отвар.

2. Полученная питательная среда на основе свекловичного отвара по ростовым качествам не уступает стандартизированным питательным средам промышленного производства.

3. Исследование *Ps. aeruginosa* показало, что морфо-физиологические, культуральные, тинкториальные и биохимические свойства данного микроорганизма не меняются.

4. Полученная питательная среда обеспечивает типичный рост *Ps. aeruginosa*, стабильность сохранения их основных биологических свойств и может быть использована при культивировании данного микроорганизма.

Библиографический список

1. Возняковская Ю.М. Эпифитная микрофлора растений и урожай / Ю.М. Возняковская. – М.: Колос, 1969. – С. 173.
2. Методы контроля бактериологических питательных сред: метод. указания // МУК 4.2.2316-08. – М., 2008.

3. Нетрусов А.М. Практикум по микробиологии / А.М. Нетрусов, Л.М. Егорова. – М.: АCADEMIA, 2005. – С. 574.

4. Поляк М.С. Питательные среды для медицинской микробиологии / М.С. По-

ляк, М.Э. Сухаревич, В.И. Сухаревич. – СПб.: НИЦФ, 2003. – С. 148.

5. Хоулт Дж. Определитель бактерий Берджи / Дж. Хоулт, Н. Криг, П. Снит. – М.: Мир, 1997.



УДК 595.79:591.5(571.1)

А.Т. Демидова

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ БИОТОПИЧЕСКОГО РАСПРЕДЕЛЕНИЯ И ОТНОСИТЕЛЬНОГО ОБИЛИЯ ШМЕЛЕЙ (HYMENOPTERA, APIDAE, *BOMBUS LATR.*) ЗОНАЛЬНЫХ, АЗОНАЛЬНЫХ И АНТРОПОГЕННЫХ ЭКОСИСТЕМ СРЕДНЕОБСКОЙ НИЗМЕННОСТИ

Ключевые слова: шмели, Среднеобская низменность, биотопическое распределение, обилие, тайга, Западная Сибирь, разнообразие.

Введение

Шмели характеризуются очень тесными связями с растительностью и зависят не только от отдельных видов растений, представляющих их кормовую базу, но и от типа растительных ассоциаций, создающих специфическую топическую, микроклиматическую и ценотическую среду. Многие шмели обладают широкой экологической пластичностью и встречаются в различных биотопах зональных, азональных и антропогенных экосистем. Приуроченность шмелей к определенным биотопам в различных регионах изучалась многими учеными [1-3]. В наших исследованиях особое внимание уделяется биотопическому распределению шмелей Среднеобской низменности.

Материал и методика работы

Исследования биотопического распределения шмелей проводили в летние периоды с 2006 по 2010 гг. в различных биотопах, расположенных в Среднеобской низменности (Ханты-Мансийский автономный округ, Томская область).

Общий объем изученного материала составил свыше 5400 особей шмелей рода *Bombus Latr.*

При изучении шмелей использовались общие методики энтомологических исследований: В.В. Попов [4], К.К. Фасулати

[5], Ю.А. Песенко [6] и др. Идентификация видов велась с использованием основных определителей: А. Løken [7, 8], А.Н. Купянская [9], Д.В. Панфилов [10]. Название видов шмелей даны по П. Вильямсу [11, 12]. Учеты проводились маршрутным методом: индивидуальный отлов стандартным энтомологическим сачком на площади 500 м² в течение 30 мин. Относительное обилие видов определялось по доле особей в сборах и пятибалльной логарифмической шкале Ю.А. Песенко [13]. Для оценки видовой устойчивости и разнообразия сообщества рассчитаны индексы разнообразия Шеннона-Уивера (H') и выравненности (E). Кроме них использовали индекс доминирования Симпсона (D_{Sm}). В качестве меры сходства фаун использовался коэффициент общности Чекановского-Сьеренсена ($1-I_{CS}$) [14].

Результаты и их обсуждение

Для решения поставленной задачи нами было выявлено четырнадцать наиболее типичных биотопов для рассматриваемого региона. Эти биотопы были объединены в сходные группы по ландшафтным характеристикам.

В зональных экосистемах средней и северной тайги Западной Сибири в пределах Среднеобской низменности были обследованы по два биотопа: смешанные и темновойные леса в средней тайге, светловоиные и смешанные леса – в северной.

В азональных природных комплексах шесть биотопов: четыре топических ком-