

УДК 579.22

ИЗУЧЕНИЕ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ И КУЛЬТУРАЛЬНЫХ СВОЙСТВ БАКТЕРИЙ *CLAVIBACTER MICHIGANENSIS SSP. SEPEDONICUS*

Тимиреева К.В., студентка 4 курса, ФВМиБ,
timirreewa2012@yandex.ru

Научные руководители: Майоров П.С., аспирант кафедры МВЭиВСЭ,
Феоктистова Н.А., кандидат биологических наук, доцент
ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ

Ключевые слова: *Clavibacter michiganensis*, *sepedonicus*, морфологические свойства, культуральные свойства.

В статье представлены результаты, связанные с изучением морфологических и культуральных свойств бактерий *Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus*. Согласно полученным данным установлено что *Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus* грамположительная бактерия, и для ее роста необходимы аминокислота, такая как L-метионин.

Введение. Кольцевая гниль картофеля относится к одним из наиболее вредоносных фитопатогенных заболеваний. При поражении болезнью потери урожая могут достигать 45%. [1,3,8]. Кольцевая гниль картофеля, вызываемая бактерией *Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus*, представляет собой одно из наиболее вредоносных и распространенных заболеваний в мире. Эффективные методы регуляции численности данного фитопатогена в настоящее время отсутствуют, а все имеющиеся в большей степени являются профилактическими. В связи с этим представляется перспективной разработка эффективного и безопасного средства для оздоровления картофеля от *Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus* с применением фагового биопрепарата. [2, 4,7].

Целью данной работы является изучение морфологических и культуральных свойств бактерий подвида *Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus*.

Материалы и методы исследований. Для исследования использовали 2 референс-штамма *Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus* Ас-1405 и Ас-2753, полученные из Всероссийской коллекции микроорганизмов.

Питательные среды и реактивы: питательный бульон (ООО «БиоКомпас-С», РФ), питательный агар для культивирования микроорганизмов сухой (ГРМ-агар) ТУ 9398-020-78095326-2006 (ФБУН ГНЦ ПМБ, РФ); картофельный агар («HiMedia», Индия), YDC-среда, NDA – среда, SCM-среда, среда Кларка, крахмальный агар, глюкозо-солевая среда. Микро-ГРАМ-НИЦФ набор реагентов для окраски микроорганизмов по методу Грама ТУ 9398-002-39484474-2002 (ЗАО НИЦФ, РФ).

Техника приготовления питательных сред и методика посевов на плотные питательные среды, учет результатов экспериментов [1,2,6].

Результаты исследований. Оптимальная температура роста для культивирования *Clavibacter michiganensis* 27°C. На МПА обнаружены мелкие колонии, разного размера. Бело-сероватого оттенка. Колонии выпуклые. Есть одиночные и парные колонии. Время культивирования 5 суток.

После окраски по Граму обнаружены грамположительные палочки неправильной формы, слегка изогнутые. (рис.1)

Тест на потребность в факторах роста. На первом этапе исследовали наличие роста бактерий *Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus* на минимальной глюкозо-солевой среде (МГСС). Для приготовления МГСС отдельно готовили:

- 1) солевой концентрат x4 (г/л): NH_4NO_3 - 4 г, NH_4Cl - 20 г, K_2HPO_4 - 12 г, Na_2SO_4 - 8 г, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,5 г, KH_2PO_4 - 4 г; pH 7,2;
- 2) 20% водный раствор глюкозы;
- 3) 2% водный раствор агар-агара.

После приготовления и стерилизации отдельных компонентов готовили МГСС путем смешивания 200 мл % водного раствора агар-агара с 65 мл солевого концентрата и 4 и 3 мл 20% водного раствора глюкозы.

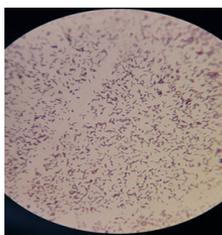


Рисунок 1 - Результат окраски по Граму – грамположительные палочки

Среду разливали по чашкам Петри и, после застывания, производили посев культур штрихом на поверхность МГСС. Посевы инкубировали при температуре 24 ± 2 °C в течение 5 суток. Отсутствие роста на МГСС свидетельствовало о потребности исследуемых бактерий в факторах роста.

На втором этапе исследовали потребность бактерий *Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus* в факторах роста. В качестве факторов роста использовали 4 аминокислоты - L-метионин, L-аспарагин, L-триптофан, L-тирозин. К МГСС добавляли отдельно по 1мл каждой аминокислоты на 100 мл среды, при концентрации аминокислот 40мкг/мл. При этом факторы роста готовились отдельно, стерилизовались кипячением.

Приготовленные среды, содержащие аминокислоту, разливали по чашкам Петри, после застывания производили посев культур штрихом. Посевы инкубировали при температуре 24 ± 2 °C в течение 5 суток. По истечению 5 суток проверяли посевы и подводили итог (рисунки 2 и 3).

На рисунках 1 и 2 представлены результаты проведенных исследований. Бактерии подвида *Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus*



Рисунок 2 – Положительный результат на МГСС с метионином



Рисунок 3 – Отрицательный результат на МГСС с аспарагином

показали хороший рост на МГСС с метионином, что свидетельствует о необходимости использования данной аминокислоты в качестве фактора роста. Абсолютно отрицательный результат был получен на МГСС с аспарагином. На поверхности среды с данной аминокислотой по истечению срока инкубирования роста культур не наблюдалось. На МГСС с триптофаном и тирозином наблюдался незначительный рост культур.

Заключение. Основываясь на данных полученных в ходе исследования можно сделать вывод, что бактерии *Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus* после окраски по Граму грамположительные палочки неправильной формы, слегка изогнутые. Также в ходе исследования было получены данные что для *Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus* необходимы факторы роста из-за установленной сложности культивирования.[9,10]Так, согласно полученным данным, максимальный эффект наблюдали при применении аминокислоты L - метионина. На других МГСС с использованными в исследовании аминокислотами (L - тирозин и L - триптофан) рост культур был незначителен, при применении L – аспарагина отсутствовал.

В дальнейшем L - метионин может быть использован в рецептуре при конструировании накопительной и селективной сред для выделения бактерий подвида *Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus*.

Библиографический список

1. Васильев, Д.А. Методы общей бактериологии. – Ульяновск, 2016. – 152 с.
2. Васильев, Д.А. Выделение и изучение биологических свойств бактерий рода *Proteus* / Д.А. Васильев, Н.А. Феоктистова, С.Н. Золотухин // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2017. - № 1. - С. 70 – 76.
3. Лысак, В. В. Физиология микроорганизмов : учеб.-метод. пособие / В. В. Лысак, Е. И. Игнатенко. – Минск : БГУ, 2016. – 80 с.
4. Майоров, П.С. Первичная идентификация микроорганизмов, выделенных из проб семенного картофеля / П.С. Майоров, Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев, К.В. Мартынова// Материалы Международной научной конференции «Молодежь и наука XXI века», 20-21 сентября 2017. Том 2. Ульяновск, УлГАУ, 2017. С. 92-96
5. Майоров, П.С. Идентификация возбудителя кольцевой гнили картофеля и определение его культуральных и тинкториальных свойств / П.С. Майоров, Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев // Материалы XV международной научно-практической конференция: «Современные тенденции сельскохозяйственного производства в мировой экономике» – Кемерово, 2016. - С. 101-105.

6. *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* // Data sheets on quarantine pests. Prepared by CABl and EPPO for the EU under Contract 90/399003 2005.
7. Определитель бактерий Берджи / под редакцией Дж. Хоулта [и др.], 9-е издание. Т.2. - М.: Мир.-1997. - С. 150.
8. Возбудитель кольцевой гнили картофеля – *Clavibacter Michiganensis* subsp. *Sepedonicus* / А.И. Перфильева, И.А. Граскова, Е.Г. Рихванов // АГРОХИМИЯ. - № 12. – 2013. - С. 34–44.
9. Основы эволюционной биохимии растений / Е.Г. Судьина, Г.И. Лозовая. - К.: Наукова думка.- 1982. – С 60 .
10. Общая фитопатология (часть 1): учебное пособие/ Ю.А. Чикин. – Томск/ 2001 – С 170 .

STUDY OF MORPHOLOGICAL AND CULTURAL PROPERTIES OF BACTERIA CLAVIBACTER MICHIGANENSIS SSP. SEPEDONICUS.

Timireva K.V., Maierov P.S., Feoktistova N.A.

Key words: *Clavibacter michiganensis, sepedonicus, morphological properties, cultural properties.*

The article presents the results related to the study of the morphological and cultural properties of Clavibacter michiganensis ssp bacteria. sepedonicus. According to the data obtained, Clavibacter michiganensis ssp. sepedonicus is a gram-positive bacterium, and for its growth an amino acid such as L-methionine is needed.