

УДК 579.2

КОНСТРУИРОВАНИЕ СРЕДЫ НАКОПЛЕНИЯ ДЛЯ БАКТЕРИЙ РОДА *CLAVIBACTER*

*Кузьмина А.Э., студент факультета ветеринарной
медицины и биотехнологии
Научный руководитель – Майоров П.С., ассистент
ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ*

Ключевые слова: микроорганизмы, *Clavibacter*, фитопатогены, антибиотики биологические свойства.

Бактериальные болезни растений, вызываемые бактериями вида *Clavibacter michiganensis* являются одними из наиболее распространенных и опасных во всем мире. В полевых условиях это вызывает увядание, хлороз в межпозвоночных пространствах и некроз, который начинается по краям. По мере прогрессирования болезни растение может разрушиться[1,4]. В данной статье приводятся результаты конструирования новой накопительной среды для бактерий вида *Clavibacter michiganensis*.

Материалы и методы. Для оценки селективности разрабатываемой среды накопления было протестировано 4 штамма бактерий рода *Clavibacter*.

Селективность всех испытанных полуселективных сред по сравнению с новыми средами оценивали с использованием гомогенатов здоровых полевых растений томатов или партий семян, которые были сильно загрязнены сапрофитными бактериями и искусственно заражены (“шипованными”) различными штаммами бактерий рода *Clavibacter*. Стебли или семена томатов измельчали в стерильных растворах со стерильной водой, а последовательные разведения наносили на среду NGY для оценки плотности сапрофитных бактерий. Затем определенное количество каждого из вышеописанных штаммов бактерий рода *Clavibacter* вводили отдельно только в один из неразбавленных или разведенных 1:10 гомогенатов, и на каждую среду наносили 100 мкл аликвот. Пластины инкубировали при температуре 26 °С. Как только бактерии начали расти, начался подсчет колоний как для сапрофитов, так и для бактерий рода *Clavibacter*. Бактерии начали расти на каждой среде через разные промежутки времени (от 2 до 15 дней)[4].

Для сравнения всех сред в одинаковых условиях определяли конечное количество колоний сапрофитов и бактерий рода *Clavibacter* на 10 точек на дюйм. Колонии с подозрением на бактерии рода *Clavibacter* очищали и идентифицировали путем повторного замачивания на новых пластинах агаре NGY или на рифампицин-, стрептомицин-агаре NGY, когда применяли двойной мутант [2,3].

Результаты собственных исследований и обсуждение. На основе изучения литературных данных было принято решение использовать в качестве азотно-витаминной основы конструируемой среды дрожжевой экстракт, основным источником углерода должен был стать маннит. Для определения наилучших параметров разрабатываемой среды провели ряд экспериментов с прототипами новой среды. Было заложено 5 экспериментов с различной концентрацией компонентов в новой среде:

№1 – дрожжевой экстракт-1,0 г; маннит -2,0 г

№2 – дрожжевой экстракт-2,0 г; маннит -2,5 г

№3 – дрожжевой экстракт-3,0 г; маннит -3,0 г

№4 – дрожжевой экстракт-4,0 г; маннит -3,5 г

№5 – дрожжевой экстракт-4,0 г; маннит -3 г

Для контроля осуществляли посев исследуемых культур бактерий на МПА. Культивирование проводили при температуре 28°C в течение 48 часов. По окончании инкубирования проводили подсчет выросших колоний. Результаты исследований приведены в таблице 1 и рисунке 1.

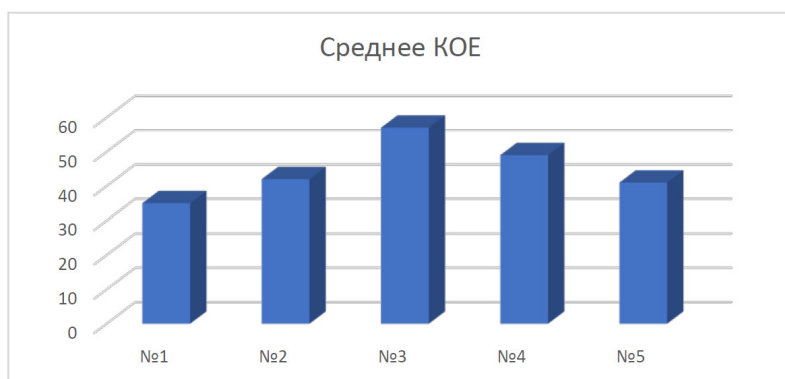


Рисунок 1 – Сравнение основы селективных сред (№1, №2, №3, №4 и №5) (на примере бактерии *C. michiganensis ssp. sepedonicus* Ac1405)

Таблица 1 – Показатель колонеобразующих единиц на основах селективных сред

Вариант среды	Колонеобразующие единицы (КОЕ) (каждый опыт в трех повторностях)											
	Ac1405			Ac2753			Ac1402			Ac1406		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
№1	31	35	41	41	28	36	38	34	35	41	40	33
	Ср.36			Ср.35			Ср.36			Ср.38		
№2	42	51	48	32	54	48	42	49	51	38	46	42
	Ср.47			Ср.45			Ср.47			Ср.42		
№3	51	49	59	44	49	56	50	50	56	47	51	46
	Ср.53			Ср.52			Ср.50			Ср.48		
№4	41	44	50	46	35	49	40	48	41	45	40	36
	Ср.45			Ср.43			Ср.43			Ср.40		
№5	42	36	32	33	35	37	41	36	39	34	40	38
	Ср.37			Ср.35			Ср.39			Ср.37		

Ср. – среднее значение

В соответствии с полученными данными образец №3 имеет лучшие показатели по КОЕ. Поэтому питательная основа конструируемой среды включала в себя следующие объемы каждого компонента: дрожжевой экстракт – 3 г и маннит – 3 г.

Поскольку бактерии рода *Clavibacter* являются требовательными в отношении состава питательной среды было принято решение дополнить конструируемую питательную среду минеральной базой, включающей набор солей фосфата калия одно- и двузамещенного и семиводного сульфата магния. Данные компоненты были выбраны поскольку соли калия и магния стимулируют синтез микробных клеток. Были проведены исследования по определению наилучшей концентрации данных солей в питательной среде. За основу были взяты литературные данные, касающиеся их применения в различных питательных средах. Использовали следующие варианты концентрации компонентов:

№1 – K_2HPO_4 – 0,1 г; KH_2PO_4 – 0,1 г; $MgSO_4$ – 0,1 г;

№2 – K_2HPO_4 – 0,2 г; KH_2PO_4 – 0,2 г; $MgSO_4$ – 0,2 г;

№3 – K_2HPO_4 – 0,3 г; KH_2PO_4 – 0,3 г; $MgSO_4$ – 0,3 г;

№4 – K_2HPO_4 – 0,1 г; KH_2PO_4 – 0,1 г; K_2SO_4 – 0,1 г;

№5 – K_2HPO_4 – 0,2 г; KH_2PO_4 – 0,2 г; K_2SO_4 – 0,3 г;

№6 – K_2HPO_4 – 0,3 г; KH_2PO_4 – 0,3 г; K_2SO_4 – 0,3 г;

Результаты проведенных исследований представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Рост бактерий *Clavibacter* на основах селективных сред

Вариант среды	Колонеобразующие единицы (КОЕ) (каждый опыт в трех повторностях)											
	Ac1405			Ac2753			Ac1402			Ac1406		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
№1	35	37	34	39	32	35	34	41	32	35	32	38
	Ср.35			Ср.35			Ср.36			Ср.35		
№2	52	47	42	43	49	43	50	49	45	43	46	44
	Ср.47			Ср.45			Ср.48			Ср.44		
№3	42	38	45	41	39	42	48	42	38	41	37	46
	Ср.42			Ср.41			Ср.43			Ср.41		
№4	36	41	35	34	41	37	39	33	37	39	31	35
	Ср.37			Ср.37			Ср.36			Ср.35		
№5	47	45	49	50	41	42	45	41	46	47	42	43
	Ср.47			Ср.44			Ср.44			Ср.44		
№6	37	38	41	38	35	40	40	45	39	45	41	38
	Ср.39			Ср.38			Ср.41			Ср.41		

Результаты исследований показали, что наилучшего роста бактерий на новой питательной среде получилось добиться при следующих концентрациях минеральной базы: K_2HPO_4 – 0,2 г; KH_2PO_4 – 0,2 г; $MgSO_4$ – 0,2 г. В соответствии с полученными данными, новая накопительная среда для бактерий *Clavibacter michiganensis* имела следующий состав (г/л):

Дрожжевой экстракт-3,0 г;

Маннит -3,0 г;

K_2HPO_4 – 0,2 г;

KH_2PO_4 – 0,2 г;

MgSO₄ – 0,2 г.

Приготовлении питательной среды проводили следующим образом. Дрожжевой экстракт вносили в 1000 мл холодной воды, медленно нагревали. Затем последовательно добавили калий фосфорнокислый двузамещенный и однозамещенный, сульфат магния, маннит. Кипятили в течение 2-3 минуты, при постоянном помешивании. Стерилизацию среды проводили текучим паром при 112 °С в течение 25 минут.

В дальнейшем были проведены испытания сконструированной среды по времени культивирования и специфичности действия.

Библиографический список:

1. Белошапкина О.Н. Защита растений. Фитопатология и энтомология. Учебник // – М.: Феникс, 2017. – 480с.
2. Васильев, Д.А. Методы общей бактериологии. – Ульяновск, 2016. – 152 с.
3. 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.
4. Madden LV, Hughes G, van den Bosch F, editors. The Study of Plant Disease Epidemics. – St. Paul: MN. APS Press; – 2007.

DESIGN OF THE ACCUMULATION MEDIUM FOR BACTERIA OF THE GENUS CLAVIBACTER

Kuzmina A.E.

Keywords: *microorganisms, Clavibacter, phytopathogens, antibiotics biological properties.*

Bacterial diseases of plants caused by bacteria of the species Clavibacter michiganensis are among the most common and dangerous worldwide. In the field, this causes wilting, chlorosis in the intervertebral spaces and necrosis that begins at the edges. As the disease progresses, the plant may collapse. This article presents the results of designing a new storage medium for bacteria of the species Clavibacter michiganensis.