

# Новая модификация питательной среды для выделения *Pseudomonas aeruginosa*

А.П.Шепелин, И.И.Марчихина, Л.П.Шолохова, О.В.Полосенко

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Московская область, Российская Федерация

Выделенная и описанная более ста лет назад синегнойная палочка является серьезной проблемой в различных областях жизни и по настоящее время. Возрастает роль синегнойной палочки в удельном весе известных возбудителей септических осложнений и возникновении внутрибольничных инфекций. Спектр проблем возникает и в процессе эксплуатации бассейнов, где в межплиточном пространстве они создают целые колонии и могут сохранять жизнеспособность в воде в течение длительного времени. Синегнойная палочка легко приспосабливается к большинству антибиотиков, устойчива даже к очень высоким их концентрациям. Патогенна для человека. Необходимость унифицировать методы лабораторных исследований по выделению и идентификации микроорганизмов рода *Pseudomonas* остается актуальной, следовательно, необходимы разработка новых и модификация имеющихся питательных сред для выделения псевдомонад.

**Ключевые слова:** псевдомонады, фенозан, бутилгидрокситолуол, специфическая активность, пигментообразование, ингибирующие свойства

**Для цитирования:** Шепелин А.П., Марчихина И.И., Шолохова Л.П., Полосенко О.В. Новая модификация питательной среды для выделения *Pseudomonas aeruginosa*. Бактериология. 2019; 4(2): 13–20. DOI: 10.20953/2500-1027-2019-2-13-20

## New nutrition modification for isolation of *Pseudomonas aeruginosa*

A.P.Shepelin, I.I.Marchikhina, L.P.Sholokhova, O.V.Polosenko

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation

*Pseudomonas aeruginosa* have been isolated and described more than a hundred years ago, is a serious problem in various areas of life today. The role of this microorganism among the known causative agents of septic complications and the occurrence of nosocomial infections is increasing. A range of problems also arises in the process of operating pools, where in the inter-tile space they create entire colonies and can remain viable in water for a long time. *Pseudomonas aeruginosa* easily adapts to most antibiotics, including very high concentrations. It is pathogenic to humans. The need to unify laboratory research methods for the isolation and identification of microorganisms of the genus *Pseudomonas* remains relevant, therefore, it is necessary to develop new and modify existing nutrient media for the isolation of pseudomonads.

**Keywords:** *Pseudomonas*, phenosan, butylhydroxytoluene, specific activity, pigmentation, inhibitory properties

**For citation:** Shepelin A.P., Marchikhina I.I., Sholokhova L.P., Polosenko O.V. New nutrition modification for isolation of *Pseudomonas aeruginosa*. Bacteriology. 2019; 4(2): 13–20. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2019-2-13-20

**Р**од *Pseudomonas* включает 18 видов, но наибольшую важность для медицины, ветеринарии и санитарии представляют *P. aeruginosa*, *P. mallei* и *P. pseudomallei*. Псевдомонады неприхотливы по питательным потребностям и способны выживать почти при полном отсутствии источников питания [1].

Псевдомонады, являясь нетребовательными к питательным веществам микроорганизмами, можно изолировать на

любых простых жидких и плотных питательных средах. Представители рода *Pseudomonas* отличаются высокой ферментативной активностью и разлагают разнообразные белки и жиры, углеводы они ферментируют сравнительно редко и усваивают их путем окисления.

Ввиду того, что *P. aeruginosa* довольно часто находится в ассоциации с другими микроорганизмами, для ее одноступенчатого выделения используется ряд элективных и

### Для корреспонденции:

Шепелин Анатолий Прокопьевич, доктор биологических наук, заместитель директора по научно-производственной деятельности ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ

Телефон: (4967) 36-0020

E-mail: shepelin@obolensk.org

Статья поступила 22.03.2019 г., принята к печати 27.06.2019 г.

### For correspondence:

Anatoly P. Shepelin, Sc.D. (Bio.), deputy director for science and production, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosptrebnadzor

Address: SRCAMB, 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation

Phone: (4967) 36-0020

E-mail: shepelin@obolensk.org

The article was received 22.03.2019, accepted for publication 27.06.2019

дифференциально-диагностических сред. Среды должны содержать источник питания, обеспечивающий рост только синегнойной палочки, либо компоненты, подавляющие рост ассоциативной микрофлоры, не задерживая при этом ее собственный рост.

В принципах селективного выделения и дифференциации псевдомонад от других грамотрицательных бактерий с применением питательных сред использована уникальная способность *P. aeruginosa* синтезировать водорастворимый феназиновый пигмент – пиоцианин, окрашивающий питательную среду в сине-зеленый цвет. Кроме того, большинство культур образуют зеленый, флуоресцирующий в ультрафиолетовых лучах пигмент флуоресцеин или пиовердин, а также другие пигменты (пиорубин, пиомеланин, аоксифеназин), но в некоторых случаях выявляются атипичные беспигментные или слабопигментированные формы, что объясняется действием сопутствующей микрофлоры, антибиотиков, недостатком кислорода. Выявление способности *P. aeruginosa* к образованию на плотных средах блестящего металлического налета нестабильно и в значительной степени зависит от состава среды культивирования [1].

**Цель исследования** – изучение влияния антиоксидантов фенозан-кислоты (3-(3,5-дитретбутил-4-оксифенил) пропионовая кислота) и бутилгидрокситолуола (2,6-Бис(1,1-диметилэтил)-4-метилфенол) (БГТ) на рост псевдомонад и ассоциативных микроорганизмов, а также возможности замены дорогостоящего импортного антиоксиданта на более дешевый отечественного производства.

### Материалы и методы

На территории РФ для выявления псевдомонад действующими нормативными документами являются: методические рекомендации «Выделение и идентификация штаммов синегнойной палочки из клинического материала» и «Обнаружение и идентификация *Pseudomonas aeruginosa* в объектах окружающей среды (пищевых продуктах, воде, сточных жидкостях)», ГОСТ 10444.15-94 «Продукты пищевые. Методы определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов», ГОСТ Р 54755-2011 «Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества бактерий вида *Pseudomonas aeruginosa*», ГФ XIV т.1 (ОФС. 1.2.4.0002.18), которые регламентируют набор питательных сред для проведения исследований [2–6].

Выделение на питательной среде чистых культур микроорганизмов с характерными для псевдомонад культуральными, морфологическими и тинкториальными свойствами требует постановки целого ряда подтверждающих тестов, а следовательно, значительного времени и материальных затрат.

Существующие среды имеют довольно сложную рецептуру и могут содержать дорогостоящие компоненты импортного производства.

Разработка селективных сред ориентирована на химические соединения, ингибирующие рост бактерий-ассоциантов *P. aeruginosa*. В связи с резистентностью к нитрофурановым препаратам для выделения псевдомонад предложены пита-

тельные среды, в состав которых вводится одно из соединений названной группы. За рубежом распространение получили сухие среды, содержащие в качестве селективного агента цетилтриметиламмоний бромид, или цетримид. В России была разработана сухая среда, состоящая из селективного агента отечественного производства – N-цетилпиридиния хлорида (N-ЦПХ) в концентрации 0,2%, а также питательной основы из сухого пептического гидролизата казеина и минеральных солей магния, калия. Детергент N-ЦПХ в концентрации 0,2–0,5% надежно угнетает рост стафилококков, стрептококков и энтеробактерий, однако при этом ингибируются и отдельные клинические штаммы синегнойной палочки. Затем, для улучшения селективных свойств, А.Ф.Мороз и соавт. ввели в состав среды фенозан, и было начато промышленное производство ЦПХ-агара с фенозаном, который был рекомендован для выделения *P. aeruginosa* наряду с ацетамидным агаром [7, 8].

Выбор специфической питательной среды для выявления псевдомонад будет всегда зависеть от типа исследуемого образца или поставленной задачи: качественное обнаружение или количественный учет.

Несмотря на то что потребность в диагностике синегнойной инфекции очевидна, и на протяжении десятилетий разработано большое разнообразие питательных сред, в том числе и для выявления возбудителей сапа и мелиоидоза, существующие бактериологические параметры схем, методов выделения, идентификации и индикации представителей рода *Pseudomonas* несовершенны.

### Результаты и обсуждение

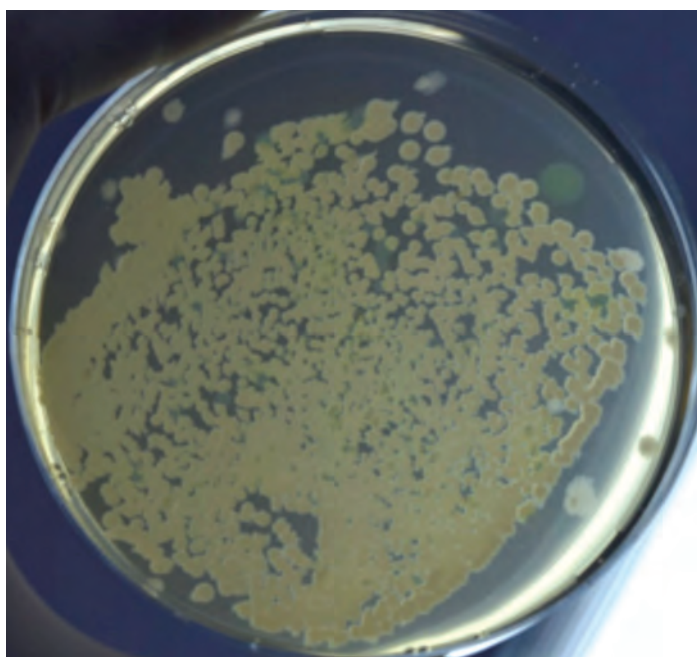
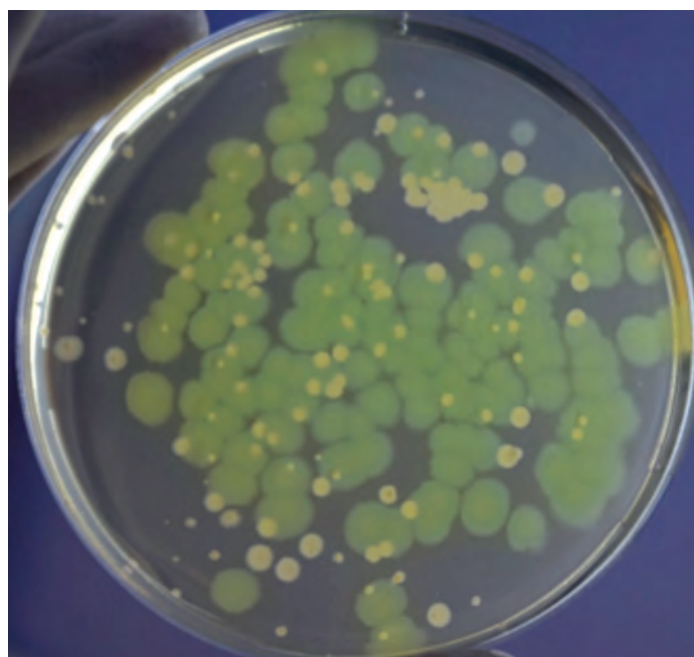
ФБУН ГНЦ ПМБ выпускает различные питательные среды для накопления и идентификации псевдомонад: Питательная среда №8 ГРМ – для выращивания *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus*, ГРМ-агар – для культивирования различных неприхотливых микроорганизмов, в том числе и синегнойной палочки, Питательная среда №9 ГРМ – для выявления пигмента пиоцианина, Цетримидный агар – для селективного выделения псевдомонад [9].

Для удовлетворения потребностей отечественных бактериологов в качественных питательных средах, в том числе и для селективного выделения псевдомонад, принято решение о разработке и производстве модифицированного ЦПХ-агара, сухого.

С этой целью прежде всего было изучено влияние фенозан-кислоты (3-(3,5-дитретбутил-4-оксифенил) пропионовая кислота) на рост псевдомонад и ассоциативных микроорганизмов, а кроме того, возможность замены дорогостоящей фенозан-кислоты (и ее производных) на более дешевый – бутилгидрокситолуол (2,6-Бис(1,1-диметилэтил)-4-метилфенол) (БГТ). Оба химических вещества являются мощными антиоксидантами, препятствующими окислению жирорастворимых витаминов А и Е, помогают вырабатывать больше необходимой клеткам энергии, в результате чего происходит естественная циркуляция питательных веществ, что способствует накоплению биомассы.

Реакциями окисления называются процессы образования свободных радикалов вследствие потери одного или не-

Таблица 1. Характер роста тест-штаммов микроорганизмов					
№ п/п	Наименование тест-штамма	Разведение	Антиоксиданты (г/л)		
			без антиоксидантов	фенозан-кислота КОЕ, диаметр мм	бутилгидрокситолуол (БГТ)
1	<i>P. aeruginosa</i> 453	10 <sup>-7</sup>	22 4,0–8,0 Колонии плоские слизистые в R-форме с образованием лимонно-желтого пигмента. Среда контаминирована.	17 4,0–8,0 Колонии плоские слизистые в R-форме с образованием лимонно-желтого пигмента. Среда контаминирована.	22 4,0–8,0 Колонии плоские слизистые в SR-форме с образованием лимонно-желтого пигмента. Нет контаминации среды
2	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 Париж	10 <sup>-7</sup>	Среда контаминирована. Обильный рост посторонней микрофлоры	13 5,0–8,0 Колонии плоские слизистые в R-форме с образованием лимонно-желтого пигмента. Среда контаминирована. Обильный рост посторонней микрофлоры	12 5,0–8,0 Колонии плоские слизистые в SR-форме с образованием лимонно-желтого пигмента. Нет контаминации среды
3	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027 (NCTC 12924)	10 <sup>-7</sup>	5 4,0–8,0 Среда контаминирована. Обильный рост посторонней микрофлоры	8 5,0–10,0 Колонии плоские слизистые в R-форме с образованием лимонно-желтого пигмента. Среда контаминирована. Обильный рост посторонней микрофлоры	9 4,0–9,0 Колонии плоские слизистые в SR-форме колоний, с образованием лимонно-желтого пигмента. Нет контаминации среды
4	<i>P. aeruginosa</i> 27/99	10 <sup>-7</sup>	14 4,0–8,0 Среда контаминирована. Обильный рост посторонней микрофлоры	15 4,0–8,0 Колонии плоские слизистые в R-форме с образованием лимонно-желтого пигмента. Среда контаминирована	16 4,0–8,0 Колонии плоские слизистые в R-форме с образованием лимонно-желтого пигмента. Нет контаминации среды
5	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 10145	10 <sup>-7</sup>	Среда контаминирована. Сплошной рост посторонней микрофлоры	25 1,6–2,2 Колонии круглые, выпуклые с образованием лимонно-желтого пигмента. Среда контаминирована.	26 1,6–2,2 Колонии круглые, выпуклые с образованием лимонно-желтого пигмента. Нет контаминации среды
6	<i>S. aureus</i> Wood-46 (ATCC 10832)	10 <sup>-1</sup>	Сплошной рост, пророст в толще агарового слоя	Сплошной рост, пророст в толще агарового слоя	Сплошной рост, нет пророста в толще агарового слоя
7	<i>P. mirabilis</i> 3177	10 <sup>-3</sup>	Сплошной рост, роение, пророст в толще агарового слоя	Сплошной рост, роение, пророст в толще агарового слоя	Сплошной рост, роение, нет пророста в толще агарового слоя
8	<i>E. coli</i> 3912/41 (O55:K59)	10 <sup>-3</sup>	Сплошной рост, пророст в толще агарового слоя	Сплошной рост, пророст в толще агарового слоя	Сплошной рост, нет пророста в толще агарового слоя

Рис. 1. Рост *P. aeruginosa* 27/99 на среде без антиоксидантов.Рис. 2. Рост *P. aeruginosa* 27/99 на среде с фенозан-кислотой.



скольких электронов, промежуточных продуктов обмена веществ при росте микроорганизмов. Свободные радикалы собираются в клеточных мембранах (липидное перокисление), клеточные липиды подвергаются окислению и повреждаются. Из-за этого клеточные мембраны становятся хрупкими и легко проницаемыми. Они плохо удерживают содержимое клетки, что приводит к ее гибели.

Антиоксиданты (фенозан и БГТ) – это доноры электронов. Они прекращают цепную окислительную реакцию, отдавая свободным радикалам свои собственные электроны, но при этом не становятся свободными радикалами. Антиок-

сиданты – это механизм защиты клеток от частиц активного кислорода [10].

Фенозан-кислота и БГТ – гидрофобные (растворимые в липидах/жирах) антиоксиданты, способные защищать клеточные мембраны от перекисного окисления липидов. Фенозан-кислота является не только антиоксидантом, но в малых дозах способна активировать протеинкиназы, альдолазу, лактатдегидрогеназу, а следовательно, выступать в роли биостимулятора.

Задачей исследования на первом этапе стала не только альтернативная частичная замена фенозан-кислоты на БГТ,

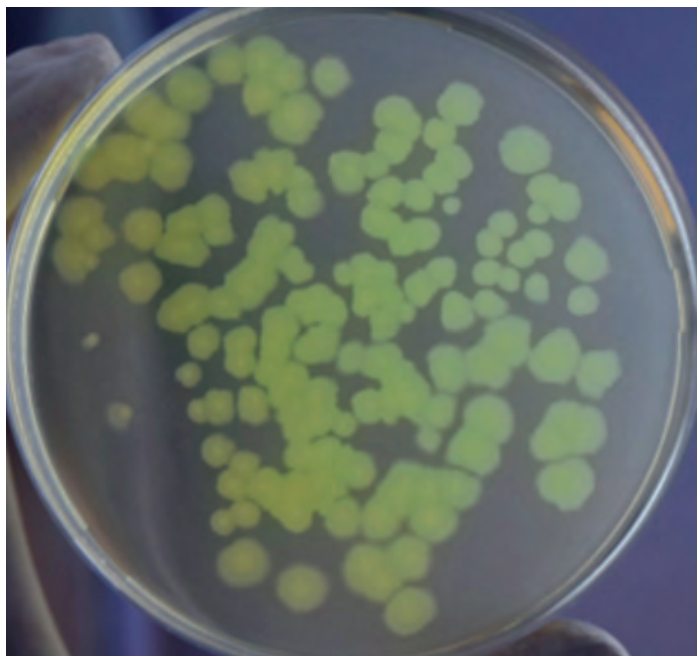


Рис. 3. Рост *P. aeruginosa* 27/99 на среде с бутилгидрокситолуолом.

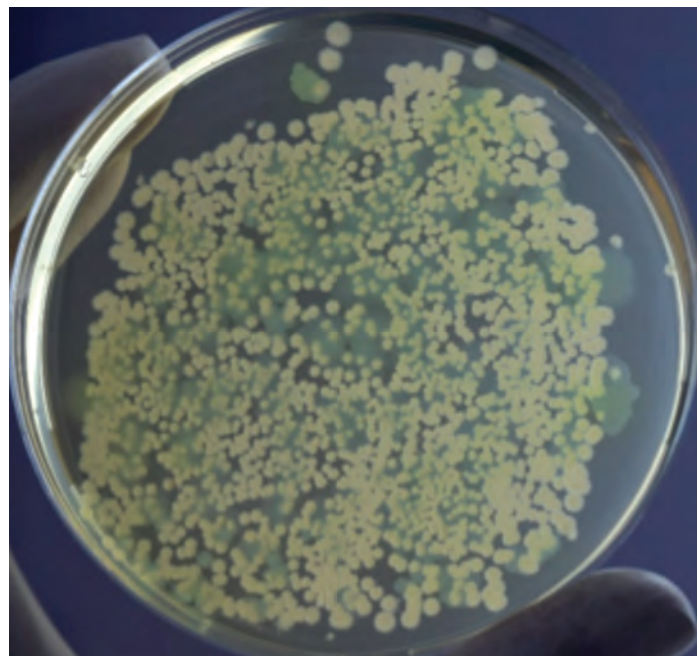


Рис. 4. Рост *P. aeruginosa* ATCC 9027 (NCTC 12924) на среде без антиоксидантов.

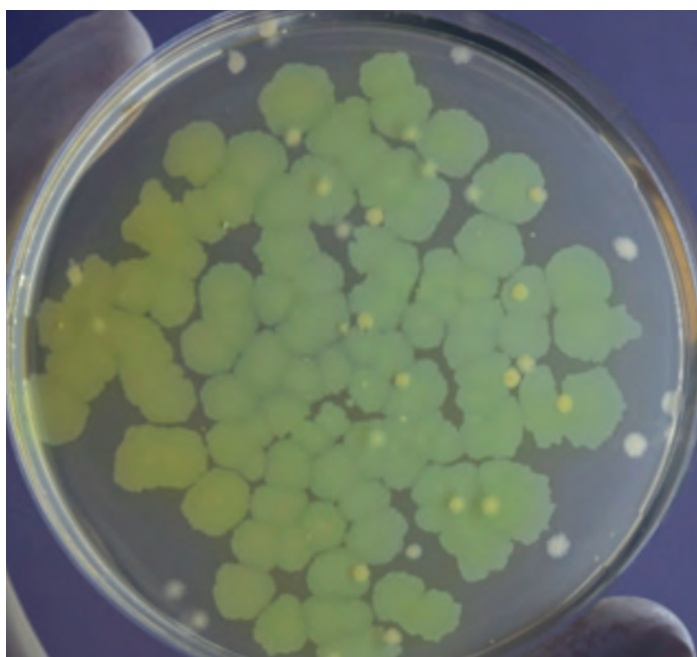


Рис. 5. Рост *P. aeruginosa* ATCC 9027 (NCTC 12924) на среде с фенозан-кислотой.

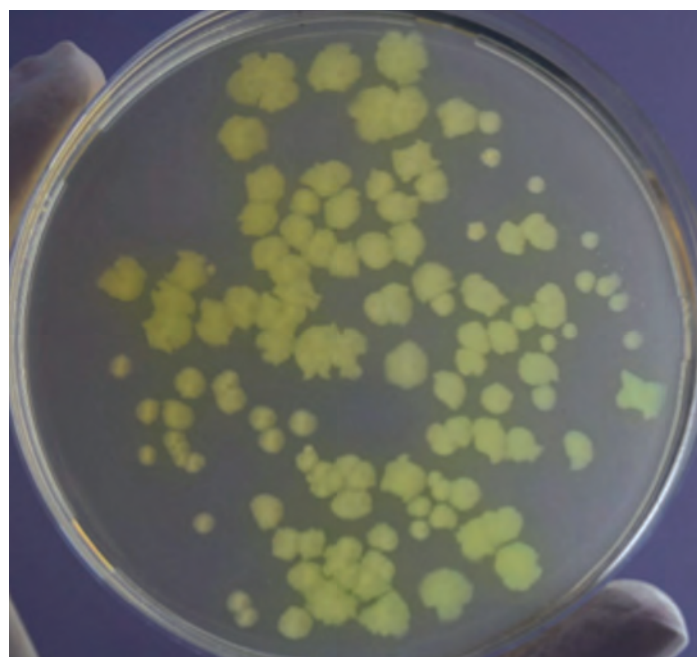


Рис. 6. Рост *P. aeruginosa* ATCC 9027 (NCTC 12924) на среде с бутилгидрокситолуолом.

но и оценка их роли в качестве биостимуляторов роста псевдомонад на ЦПХ-агаре [11].

Действие каждого из антиоксидантов и их суммарной комбинации в концентрации 0,1 г/л изучали на модели ЦПХ-агара без добавления селективного агента – N-цетилпиридиния хлорида (N-ЦПХ).

Разработанные в ФБУН ГНЦ ПМБ питательные среды для выявления псевдомонад в качестве белковой основы содержат панкреатические гидролизаты казеина, рыбной кормовой муки, пептон мясной. Многолетней практикой установлено, что данные источники азотистого питания

в полной мере обеспечивают питательные потребности микроорганизмов.

В качестве белковой основы ЦПХ-агара использовали панкреатический гидролизат рыбной муки (ПГРМ). Кроме того, среда содержала сернокислые магний и калий – 2,4 и 7,6 г/л соответственно, калий фосфорнокислый однозамещенный и калий фосфорнокислый двухзамещенный по 1,0 г/л, натрий углекислый для стабилизации pH среды при росте микроорганизмов, агар бактериологический. ЦПХ-агар стерилизуется кипячением в течение 1–2 мин до полного расплавления агара.

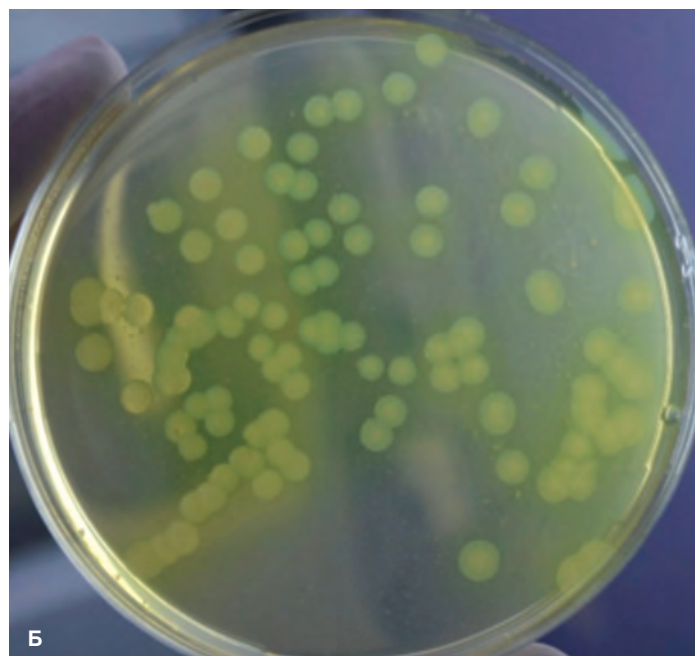
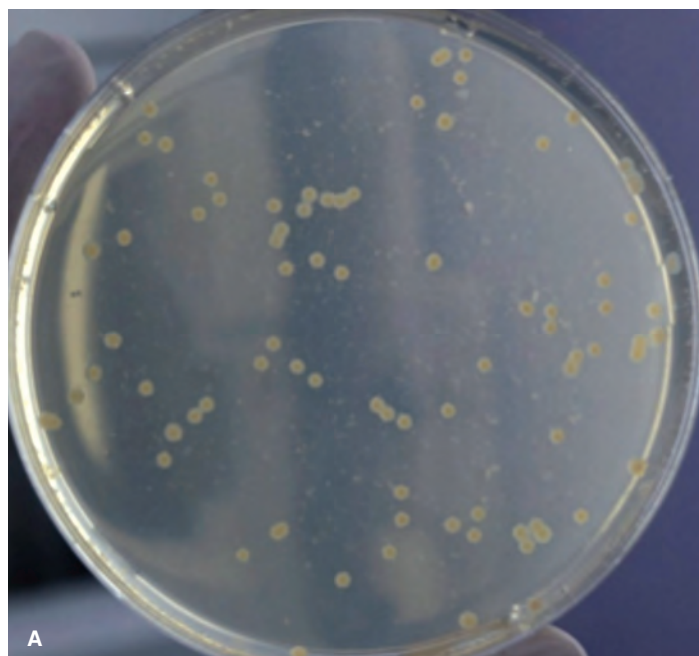


Рис. 7. Рост *P. aeruginosa* 27/99 на контрольном ЦПХ-агаре и экспериментальном ЦПХ-агаре с фенозан-кислотой и бутилгидрокситолуолом. А – контрольный ЦПХ-агар; Б – экспериментальный ЦПХ-агар.

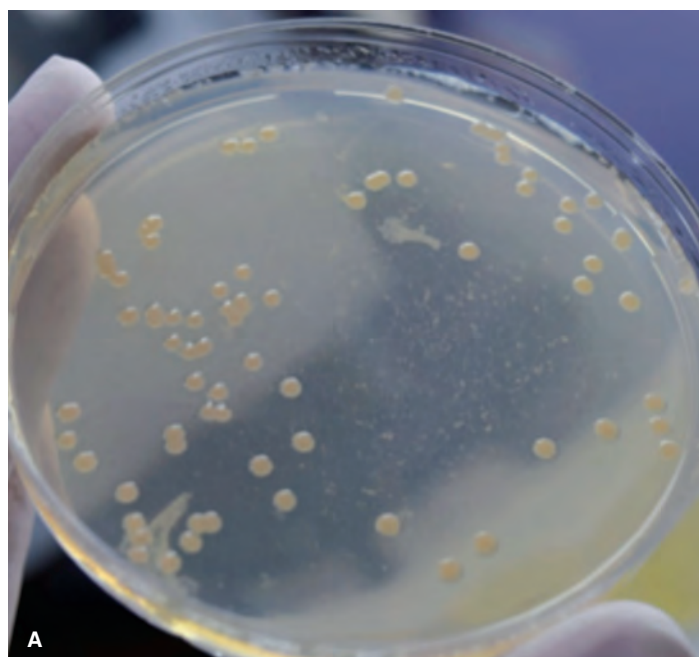


Рис. 8. Рост *P. aeruginosa* ATCC 10145 на контрольном ЦПХ-агаре и экспериментальном ЦПХ-агаре с фенозан-кислотой и бутилгидрокситолуолом. А – контрольный ЦПХ-агар; Б – экспериментальный ЦПХ-агар.



Для оценки ростовых свойств использовали тест-штаммы культур микроорганизмов из разведений  $10^{-7}$  и  $10^{-6}$  для псевдомонад и  $10^{-1}$ ,  $10^{-3}$  – для возможных сопутствующих микроорганизмов.

Для контроля посевной дозы тест-штаммов микроорганизмов использовали неселективную питательную среду общего назначения – ГРМ-агар. Так как экспериментальные варианты среды не содержали ингибиторов, посева инкубировали 24 ч при температуре  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ . Результаты исследования влияния антиоксидантов на рост псевдомонад из разведения  $10^{-7}$  представлены в таблице 1, и рост псевдомонад из разведения  $10^{-6}$  – на рис. 1–6.

Следует заметить, что мягкая стерилизация образцов питательной среды и отсутствие ингибиторов не могут обеспечить полную стерильность препаратов, а следовательно,

вероятен пророст посторонней микрофлоры в процессе инкубирования посевов.

В результате проведенных исследований на питательных средах с использованием БГТ отмечена более выраженная селективность среды в отношении псевдомонад, где после инкубации посевов тест-штаммов псевдомонад из разведения  $10^{-7}$  и  $10^{-6}$  полностью отсутствовал рост посторонних микроорганизмов, в то время как на средах с фенозан-кислотой и не содержащей БГТ наблюдался пророст микроорганизмов как в толще, так и на поверхности агаровой пластины среды. В отношении роста возможных ассоциантов при посевной дозе  $10^6$  и  $10^8$  мк. Кл./мл и в отсутствие в составе среды основного ингибитора – N-цетилпиридиния хлорида ингибирующий эффект слабо выражен.

Таблица 2. Биологические показатели качества ЦПХ агара

№ п/п	Наименование тест-штаммов	Разведение	ЦПХ-агар			Контроль. Питательная среда для выделения синегнойной палочки (ЦПХ агар) С Мк 020518 Дата изг. 05.2018 Годен до 05.2020 ФГУП «НПО Микроген»
			На основе ПГРМ фенозан-кислота – 0,1 г/л	На основе ПГРМ бутилгидрокситолуол – 0,1 г/л	На основе ПГРМ фенозан-кислота – 0,025 г/л. Бутилгидрокситолуол – 0,075 г/л	
1	<i>P. aeruginosa</i> 453	$10^{-7}$	23 6,0–8,0 Колонии плоские, слизистые в R-форме с образованием лимонно-желтого пигмента	27 5,0–8,0 Колонии плоские, слизистые в SR и R-форме с образованием лимонно-желтого пигмента	21 5,0–8,0 Колонии плоские, слизистые в SR- и R-форме с образованием лимонно-желтого пигмента	16 2,0–2,5 Колонии плоские, в S-форме без образования пигмента
2	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 Париж	$10^{-7}$	18 6,0–8,0 Колонии плоские, слизистые в R-форме с образованием лимонно-желтого пигмента	10 5,0–8,0 Колонии плоские, слизистые в R-форме с образованием лимонно-желтого пигмента	13 5,0–8,0 Колонии плоские, слизистые в R-форме с образованием лимонно-желтого пигмента	17 2,0–2,5 Колонии плоские, в S-форме без образования пигмента
3	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027 (NCTC 12924)	$10^{-7}$	12 1,8–2,0 Колонии круглые, слизистые в S- и SR-форме с образованием лимонно-желтого пигмента	5 1,8–2,0 Колонии круглые, слизистые в S- и SR-форме с образованием лимонно-желтого пигмента	20 1,8–2,0 Колонии круглые, слизистые в S- и SR-форме с образованием лимонно-желтого пигмента	4 1,6–1,8 Колонии круглые, выпуклые в S-форме без образования пигмента
4	<i>P. aeruginosa</i> 27/99	$10^{-7}$	27 6,0–8,0 Колонии плоские, слизистые в SR- и R-форме с образованием лимонно-желтого пигмента	21 6,0–8,0 Колонии плоские, слизистые в SR- и R-форме с образованием лимонно-желтого пигмента	16 6,0–8,0 Колонии плоские, слизистые в SR- и R-форме с образованием лимонно-желтого пигмента	11 1,8–2,0 Колонии круглые, выпуклые в S-форме без образования пигмента
5	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 10145	$10^{-7}$	21 6,0–8,0 Колонии плоские, слизистые в SR-форме с образованием лимонно-желтого пигмента	12 6,0–8,0 Колонии плоские, слизистые в SR- и R-форме с образованием лимонно-желтого пигмента	17 6,0–8,0 Колонии плоские, слизистые в SR- и R-форме с образованием лимонно-желтого пигмента	11 2,0–2,5 Колонии круглые, выпуклые в S-форме без образования пигмента
6	<i>S. aureus</i> Wood-46 (ATCC 10832)	$10^{-1}$	Нет роста	Нет роста	Нет роста	Нет роста
7	<i>S. aureus</i> ATCC 6538-P (FDA 209-P)	$10^{-1}$	Нет роста	Нет роста	Нет роста	Нет роста
8	<i>P. mirabilis</i> 3177	$10^{-3}$	Нет роста	Нет роста	Нет роста	320
9	<i>P. vulgaris</i> HX 19 222	$10^{-3}$	Нет роста	Нет роста	Нет роста	Нет роста
10	<i>E. coli</i> 3912/41 (O55:K59)	$10^{-3}$	Нет роста	Нет роста	Нет роста	Нет роста
11	<i>E. coli</i> ATCC25922	$10^{-3}$	Нет роста	Нет роста	Нет роста	Нет роста
12	<i>S. typhimurium</i> 79	$10^{-3}$	Нет роста	Нет роста	Нет роста	Сплошной рост
13	<i>K. pneumoniae</i> 3534/51	$10^{-3}$	Нет роста	Нет роста	Нет роста	180

Отмечено, что исследуемые антиоксиданты в составе среды проявляют свойства биостимуляторов, повышая на фоне ингибиции микробов-ассоциантов чувствительность среды, а следовательно, высеваемость псевдомонад.

Таким образом, в составе ЦПХ-агара возможна полная или частичная замена фенозан-кислоты на бутилгидрокситолуол. БГТ – это производное фенола, пищевая добавка (E321), которая схожа с витамином Е. Обладает мощными антиокислительными свойствами, остается стабильной при высоких температурах и значительно дешевле фенозан-кислоты.

На втором этапе исследования был отработан качественный и количественный состав ЦПХ-агара на основе ПГРМ с N-цетилпиридинием хлористым в качестве ингибитора сопутствующих микроорганизмов. Результатом стал выбор оптимального состава питательной среды для селективного выделения представителей рода *Pseudomonas* при проведении бактериологических анализов.

В отличие от коммерческого аналога, в ЦПХ-агаре, разработанном в ФБУН ГНЦ ПМБ, произведена частичная замена фенозан-кислоты на БГТ без потери показателя специфической активности среды, дифференцирующих (пигментообразование) и ингибирующих свойств.

По результатам проведенных исследований составлена пропись питательной среды для выделения псевдомонад, включающая в качестве азотистого питания панкреатический гидролизат рыбной муки (ПГРМ), сернокислые магний и калий – 2,4 и 7,6 г/л соответственно, калий фосфорнокислый однозамещенный и калий фосфорнокислый двузамещенный по 1,0 г/л, фенозан-кислоту – 0,025 г/л, бутилгидрокситолуол – 0,075 г/л, N-цетилпиридиний хлористый – 0,2 г/л, натрий углекислый –  $0,2 \pm 0,05$  г/л, агар бактериологический –  $(9 \pm 2)$  г/л.

С целью подтверждения обоснованности частичной замены в составе ЦПХ-агара фенозан-кислоты в таблице 2 представлены сравнительные результаты оценки по биологическим показателям качества сред для выявления псевдомонад с использованием фенозан-кислоты, БГТ и комплекса этих компонентов в сравнении с коммерческим ЦПХ-агаром производства ФГУП «НПО Микроген» через 48 ч инкубации посевов при температуре  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ .

Сравнительный рост псевдомонад из разведения  $10^{-6}$  на контрольном и разработанном на основе ПГРМ ЦПХ-агаре с использованием комплекса фенозан-кислоты и БГТ через 24 ч инкубации посевов при температуре  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  представлен на рис. 7 и 8.

## Заключение

Результаты сравнительной оценки специфической активности разработанного ЦПХ-агара доказали обоснованность частичной замены фенозан-кислоты на БГТ. Контрольная питательная среда для выделения синегнойной палочки (ЦПХ агар) производства ФГУП «НПО Микроген» обладает более низкой чувствительностью в отношении псевдомонад и менее выраженным ингибирующим эффектом в отношении сопутствующих микроорганизмов, так, на среде наблюдался рост *S. typhimurium* 79, *K. pneumoniae* 3534/51 и *P. mirabilis* 3177.

Совокупность компонентов, входящих в состав среды ЦПХ-агара ФБУН ГНЦ ПМБ, обеспечивает питательные потребности для роста псевдомонад с образованием пигментов. N-цетилпиридиний хлористый в предложенной концентрации 0,2 г/л (в среде прототипе – 0,3 г/л) подавляет рост возможных бактерий-ассоциантов и при этом не влияет на чувствительность среды и способность псевдомонад к пигментообразованию. Комплекс антиоксидантов (фенозан-кислота и БГТ) предотвращает окисление жирорастворимых витаминов А и Е, помогает вырабатывать больше необходимой клеткам энергии, способствует накоплению биомассы. При изучении селективных свойств среды без добавления ЦПХ и мягкой стерилизации кипячением отмечено, что на среде с комплексом антиоксидантов, в отличие от среды только с фенозаном, полностью подавляется возможный поверхностный и глубинный пророст микрофлоры, присутствующей в сырье.

Следует отметить, что снижение концентрации ингибирующих компонентов (ЦПХ, фенозан-кислоты и БГТ) в разработанном ЦПХ-агаре позволяет снизить себестоимость среды при ее производстве без ухудшения качества препарата.

Экспериментально установлено, что разработанный ЦПХ-агар обладает высокой чувствительностью в отношении псевдомонад, а следовательно, высеваемостью при бактериологических исследованиях. Отличительной особенностью разработанного ЦПХ-агара от среды сравнения является стабильность пигментообразования псевдомонад и значительная ингибиция микробов-ассоциантов.

## Литература

1. Грамотрицательные аэробы. Род Псевдомонады [Электронный ресурс]. Доступно по: <https://studfiles.net/preview/1839332/page:8>
2. ГОСТ 10444.15-94. Продукты пищевые. Методы определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов.
3. ГОСТ Р 54755-2011. Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества бактерий вида *Pseudomonas aeruginosa*.
4. Государственная фармакопея Российской Федерации ГФ XIV 2018; 1: 1128-1200.
5. Методические рекомендации. Выделение и идентификация штаммов синегнойной палочки из клинического материала. 1984, с. 1-18.
6. Методические рекомендации. Обнаружение и идентификация *Pseudomonas aeruginosa* в объектах окружающей среды (пищевых продуктах, воде, сточных жидкостях). 1984, с. 1-15.
7. Васильев ДА, Щербиков АА, Карпунина ЛВ, Золотухин СН. Учебно-методическое пособие. Методы общей бактериологии. Ульяновск, 2013, с. 8-18. УДК 619:616.
8. Приказ №535. Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений. 1985, с. 82-8.
9. Шепелин АП, Сергеева АБ, Полосенко ОВ. Определение специфической активности питательных сред для *Pseudomonas aeruginosa*. Бактериология. 2017;2(1):54-60. DOI: 10.20953/2500-1027-2017-1-54-60
10. Антиоксиданты – вся основная информация [Электронный ресурс]. Доступно по: <https://fitfan.ru/nutrition/10326-antioksidanty-vsja-osnovnaja-informacija.html>
11. Трещенкова ЮА, Голощапов АН, Бурлакова ЕБ. Влияние низких доз фенозана на лактатдегидрогеназу и микровязкость микросомальных мембран клеток мозга мышей. Радиационная биология. Радиозоология. 2003;43:320-2.

## References

1. Gram-negative aerobes. Genus *Pseudomonas* [Internet]. Available at: <https://studfiles.net/preview/1839332/page:8> (In Russian).
2. GOST 10444.15-94. Food. Methods for determining the number of mesophilic aerobic and facultative anaerobic microorganisms. (In Russian).
3. GOST R 54755-2011. Food. Methods of detection and determination of the number of bacteria species *Pseudomonas aeruginosa*. (In Russian).
4. State Pharmacopoeia of the Russian Federation GF XIV 2018; 1: 1128-1200. (In Russian).
5. Methodical recommendation. Isolation and identification of *Pseudomonas aeruginosa* strains from clinical material. 1984, p. 1-18. (In Russian).
6. Methodical recommendation. Detection and identification of *Pseudomonas aeruginosa* in environmental objects (food, water, waste liquids). 1984, p. 1-15. (In Russian).
7. Vasil'ev DA, Shcherbakov AA, Karpunina LV, Zolotukhin SN. Metody obshchei bakteriologii [Methods of general bacteriology]. Ulyanovsk, 2013, p. 8-18. UDK 619:616. (In Russian).
8. Order No. 535. On the unification of microbiological (bacteriological) research methods used in clinical diagnostic laboratories of medical institutions. 1985, pp. 82-8. (In Russian).
9. Shepelin AP, Sergeeva AB, Polosenko OV. Determination of nutrient medium specific activity for *Pseudomonas aeruginosa*. *Bacteriology*. 2017;2(1):54-60. DOI: 10.20953/2500-1027-2017-1-54-60 (In Russian).
10. Antioxidants – all basic information [Internet]. Available at: <https://fitfan.ru/nutrition/10326-antioksidanty-vsja-osnovnaja-informacija.html> (In Russian).
11. Treshchenkova YuA, Goloshchapov AN, Burlakova EB. Effect of Low Doses of Phenozan on Lactate Dehydrogenase and Microviscosity of Microsomal Membranes of Brain Cells. *Radiation biology. Radioecology*. 2003;43:320-2. (In Russian).

### Информация об авторах:

Марчихина Ирина Ивановна, заведующий лабораторией микробиологических и физико-химических методов анализа НПО ПС ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора  
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ  
Телефон: (4967) 36-0020  
E-mail: [marchikhina@obolensk.org](mailto:marchikhina@obolensk.org)

Шолохова Любовь Петровна, заведующий сектором подготовки тест-штаммов НПО ПС ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора  
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ  
Телефон: (4967) 36-0017  
E-mail: [sholohovalp@obolensk.org](mailto:sholohovalp@obolensk.org)

Полосенко Ольга Владимовна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник сектора микробиологических исследований лаборатории микробиологических и физико-химических методов анализа НПО ПС ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора  
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ  
Телефон: (4967) 36-0020  
E-mail: [polosenko@obolensk.org](mailto:polosenko@obolensk.org)

### Information about authors:

Irina I. Marchikhina, head of the laboratory of microbiological and physico-chemical methods of analysis, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор  
Address: SRCAMB, 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation  
Phone: (4967) 36-0020  
E-mail: [marchikhina@obolensk.org](mailto:marchikhina@obolensk.org)

Lyubov P. Sholokhova, head of the test strain preparation sector, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор  
Address: SRCAMB, 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation  
Phone: (4967) 36-0020  
E-mail: [sholohovalp@obolensk.org](mailto:sholohovalp@obolensk.org)

Olga V. Polosenko, PhD (Biology), leading researcher, microbiological research sector, laboratory of microbiological and physico-chemical methods of analysis, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор  
Address: 142279 Obolensk, Serpukhov District, Moscow Region, Russia  
Phone: (4967) 36-0017  
E-mail: [polosenko@obolensk.org](mailto:polosenko@obolensk.org)

## НОВОСТИ НАУКИ

### Спусковой крючок для аутофагии может помочь в устранении патогенных инфекций

Chaudhary et al. показали, что белки наружных мембран с третичной структурой b-ствола от грамотрицательных бактерий или митохондрий распознаются специфическими рецепторами на макрофагах и эпителиальных клетках. Добавление белков наружной мембраны к макрофагам мыши вызывало аутофагию и позволило мышам успешно избавиться от инфекции *Salmonella typhimurium*. Таким образом, иммунные ответы, активируемые белками наружных мембран, могут способствовать очистке от патогенов или аутоиммунных заболеваний.

*β-Barrel outer membrane proteins suppress mTORC2 activation and induce autophagic responses.*  
Chaudhary A, Kamischke C, Leite M, Altura MA, Kinman L, Kulasekara H, et al.  
*Sci Signal*. 2018 Nov 27;11(558). pii: eaat7493. DOI: 10.1126/scisignal.aat7493.

### Еще одно правило N-конца

Белки, которые выходят из рибосомы, несут N-концевой остаток метионина (Met). У бактерий Met формируется до начала трансляции, тогда как у эукариот большинство зарождающихся белков, по-видимому, начинается с немодифицированного Met. Обнаружено на дрожжах, что N-концевое формирование эукариотических белков выявляется даже в нормальных условиях и значительно увеличивается при специфических стрессах, которые вызывают сохранение в цитоплазме некоторой части Fmt1-формилтрансферазы. Было обнаружено, что для удержания этого обычно митохондриального белка требуется Gcn2 киназа. Кроме того, было показано, что убиквитинлигаза Psh1 нацелена на N-концевые формилированные эукариотические белки для протеосом-зависимой деградации с помощью так называемого пути правила fMet/N-end.

*Science Magazine – November 30, 2018, p. 1019*