

УДК 579.672

## ИДЕНТИФИКАЦИЯ БАКТЕРИЙ ГРУППЫ «*VACILLUS CEREREUS*» МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНО-ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

*Маслюкова К.В., аспирант факультета ветеринарной медицины и биотехнологии,*

*Феоктистова Н.А., кандидат биологических наук, доцент кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ,*

*Масиленко А.В., кандидат биологических наук, доцент кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ, Ульяновск, Россия*

**Ключевые слова:** бактерии, «*Vacillus cereus*», полимеразно-цепная реакция, результаты.

*В статье представлены результаты исследований по идентификации 60 культур к группе «*Vacillus cereus*» методом постановки полимеразно-цепной реакции. Установлено, что по 13 полевым штаммам, выделенным из пищевых продуктов и бактериологическим методом идентифицированным как *V.cereus* и *V. pseudoanthracis*, получены отрицательные результаты.*

**Введение.** *Bacillus anthracis, B. cereus, B. mycoides, B. pseudomycoides, B. thuringiensis и B. weihenstephanensis* составляют таксономическую группу «*Vacillus cereus*». У них много общих морфологических свойств, высокая гомология и сходная организация геномов, отличающаяся относительно низким содержанием ГЦ-пар и наличием больших плазмид, способных в эксперименте к меж- и внутривидовой передаче. Эти шесть видов бацилл нелегко различить на основе фенотипических и генетических особенностей [1-3]. Они занимают общие экологические ниши, а пять из них оказывают существенное влияние на здоровье и смертность человека [4-7].

**Цель работы** – провести идентификацию *B. anthracis, B. cereus, B. mycoides, B. thuringiensis* методом постановки полимеразно-цепной реакции с применением оригинальных праймеров на группу «*Vacillus cereus*».

**Материал и методика исследований.** Работа была выполнена на штаммах бактерий видов *B. cereus* (выделены из проб пищевых продуктов), *B. anthracis, B. mycoides* (выделены из проб пищевых продук-

тов), *B. thuringiensis*, *B. megaterium*, *B. coagulans*, *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. pseudoanthracis*, которые были получены из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ. Для постановки полимеразно-цепной реакции (ПЦР) использовали детектирующий амплификатор ДТ-96 («ДНК-Технология», Москва). Для поиска последовательностей генов и дальнейшего подбора праймеров специфичных для представителей группы «*Bacillus cereus*» была использована биоинформационная база данных NCBI – национальный центр биотехнологической информации - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. При приготовлении реакционной смеси использовали следующие объемы компонентов в расчете на одну пробирку: 2,5х реакционная смесь – 10 мкл; смесь праймеров, 10 пкмоль/мкл каждого - 0,5-1,0 мкл; MgCl<sub>2</sub>, 25 mM - 0-1,5 мкл; Dd H<sub>2</sub>O – до 25 мкл; образец ДНК – 1-5 мкл.

**Результаты исследований.** В результате проведенных исследований была проведена идентификация бактерий группы «*Bacillus cereus*» из вышеназванной коллекции (рис. 1). Полученные результаты свидетельствуют о том, что проведенная нами ранее бактериологическая идентификация бактерий, выделенных из проб пищевого сырья и готовой продукции животного и растительного происхождения ставит под сомнение видовую принадлежность и принадлежность к группе «*Bacillus cereus*»: *B. cereus* 1, *B. cereus* 3, *B. cereus* 9, *B. cereus* 19, *B. cereus* 21, *B. cereus* 29, *B. cereus* 38, *B. cereus* 39, *B. cereus* 40, *B. cereus* 41, *B. cereus* 42, *B. cereus* 43. Отрицательный результат был получен по штамму *B. pseudoanthracis* 104. В качестве отрицательного контроля были использованы штаммы рода *Bacillus*, не входящие в вышеназванную группу - *B. megaterium*, *B. coagulans*, *B. subtilis*, *B. pumilus*.

Номер лунки	Идентификатор пробирки	Ср, Fam	Ср, Hex	Результат
A1	<i>B. cereus</i> 1 (60-40)			-
B1	<i>B. cereus</i> 2 (60-40)	32,7		+
C1	<i>B. cereus</i> 3 (60-40)			-
D1	<i>B. cereus</i> 4 (60-40)	29,0		+
E1	<i>B. cereus</i> 5 (60-40)	34,2		+
F1	<i>B. cereus</i> 6 (60-40)	30,5		+
G1	<i>B. cereus</i> 7 (60-40)	27,7		+
H1	<i>B. cereus</i> 8 (60-40)	33,0		+
A2	<i>B. cereus</i> 9 (60-40)			-

B2	B.cereus 10 (60-40)	33,1		+
C2	B.cereus 11 (60-40)	33,4		+
D2	B.cereus 12 (60-40)	33,5		+
E2	B.cereus 13 (60-40)	29,2		+
F2	B.cereus 14 (60-40)	32,5		+
G2	B.cereus 15 (60-40)	34,0		+
H2	B.cereus 16 (60-40)	30,1		+
A3	B.cereus 17 (60-40)	29,3		+
B3	B.cereus 18 (60-40)	34,1		+
C3	B.cereus 19 (60-40)			-
D3	B.cereus 20 (60-40)	28,5		+
E3	B.cereus 21 (60-40)			-
F3	B.cereus 22 (60-40)	34,3		+
G3	B.cereus 23 (60-40)	32,2		+
H3	B.cereus 24 (60-40)	33,6		+
A4	B.cereus 25 (60-40)	31,9		+
B4	B.cereus 26 (60-40)	29,1		+
C4	B.cereus 27 (60-40)	29,0		+
D4	B.cereus 28 (60-40)	32,8		+
E4	B.cereus 29 (60-40)			-
F4	B.cereus 30 (60-40)	30,0		+
G4	B.cereus 31 (60-40)	30,9		+
H4	B.cereus 32 (60-40)	30,0		+
A5	B.cereus 33 (60-40)	27,7		+
B5	B.cereus 34 (60-40)	30,4		+
C5	B.cereus 35 (60-40)	29,6		+
D5	B.cereus 36 (60-40)	26,2		+
E5	B.cereus 37 (60-40)	26,1		+
F5	B.cereus 38 (60-40)			-
G5	B. anthracis 55 ВНИИВВИМ (60-40)	32,7		+
H5	B. cereus 96 (60-40)	27,7		+
A6	B. pseudoanthracis 104 (60-40)			-
B6	B.cereus 39 (60-40)			-
C6	B. mycoides H (60-40)	30,2		+
D6	B.cereus 40 (60-40)			-
E6	B. anthracis СТИ (60-40)	33,1		+
F6	B. anthracis Sterne 34 F 2(60-40)	28,6		+
G6	B. anthracisШля-15 (60-40)	26,7		+
H6	B. mycoides 537 (60-40)	27,6		+
A7	B. thuringiensis 1 (60-40)	32,7		+
B7	B. thuringiensis 2 (60-40)	31,3		+

C7	<i>B.cereus</i> 8035 (60-40)	26,9		+
D7	<i>B.cereus</i> ATCC 14579 (60-40)	34,2		+
E7	<i>B. mycooides</i> 1 (60-40)	33,2		+
F7	<i>B.cereus</i> 41 (60-40)			-
G7	<i>B.cereus</i> 42 (60-40)			-
H7	<i>B. anthracis</i> 94 (60-40)	33,9		+
A8	<i>B. anthracis</i> M-71 (60-40)	33,1		+
B8	<i>B. anthracis</i> Devis(60-40)	33,6		+
C8	<i>B. anthracis</i> Ихтиман (60-40)	34,4		+
D8	<i>B.cereus</i> 43 (60-40)			-
E8	<i>B. subtilis</i> 6633 (60-40)			-
F8	<i>B. pumilus</i> 66 (60-40)			-
G8	<i>B.coagulans</i> 566 (60-40)			-
H8	<i>B.megaterium</i> 182 (60-40)			-

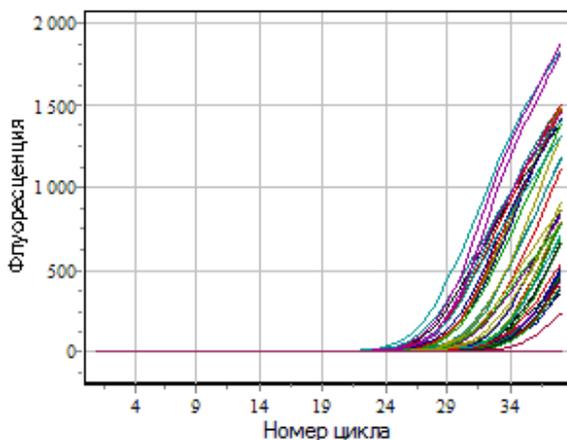


Рисунок 1 - Отчёт по результатам анализа ПЦР

**Заключение.** В результате проведенных исследований было установлено, что бактериологическим методом идентифицированные бактерии как представители вида *Bacillus cereus* штаммы *B. cereus* 1, *B.cereus* 3, *B.cereus* 9, *B.cereus* 19, *B.cereus* 21, *B.cereus* 29, *B.cereus* 38, *B.cereus* 39, *B.cereus* 40, *B.cereus* 41, *B.cereus* 42, *B.cereus* 43 (выделены из проб пищевых продуктов) не входят в группу «*Bacillus cereus*». Отрицательный результат был получен по штамму *B. pseudoanthracis* 104. Для получения точных результатов по их идентификации необходимы дополнительные исследования.

## Библиографический список:

1. Klevan, A. Evolution of pXO1 Backbone in the *Bacillus cereus* Group of Bacteria / A. Klevan, E. Helgason, N.J. Tourasse, A.-B. Kølsto // Abstract book / *Bacillus* – ACT 2007 – International Conference on *Bacillus anthracis*, *B. cereus* and *B. thuringiensis*- Oslo, Norway, 2007. – P. 93.
2. Schwieger, F. A New Approach to Utilise PCR–Single Strand Conformation Polymorphism for 16S rRNA Gene-Based Microbial Community Analysis / F. Schwieger, C. Tebbe // *Appl. Environ. Microbiol.* - 1998. – Vol. 64. P. 4870–4876.
3. Turnbull, P. C. *Bacillus anthracis* but not Always Anthrax / P. C. Turnbull, R. A. Hutson, M. J. Ward, [et al.] // *J. Appl. Bacteriol.* - 1992. – Vol. 72. - P. 21–28.
4. Cherif, A. *Bacillus anthracis* Diverges from Related Clades of the *Bacillus cereus* Group in 16S-23S Ribosomal DNA Intergenic Transcribed Spacers Containing tRNA Genes / A. Cherif, S. Borin, A.A. Rizzi [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2003. - Vol. 69. - № 1. - P. 33–40.
5. Еременко, И.Е. Группа бактерий «*Bacillus cereus*» - проблемы идентификации и таксономии / И.Е. Еременко/ *Медицинский вестник северного Кавказа*. – 2008. - № 3. – С.57-60.
6. Феоктистова, Н.А. *Bacillus cereus* - возбудитель пищевой инфекции / Н.А. Феоктистова/ Роль молодых ученых в реализации национального проекта «Развитие АПК»: материалы Международной научно-практической конференции. - 2007. - С. 317-318.
7. Феоктистова, Н.А. Выявление бацилл, вызывающих порчу продуктов питания (БВП) бактериологическими методами / Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев, Т.Г. Юдина, С.Н. Золотухин / *Актуальные вопросы ветеринарной науки: материалы Международной научно-практической конференции*. 2015. - С. 103-110.

**IDENTIFICATION OF BACTERIA OF THE *BACILLUS CEREUS* GROUP BY POLIMERAZNO-TSEPNOY REAKTSII METHOD**

**Maslyukova K.V., Feoktistova N.A., Mastilenko A.V.**

**Key words:** *bacteria*, «*Bacillus cereus*», *polimerazno-chain reaction*, *results*.

*Results of researches on identification of 60 cultures to the Bacillus cereus group by method of statement of polimerazno-chain reaction are presented in article. It is established that on 13 field strains allocated from foodstuff and the bacteriological method identified as B.cereus and B. pseudanthracis negative results are received.*