

ВАСИЛЬЕВ Д.А., КАЛДЫРКАЕВ А.И.,
ФЕОКТИСТОВА Н.А., АЛЁШКИН А.В.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ
БАКТЕРИЙ
BACILLUS CEREUS
НА ОСНОВЕ
ИХ ФЕНОТИПИЧЕСКОЙ
ХАРАКТЕРИСТИКИ

IDENTIFICATION
OF BACILLUS CEREUS BACTERIA
BASED ON THEIR PHENOTYPIC
CHARACTERISTIC

УДК 576.8
ББК 28.4

Васильев Д.А., Калдыркаев А.И., Феоктистова Н.А., Алёшкин А.В.

Идентификация бактерий *Bacillus cereus* на основе их фенотипической характеристики. Научное издание. – Ульяновск: НИИЦМиБ УлГСХА им. П.А. Столыпина, 2013. – 98 с.: Ил. 49.

ISBN: 978-5-905970-10-8

Рецензент: д.б.н., профессор, декан ФВМ ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина» Золотухин Сергей Николаевич

Книга «Идентификация бактерий *Bacillus cereus* на основе их фенотипической характеристики» является иллюстративным источником бактериологических тестов используемых для идентификации бактерий *Bacillus cereus*, позволяющим внести ясность в схему таксономической систематики бактерий данного вида. Достоинства книги – подробное описание и иллюстративное сопровождение классических бактериологических тестов, воспроизводимых в условиях стандартной бактериологической лаборатории.

Книга может служить практическим справочным пособием для специалистов-бактериологов, работающих в области биологии, медицины, ветеринарии, биотехнологии, агрономии и пищевой промышленности.

Vasil'ev D.A., Kaldyrkaev A.I., Feoktistova N.A., Aleshkin A.V.

Identification of *Bacillus cereus* bacteria based on their phenotypic characteristic. – Ulyanovsk, 2013.

The book "Identification of *Bacillus cereus* bacteria based on their phenotypic characteristic" is an illustrated source of bacteriological tests used for identification of *Bacillus cereus* bacteria allowing to cast light upon the taxonomic system of this species of bacteria. One of the advantages of this book is a comprehensive illustrated description of classic bacteriological tests reproducible in a standard bacteriological laboratory environment.

The book may serve as a practical reference guide for bacteriological specialists involved in the fields of biology, medicine, veterinary, biotech, agriculture and food industry.

Ulyanovsk, 2013, RICH&B, Ulyanovsk State Agricultural Academy – 98 p.: I. 49.

Научные исследования проводятся при финансовой поддержке государства в лице Минобрнауки России в рамках реализации федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009 – 2013 годы (соглашение № 8267 от 10.08.2012).

Печатается по решению научно-технического совета Ульяновской ГСХА им. П.А. Столыпина (протокол № 1 от 5 февраля 2013 года).

© Васильев Д.А., Калдыркаев А.И., Феоктистова Н.А., Алёшкин А.В., 2013
© НИИЦМиБ УлГСХА им. П.А. Столыпина, 2013

ВВЕДЕНИЕ

Бактерии рода *Bacillus* формируют многочисленные виды и благодаря своей природе многовариантны и, как следствие, значимы в современной человеческой цивилизации. Бактерии вида *Bacillus cereus* также отличаются своей многогранностью, и люди пытаются использовать этот феномен в своей практической жизни. Одной из этих граней, подлежащей изучению, является возможность вызывать отравления человека через пищевые продукты. Пищевые токсикозы – это одна из злободневных проблем нашего времени. Отравление наступает при отсутствии систем профилактики, мониторинга, контроля инфекции, при употреблении в пищу недостаточно термически обработанных и неправильно хранящихся пищевых продуктов, в которых происходит размножение и накопление возбудителя (Езепчук, 1969; Ефимочкина, 2010).

В обзоре Foot Technol за 1988 год *Bacillus cereus* вошел в список 10 основных инфекционных агентов, вызывающих кишечные заболевания людей в Северной Америке. По мнению W. Sperber (1991) бактерии *Bacillus cereus* входят в группу из 4-х наиболее опасных микроорганизмов – источников пищевого отравления людей. Так, С. Нейчев (1977), приводя данные о возбудителях пищевых инфекций и интоксикации, указывает на *Bacillus cereus* наряду со *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Clostridium perfringens*, *Shigella*, *E. coli*, *Enterococcus*.

Пищевую токсикоинфекцию с преобладающим диарейным синдромом вызывает употребление в пищу термически не обработанных мясных и рыбных блюд, невымытых овощей, непастеризованного молока, в то время как контаминированный бактериями *Bacillus cereus* (105-108 КОЕ/г) рис и другие крахмал содержащие продукты, а также сыр вызывают гастроэнтерит с ведущим рвот-

ным синдромом (Wijnands L. et al., 2006).

По данным Центра по контролю и профилактике заболеваний (CDC Foodborne Outbreak Online Database) в США ежегодно регистрируется более 60 000 случаев заболеваний, вызванных *Bacillus cereus*. При этом отмечается, что некоторым пациентам с рвотной симптоматикой при бациллярной пищевой инфекции ошибочно диагностируют интоксикационный синдром, вызванный *Staphylococcus aureus*, в то время как ложным возбудителем диарейного типа этой токсикоинфекции считают *Clostridium perfringens* (Scallan E. et al., 2011). В связи с этим контроль *Bacillus cereus* в ряде продуктов является обязательным санитарно-эпидемиологическим показателем, утвержденным в СанПиН 2.3.2.1078-01.

Для подтверждения наличия *Bacillus cereus* в пищевых продуктах и клинических образцах за рубежом пытаются использовать серологические (ИФА) и молекулярно-генетические (ПЦР) методы (Jung M.Y. et al., 2011; Tallent S.M. et al., 2012). Наиболее распространенный (классический) метод идентификации этого вида бацилл основан на выделении чистой культуры на МҮР среде Мозеля – желточный агар с маннитом, полимиксином и феноловым красным, и ее последующем биохимическом тестировании (Rhodehamel E.J. and Harmon S.M., 2001; Schulten S.M. et al., 2000). В связи с этим, вопрос о разработке ускоренного достоверного метода идентификации бактерий *Bacillus cereus* все еще остается актуальным. Известно, что межвидовая дифференциация бактерии первой морфологической группы, к которой относятся *Bacillus cereus*, крайне затруднительна (Глинская Е. В., Пермякова Н. Ф., 2004; Селенинов Ю.О., 2008; Ефимочкина Н.Р., 2010). В связи с этим трудно с уверенностью сказать, все ли вспышки, описанные названными выше авторами, были вызваны *Bacillus cereus*, не исключено, что некоторые из них были обусловлены размножением других представителей этого рода и первой морфологической группы, в частности.

Бактерии *Bacillus cereus* способны при определенных условиях вызывать у человека широкий спектр заболеваний, включающих

пищевые токсикоинфекции, системные и местные гнойные инфекции, в т.ч. молниеносный сепсис, менингит, абсцесс мозга, эндофтальмит, пневмонию, эндокардит, остеомиелит, кожную инфекцию по типу газовой гангрены и т.д., а у животных – мастит крупного рогатого скота (Smith и др., 1975; Musa M.O. et al., 1999; Abusin S. et al., 2008; Avashia S.B. et al., 2007; Brett M.M. et al., 2005; Darbar A., Harris I.A. and Gosbell I.B., 2005). Основные факторы патогенности *Bacillus cereus* связаны с выделением разрушающих ткани реактивных экзоферментов: гемолизина, фосфолипаз, токсина вызывающего рвоту и порообразующих энтеротоксинов (HBL, NHE, и цитотоксина K) (Edward J., 2010; Ghelardi E. et al. 2007).

Выше перечисленные причины вызывают научный и практический интерес к бактериям вида *Bacillus cereus*. В значительной степени это обусловлено сложными и трудоемкими методами лабораторной индикации и идентификации бактерий вида *Bacillus cereus*, что затрудняет получение исчерпывающей информации о роли вышеуказанного вида в возникновении пищевых отравлений продуктами питания животного, растительного и смешанного происхождения, в патологии теплокровных различных видов.

ГЛАВА I

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. СИСТЕМАТИКА И ИДЕНТИФИКАЦИЯ БАКТЕРИЙ РОДА *BACILLUS*

Аэробные спорообразующие бактерии объединены в род *Bacillus*, включенный в семейство *Bacillaceae*. Основными признаками этого рода являются: образование эндоспор, наличие каталазы, в большинстве случаев положительная окраска по Граму (Bergey's manual, 1993).

Бациллы распространены повсеместно, большинство их обитает в почве. Они участвуют в круговороте веществ в природе. Благодаря наличию разнообразных ферментов вызывают деградацию сложных органических соединений. Нестабильность биологических свойств аэробных споровых бактерий, обусловленная их приспособляемостью к условиям обитания, на протяжении всей истории изучения бацилл была и остается одной из главных причин нечеткой таксономии внутри рода и многочисленных попыток ее усовершенствования. Для организмов этого рода предлагалось более 150 наименований. Многие виды переименовывались четыре-пять раз (Bonde, 1975).

Классификация Форда, по которой аэробные спорообразующие бактерии подразделялись на 9 групп с 28 видами, была положена в основу внутриродового разграничения бацилл в первых изданиях определителя Берджи и строилась главным образом на морфологических признаках (Мирзоева, 1959). Классификация Gibson (1974) основывалась на способности ферментировать глюкозу, образовывать ацетилметилкарбинол. Однако, как теперь известно, деление только по механизму углеводного обмена не совпадает с общепринятым таксономическим делением

«Конкретные механизмы брожения развивались в ходе эволюции в некоторых группах бактерий независимо друг от друга» (Вуд, 1965).

Классификация N.R.Smith, R.E. Gordon и F.E. Clark (1952) базируется на всестороннем изучении биологических свойств аэробных бацилл с учетом стандартизации условий их выращивания, методов исследования. Эта классификация включает описание 25 видов, что отражено в 7-м издании определителя Берджи (1937). Авторы подразделяют спорообразующие бактерии на три группы по форме спор, соотношению поперечника спор и вегетативных клеток. Этим признакам придавал первостепенное значение при видовом и групповом разграничении спорообразующих бактерий Н.А.Красильников (1949).

Попытка дальнейшего совершенствования классификации бактерий рода *Bacillus* предпринята в работе F.Lemille, H.Barjas, A. Bonnefoi (1969), которые использовали 64 биохимических теста для изучения как музейных, так и выделенных аэробных бацилл. Авторы расширили спектр источников углерода и ввели такие тесты, как проба на оксидазу, обнаружение лизиндекарбоксилазы, галактозидазы, триптофандезаминазы. Предложена схема, позволяющая разграничить виды 1 морфологической группы. Данная схема, подтвердила правильность принципа идентификации N.R.Smith, R.E. Gordon, F.E. Clark (1952).

Схема для идентификации бацилл, предлагаемая J. Wolf и A.N. Barker (1968), кроме биохимических признаков для разграничения некоторых видов включает и такие морфологические признаки, как размеры клеток, наличие вакуолей. Например, рекомендуется дифференцировать виды *Bacillus cereus* и *Bacillus subtilis* по размерам клеток, наличию или отсутствию вакуолей и лецитиназной реакции. Однако некоторые штаммы *Bacillus cereus* не образуют лецитиназы; по данным F. Lemille и соавт. (1969), этот признак считается варибельным. Известно, что клетки *Bacillus cereus* отличаются большими размерами (длина их превышает 0,9 мкм), но появились сведения о крупно клеточных штаммах *Bacillus subtilis* (Bergeys manual, 1993). Нестабильность признака вакуолеобразова-

ния также затрудняет дифференциацию указанных видов бацилл.

В основу классификационной схемы W. Kundrat (1963) положен принцип разделения на морфологические группы, а также биохимический принцип разграничения видов; из новых тестов, предлагаемых автором, можно отметить тест на чувствительность к сульфаниламиду, выявление способности к росту при 56,6 °С, реакцию на аргиназу.

J.C. Ottow (1972) предложил использовать в качестве дифференциально-диагностических признаков для разграничения некоторых видов три свойства: наличие пектиназы, уреазы, лецитиназы. Виды *Bacillus brevis*, *Bacillus firmus*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus stearothermophilus* на основании отсутствия указанных ферментов объединены в одну группу.

В издании определителя Bergey's manual (1997) дано описание 22 видов рода *Bacillus*, составляющих I группу. Во II группу включены 26 видов, нуждающихся в дальнейшем изучении с целью уточнения их систематического положения. В качестве первого ключа для дифференциации бацилл I группы предлагают морфологические признаки: форма и расположение спор в клетках, соотношение их размеров, способность к образованию кислоты и газа на средах с глюкозой. Описание видов спорообразующих бактерий завершается таблицами, в которых приведены дифференцирующие признаки для близких в фенотипическом отношении видов, например, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus megaterium*.

Несколько отличается принцип определения вида по R.E. Gordon (1973). Для определения видов предложены два ключа. Первый построен на использовании 18 признаков и позволяет идентифицировать только наиболее типичные штаммы. Второй ключ предусматривает отнесение идентифицируемого штамма к одной из трех морфологических групп с дальнейшим изучением комплекса его морфологических, биохимических признаков и отношения к факторам внешней среды. После предварительной идентификации выделенного штамма пользуются таблица-

ми, в которых перечислены свойства данного вида в сравнении со свойствами других близких в фенотипическом отношении видов. Автор подчеркивает необходимость использования для контроля правильности идентификации типовых штаммов данного вида. Предлагаемые ключи не позволяют идентифицировать «промежуточные» штаммы, отклоняющиеся по фенотипическим признакам от типичных представителей данного рода.

M.Durand, F.Pichinity, C.Job et al. (1979) проверили способность 14 штаммов *Bacillus subtilis* и 15 штаммов *Bacillus licheniformis* к утилизации в качестве единственного источника углерода и энергии в среде 60 соединений (моно-, ди- и трисахаридов, глюкозидов, полисахаридов, полиолов и аминокислот). По этим характеристикам исследуемые штаммы разделились на две группы. В одну из них входят представители как *Bacillus licheniformis* и *Bacillus subtilis*. Один из штаммов сенной палочки не укладывался в рамки этих групп. Таким образом, утилизацию источников углерода нельзя считать достаточно достоверным признаком при идентификации бацилл. Предложен ряд дополнительных тестов для видовой дифференцировки представителей рода *Bacillus*.

Так, при видовой идентификации бацилл, Н. Barjas и V. Cosmao-Dumanoir (1975) рекомендуют использовать в качестве дополнительных таксономических критериев способность разлагать хитин, мелибиозу, аминдалин. Для разграничения *Bacillus subtilis* и *Bacillus cereus* наряду с общепринятыми тестами проводится изучение особенностей потребления аминокислот бациллами при культивировании на сыворотке крови (Резник и соавт., 1978).

Для дифференциации некоторых видов используют тест на чувствительность бактерий к красителям, в частности, к основному фуксину и нейтральному красному. Эти красители, по данным К.-Y.Chan, К.-М. Ко (1978), подавляют рост *Bacillus megaterium* и не действуют на *Bacillus firmus*. В основу метода ускоренной дифференциации возбудителя сибирской язвы от сапрофитных видов *Bacillus megentericus* и *Bacillus cereus* положена различная регулирующая способность этих бактерий к лакмусу и индигокармину (Ипатенко, 1983).

Несмотря на подавление роста сопутствующей микрофлоры на средах с антибиотиками, давали рост близкородственные спорообразующие микроорганизмы, особенно *Bacillus cereus*, и поэтому, не всегда представлялась возможность их дифференциации с возбудителем сибирской язвы (Затула, 1973).

В Ставропольском научно-исследовательском институте вакцин и сы-вороток для идентификации возбудителя сибирской язвы из объектов внешней среды разработана питательная среда с добавлением в качестве ингибиторов роста посторонней микрофлоры антибиотиков полимиксина, налидиксовой кислоты, триметоприма, гризеофульвина, а также моющего средства «Прогресс». На данной среде *Bacillus anthracis* и *Bacillus cereus* имеют однотипные колонии (Буравцева, 1983).

Для выделения *Bacillus cereus* из почвы и дифференциации от близкородственных видов, используется селективная питательная среда PLET содержащая полимиксин В, лизоцим, ЭДТА и ацетат таллия (Knisely, 1966; Titball et al., 1991). На указанной среде растет большинство штаммов *Bacillus anthracis*, а так же некоторые лизоцимустойчивые штаммы *Bacillus megaterium*.

Перспективным направлением при дифференциации возбудителя сибирской язвы явилось использование его биохимических особенностей. Наиболее простым и доступным тестом дифференциации *Bacillus anthracis* от близкородственных бацилл можно было бы считать выращивание на среде Эндо (Ипатенко, 1983). При росте сибиреязвенного микроба цвет среды не изменяется, а при росте антракоидов она краснеет. Но этот признак не всегда достоверен и надежен.

Некоторые исследователи предлагают использовать агаровую среду с добавлением 5 % крови барана, что позволяет получать не только рост культуры, но и дифференцировать *Bacillus cereus* по четкой зоне гемолиза от близкородственных видов (Mossel et. al., 1955). Однако, известны сибиреязвенные штаммы, способные гемолизировать эритроциты, а также штаммы споровых сапрофитов, не обладающие гемолитическими свойствами (Груз, 1965; Seidel, 1963).

Для выделения и дифференциации возбудителя *B. cereus* предлагалась яично-желточная питательная среда, иногда с добавлением этилового спирта. На такой среде грамотрицательная флора не развивалась, а колонии *Bacillus anthracis* и *Bacillus cereus* различались по способности расщеплять лецитин яичного желтка и образованию вокруг колоний зоны преципитации (Полховский, 1970). Однако у других исследователей использование такой среды осложнялось идентичным поведением на ней сибиреязвенного микроба и некоторых споровых аэробов (Шляхов с соавт., 1975). На использовании редуцирующей способности сибиреязвенного микроба в отношении метиленовой синьки основана агаровая среда, содержащая глицерин, водный раствор метиленовой синьки и экстракт хрена. На этой среде удавалось дифференцировать сибиреязвенные и близкородственные бациллы, но не все штаммы *Bacillus anthracis* обладали редуцирующей активностью (Груз, 1965; Шляхов с соавт., 1975; Ivanovics, 1963; Seidel, 1963). На различиях в редуцирующей способности возбудителя сибирской язвы и сходных близкородственных микробов основаны рекомендации по использованию питательной среды с индигокармином и лакмусом, позволяющей в течение 6-10 ч. дифференцировать *Bacillus anthracis* от *Bacillus cereus*, *Bacillus mesentericus*. *Bacillus anthracis* и близкородственные микробы удавалось дифференцировать при выращивании на агаре, содержащем желчь и бриллиантгрюн. Для дифференциации бацилл сибирской язвы и сходных с ними спорообразующих сапрофитов могут быть использованы морфологические особенности роста на плотной синтетической среде, содержащей натрий-аммоний-фосфат в качестве единственного источника азота (Акимович, Самойлова, 1967).

Известно, что в отличие от близкородственных микробов *Bacillus anthracis* не обладает способностью вырабатывать щелочную фосфатазу (Груз, 1965; Иванова, 1957; Ivanovics, 1958). На этом принципе с учетом методов определения микробных фосфатаз основано использование питательной среды Ставропольского научно-исследовательского института вакцин и сывороток

для выделения и одновременной дифференциации возбудителя сибирской язвы (Буравцева, 1997). В агаровую питательную среду при температуре 45-55 °С добавляют прогретый до 65 °С в течение 20 мин. фенолфталеинфосфат натрия до конечной концентрации 0,01 % в среде. На агаре через 16-20 часов вырастают сероватоматовые колонии. Для дифференциации сибиреязвенного микроба и сапрофитных микроорганизмов на крышку чашки Петри наносят 2-3 капли 10 % водного раствора аммиака и чашку закрывают. Сапрофиты, особенно *Bacillus cereus*, вырабатывают щелочную фосфатазу, которая разлагает фенолфталеинфосфат натрия с образованием индикатора фенолфталеина. Поэтому, при добавлении аммиака, имеющего щелочную реакцию, колонии через 10-20 с окрашиваются в яркий красный или малиновый цвет. Колонии *Bacillus anthracis* остаются серыми или слегка розовеют и их отбирают для пересевов и дальнейшей идентификации. Некоторые исследователи считали тест на щелочную фосфатазу одним из наиболее достоверных для отличия *Bacillus anthracis* от *Bacillus cereus* (Груз, 1965; Ivanovics, 1958). Однако признак обнаруживался не постоянно (Seidel, 1963). Отдельные слабовирулентные и вакцинные сибиреязвенные штаммы с трудом отличались от близкородственных микробов (*Bacillus cereus*, *Bacillus mesentericus*) (Груз, 1975).

Таким образом, изложенные данные свидетельствуют об отсутствии единых критериев типизации аэробных бацилл и трудностях их идентификации.

В настоящее время наблюдается тенденция к выделению и описанию новых видов. Это объясняется тем, что в пределах каждого вида встречаются многочисленные разновидности, формы, штаммы, являющиеся естественными вариантами или искусственными мутантами со свойствами, отличающимися от свойств материнского штамма.

Благодаря развитию в последнем десятилетии нумерической таксономии стало возможным группировать организмы на основе взаимного сходства с учетом не менее 40-50 признаков. Такой подход позволяет определить положение особи, даже если она находится в промежутке между известными систематическими

группами. Указанный принцип нашел применение в таксономических исследованиях рода *Bacillus*. G. Bonde (1975) подверг нумерическому анализу 460 штаммов, используя 68 тестов из числа обычно применяющихся.

Нумерический анализ (Bonde, 1975) продемонстрировал несовершенство традиционной классификации бацилл. Так, в результате группового анализа оказалось, что 35 % типичных штаммов, среди которых большинство было нетиповыми, необходимо было переименовывать; 47 % идентифицируемых штаммов отнесены к одним и тем же видам по обоим ключам, ряд штаммов удалось отнести к определенному виду только при использовании одной из классификационных схем.

Преимущество нумерического подхода при классификации споровых бактерий по сравнению с традиционным методом демонстрируют А. Воеуе и М. Aerts (1976). Авторам с помощью обычных методов не удалось классифицировать 138 культур, выделенных в Северном море. В результате применения нумерического анализа при изучении 63 морфологических и биохимических признаков все штаммы разделены на две большие группы и ряд подгрупп, внутри которых штаммы группировались при высоком коэффициенте подобия (78-82 %). В отдельные группы объединены штаммы с меньшим коэффициентом подобия (63-68 %). Большая часть штаммов идентифицирована как *Bacillus licheniformis*, отдельные штаммы - как *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus firmus*. Часть штаммов оставалась неидентифицированной.

Таким образом, в основе нумерической таксономии лежит «чисто статистическая процедура определения сходства организмов, а, следовательно, и родства организмов» (Заварзин, 1974). Это трудоемкий метод, предусматривающий изучение большого числа признаков и использование вычислительной техники.

В таксономических исследованиях рода *Bacillus* в настоящее время используются методы генетического анализа. Определяя количественное содержание оснований в ДНК разных организмов, можно получить представление о сходстве генетического

аппарата этих организмов. Обычно сравнивается молярное содержание ГЦ-оснований ДНК у разных объектов. В клетках аэробных споровых бактерий молярное содержание ГЦ-оснований составляет 32-65% общего количества оснований ДНК (Африкян, 1973).

По молярному содержанию ГЦ-оснований в молекуле ДНК аэробных бацилл A.Candel, V.Mastandrea, G. Cenci et al. (1978) объединили изученные ими виды в следующие группы: I группа (41,5-47,7 %) *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus firmus*; II группа (32,5-34,3 %) *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*; к III группе отнесены штаммы, которые не удалось объединить по принципу сходства нуклеотидного состава ДНК.

Другие исследователи (Baptist, Mandel, Cherna, 1978) также группируют отдельные виды споровых бактерий на основе содержания ГЦ-оснований. *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* составляют одну группу с молярным содержанием ГЦ 35,2-36,7 % к общему составу азотистых оснований в молекуле ДНК.

В последние годы используют метод гибридизации ДНК-ДНК для разграничения организмов на внутривидовом уровне. В основе метода гибридизации ДНК-ДНК лежит способность ренатурированной одноцепочечной ДНК в определенных условиях денатурироваться, т.е. соединяться с комплиментарной нитью с образованием двухцепочечной молекулы ДНК.

При изучении бактерий рода *Bacillus* было установлено, что в каждом случае гибридизации с гомологичной ДНК гибридизуемость достигает 100% (Somerville, Jenes, 1972). В большинстве случаев гомология молекул ДНК разных видов очень низкая и составляет 2-10 % (Seki, 1975, 1978). Для штаммов внутри вида степень гомологии ДНК – 50 % и выше. Авторы обнаружили генетическую однородность представителей отдельных видов, таких как *Bacillus pumilus*, *Bacillus coagulans*. Однако существуют гетерогенные виды бацилл, к которым отнесены *Bacillus sphaericus* и *Bacillus circulans*. Степень гомологии ДНК разных штаммов этих видов составляет соответственно 18-98 и 2-3 % (Seki, Chung, 1978).

Среди представителей рода *Bacillus* можно выделить виды, которым свойственна высокая степень гибридизуемости. К ним относятся *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus anthracis* (Somerville, Jenes, 1972). T.Seki, C. Chung (1978) указывают на высокую степень гомологии ДНК *Bacillus cereus* и *Bacillus thuringiensis* (54-80 %), они предлагают рассматривать их как один вид. Эту точку зрения поддерживает на основе аналогичных результатов В.А. Полховский (1975). Некоторые штаммы *Bacillus megaterium* обладают большим сходством с *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*. Гибридизуемость ДНК различных серотипов *Bacillus thuringiensis* колеблется в пределах 68-88 % (Somerville, Jenes, 1972; Ahmed et al., 1983).

Таким образом, результаты идентификации на основе методов молекулярной биологии, несомненно, дают ценную информацию о сходстве генотипов. Следует признать, что данные различных авторов не совпадают вследствие применения ими различных методических приемов.

Фаготипирование является надежным методом дифференциации бактерий (Сергиенко, 1936; Калдыркаев с соавт., 2011). В ряде случаев фаги используются для быстрого определения видовой принадлежности бацилл, в частности, *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*. Проверенные Э.К. Африкяном (1973) исследования показали, что специфика фаголизиса может быть использована для разграничения и идентификации сводных видов – подро́дов. Фаги спорообразующих бактерий изучены недостаточно, несмотря на их большое значение в фаголизисе производственных культур, идентификации и типировании отдельных видов бацилл, а также в эволюции бактерий.

Нередко для идентификации отдельных видов используются иммунологические методы - реакция агглютинации, иммуноэлектрофоретический анализ антигенных компонентов, методы иммунофлюоресценции и др., (Полховский, 1967; Mastroeni, 1974; Dominici, 1972; Michel, 1973; Barjas, 1973; Манина, 1975).

В первую группу входят наиболее близкие к *Bacillus anthracis* виды: *Bacillus cereus* (*Bacillus anthracoides*, *Bacillus*

pseudoanthracis) - восковая бацилла, *Bacillus mycoides* - корне-видная бацилла, *Bacillus megaterium* - капустная бацилла, *Bacillus subtilis* - сенная бацилла, *Bacillus pumilus* (*Bacillus mesentericus*) - картофельная бацилла. Все они имеют ряд сходных морфологических и культуральных свойств. Наряду с наличием общих свойств для основных видов - представителей первой группы существует ряд дифференциальных признаков, которые позволяют проводить идентификацию аэробных бацилл на уровне вида (Ezzell, 1990; Graham, 1984; Ramisse, 1996; Мерчина, 2003), а также дифференцировку штаммов сибиреязвенного микроба (Patra, 1996). Однако следует отметить, что существование более 50 видов бацилл в пределах рода *Bacillus*, границы между которыми определены на основании ограниченного количества тестов, оценивающих культурально-морфологические и биохимические свойства, не являются установленными окончательно. Значительное межвидовое разнообразие еще раз свидетельствует о сложности в дифференцировке бацилл.

1.2. БАКТЕРИИ РОДА *BACILLUS*, ОБНАРУЖИВАЕМЫЕ В ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ

Описываемый микроорганизм был открыт и назван *Bacillus cereus* в 1888 г. Frankland, синонимы: *Bacillus pseudoanthracis* (Wahrlich, 1890/91) и *Bacillus anthracoides* (Kiippi Wood, 1889). В определитель микробов Берджи (1957) этот микроб входит под своим первоначальным названием, которое является общепринятым в современной литературе. По систематическому положению *Bacillus cereus* относится к роду *Bacillus*, к группе апатогенных аэробных спорообразователей, т. е. по первичной характеристике они были отнесены к сапрофитам. Вследствие этого длительное время оставалась неизученной их роль в патологии человека. Правда, в отдельных сообщениях содержались, описания возбудителей отравлений, изолированных из пищи, которых можно было отнести к *Bacillus cereus* (Nikodemusz, 1960; Bodnar, 1962), но авторы ошибочно относили их к другим видам микробов.

К настоящему времени биологические свойства *Bacillus cereus* достаточно изучены. Прежде всего, обращает на себя внимание то, что морфологически бактерии *Bacillus cereus* очень похожи на бактерии *Bacillus anthracis* (Калдыркаев с соавт., 2011; Smith et al. (1952) даже считали, что *Bacillus anthracis* является патогенной разновидностью *Bacillus cereus*.

Н. Станчева (1997), изучая состав липолитических микроорганизмов, выделенных из свежего овечьего молока машинной дойки, установила, что процент контаминации молока бациллами (*Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*) составляет 24, 24 %, за которыми следуют представители рода *Micrococcus*. Проведены исследования 114 образцов сырого молока на наличие бацилл и установили, что бациллы (*Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*) можно выделить даже после прогрева в течение 10 минут при 80 Co. S.Gaillard, I.Lequerinel, P. Mafart (1998), определяя содержание спорообразующих бактерий в пробах молока, установили, что после термической обработки молока чаще обнаруживались *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus coagulans*.

Н. Berkel, R. Hodlok (1976) выделяли спорообразующие бактерии *Bacillus cereus* из вареных колбас. По данным S.Noriyasu, K.Naruhiko (1998), при изучении более 100 образцов пастеризованной ветчины в 21 % проб обнаруживались бактерии рода *Bacillus* и наиболее распространенными являлись *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*. В сообщении C.Klug, K.Fehlhaber, U.Muller, P. Braun (1998) приводятся данные о наличии спорообразующих аэробных бактерий в некоторых партиях колбас различных сортов, высказывается мнение, что причиной контаминации колбас являются добавляемые специи. Бактериологическое исследование более 100 проб различных специй (лавровый лист, перец, корица, сухой чеснок, сухая горчица) показало, что спорообразующие аэробные бактерии, более чем в половине случаев обнаруживаются в количестве до 8500 бактерий на 1 г пробы.

Бактерии вида *Bacillus cereus* были выделены из проб хрустящего ямса, находящегося на складах (Rasko et. al., 2005).

Интересные результаты получил I. Molska (1996), анализируя случаи диареи неизвестной этиологии. Объектом исследования были пробы пищевых продуктов, которые употреблялись не сразу после приготовления, а хранились при комнатной температуре некоторое время. В 25 % проб были выделены бактерии вида *Bacillus cereus*, их количество составило более 106 КОЕ /г. I. Molska (1996) провел бактериологическое исследование порченных пищевых продуктов и установила, что одной из причин порчи является контаминация их *Bacillus cereus*. Проведя бактериологическое исследование более 6300 проб продуктов, M. Mazas et al. (1995) обнаружили достаточно частое по сравнению с другими выделение бацилл, и с этим они связывают определенный процент зарегистрированных пищевых токсикоинфекций. Результаты, полученные A. Renata et al. (1998) при исследовании обсемененности блюд быстрого приготовления бактериями вида *Bacillus cereus*, получили следующие результаты: из 90 проб в 11,1 % случаев были выделены вышеуказанные микроорганизмы. Наиболее часто этот возбудитель выделяли из рыбных блюд.

Большое количество исследований посвящено определению спорообразующих бактерий в пищевых продуктах, в том числе и тех, которые употребляются в пищу без термической обработки. Так, В.А.Мирзоева (1959) подчеркивает существенную роль *Bacillus subtilis* и *Bacillus mesentericus* в порче молочных продуктов, кондитерских изделий, сахарных сиропов, консервов, зерновых, хлебных и других продуктов. Л. Петрова (1973) приводит подробные данные о дифференциации спорообразующих аэробных бактерий, выделенных из мясных полукопченостей: 26 % из числа выделенных культур составили *Bacillus subtilis*. С.П. Аскалонов и А.И. Ильченко (1962) обращают внимание на то, что *Bacillus mesentericus* может обсеменять различные пищевые продукты (хлеб, мясо и др.), вызывая нередко их порчу.

Методом флюоресцентной микроскопии определяли наличие *Bacillus subtilis* в колбасах, кондитерских изделиях, рыбных продуктах. Важным обстоятельством является то, что обычные

методы термической обработки не всегда устраняют из продуктов питания бактерии указанной группы, поскольку их споры не гибнут даже после обработки при 120°C в течение 1 ч (Adeyanju, 1988). Так, С. Jonescu (1966) установил наличие *Bacillus subtilis* в молоке в количестве 10³ микробных клеток в 1 мл. При пастеризации молока число указанных бактерий несколько уменьшилось, однако в половине исследованных бутылок даже после обработки все же оно составило 10³ микробных клеток в 1 мл. Pisu, Stazzi (1952), обследуя партии сырого и пастеризованного молока, обнаружил бактерии рода *Bacillus*, в частности виды *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* и др. Некоторые штаммы проявляли высокую термоустойчивость.

G. Lott (1972), рассматривая роль психрофильных бактерий, утверждает, что в молочных продуктах особенно опасны бактерии родов *Clostridium* и *Bacillus*. На 107-108 психрофиллов приходится 104-105 спорообразующих.

H. Berkel и R. Hodlok (1976) выделяли спорообразующие бактерии из вареных колбас. Изолированные культуры отнесены к видам первой морфологической группы: *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis*.

Ю.Г. Костенко и соавт. (1978) показали, что в пастеризованных консервах «шейка ветчинная» спорообразующим аэробным бактериям принадлежит значительный удельный вес в общей микрофлоре.

Микробиологическое исследование большого количества проб мясного фарша провела Е.П. Динчева (1970) в Болгарии. При исследовании более 200 партий фарша установлено, что общее количество бактерий колебалось в пределах 106-1010 клеток/г. После хранения фарша при температуре 4 °C в течение 48 ч количество бактерий увеличивалось в два - восемь раз. Спорообразующие аэробные бактерии, преимущественно бациллы, обнаружены в трети проб (31,5 % проб).

P. Garry, I. Vendeuvre, M. Bellon-Fontaine (1998) приводят результаты анализа микрофлоры, содержащейся в тесте, пшеничной муке и зернах пшеницы. Из образцов охлажденного теста

и пшеничной муки выделены и идентифицированы 95 штаммов бацилл. Среди 53 штаммов, выделенных из охлажденного теста, 24 штамма - *Bacillus subtilis*, 17 - *Bacillus cereus*, 10 - *Bacillus pumilis*, 2 - *Bacillus licheniformis*. Из пшеничной муки выделены *Bacillus pumilis* - 11 штаммов, *Bacillus subtilis* - 10, *Bacillus brevis* и *Bacillus cereus* по два, *Bacillus coagulans*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium* - по одному. Из пшеницы выделили *Bacillus circularis* - 6, *Bacillus subtilis* - 3, *Bacillus cereus* - 1, *Bacillus licheniformis* - 1 штамм. Таким образом, исследованные продукты существенно отличались по числу и видам выделенных из них штаммов бацилл.

Множество проб самых различных пищевых продуктов исследовали M. Mazas, J. Gonzalez et al. (1995). Проведя бактериологическое исследование более 6300 проб продуктов, они обнаружили достаточно частое по сравнению с другими видами выделение бактерий рода бацилл. Хотя в этой работе авторы не указывают, какое количество из выделенных бактерий данной группы обладало токсическими свойствами, однако из других публикаций известно, что именно с этими бактериями они связывают определенный процент зарегистрированных пищевых токсикоинфекций. I. Molska (1996) провела бактериологическое изучение причин порчи различных пищевых продуктов. Она установила, что среди выделяемых из пищевых продуктов микробных культур определялись и спорообразующие бактерии. В их числе чаще других были изолированы *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*.

Таким образом, приведенные данные литературы свидетельствуют о том, что спорообразующие аэробные бактерии достаточно часто обнаруживаются в различных пищевых продуктах, в том числе в употребляемых в пищу без термической обработки. Ряд авторов обращает внимание на встречаемость в пищевых продуктах токсигенных культур этой группы, наличие у них факторов патогенности.

1.3. ЭТИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ *BACILLUS CEREUS* В ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА

Первые убедительные данные о пищевых отравлениях продуцируемых данными бактериями относятся к 1951 г., когда Cristensen с соавторами сообщили о пищевом отравлении, которое наступило после потребления пудинга, контаминированного культурой *Bacillus cereus*. Из 148 человек, евших пудинг, заболели 121 (15 взрослых и 106 детей). Затем Pisu и Stazzi (1952) наблюдали в Италии отравление куриным бульоном, содержащим в 1мл до $6,0 \times 10^5$ КОЕ *Bacillus cereus*, причем заболело 6 человек из 8.

Науге (1955) описал массовые вспышки заболеваний в Норвегии, охватившие 600 человек. Причиной отравления были картофельное пюре и крем, в которых число бактерий *Bacillus cereus* достигло 105 КОЕ/г.

В Нидерландах Clarenburg и Kampelmacher (1957) наблюдали за 1956 г 7 массовых пищевых отравлений, вызванных *Bacillus cereus*. В одном из случаев заболело 5 детей после употребления в пищу картофельного салата, содержащего $2,0 \times 10^7$ КОЕ/г, другая вспышка охватила 200 взрослых, евших пудинг, содержащий в $3,0 \times 10^6$ КОЕ/г *Bacillus cereus*.

В Венгрии Tarjan (1958) первым обратил внимание на роль в пищевых отравлениях аэробных спорообразователей и сообщил о выявлении случаев, вызванных *Bacillus cereus*.

Nikodemusz (1958) диагностировал впервые в Венгрии случай массового пищевого отравления, вызванного употреблением овощного супа, контаминированного *Bacillus cereus* в количестве $1,0 \times 10^8$ КОЕ/мл и $3,6 \times 10^4$ спор/мл, определенных по методу Моссея (Mossel et al., 1953). Из 175 человек, участвовавших в обеде, заболело 65; патогенные кишечные бактерии, стафилококки и клостридии не были обнаружены в остатках пищи.

Vodnar (1962) описал два семейных пищевых отравления: в одном случае тяжелее всех заболела 4-летняя девочка – у нее появились рвота, частый водянистый стул, а затем наступило

бессознательное состояние; в больнице был установлен гастрит, осложнившийся ацетонемией. Из промывных вод желудка и из остатков рвоты в большом количестве выделены *Bacillus cereus* при отрицательном ответе на стафилококки и патогенные кишечные бактерии; последние не были найдены и в стуле. Во втором случае заболели двое 9-летних детей и мать: у матери отмечены кратковременные легкие боли в желудке, у детей - дурнота, головная боль, многократная рвота; всех заболевших госпитализировали с диагнозом гастрита, осложненного коллапсом. Из промывных вод желудка и испражнений при посеве на мясопептонный агар в большом количестве выделили *Bacillus cereus*. В посевах испражнений на среды, селективных для патогенных кишечных бактерий, рост *Bacillus cereus* отсутствовал. С целью контроля у 36 здоровых и у 16 лиц с гипацидным и анацидным желудочным соком было исследовано содержимое желудка и ни в одном случае *Bacillus cereus* обнаружить не удалось.

Кроме того, Nikodemusz (1958), Nikodemusz, Csaba (1959, 1960), Nikodemusz, Bouquet (1961), а также Bodnar (1961) и другие венгерские исследователи опубликовали еще ряд сообщений о пищевых отравлениях, при которых в исследуемом материале не обнаруживались ни общепризнанные возбудители кишечных инфекций, ни синтетические возбудители пищевых отравлений, но высевалась *Bacillus cereus* в чистой культуре или в большом количестве.

В Чехословакии Heral (1963) сообщил об отравлениях жареной свининой, содержавшей $7,0 \times 10^6$ КОЕ/г бактерий *Bacillus cereus*. Клиническая картина при пищевом отравлении, вызванном *Bacillus cereus*, большей степенью отличается легким и кратковременным течением с благополучным исходом, инкубационный период от 4 до 16 часов.

Типичными симптомами считаются боли в животе, профузный понос и тошнота (Nikodemusz, 1958; Temper, 1963). Стул учащается до 10-15 раз, испражнения водяные, но без крови (Bodnar, 1962).

Nauge (1955) наблюдал рвоту и ректальный тенезм.

Bodnar (1962) указывает на сильную рвоту и бессознательное состояние.

Wildfihr (1959) отмечает выраженные общие явления и отеки, увеличение печени и селезенки, симптомы заболевания в большинстве случаев исчезают через 11-14 часов и в пределах 24-48 часов, приводя к полному выздоровлению.

Однако, Temper (1963) описал пищевое отравление, вызванное *Bacillus cereus*, с летальным исходом: годовалый ребенок заболел через 11 часов после питания копченой колбасой, содержащей бактерии *Bacillus cereus* в количестве $3,6 \times 10^7$ КОЕ/г; появились боли в животе, общая тяжелая интоксикация и бурная рвота с кровавой слизью, которая повторилась через 6 и 8 часов; через 14 часов от начала заболевания наступила смерть. При вскрытии обнаружен токсический энтерит: набухание, отек и застойная гиперемия внутренних органов свидетельствовали об интоксикации. При бактериологическом исследовании селезенки, желчного пузыря и мазков из прямой и тонких кишок патогенные кишечные бактерии не обнаружены. Этиологической причиной заболевания и смерти ребенка автор считает бактерии *Bacillus cereus*.

Wildfihr (1959), не приводя конкретных случаев, указывает, что этиологическая роль *Bacillus cereus* в заболевании подтверждается посмертно выделением при вскрытии культур этого микроба из внутренних органов.

Изложенные данные показывают, что при определенных условиях *Bacillus cereus* может явиться этиологической причиной пищевых отравлений. Большой вклад в решение этого вопроса сделали венгерские ученые, которым удалось при пищевых отравлениях выделить *Bacillus cereus* в больших количествах из промывных вод, рвотных масс и стула заболевших. Наблюдения также показали, что вспышки пищевых отравлений, вызванных бактериями *Bacillus cereus*, нередко бывают массовыми, причем заболевание поражает не только взрослых, но и детей. Наконец, не всегда эти заболевания оканчиваются благополучно.

Вышеизложенные факты приобретают еще больший вес в свете того, что в последние 10 лет группе апатогенных аэробных спо-

рообразователей приписывается значительная роль в этиологии пищевых отравлений, вызванных неспецифическими бактериями (Jung M.Y. et al., 2011; Tallent S.M. et al., 2012).

Итак, заболевания, вызванные бактериями *Bacillus cereus*, имеют значительный удельный вес среди подобных заболеваний, который постоянно возрастает. В то же время, например в зарубежных странах, после широкого внедрения методов выделения и идентификации *Bacillus cereus* в практических лабораториях нередко при пищевых отравлениях стали идентифицировать *Bacillus cereus*, как возбудителя этого заболевания (Dierick et al., 2005; Ghelardi E. et al. 2007; Arnesen L. P. S. et al., 2008; Edward J., 2010).

Бактерии *Bacillus cereus* продуцируют несколько токсинов, включая некротизирующий энтеротоксин, рвотный токсин, фосфолипазу С, протеазы, гемолизины и энтеротоксины, которые являются важными детерминантами вирулентности. Энтеротоксин и рвотный токсин ответственны за симптомы диареи и рвоты, имеющие место при гастроинтестинальных заболеваниях. Роль *in vivo* гемолизина и фосфолипазы не совсем ясна, но они могут быть значимыми детерминантами вирулентности при раневой инфекции, инфекции глаза и других некротизирующих поражениях (Drobniewski, 1993; Carretto et al., 2000).

Инфекция, вызванная микроорганизмами из рода *Bacillus* (вероятно в большинстве случаев *Bacillus cereus*) была описана еще в начале XX века и возможно даже ранее. Клинически значимые инфекции, вызванные *Bacillus cereus*, делятся на 6 широких групп:

1. локальные инфекции, особенно в области ожогов, травматических и послеоперационных ран и инфекции глаза;
2. бактериемия и септицемия;
3. инфекции ЦНС, включая менингиты, абсцессы и инфекции, связанные с шунтированием;
4. респираторные инфекции;
5. эндокардиты и перикардиты;
6. пищевые токсикоинфекции, характеризующиеся токсин-индуцированной рвотой и диареей (Ezzell et al., 1990; Motoi, 1997).

Широкое распространение бактерий вида *Bacillus cereus* приводит к тому, что контаминация из окружающей среды в госпиталях и клиниках происходит также широко. При неизвестной этиологии инфекции, подозревать в качестве ее возбудителя *Bacillus cereus* нужно у пациентов, злоупотребляющих внутривенными наркотиками или у пациентов с иммунодефицитом, вызванным ВИЧ-инфекцией, химиотерапией или злокачественными новообразованиями. Клинически инфекции *Bacillus cereus* могут быть разделены на две большие подгруппы - заболевания ЖКТ и прочие, кроме того, могут быть разделены на локальную и системную инфекции (Cotton et al., 1987).

Желудочно-кишечные заболевания, вызванные бактериями вида *Bacillus cereus* более распространены, чем считалось раньше. Диарея и рвота обычно прекращаются самостоятельно и обычно протекают не тяжело. Контаминация пищи широко распространена, также как и бессимптомное носительство в ЖКТ, из-за стабильности споровых форм. В большинстве случаев, необходимо проведение специальных дополнительных лабораторных исследований, чтобы подтвердить наличие токсигенных штаммов и установить эпидемиологическую связь между выделением микроорганизма в пище и в материале от пациента (Алтон, 1988; Akiyama et al. 1997; Snezana, Zora, 1998).

Хотя наиболее часто *Bacillus cereus* является возбудителем пищевых токсикоинфекций, он может быть связан также с развитием других заболеваний у человека. Тяжелые негастроинтестинальные инфекции встречаются редко и обычно связаны с травмами или операциями, особенно характерны для трансплантологии инородного материала, включая протезы, внутривенные катетеры или вентрикулярные шунты. Внутривенные наркоманы находятся в группе риска, что связано, как с сопровождающими инъекцию принадлежностями, так и с самим героином, которые часто бывают контаминированными микроорганизмами, включая *Bacillus cereus*. Спинальная анестезия также несет потенциальный риск инфекции ЦНС. Выделение спорообразующих грамположительных микроорганизмов, схожих с видом *Bacillus cereus*

из глаза или других в норме стерильных сред, таких как кровь и цереброспинальная жидкость, при наличии симптомов, связанных с присутствием микроорганизма, не должно игнорироваться клиницистами и ошибочно приниматься за контаминацию. При старте эмпирической терапии, клиницисты должны учитывать возможность инфекции *Bacillus cereus*, поскольку задержка в назначении адекватного лечения может привести к значимому повышению смертности (Сидоров, 1995; Смирнов и др., 1982, 1983; Давиденко с соавт., 1991; Sliman, 1987; Auger et al., 2009).

Выработка токсинов, тканевая инвазия и размножение бактерий вносят вклад в проявления инфекции. Споры *Bacillus cereus* обнаруживаются повсеместно в окружающей среде, в том числе и внутри больниц; выявление бактерий *Bacillus cereus* в окружающей среде может не всегда свидетельствовать о высокой вероятности заболеваемости. Однако, контаминация одежды, внутривенных катетеров или линий могут быть связаны с повышенным риском инфекции. В одном из исследований было показано, что контаминация операционного белья стала причиной двух случаев менингита после нейрохирургических процедур. Важна также контаминация рук медработников через полотенце особенно в неонатологическом и других специальных отделениях, потому что мытье рук со спиртовыми растворами неэффективно против спор *Bacillus* (Brison, 1978; Banerjee et al. 1988).

Локальная инфекция, вызванная *Bacillus cereus* может проявляться как хирургическая, травматическая раневая инфекция, ожоговая инфекция или инфекция глаза. Первичная инфекция кожи, которая приводит к формированию некротической буллы, также была описана. Диагностика инфекции *Bacillus cereus*, по данным микробиологического исследования раневого отделяемого сложна, поскольку часто встречаются смешанные культуры. Тем не менее, инфекция вероятна в том случае, если выявляется массивный рост грамположительных бактерий, или «кlostридиальные микроорганизмы» подозреваются при микроскопии. Патогенная значимость бацилл в ране может быть подтверждена их присутствием в образцах, взятых во время хирургической

биопсии, где они могут быть выделены с помощью периодического кислотного реагента по (Terranova, 1978; Stoeva, 1989; Suttle, 1991; Han et. al., 2006). В исследовании раневых осложнений после тотальной артропластики бедра, виды *Bacillus* были выделены у 25 % пациентов. Все пациенты получали предоперационную антибиотикопрофилактику бензилпенициллином, флуклоксациллином, клоксациллином или цефуроксимом. Хотя половина выделенных штаммов была чувствительна к флуклоксациллину и подобным антибиотикам *in vitro*, эти препараты, по всей видимости, были недостаточно эффективны клинически. Хотя в большинстве случаев локальная инфекция протекает нетяжело, встречаются тяжелые случаи глубокой инфекции, такие как некротизирующие фасцилиты, и гангрена. В литературе описаны случаи острого и хронического остеомиелита. В таких случаях требуется длительная внутривенная антимикробная терапия с адекватным хирургическим дренированием, но заболеваемость и смертность остаются высокими (Mc Clou, 1951; Смирнов, 1983; Mercier, 1990).

Системные заболевания связаны с наличием входных ворот для проникновения инфекции в систему, например вентрикулярного шунта или внутривенной канюли при bacteriemia или септицемии. Инфекции, связанные с *Bacillus cereus* обычно являются некротизирующими, что обусловлено выработкой некротизирующего энтеротоксина, как одного из факторов вирулентности (Kotiranta et al., 2000).

Диагностика системной инфекции сложна, поскольку виды *Bacillus* являются частыми контаминантами культур крови. Во многих случаях инфекции роль бактерий *Bacillus cereus* первоначально не дооценивается и она принимается за контаминант, но дальнейшее ухудшение клинического состояния и другие факторы заставляют пересматривать значимость этого микроорганизма. Настоящее количество случаев заболеваний, связанных с бактериями вида *Bacillus cereus*, вероятно выше, чем диагностируется; во многих публикуемых исследованиях также не идентифицируется вид полученных колоний *Bacillus* (Смирнов, 1983;

Kramer, Gilbert , 1989).

В большинстве случаев, бактериемия и септицемия являются транзиторными и не имеют клинического значения. Наиболее значимые случаи инфекции, связанные с бактериемией наблюдаются у внутривенных наркоманов, пациентов, находящихся на гемодиализе или длительно получающих внутривенную инфузионную терапию, новорожденных и пациентов со злокачественными новообразованиями. Бактериемия может осложняться инфекцией легких и глаза, формированием абсцессов и эндокардитов (Malkov, 1983; Tetart, 2001).

Бактерии *Bacillus cereus* не частая, но значимая причина бактериальных эндокардитов, особенно если связана с внутривенным введением препаратов или сопутствующими заболеваниями клапанов. Чаще всего бактерии попадают в организм с препаратом или устройством для введения. Поражается в большинстве случаев трикуспидальный клапан. Несколько случаев были связаны с водителем ритма и искусственным клапаном. Антимикробная терапия с профилактикой тромбоза обычно была достаточно эффективна, хотя в нескольких случаях потребовалась замена клапана, а также несколько пациентов погибли (Spira, Goepfert, 1975).

В литературе описано, как минимум, 30 случаев менингита и энцефалита, с высокой вероятностью, связанные с *Bacillus cereus* у детей и взрослых. Риск инфекции связан с состояниями, при которых снижен иммунитет и имеется доступ к центральной нервной системе, включая спинальную анестезию и шунты, но, по меньшей мере, 25 % случаев инфекции отмечаются у вероятно здоровых новорожденных. Агрессивная антимикробная терапия и удаление инородного тела в этих случаях необходимы, но такие состояния связаны с высокой смертностью. Абсцессы мозга как проявление инфекции *Bacillus cereus* также отмечаются, но чрезвычайно редко (Norris, 1981; Norma et al., 2009).

Легочная инфекция, вызванная *Bacillus cereus*, хотя встречается не часто, является тяжелым жизнеугрожающим заболеванием. Давно известно, что сибирская язва легких, вызванная *Bacillus anthracis*, часто является фатальным заболеванием и обычно со-

проводится быстрым развитием необратимого сепсиса. Легочная форма сибирской язвы начинается резко с высоким подъемом температуры, нарушением дыхания и болями в груди. Она быстро прогрессирует и часто летальный исход наступает до того, как лечение сможет остановить инвазивное распространение инфекции. Инфекция, вызванная *Bacillus cereus*, в некоторых случаях может протекать схожим образом. Большое количество микроорганизмов, с учетом того, что они могут продуцировать широкий спектр токсинов и ферментов, может обуславливать быстрое течение и фатальный исход заболевания. Пневмония, абсцессы и плевриты встречаются в типичных группах риска, в небольшом проценте случаев, у пациентов при этом фиксируется бактериемия. Осложнения могут быть тяжёлыми. Пневмония может осложняться легочным кровотечением, острой дыхательной недостаточностью, напряженным пневмотораксом, эмпиемой и бронхоплевральной фистулой. Докладывается о некоторых необычных случаях, когда бактерии вида *B. cereus* были очевидными возбудителями фатальных респираторных заболеваний у условно здоровых взрослых пациентов (Nikodemusz, 1958; Bodnar, 1961; Rasko et al., 2005).

Бактерии *Bacillus cereus*, в отличие от практически всех штаммов *B. anthracis*, продуцируют β -лактамазы и резистентны к β -лактамным антимикробным препаратам, включая цефалоспорины третьего поколения. Микроорганизм обычно чувствителен к аминогликозидам, клиндамицину, ванкомицину, хлорамфениколу и эритромицину (Затула, Резник, 1973; Донецкая, 2008).

Сообщалось об эффективности ципрофлоксацина при лечении пациентов с редкими случаями бронхоэктаза. В случаях менингита и тяжелых системных инфекций, эмпирическое назначение аминогликозида и ванкомицина - наиболее подходящая комбинация. Хотя распространенная комбинация ампициллина и гентамицина для лечения инфекций, вызванных бактериями рода *Listeria*, при выявлении роста грамположительных бактерий в ликворе обеспечивает адекватную активность в отношении большинства видов *Bacillus* (Wildfihr, 1995; Бакулов И.А. с соавт., 2004; Webel et al., 1989).

1.4. ИЗУЧЕНИЕ ВИРУЛЕНТНОСТИ БАКТЕРИЙ *BACILLUS CEREUS*

Бактерии *Bacillus cereus* относится к грамположительным факультативно-анаэробным, подвижным, спорообразующим, палочковидным бактериям, широко распространенным в окружающей среде (почве, пресной и морской воде, кишечнике беспозвоночных, на растениях и т.д.) и имеющим фенотипические и генетические (16S рРНК) признаки, сходные с рядом других видов рода *Bacillus*: *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides*, *Bacillus thuringiensis* и *Bacillus anthracis* (Rasko D. et al., 2005; Han C. et al., 2006; Auger S. et al., 2009).

Бактерии *Bacillus* способны при определенных условиях вызывать у человека широкий спектр заболеваний, включающих пищевые токсикоинфекции, системные и местные гнойные инфекции, в т.ч. молниеносный сепсис, менингит, абсцесс мозга, эндофтальмит, пневмонию, эндокардит, остеомиелит, кожную инфекцию по типу газовой гангрены и т.д., а у животных – мастит крупного рогатого скота (Brett et al., 2005; Darbar et al., 2007; Dohmae et al 2008) Основные факторы патогенности *Bacillus cereus* связаны с выделением разрушающих ткани реактивных экзоферментов: гемолизинов, фосфолипаз, токсина вызывающего рвоту и порообразующих энтеротоксинов (HBL, NHE, и цитотоксина K) (Ghelardi et al., 2007; Arnesen et al., 2008).

Пищевую токсикоинфекцию с преобладающим диарейным синдромом вызывает употребление в пищу термически не обработанных мясных и рыбных блюд, невымытых овощей, непастеризованного молока, в то время как контаминированный *Bacillus cereus* (105-108КОЕ/г) рис и другие крахмал содержащие продукты, а также сыр вызывают гастроэнтерит с ведущим рвотным синдромом (Павлова, 1971; Wijnands et al., 2006).

По данным Центра по контролю и профилактике заболеваний (CDC Foodborne Outbreak Online Database) в США ежегодно регистрируется более 60 000 случаев заболеваний, вызванных

Bacillus cereus. При этом отмечается, что некоторым пациентам с рвотной симптоматикой при бациллярной пищевой инфекции ошибочно диагностируют интоксикационный синдром, вызванный *Staphylococcus aureus*, в то время как ложным возбудителем диарейного типа этой токсикоинфекции считают *Clostridium perfringens* (Bad Bug Book and Edition Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook, 2012).

Для подтверждения наличия *Bacillus cereus* и/или ее токсинов в пищевых продуктах и клинических образцах используются морфологические, биохимические, серологические (ИФА) и молекулярно-генетические (ПЦР) методы (Tallent et al., 2012). Последние исследования свидетельствуют о возможности обнаружения токсина вызывающего рвоту, с помощью животных моделей (кошек, обезьян) и клеточных культур (Bad Bug Book and Edition Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook, 2012).

Наиболее распространенный (классический) метод идентификации этого вида бацилл основан на выделении чистой культуры на МYP среде Мозеля – желточный агар с маннитом, полимиксином и феноловым красным, и ее последующем биохимическом тестировании (Полховский, 1967; Rajkovic et al., 2006; Schulten et al., 2000).

Однако, нестабильность ферментативных реакций *Bacillus cereus* затрудняют межвидовую дифференциацию бактерий первой морфологической группы рода *Bacillus* и, кроме того, требуют серьезных временных затрат (Салтыков с соавт., 1976; Глинская, Пермякова, 2004; Ефимочкина, 2010). В связи с этим, вопрос о разработке ускоренного достоверного метода идентификации *Bacillus cereus* все еще остается актуальным.

При экспериментальном введении подкожным методом бактерии вида *Bacillus cereus* вызывают расстройства функции желудочно-кишечного тракта, вялость, заторможенность движений. При введении больших доз этих микроорганизмов заболевания развиваются остро, с быстро наступающим (10 - 16 ч.) летальным исходом. При морфологическом исследовании в органах

павших животных наблюдаются геморрагии, воспалительные и некротические изменения. В наибольшей степени эти поражения регистрируются в кишечнике, печени, мышце сердца и в мозге. Вышеописанные изменения у животных сходны с теми, которые зарегистрированы у погибших от токсикоинфекций людей (Полховский, 1975; Затула, Резник, 1976).

Ряд штаммов этого вида продуцирует фосфолипазы, летальный токсин и гемолизин (Езепчук и др., 1990).

Фосфолипазы бактерий *Bacillus cereus* не оказывают выраженного токсического действия на животных, однако эти бактерии продуцируют гемолизины и летальный токсин, болезнетворные для животных. Синтезирование этих токсинов интенсивно при культивировании бактерий вида *Bac. cereus* на мясных, а также на синтетических и полусинтетических средах (Jonson, Bonventre, 1967; Затула, Резник, 1976; Ипатенко, 1983).

В материалах семинара, состоявшегося в 1990 году опубликована работа Езепчука Ю.В. и Битцаева А.Р. «Структурное сходство токсинов *Bacillus cereus* и *Bacillus anthracis*». Авторы считают, что существует структурное и функциональное сходство между диареогенным - летальным токсином (DLT) *Bacillus cereus* и экзотоксином *Bacillus anthracis*. DLT обладает тремя типами биологической активности: диареогенным, летальным и васкулярным. Однако, механизмы действия токсина *Bacillus cereus* остаются не до конца изученными. Считается, что патогенность *Bacillus cereus* связана с ее способностью синтезировать и секретировать два экзотоксина. Один из них состоит из трех белковых компонентов, обладает, как выше указывалось, диареогенной, летальной активностью и повышает проницаемость сосудов (диареогенно - летальный токсин). Вторым токсином - цереолизин - вызывает цитолитический и летальный эффект и также нарушает проницаемость кровеносных сосудов. Попадая в пищевые продукты, патогенные варианты *Bac. cereus* размножаются в них и продуцируют экзотоксины. Под влиянием протеолитических и других ферментов, выделяемых *Bacillus cereus*, в продуктах накапливаются различные ядовитые вещества (птомаины). Все это

вместе взятое и приводит к развитию пищевого отравления (Бакулов с соавт., 2007).

Данные, свидетельствующие о продуцировании гиалуронидаз штаммами бактерий *Bacillus cereus*, приводит Glatz et al. (1974). Он изучал нарушение сосудистой проницаемости у кроликов после введения культуральных фильтратов *Bacillus cereus*. Фактор проницаемости в бесклеточных фильтратах изучаемых культур определяли: по степени распространения витального красителя (синьки Эванса) в коже белых кроликов, интенсивности экссудации в просвет перевязанного сегмента кишки кролика, величине некротической реакции у морских свинок. Вещества, обуславливающие все три вида активности, обнаруживались в фильтратах исследованных культур в логарифмической фазе роста при интенсивной аэрации, инактивировались нагреванием в температурном режиме 56 °С, недиализабельны, переходили в осадок при 40-60 % насыщении сульфатом аммония и нейтрализовались антисывороткой.

Более детальную характеристику энтеротоксина, вырабатываемого бактериями *Bacillus cereus* представили Spira, Goerfert (1975). Сравнивая токсичность экстрактов из биомассы и препарата после обработки ультразвуком, авторы пришли к выводу о том, что энтеротоксин синтезируется активно растущими клетками и секретируется в среду независимо от процесса клеточного лизиса. Полученный энтеротоксин блокируется кроличьей антисывороткой, теряет активность после диализа и при алкилировании (Adam, 1958; Sechter, 1962; Езепчук, 1985).

О значительной распространенности гемолитических штаммов бактерий *Bacillus cereus* свидетельствуют данные Акопяна, Африкяна (1967), согласно которым из 172 изученных штаммов гемолитической активностью характеризовались 146. Выделенные нами из объектов окружающей среды и пищевых продуктов 43 штамма бактерий *Bacillus cereus* также обладают ярко выраженной гемолитической активностью.

В.А. Полховский (1968) исследовал летициназную активность более чем у 100 штаммов бактерий *Bacillus cereus*, выделенных из

объектов окружающей среды, а также взятых от больных людей с пищевыми токсикоинфекциями и животных с различными воспалительными процессами. Он установил, что тип лецитиназ не обусловлен источником выделения бактерий, хотя культуры, полученные из пораженной ткани животных, пищевых продуктов и погибших куриных эмбрионов характеризовались большей лецитиназной активностью, чем выделенные из почвы, воды и т.д. Проведенные исследования по изучению лецитиназной активности выделенных нами бактерий *Bacillus cereus* также подтверждают данные Полховского (1968). Штаммы бактерий вида *Bacillus cereus*, выделенные из объектов окружающей среды, обладают менее выраженной лецитиназной активностью по сравнению с цереусными штаммами, выделенными из проб пищевых продуктов (специй, молока, творог, грибы, картофель). В числе ферментов патогенности, продуцируемых *Bacillus cereus*, называют и декарбоксилазы. Полховский В.А. (1970) показали, что из 65 изученных штаммов два декарбоксилировали гистидин, тирозин и глютаминовую кислоту; пять - тирозин и глютаминовую кислоту; три - гистидин и тирозин; четырнадцать - одну из этих аминокислот. Полному декарбоксилированию подвергалась только аспарагиновая кислота. Были проведены исследования по определению декарбоксилазной активности 228 штаммов *Bacillus cereus* разного происхождения. В их числе были 80 культур, выделенных от больных с пищевыми токсикоинфекциями, 100 - из внешней среды (в том числе из воды и пищевых продуктов) и 48 - энтомопатогенных. Субстратами для определения декарбоксилазной активности служила 21 аминокислота. Установлено, что около 60 % изученных штаммов обладало декарбоксилазной активностью (Ахундова, 1967; Еременко, 1997).

Выше перечисленные данные свидетельствуют о возрастающем интересе к указанному микроорганизму в мире. Однако после 1991 года объём исследований, посвящённых *Bacillus cereus* отечественными бактериологами, сократился или проводится несколько односторонне с изучением его пробиотических свойств и возможности их использования.

ГЛАВА II

ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ *BACILLUS CEREUS*

Учитывая, что отсутствует комплексный подход к фенотипической классификации *Bacillus cereus* мы взяли за основу схему Gordon et al.(1973). Первым этапом нашей работы стало изучение биологических свойств референс - штаммов *Bacillus cereus* из коллекции музея кафедры для создания схемы по бактериологической типизации бактерий *Bacillus cereus*.

2.1. ТИНКТОРИАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА *BACILLUS CEREUS*

В мазках, приготовленных со скошенного мясопептонного агара, бактерия *Bacillus cereus* у всех референс-штаммов имеет вид крупных 1,0-1,2х3,0-5,0 мкм грамположительных палочек со слегка закругленными концами, лежащих в виде цепочек или штакеттообразных скоплений, реже отдельно друг от друга (рис. 1, 2). *Bacillus cereus* образует субтерминальные или центральные споры (рис. 3). Некоторые штаммы образуют капсулу при выращивании на 1%-ный бикарбонатно-сывороточном агаре в атмосфере с CO₂ (рис. 4). В раздавленной капле подвижны, однако, могут встречаться штаммы со слабо выраженной подвижностью.

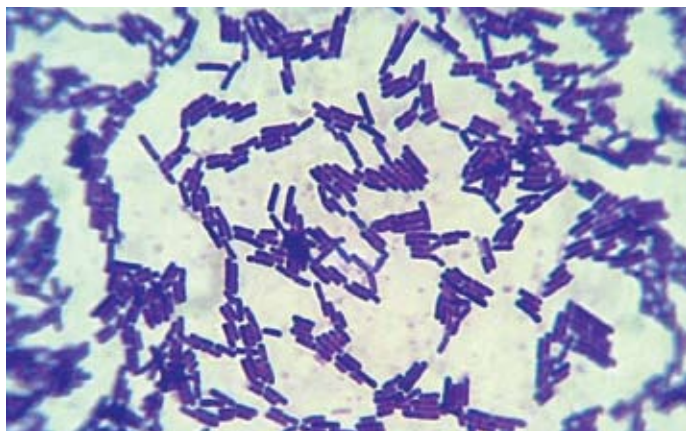


Рис. 1. Микроскопия *Bacillus cereus* 8035 (x1500)

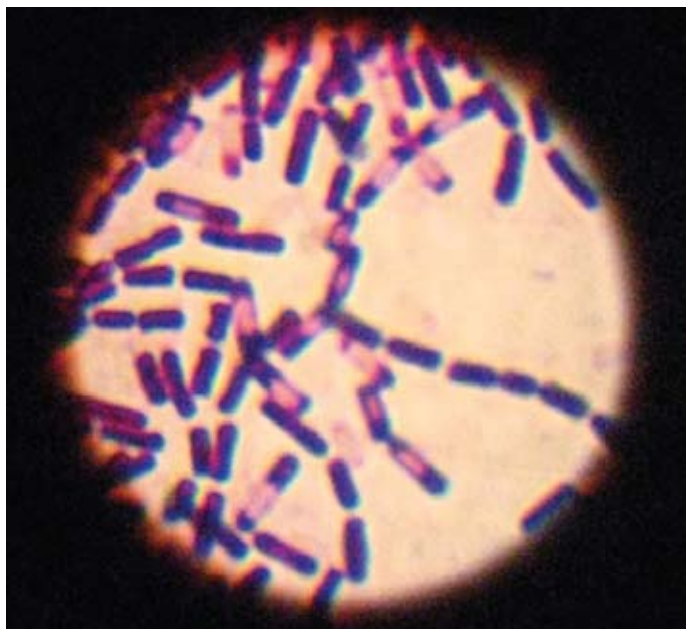


Рис. 2. Окраска по Грамму, споры *Bacillus cereus* 8035 в виде не прокрашенных участков (x2500)

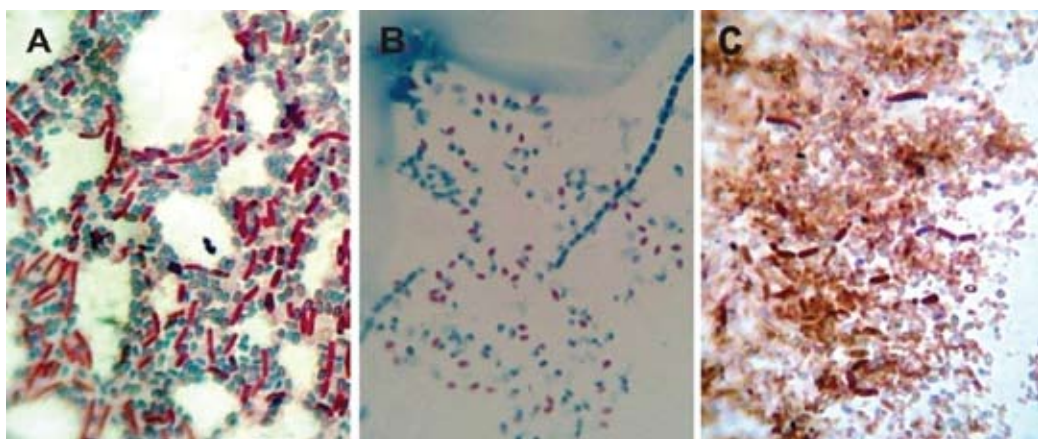


Рис.3. Окраска спор *Bacillus cereus* 8035 методом Трухильо (А), Аюески (В), Пешкова (С) (x1500)

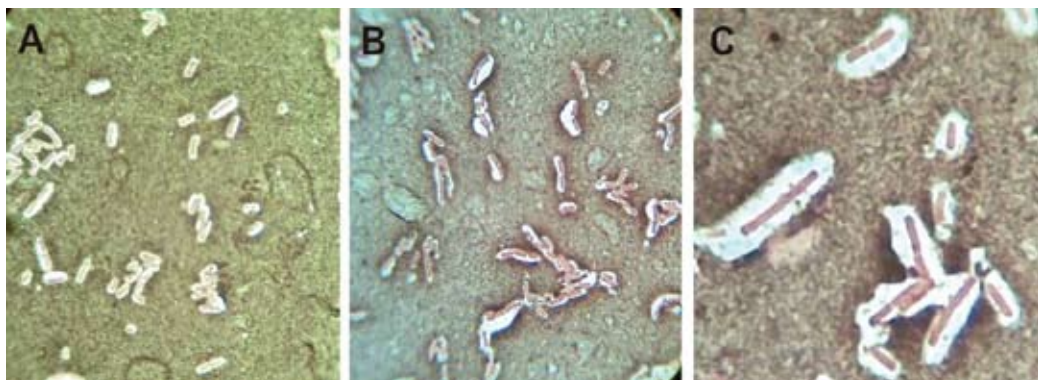


Рис.4. Окраска капсулы по Бурри-Гинсу: *Bacillus cereus* № 8035 (А), *B. cereus* № 96 (В) и *B. cereus* № 2527 (С)

2.2. ИЗУЧЕНИЕ КУЛЬТУРАЛЬНЫХ СВОЙСТВ *BACILLUS CEREUS*

Для изучения культуральных свойств *Bacillus cereus* использовали как жидкие, так и плотные питательные среды. Плотные питательные среды подбирались с учетом наилучшей избирательно-диагностической способности, чтобы можно было сразу проверить такие свойства, как рост в присутствии хлорида натрия, лецитиназу, фосфатазу, ферментацию маннита, устойчивость к полимиксину. Особенностью *Bacillus cereus* является неприхотливость к питательному составу сред. Оптимальная температура роста *Bacillus cereus* составила 35-37°C.

В результате исследований было установлено, что *Bacillus cereus* факультативный анаэроб, так как расщепляет глюкозу в аэробных и анаэробных условиях (рис. 27).

В первые сутки, на МПА *Bacillus cereus* образовывали «восковидные» серо-белые распластанные колонии с неровными краями, имеющими зернистую структуру (часто образуют коричневый пигмент) размером 5-10 мм (рис. 5), через 48 часов культивирования колонии увеличивались в диаметре до 1,5-2 см (рис. 6).



Рис 6. Рост штамма *Bacillus cereus* 8035 на МПА через 48 часов



Рис 5. Рост штамма *Bacillus cereus* 8035 на МПА через 18 часов.

При росте в МПБ, в первые 18-24 часов (зависит от штамма *Bacillus cereus*), происходит помутнение, с последующим прояснением и образованием пленки, которая легко разбивается встряхиванием, оставляя на стенках пристеночное кольцо и ложась на дно, образует тем самым осадок. После чего пленка образуется вторично (рис. 7).

На кровяном агаре при температуре 37°C в течение 24 ч. *Bacillus cereus* формирует крупные шероховатые матовые колонии в R-форме, с неровными волнистыми краями, образуя четкую зону β -гемолиза (рис. 8).

Бактериям *Bacillus cereus* свойственно разжижение желатина быстрое и сильное в течение 1-4 суток (80% штаммов), вдоль укола образует горизонтальные отростки (рис.20).

На селективных и дифференциально-диагностических средах для *Bacillus cereus*, все штаммы *Bacillus cereus* показали хороший рост (рис. 9 – 16), несмотря на присутствие в средах ингибирующих компонентов: натрия хлорида, лития хлорида, 2,3,5-трифенилтетразолиум хлорида (ТТХ), этанола, полимиксина В.

На дифференциально-диагностической среде для выявления и культивирования сибиреязвенного микроба с фенолфталейнфосфатом натрия, бактерии *Bacillus cereus* растут в виде распластаных матовых колоний диаметром 1-1,5 см. При взаимодействии с парами аммиака *Bacillus cereus* и другие спорообразующие сапро-

фиты приобретают розовый или красный цвет, колонии же *Bacillus anthracis* не изменяют своего цвета, либо слабо розовеют (рис. 9).

На желточном агаре с хлористым натрием, полимиксином В и 2,3,5-трифенилтетразолиум хлоридом (ГОСТ 10444.8-88) колонии круглые, блестящие, красные, диаметром около 5-15,0 мм с зоной белого преципитата диаметром около 10-30,0 мм (рис. 10).

Рост на желточном агаре наблюдался в виде крупных беловатых распластанных колоний со слегка изрезанными краями, окруженными зоной матового коагулята (рис. 11).

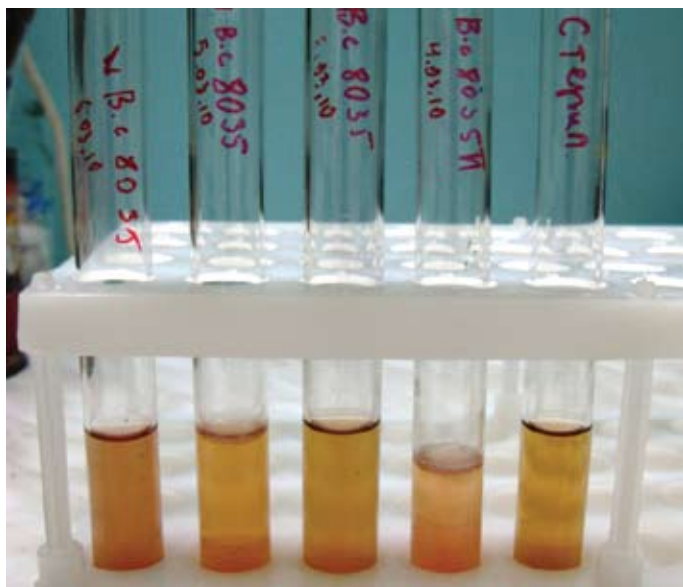


Рис.7. Рост штамма *Bacillus cereus* № 8035 на МПБ 18 часов.



Рис. 8. Рост штаммов *Bacillus cereus* № 8035 на кровяном агаре.



Рис. 9. Суточная культу-
ра *Bacillus cereus* 8035
на дифференциально-
диагностической среде для
выявления и культивирования
сибиреязвенного микроба



Рис.10. Рост *Bacillus cereus*
8035 на среде с полимиксином
и ТТХ



Рис.11. Рост *Bacillus cereus* 8035
на желточном агаре



Рис.12. Рост *Bacillus cereus* 8035 на среде Донована



Рис.13. Рост *Bacillus cereus* 8035 на полимиксиновой среде.



Рис.14. Рост *Bacillus cereus* 8035 на среде Моссея.



Рис.15. Рост *Bacillus cereus* 8035 на солевом полимиксиновом агаре с ТТХ.



Рис.16. Рост *Bacillus cereus* 2527 на среде PEMBA

На модифицированной среде Донована бактерии *Bacillus cereus* 8035 формировали белые округлые колонии со слегка изрезанными краями, окруженные зоной белого матового коагулята (рис.12).

На полимиксиновом агаре (Пивоваров Ю.П., 1970) бактерии *Bacillus cereus* растут в виде крупных, шероховатых колоний окруженные зоной бело преципитата (рис. 13).

Рост *Bacillus cereus* на среде Мосселя проявляется в образовании распластанных зернистых колонии розового цвета (вследствие отсутствия способности ферментировать маннит), окруженных зоной коагулята розового цвета; среда бесцветная или со слабо-розовой окраской (рис.14).

На солевом полимиксиновом агаре с ТТХ (Пивоваров Ю.П., 1970) *Bacillus cereus* 8035 растет ярко-рубиновыми колониями на фоне широкой зоны глубокого равномерного белого коагулята; колонии в первые часы роста округлые, выпуклые, через 24-48 часов - распластанные по поверхности агара с изрезанными краями (рис.15).

2.3. ИЗУЧЕНИЕ БИОХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ *BACILLUS CEREUS*

Первоначально нами были изучены биологические особенности референс – штаммов *Bacillus cereus*, в сравнении с близкородственными видами: *Bacillus subtilis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus mesentericus*, *Bacillus pseudoanthracis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus anthracis* (табл. 2-5). Для определения биохимических особенностей были изучены протеолитические, сахаролитические, редуцирующие, ферментативные свойства бактерий с целью создания дифференциальной системы для идентификации микроорганизмом. Изучение штаммов 105 штаммов *Bacillus cereus* проводилось более чем по 30 биохимическим показателям (табл. 1).

Таблица 1. Дифференциальные признаки *Bacillus cereus*.

№	Дифференциально-диагностические тесты	Реакция		
		+	±	-
1.	Рост при 55°C	5	0	100
2.	Рост при pH 4,0	24	53	28
3.	Рост в анаэробных условиях	105	0	0
4.	Подвижность	105	0	0
5.	Лецитиназа	102	3	0
6.	Желатиназа	105	0	0
7.	Липаза	95	10	0
8.	Гемолиз	105	0	0
9.	Каталаза	105	0	0
10.	Фосфатаза	105	0	0
11.	Оксидаза	105	0	0
12.	Обнаружение ДНКазы	105	0	0

№	Дифференциально-диагностические тесты	Реакция		
		+	±	-
13.	Редукция нитратов	105	0	0
14.	Утилизация цитрата	105	0	0
15.	Рост при 5%NaCl	105	0	0
16.	Рост при 7%NaCl	105	0	0
17.	Фогес-Праскауера	105	0	0
18.	Нитратредуктаза	105	0	0
19.	Триптофадезаминаза	0	0	105
20.	Фениланиндезаминаза	0	0	105
21.	Лизиндекарбоксилаза	0	0	105
22.	Орнитиндекарбоксилаза	0	0	105
23.	Аргининдегидролаза	0	0	105
24.	Индол	0	0	105
25.	Уреаза	80	22	3
26.	Сероводород	87	1	17
27.	Эскулин	26	5	74
28.	Глюкоза	105	0	0
29.	Сахароза	101	0	4
30.	Лактоза	8	10	83
31.	Маннит	0	6	99
32.	Манноза	12	8	85
33.	Сорбит	3	2	100
34.	Адонит	2	0	103
35.	Арабиноза	0	2	103
36.	Ксилоза	0	0	105
37.	Мальтоза	0	0	105
38.	Рафиноза	0	0	105
39.	Дульцит	0	0	105
40.	Крахмал	105	0	0
41.	Салицин	78	12	15

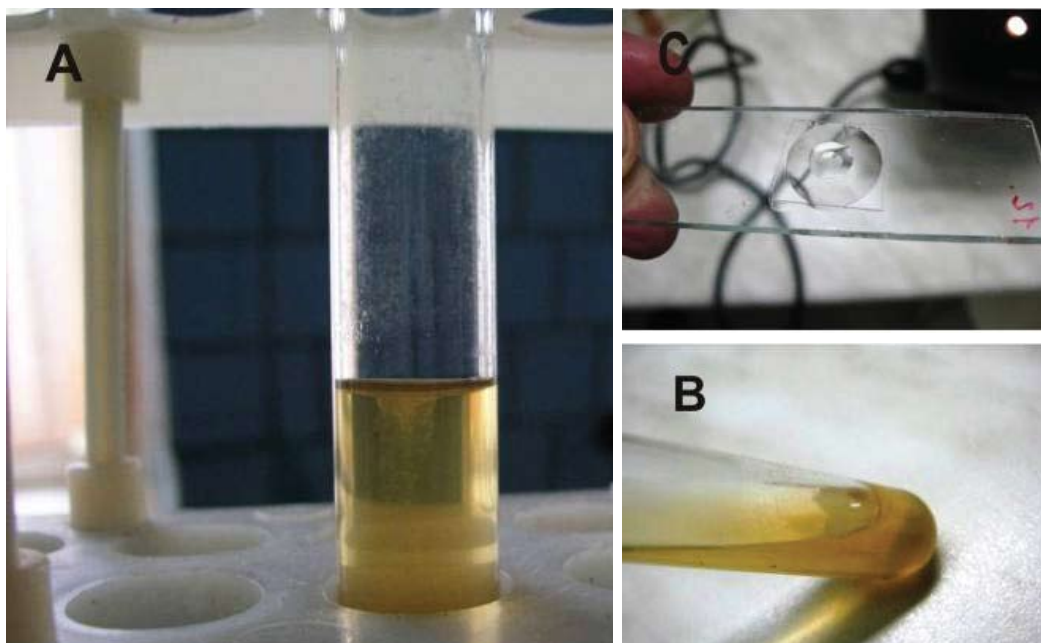


Рис. 17. Методы определения подвижности «уколом в столбик» (А), Шукевича (В), «висячей капли» (С)

Одним из важных тестов является определение подвижности. Подвижность бактерий определяли посевом «уколом в столбик» в 0,7% МПА, методом Шукевича и методом «висячей капли». Экспериментальным путем установлено, что все исследуемые культуры *Bacillus cereus* – подвижны (рис. 17).

Установлено, что температурный оптимум роста для *Bacillus cereus* - 30 °С, однако споры его могут прорасти при широком интервале температур от 3 - 5° до 70 °С и давать рост при 6 - 55 °С (около 4% штаммов); при температуре 12 - 39 °С достаточно интенсивный рост дают все штаммы *Bacillus cereus* в широком интервале рН от 4 до 12,5 (около 30% штаммов), в интервале же рН 7 - 9,5 интенсивный рост дают все без исключения штаммы этого вида бацилл (табл. 1).

Для фенотипического определения вирулентных факторов определяли наличие лецитиназы (по наличию зоны коагулята на средах с желтком), гемолитической активности у выделенных штаммов на МПА с добавлением 5% крови барана. Протеолитическую активность проверяли на питательном бульоне с желатином и молочном агаре. ДНКазную активность на среде DNA BA (Difco) (рис.18, 19, 20, 21, 22).

Все без исключения штаммы *Вас. cereus* дают положительную реакцию на каталазу, оксидазу, фосфатазу и реакцию на ацетилметилкарбинол (реакция Фогес-Проскауера) разной интенсивности (рис. 23-26).



Рис. 18. Определение лецитиназной активности.



Рис. 19. Определение гемо-
литической активности *Bacillus*
cereus

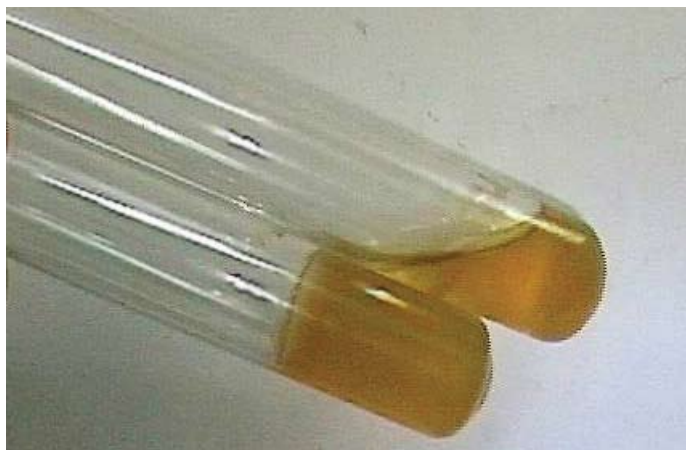


Рис. 20. Разжижение желати-
на *Bacillus cereus* в верхней
пробирке, нижняя пробирка
– контрольная.



Рис. 21. Гидролиз казеина *Bacillus cereus* на молочном агаре (проявляется в виде просветления сре-
ды вокруг колоний)

Рис. 22. Наличие зоны лизиса
вокруг колоний *Bacillus cereus*
при определении ДНКазной
активности.

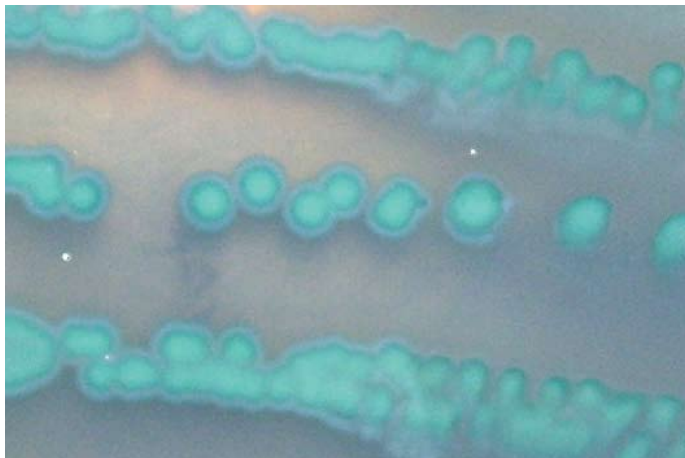


Рис. 23. Определение каталаз-
ной активности *Bacillus cereus*

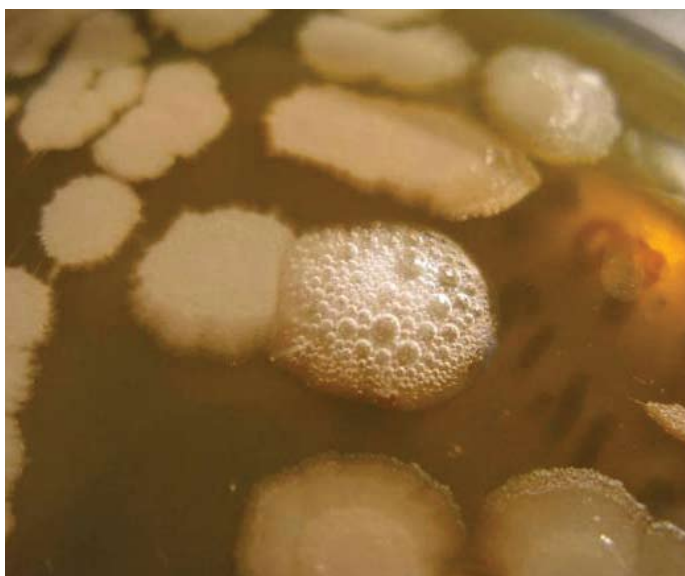


Рис. 24. Определение оксидазы
Bacillus cereus (положительная
реакция)





Рис. 25. Определение фосфатазной активности *Bacillus cereus* (под воздействием 30% нашатырного спирта при наличии фосфатазы колонии приобретают розовый цвет)



Рис. 26. Реакция Фогес-Проскауера (при наличии ацетона среда приобретает красное окрашивание).

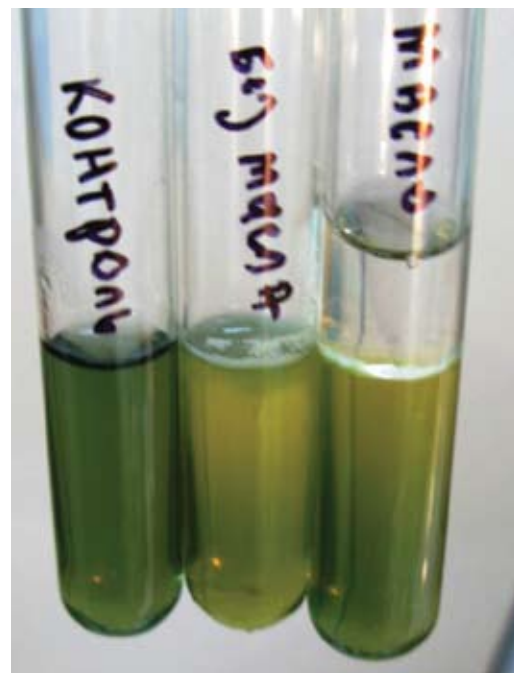


Рис. 27. Обесцвечивание среды Хью-Лейвсона в обеих пробирках

На среде Хью-Лейфсона изменение цвета наблюдалось во всех пробирках, это говорит о том, что все выделенные микроорганизмы относятся к факультативным анаэробам (рис. 27).

Для определения фермента уреазы использовали среду Кристенсена, содержащую мочевины (рис. 28).

При культивировании *Bacillus cereus* на цитратном агаре Симмонса изменяет цвета среды (с зеленого на синий), что свидетельствует о способности изучаемых штаммов утилизировать цитрат натрия (рис. 29).

Наличие триптофандезаминазы, фениланиндезаминазы, аргинин-дигидролазы, лизиндекарбоксилазы и орнитиндекарбоксилазы проверяли с помощью микротест-систем (рис. 30). При этом изменение цвета среды в лунках с реактивами не наблюдалось (отрицательная реакция).

Изучение окислительных свойств проводилось на средах с углеводами в полужидком агаре (рис. 31), по результатам исследования было выявлено окисление следующих углеводов (табл.1).

Рис. 28. Определение уреазы – верхняя пробирка - рост референс-штамма *Bacillus cereus* 2527, нижняя - контроль



Рис. 29. Рост референс-штамма *Bacillus cereus* 2527 на среде Симмонса через 48 часа инкубации при 37° (нижняя пробирка), верхняя пробирка – контроль



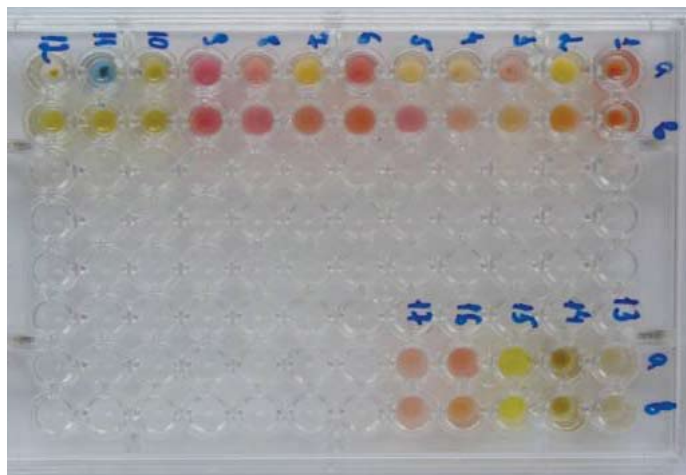


Рис. 30. Тест-система для изучения ферментативных свойств штаммов Рост *Bacillus cereus*

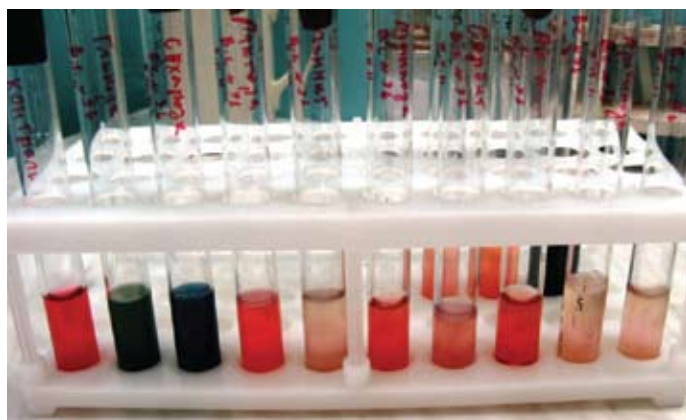
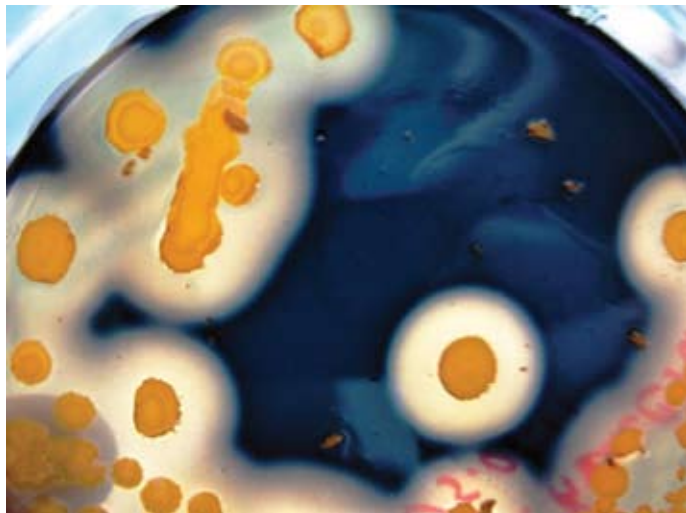


Рис. 31. Рост референс-штамма *Bacillus cereus* 2527 на цветном ряду Гисса: 1 – глюкоза и 2 - сахароза (в этом случае с индикатором ВР (водный голубой + розоловая кислота) – положительны); 3 - лактоза; 4 - маннит; 5 - дульцит; 6 - мальтоза; 7 – сорбит (отрицательны)



Рис. 32. Изучение сахаролитических свойств референс-штамма *Bacillus cereus* 2527

Рис. 33. Гидролиз крахмала референс-штаммом *Bacillus cereus* 2527 (положительная реакция – образование бесцветной зоны вокруг колонии, на фоне общего посинения среды).



Кроме того, изучение сахаролитических свойств бактерий *Bacillus cereus* было продублировано по системе для ускоренного определения биохимических свойств, произведенные ФГУН НИИЭМ им. Пастера (рис. 32).

Наши исследования на средах Гисса показали, что бактерии *Bacillus cereus* не ферментируют углеводы: мальтозу, арабинозу, ксилозу; многоатомные спирты дульцит, сорбит, маннит (табл.1).

Определение способности бактерий *Bacillus cereus* к гидролизу крахмала проводили на мясопептонном агаре с добавлением 2 % крахмала. (рис. 33).

2.4. ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ БАКТЕРИЙ *BACILLUS CEREUS*

В настоящее время определение бактерий *Bacillus cereus* производится по ГОСТ 1044.8-88 «Продукты пищевые. Методы определения *Bacillus cereus*», а так же по схеме, предложенной Gordon (1973).

Данный ГОСТ предлагает следующую схему выделения бактерий (рис. 34): Выделяя и идентифицируя бактерии *Bacillus cereus* по данной схеме, возникает ряд трудностей. Во-первых, это длительность исследования по причине исследования биохимическими методами. Второе, используемые здесь тесты дают спорный результат, так как схожие свойства имеют близкородственные виды.

По росту на дифференциально-диагностических средах *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus mesentericus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis* морфологически очень схожи. Используя систему биохимических тестов, мы сталкиваемся с проблемой вариабельности биохимических признаков (табл. 2).

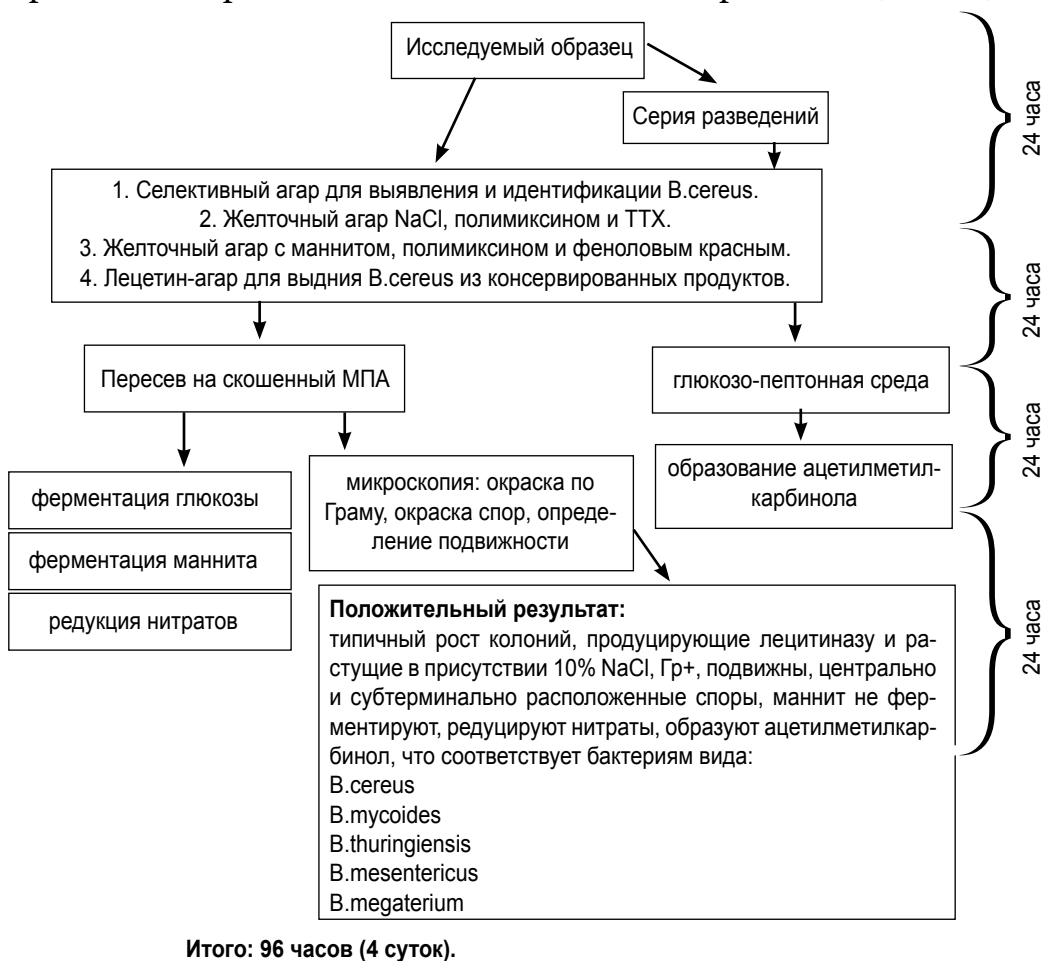


Рис. 34. ГОСТ 1044.8-88 «Продукты пищевые. Методы определения *Bacillus cereus*»

При диагностике предложенной ГОСТ 10888.4-88 дифференциация *Bacillus cereus* не возможна. Так аналогичными признаками обладают многие бактерии вида *Bacillus* (табл. 2).

Анализируя данную схему можно сказать, что достоверно по ней можно типировать только *Bacillus subtilis*, руководствуясь описанием морфологии колоний и отсутствию лецитиназной активности. На рис. 35-47 отражены особенности роста бактерий рода *Bacillus* на разных питательных средах.

Таблица 2 – Типирование *Bacillus cereus* по ГОСТ 10444.-88

Признаки	Виды бактерий						
	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Bacillus mesentericus</i>	<i>Bacillus mycoides</i>	<i>Bacillus anthracis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
Морфология колоний на МПА	крупные шероховатые колонии			морщинистые	крупные шероховатые колонии	морщинистые	крупные шероховатые колонии
Окраска по Грамму	+	+	+	+	+	+	+
Тест Фогес-Проскауера	+	±	+	+	+	+	+
Лецитиназ	+	-	+	±	+	-	+
Спорообразование	+	+	+	+	+	+	+
Маннит	±	±	±	±	±	+	±
Редукция нитратов	+	±	±	+	+	+	+

Условные обозначения:

« + » - положительны,

« - » - отрицательны,

« ± » - вариабельный признак.

Методика определения биохимических свойств бактерий рода *Bacillus* по Gordon (1973)

1. Подвижность микроорганизмов изучали в препаратах «ви-сячая капля» и «раздавленная капля», а также при посеве культуры в полужидкий агар (0,45-0,75% агара) уколом.

2. Образование аммиака, индола, сероводорода определяли с помощью индикаторных бумажек, помещенных под пробку пробирок с МПБ. При образовании индола бумажка приобретала сиреневый или малиновый цвет различной интенсивности. Об образовании сероводорода судили по почернению индикаторной бумажки. При образовании аммиака индикаторная бумажка краснеет.

3. Для определения гидролиза мочевины (наличие фермента уреазы) производили посев на среду с мочевиной. Покраснение среды через 20-24 ч. Рост при 37 °С свидетельствует о наличии у данного штамма фермента уреазы.

4. Редукцию нитратов определили после роста культуры на бульоне с нитратами в течение 24-72ч. В каждую пробирку с засеянным нитратным бульоном прибавляли по 1 мл реактива. Если нитрат восстановлен в нитрит, то получалось темно-синее окрашивание.

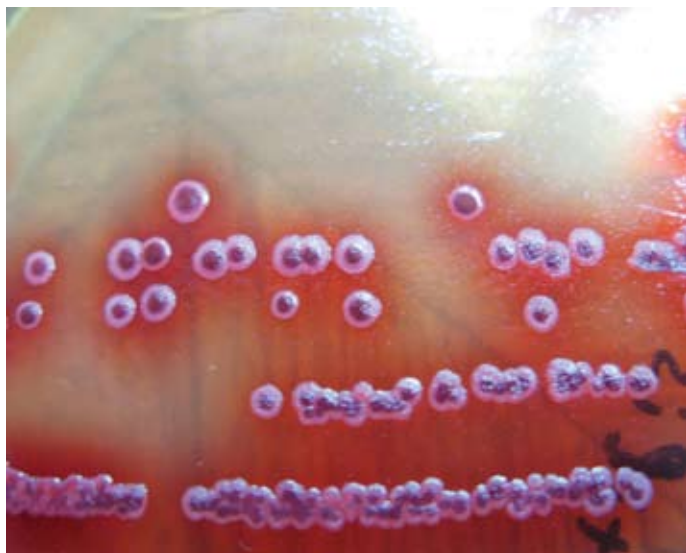


Рис. 35. Рост *Bacillus subtilis* на полимиксиновой среде



Рис. 36. Рост *Bacillus subtilis* на среде с ТТХ и яичным желтком

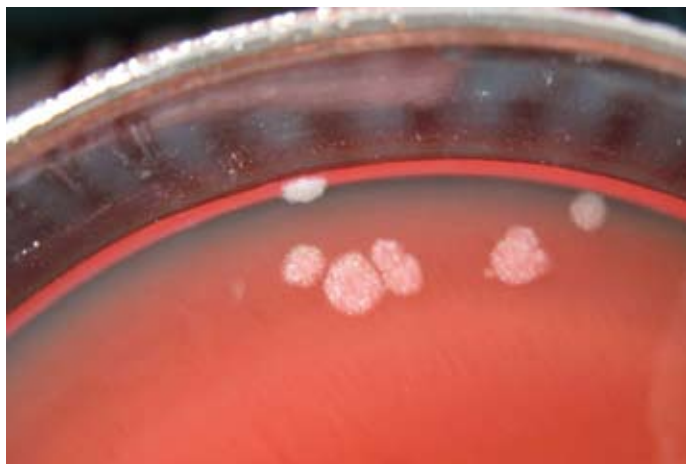


Рис. 37. Рост *Bacillus mesentericus* на среде с ТТХ и яичным желтком

Рис. 38. Рост *Bacillus thuringiensis* на МПА



Рис. 39. Рост *Bacillus anthracis* 55 ВНИИВВиМ на кровяном агаре



Рис. 40. Морфология колонии *Bacillus mycoides*



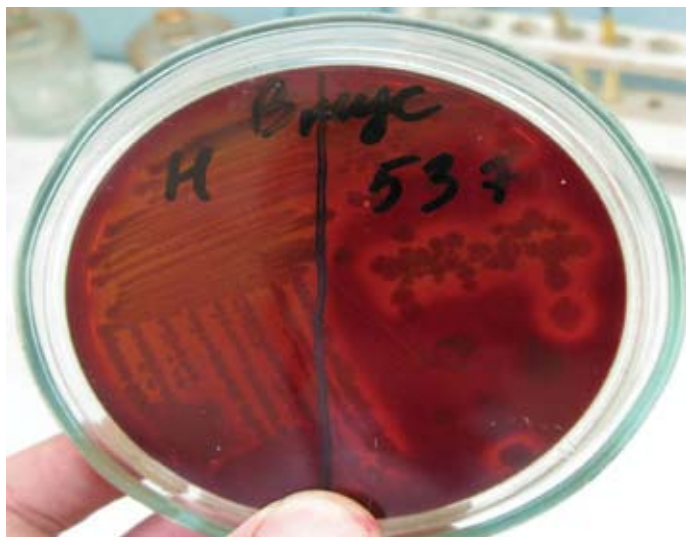


Рис. 41. Рост *Bacillus mycoides* на кровяном агаре



Рис. 42. Рост *Bacillus mycoides* на МПА



Рис. 43. Рост *Bacillus anthracis* 55 ВНИИВВиМ на МПА



Рис. 44. Рост бактерий рода *Bacillus* на кровяном агаре

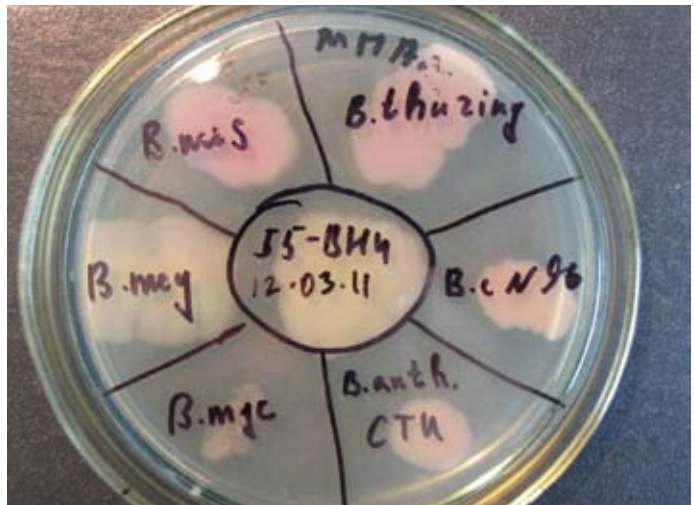


Рис. 45. Рост бактерий рода *Bacillus* на сибиреязвенной среде (определение фосфатазной активности)

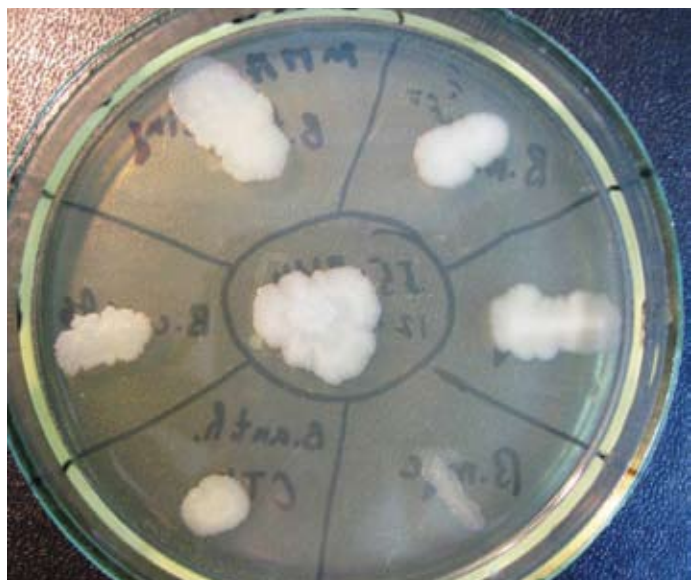


Рис. 46. Рост бактерий рода *Bacillus* на МПА

5. Гидролиз казеина изучали на молочном агаре. Культуру засеивали на среду штрихом, инкубировали в термостате при 37 °С. Наблюдали за появлением прозрачных зон гидролиза.

6. Для изучения разложения тирозина культуру инкубировали на агаре с тирозином. О разложении тирозина судили по исчезновению кристаллов тирозина в среде округ посевов.

7. Гидролиз крахмала наблюдали на картофельном агаре. Чашки Петри с засеянным картофельным агаром через 24-48 ч. заливали раствором Люголя. Светлые зоны вокруг посевов свидетельствовали о гидролизе крахмала.

8. Для изучения продукции каталазы чашечную культуру заливали 10% H_2O_2 . Образовавшие пузырьки газа свидетельствовали о наличии каталазы.

9. С помощью реакции Фогес-Проскауэра устанавливали в среде ацетон, промежуточный продукт, образующийся при распаде глюкозы. Для постановки реакции Фогес-Проскауэра (в модификации Барита) культуры выращивали на среде Кларка 1-3 суток при 37 °С. Затем 1 мл культуральной жидкости переносили в пробирку и прибавляли 0,6 мл α – нафтола (5% раствор в абсолютном спирте) и 0,2 мл 40% КОН, взбалтывали. При положительной реакции через 2-5 мин наблюдали розовое окрашивание. У штаммов, дающих сильную реакцию, окраска становится интенсивной и через 30 мин, а через 1 час переходит в малиновую. В случае отрицательной реакции розового окрашивания не наблюдается, и раствор принимает цвет меди.

10. Продукцию летициназы изучали на бульоне с яичным желтком. О летициназной активности судили по появлению беловатой мути и всплывающим хлопьям.

11. Продукция газов из нитратов в анаэробных условиях изучали на нитратном бульоне с поплавком или под слоем стерильного вазелинового масла. При продукции газа он скапливался в поплавке.

12. Для определения утилизации углеводов культуры засеивали на полужидкую среду Омелянского с углеводами. При образовании кислоты из углеводов цвет среды изменяется с зеленого на желтый.

13. О кислотообразовании культур при росте на лакмусовом молоке судили по изменению цвета молока до розового (красного).

14. Продукцию аргининдигидролазы изучали на среде Шеррио. Пробирку со средой Шеррис и контрольную (без аргенина) засеивали 18 часовой культурой и заливали стерильным вазелиновым маслом. Посевы инкубировали при 37 °С в течение 5 дней. Если бактерии не способны анаэробному расщеплению глюкозы, то среда в контрольной пробирке (без аргенина) остается серой или слабо розовой. О разложении аргенина свидетельствует появление фиолетовой окраски в опытной пробирке.

15. Для быстрого спорообразования культуры выращивали на кукурузно-пептонном агаре.

16. Рост в анаэробных условиях изучали на анаэробном агаре. Петлю суточной бульонной культуры засеивали уколом в столбик среды. Рост культуры по всей длине укола свидетельствовали об анаэробном росте.

Таблица 3 – Определения свойств бактерий рода *Bacillus* (по Gordon 1973)

Признаки	Виды бактерий						
	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Bacillus mesentericus</i>	<i>Bacillus mycoideus</i>	<i>Bacillus anthracis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
Каталаза	+	+	+	+	+	+	+
Реакция Фогес-Проккауэра	+	+	+	—	+	+	+
Рост в анаэробном агаре	+	+	-	+	+	-	+
Рост при 5 % NaCl	+	+	-	+	+	+	-
Рост при 7% NaCl	+	+	+	+	-	+	±
Образование кислоты и газа из глюкозы	-	-	-	-	-	-	±
Редукция нитратов	+	+	+	±	+	+	+
Гидролиз крахмала	+	+	-	+	+	+	+
Рост при 65С	-	-	-	-	-	-	-
Ширина клетки 1,0 мкм	+	+	+	+	+	+	±
Образов.кислоты из глюкозы	+	+	+	+	+	+	+
Гидролиз казеина	+	+	+	+	+	+	+
Параспоральные включения	+	+	-	+	+	+	-

Условные обозначения:

« + » - положительны,

« - » - отрицательны,

« ± » - переменный признак.

17. Об утилизации цитрата и пропионата судили по наличию роста культур на среде Козера.

18. О разжижении желатина судили по разжижению мясо-пептонной желатине.

По результатам наших исследований биохимических свойств референс – штаммов *Bacillus cereus*, а также выделенных в последствие полевых штаммов можно сделать вывод, что род *Bacillus* отличается многообразием и сходством фенотипического проявления различных видов. Из чего следует, что биохимические тесты, указанные в ГОСТ 1044.8-88 «Продукты пищевые. Методы определения *Bacillus cereus*», а также тесты предложенные Гордоном (1973) (табл.3) не дают 100 % результата.

В результате по ГОСТ схема исследования занимает 4-5 суток, с использованием дополнительных тестов схема удлинняется (схема Gordon), усложняя тем самым процесс идентификации, не улучшая результата.

Метод бактериологической диагностики, изложенный в пособии Сбойчаковой В.Б. (2007), основан на выделении *Bacillus cereus* из колоний, полученных при поверхностном посеве продукта, его разведения или культуральной жидкости на селективные среды. Принадлежность выделенных колоний к *Bacillus cereus* определяют по морфологическим и биохимическим свойствам. В зависимости от требований нормативно-технической документации подсчитывают количество или учитывают присутствие (отсутствие) *Bacillus cereus* в исследуемом продукте.

Метод предназначен для:

1) установления соответствия микробиологических показателей качества пищевого продукта требованиям нормативно-технической документации;

2) исследования продукта по санитарно-эпидемиологическим показаниям;

3) анализа микрофлоры посевов (культуральной жидкости), в которых обнаружены мезофильные факультативно-анаэробные микроорганизмы, при необходимости подтверждения присутствия в посевах *Bacillus cereus*.

Первый этап: бактериоскопия исходного материала (рвотные массы, промывные воды, фекалии, пищевые продукты) и посев исследуемого материала на плотные питательные среды для выделения возбудителя и определения его количества. Для этого пищевые продукты титруют на деципроцентной (0,1%) пептонной воде до 10^{-7} , фекалии, рвотные массы, промывные воды от 10^{-2} до 10^{-4} . Затем по $0,1 \text{ см}^3$ засевают на плотные питательные среды: Пивоварова (ЖСА с полимиксином и ТТХ) (рис. 47), Никодемуса (желточно-спиртовой агар) или Чистовича (ЖСА). Температура инкубации составляет 37°C , лучше 30°C . На среде Пивоварова учёт проводят через 48 ч, на средах Никодемуса и ЖСА через 72 ч. Затем вычисляют индекс возбудителя.

Второй этап: изучение характера роста на среде Пивоварова - колонии розовые (могут быть красные) за счёт редукции ТТХ, окружённые зоной лецитиназной активности. На среде Никодемуса образуют крупные белые распластанные колонии со слегка изрезанными краями, окруженные широкой зоной глубокого белого равномерного матового коагулята или двойной зоной - коагулят и просветление. После оценки роста 3-5 колонии пересевают на скошенный агар и параллельно на мясопептонный бульон, инкубируют при темпер 37°C в течение 24 ч.

Идентификация *Bacillus cereus*:

1. подвижность в раздавленной капле(+)
2. На среде Гисса с маннитом(-)



Рис. 47. Рост бактерий *Bacillus cereus* на полимиксиновой среде с ТТХ

3. На среде Кларка за 48 часов образует ацетоин, т.е. реакция Фогес-Проскауэра.

4. На кровяном агаре гемолиз (+)

5. Окисление, ферментация глюкозы (++)

6. Каталаза (+).

Для доказательства идентичности выделенной культуры из различных материалов определяют метки.

Определение биовара на среде Гисса:

- лактоза (+/-);

- сахароза(+/~);

- глицерин (+/-)

- галактоза (+/-);

- дульцит (+/-);

- арабиноза (+/-);

Определение вирулентности: 5x10⁷ КОЕ вводят внутрибрюшинно двум белым мышам массой 10-15 г. На 1-4 сутки мыши погибают, и в органах обнаруживается *Bacillus cereus*.

Этиологическую роль бактерий *Bacillus cereus* при пищевых отравлениях можно признать (при отсутствии патогенных микроорганизмов) в следующих случаях, когда *Bacillus cereus*:

1. обнаружен в пищевых продуктах в количествах 10⁵/г (см³) или более;

2. обнаружен одновременно в рвотных массах, промывных пол испражнениях в количестве 10² КОЕ/г (см³) и более;

3. выделен из фекалий у большинства пострадавших;

4. выделен из фекалий больного только в остром периоде болезни в количестве 10²-10³ КОЕ/г и более с последующим исчезновением микроорганизма после выздоровления.

2.5. ОПТИМИЗАЦИЯ СХЕМЫ ВЫДЕЛЕНИЯ *BACILLUS CEREBUS*

Изучив биологические свойства *Bacillus cereus* (табл. 1) на имеющихся референс - штаммах, мы приступили к разработке оптимальной схемы выделения и идентификации *Bacillus cereus* из объектов ветеринарного надзора.

Мы попытались оптимизировать схему за счёт поиска отличительных признаков и исключая сходные, для этого референс-штаммы изучались по множеству биохимических тестов (табл. 1).

Первоначально её тестировали на искусственно контаминированных объектах ветеринарного надзора с целью выявления оптимальных параметров создаваемой схемы. В результате проведённых экспериментов с варьированием временных и температурных параметров нами предлагается следующая схема выделения и идентификации бактерий *Bacillus cereus* включающая несколько этапов (рис. 48).

1 этап. Подготовка проб

Исследуемый материал делили на 2 группы:

- 1) Сухие продукты, почва, продукты не первой свежести (сохраняющие, в основном спорую форму *Bacillus cereus*);
- 2) Пищевые продукты, либо пат. материал, фекалии (содержащие, в основном вегетативную форму *Bacillus cereus*).

Если того требовали исследования, делали ряд последовательных десятикратных разведений: 10-1, 10-2, 10-3, 10-4.

После чего пробы прогревали на водяной бане, с целью избавления от вегетативной грамотрицательной микрофлоры. Исключения составляют пробы 2 группы из свежих продуктов и фекалий, так как в них возбудитель содержится в основном в вегетативной форме.

Далее последовательно отбирали по 0,2-1,0 см³ содержимого из разведений 10-1-10-4 и переносили по 0,2 см³ в чашки Петри с селективной средой (чтобы получить изолированные колонии) и по 1 см³ в пробирки со средой обогащения (чтобы выявить наличие).

При посеве на чашки выявляли количество бактерий, при посеве на среду обогащения выявляли наличие возбудителя в определенном разведении.

Среду обогащения с продуктом инкубировали 24 часа при 37 Со, после чего петлей делали посевы на селективные среды для получения изолированных колоний. *Bacillus mycoides* являются наиболее распространенными представителями этой группы

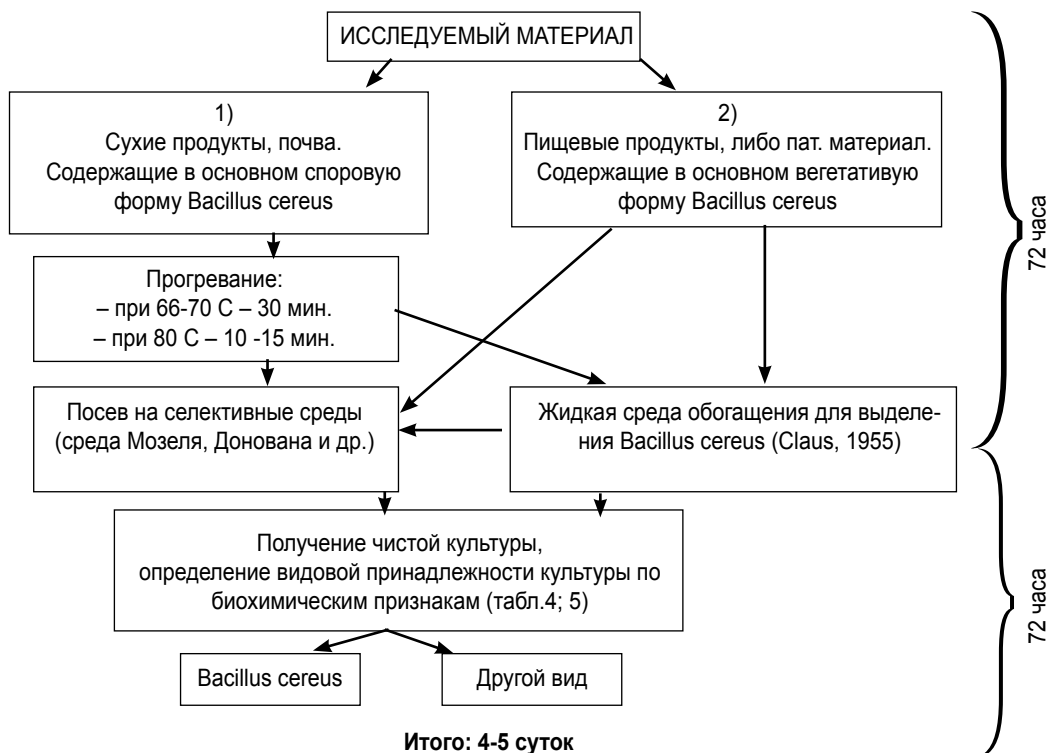


Рис. 48 Выделение бактерий вида *Bacillus cereus* традиционной схемой бактериологического исследования

микроорганизмов. В то же время содержание *Bacillus cereus* в почве зависит от содержания в ней органических веществ. *Bacillus cereus* лучше развивается в почвах с нейтральной и слабощелочной реакцией, что естественно сказывается на частоте обнаружения его в таких почвах, а также на количественной характеристике его содержания. Имеются данные о том, что количество *Bacillus cereus* в почве возрастает по мере продвижения с севера на юг, достигая максимума в средней полосе и снижаясь в почвах южных республик нашей страны. В почвах центральной полосы *Bacillus cereus* содержится в количествах до десятков тысяч в 1 г. Для выделения бактерии *Bacillus cereus* в качестве селективной среды использовали желточно-солевой агар с добавлением триметоприма и полимексина, также нами использовались среды: желточно-солевой агар с ТТХ; среда Мозеля (МYP-агар) и аналогичный ей селективный агар для выделения *Bacillus cereus* (РЕМВА) – отличие лишь в использование различных красителей фенолового красного и бромтимолового синего.

2 этап. Подсчет и пересев типичных колоний

В посевах, прошедших термостатирование, подсчитывали число колоний, похожих по внешнему виду с колониями референс – штаммов *Bacillus cereus*.

Для подтверждения принадлежности обнаруженных колоний к колониям, образуемым *Bacillus cereus*, микроорганизмы из 5-7 типичных колоний пересевали на скошенный мясопептонный агар и термостатировали его 18-24 ч при $(37\pm 0,5)^{\circ}\text{C}$. Выделенные культуры типировались по биохимическим и культуральным свойствам (табл. 4; 5).

3 этап. Идентификация

В результате анализа литературных данных исследователей (Полховского В.А., 1969; Gordon R.F., 1973; Norris J.R. et al., 1981; Сидорова М.А., 1995; Васильев Д.А. и др., 1999), и результатов собственных исследований нами были отобраны, на наш взгляд, тесты, позволяющие с наибольшей достоверностью идентифицировать *Bacillus cereus*.

Для более полной видовой принадлежности, все типичные колонии бактерий выросшие на дифференциально-диагностических средах, пересевали на МПА и МПБ для дальнейшего дифференцирования по всем отобраным нами в ходе исследований признакам (табл. 4, 5).

На основании составленной схемы включающей 30 биохимических тестов и характеристики по культуральным свойствам нами в период с 2007 по 2011 год было отобрано 536 пробы (табл. 6) продуктов и взятые в хозяйствах Ульяновской и Самарской областей, в результате исследований нами было выделено 398 штаммов рода *Bacillus*: 210 - штамма из почвы; 67 – вода рек, озера, сточные воды; 46 - сена и остатков растительного происхождения; 90 - пряности и приправы; 67 - молочная продукция; 56 – мясная продукция. Из них 102 идентифицировано как *Bacillus cereus*.

Анализируя полученные данные можно сказать, что наибольший процент выделенных штаммов приходится на почвы 46,5 %, она является основной средой его обитания. В то же время содержание *Bacillus cereus* в почве зависит от содержания в ней органических

веществ. *Bacillus cereus* лучше развивается в почвах с нейтральной и слабощелочной реакцией, что естественно сказывается на частоте обнаружения его в таких почвах, а также на количественной характеристике его содержания. Имеются данные о том, что количество

Таблица 4 – Предлагаемая идентификационная таблица по наиболее важным видам *Bacillus* с обобщенными свойствами (по Полховскому, 1969; Гордону, 1973; Norris et al., 1981; Сидорову, 1995, Васильев и др., 1999)

Признаки	Вид						
	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Bacillus mesentericus</i>	<i>Bacillus mycoides</i>	<i>Bacillus anthracis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
Патогенность для мышей	+	-	-	-	+	-	-
Рост в присутствии лизоцима	+	-	-	+	+	±	+
Анаэробный рост	+	-	-	+	+	-	+
Каталаза	+	+	+	+	+	+	+
Фосфатаза	+	±	±	-	-	+	+
Тест Фогес-Проскауера	+	-	-	±	+	+	+
Внутриклеточные кристаллы	-	-	-	-	-	-	+
Подвижность	+	±	+	-	-	+	+
Рост при тем. 45 С ⁰	+	+	+	-	-	+	+
Капсулообразование в атмосфере с повышенным содержанием СО ₂	±	±	-	-	±	-	±
Гемолиз	+	-	±	+	-	-	+
Лецитиназа	+	±	-	-	-	-	±
Редукция нитратов до нитритов	+	±	-	+	±	+	+
Утилизация цитрата	+	+	+	±	±	+	+
Расщепление тирозина	+	±	-	±	+	-	±
Казеина	±	-	+	-	+	+	+
Крахмал	+	+	-	+	+	+	+
Мочевина	±	-	-	-	-	+	±
Сероводород	-	-	+	-	-	+	-
Арабиноза	-	+	+	+	-	+	±
Галактоза	-	+	-	-	±	-	-
Мальтоза	+	+	±	+	+	-	+
Маннит	-	+	+	-	-	+	-
Раффиноза	-	+	-	-	-	-	-
Ксилоза	-	±	+	-	-	+	-
Галактоза	-	+	-	-	±	-	-
Эскулин	±	-	±	-	-	+	±
Саллицин	+	-	-	+	±	+	+

Условные обозначения:

« + » - положительные,

« - » - отрицательны,

« ± » - вариабельный признак.

Таблица 5 – Культуральные свойства видов *Bacillus* (Васильев и др., 1999)

Виды	Признаки	
	Рост на МПА	Рост на МПБ
<i>Bacillus cereus</i>	Колонии белые, восковидные, твердые, круглые, иногда окрашенные в желтоватый цвет	Среда мутная, осадок трудноразбиваемый, крошковатый, прочные пленка и пристеночное кольцо. При образовании пленки среда просветляется
<i>Bacillus megaterium</i>	Колонии слизистые, желтовато-белые, темнеют при наличии тирозина в среде	Помутнение среды, пленки не образует, осадок незначительный
<i>Bacillus mesentericus</i>	Толстый матово-белый морщинистый налет, образует пленку в конденсатной воде	Бульон остается почти прозрачным, на поверхности среды морщинистая пленка
<i>Bacillus mycoides</i>	Войлоковидные наложения, ползущие по поверхности среды	Помутнения среды нет, на дне ватообразный осадок, пленки не образует
<i>Bacillus anthracis</i>	Серо-белые, как пушинки, колонии, при увеличении вид «львиной гривы»	Среда с осадком (хлопьевидный), прозрачная, без пленки, кольцо около стенок легко смывается
<i>Bacillus subtilis</i>	Колонии белые или сероватые, морщинистые, ползущие на стенку пробирки, в конденсатной воде пленка	Бульон мутный, при образовании пленки среда просветляется
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Колонии белые, восковидные, твердые, круглые, иногда окрашенные в желтоватый цвет, по краям извитые нити	Среда мутная, осадок трудноразбиваемый, крошковатый, прочные пленка и пристеночное кольцо

Таблица 6 – Источники выделения штаммов бактерий *Bacillus cereus*.

№ п/п	Источники выделения	Количество образцов	Количество выделенных штаммов рода <i>Bacillus</i>	Количество выделенных штаммов бактерий вида <i>Bacillus cereus</i>
1	Почвы	210	198	45
2	Вода рек, озера, сточные воды	67	42	18
3	Сена и остатков растительного происхождения	46	24	8
4	Пряности и приправы	90	61	17
5	Молочная продукция	67	28	8
6	Мясная продукция	56	45	6
Итого:		536	398	102

Bacillus cereus в почве возрастает по мере продвижения с севера на юг, достигая максимума в средней полосе и снижаясь в почвах южных республик нашей страны. В почвах центральной полосы *Bacillus cereus* содержится в количествах до десятков тысяч в 1 г.

Далее следуют вода рек и водоемов 20,3 %, почти постоянно обнаруживается в воде открытых водоемов в количествах до тысяч и даже десятка тысяч в 1 литре. Присутствие *Bacillus cereus* в водопроводной говорит о низкой эффективности применяемых методов обеззараживания в отношении споровых форм микроорганизмов.

Наиболее высокий процент обсеменения *Вас. cereus* отмечается в группе молочных продуктов (около 30 %). При этом довольно значительно отличается частота выделения этого микроорганизма из различных продуктов, представляющих данную группу. Самый большой процент обсеменения отмечается обычно у пастеризованного молока (до 60 %) и топленого молока (35-40 %). Из сырого молока, очевидно, в силу конкурентного действия сопутствующей микрофлоры, *Bacillus cereus* выделяется значительно реже (в 10-15 %), а в молочнокислых продуктах он, как правило, вообще не обнаруживается.

Второе место по частоте обнаружения *Bacillus cereus* занимают концентраты, где этот микроорганизм обнаруживается в 20-25 % случаев. При этом более часто данный микроорганизм обнаруживается в концентратах, содержащих жир и животные белки (молочно-овощные, молочно-крупяные, мясо-овощные и мясо-крупяные концентраты), что связано, очевидно, с характером используемого для их изготовления сырья, а также защитным действием жира и белка на споры *Bacillus cereus* в процессе изготовления концентратов. Массивность обсеменения концентратов данным микроорганизмом может достигать сотен и тысяч в 1 г. Очень много в приправах и специях 19,8 %, наименьший процент в мясной продукции 5,3 %. Следующее по частоте обнаружения *Bacillus cereus* место (около 10 %) занимает группа продуктов растительного происхождения. Однако сравнительно низкий средний процент обсеменения продуктов данной группы

не позволяет с полной объективностью характеризовать их эпидемиологическую опасность, ибо в обсеменении *Bacillus cereus* продуктов растительного происхождения отмечаются чрезвычайно большие колебания. Наиболее часто этот микроорганизм обнаруживается на сырых овощах (более 50 % случаев) в количествах до десятков тысяч на 1 г. Овощные полуфабрикаты обсеменены *Bacillus cereus* в 15-16 % случаев, а на готовых овощных блюдах этот микроорганизм встречается только в 4-6 % случаев. Массивность обсеменения *Bacillus cereus* готовых овощных блюд обычно не превышает сотен в 1 г, однако в холодных овощных блюдах (салаты, винегреты), длительно хранившихся до реализации, *Bacillus cereus* может содержаться в количествах десятков и даже сотен тысяч в 1 г.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Первоначально выделение *Bacillus cereus* из подозреваемого продукта происходило лишь из продуктов, содержащих возбудителя в количестве, превышающем сотни тысяч в 1 г (Ипатенко, 1987; Васильев, 1999). Попытки выделить этот микроорганизм из фекалий больных длительное время не имели успеха. Лишь после 1962 года, когда Никодемусом была предложена спиртово-желточная среда для выделения *Bacillus cereus*, этот микроорганизм стали почти постоянно выделять из кишечного содержимого людей в случаях пищевых отравлений (Пивоваров, 1970; Nikodémusz, 1979; Смирнов, 1982).

Для выделения *Bacillus cereus* был предложен ряд питательных сред. Первоначально, когда этот микроорганизм изучался главным образом как почвенный микроорганизм, для выделения его использовался обычный желточный агар или кровяной агар. Однако проведение широких исследований по изучению этиологической роли данного микроорганизма при пищевых отравлениях у человека потребовало разработки новых питательных сред, позволяющих выделять данный микроорганизм из сильно загрязненных микрофлорой объектов, например, из фекалий и продуктов питания. Было предложено для исследования продуктов питания применять среды Моссея и Донован. Среда Никодемуса позволяет выделять *Bacillus cereus* из материалов, имеющих очень большую обсемененность другими микроорганизмами, однако на ней растут не все штаммы *Bacillus cereus*, лишь около 10 % спор *Bacillus cereus*, находящихся в исследуемом объекте). Недостатком данной среды является и значительная задержка роста на ней данного микроорга-

ма, что замедляет исследования. Поэтому при расследовании случаев пищевых отравлений целесообразно использовать для посевов на *Bacillus cereus* солевой полимиксиновый агар с ТТХ (2,3,5-трифенилтетразолий хлористый), на котором вырастают почти все штаммы данного микроорганизма, а предварительный ответ о наличии *Bacillus cereus* может быть дан уже спустя сутки с начала исследования. Среда Чистовича (агар с 8 – 10-процентным содержанием поваренной соли) также позволяет выделять *Bac. cereus* из сильно загрязненного микрофлорой материала, однако на этой среде дают рост лишь 1 – 5% спор данного микроорганизма. Что касается других сред, то использовать их для выделения *Bacillus cereus* из фекалий, почв практически не представляется возможным, ибо бурно развивающаяся сопутствующая микрофлора препятствует размножению данного микроорганизма. Одним из недостатков выше указанных сред является рост близкородственных видов *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus mesentericus*. Колонии выросшие на диагностических средах, требуют дополнительной достаточно длительной диагностики (4-5 суток) с применением биохимических тестов.

Использование современных методов диагностики (ПЦР, ИФА), которые могут быть использованы для идентификации бактерии *Bacillus cereus*, дорогостоящие и недоступны большинству бактериологических лабораторий. Поэтому изыскание простых и доступных методов для лабораторной практики является актуальной проблемой.

Первоочередной задачей наших исследований стало выделение бактерий *Bacillus cereus* из объектов санитарного надзора, оптимизация и усовершенствование схемы выделения бактерий. В период с 2007года по 2012 год было исследовано 536 проб объектов санитарного надзора (табл. 6), в результате исследований было выделено и идентифицировано 102 штамма *Bacillus cereus*. Выделение бактерий *Bacillus cereus* проводили по нескольким методикам (схемам):

1. По ГОСТ 1044.8-88 «Продукты пищевые. Методы определения *Bacillus cereus*».

2. По схеме Гордона, 1973.

Анализируя вышеуказанные методики, можно сказать, что по просту на диагностических средах *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus mesentericus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis* морфологически очень схожи.

Используя систему биохимических тестов, предложенной ГОСТ 1044.8-88 и в схеме, предложенной Гордоном (1973), мы сталкиваемся с рядом недостатков:

- проблемой вариабельности биохимических признаков и соответственно с высокой вероятностью недостоверного результата;

- малое количество тестов (нализы по предложенным тестам дают картину, при которой большинство биологических свойств попросту слиты и не дают равнозначного результата);

- диагностируя бактерии по данным схемам и свойствам, возникает ряд трудностей: во-первых, это длительность исследования по причине исследования биохимическими методами и второе, используемые здесь тесты дают спорный результат, так как схожие свойства имеют близкородственные виды.

Нами была разработана новая схема выделения, делящая объекты исследования на 2 группы в зависимости от формы, в которой находится возбудитель (вегетативной или споровой). Данная схема расширена дополнительными биологическими тестами (табл.4; 5) дополнена нами в соответствии с данными Полховского, 1969; Gordon, 1973; Norris et al., 1981; Сидорова, 1995, которые, с высокой достоверностью позволяют типировать возбудителя *Bacillus cereus* в течение 4 – 5 суток.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРНЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Акимович, В.В., Самойлова Л.В. Индентификация бацилл сибирской язвы по начальному росту на питательной среде / В.В.Акимович, Л.В. Самойлова // Микробиол., эпидемиол., иммунобиол. – 1969. – №12. – С. 125.
2. Акопян, А.А. Гемолитические свойства аэробных спорообразующих бактерий / А.А. Акопян, Э.Г. Африкян // Журн. эксперим. и клин. мед. – 1967. – Т. 5. – С. 22.
3. Алтон, Л.В. Развитие и выживаемость бактерий рода *Bacillus* в морской и речной воде / Л.В. Алтон // Гигиена и санитария. – 1988. – № 9. – С.14–16.
4. Асколонов, С.П. Пищевые заболевания, вызываемые спорообразующими бактериями *Bacillus subtilis* и *Bacillus mesentericus* / С.П. Асколонов, А.И. Ильченко // Вопросы питания. – Киев: Госмедиздат УССР. – 1962 – С.226–229.
5. Африкян, Э.К. Энтомопатогенные бактерии и их значение / Э.К. Африкян // Ереван: Изд-во АН АрмССР. – 1973. – С.418.
6. Ахундова, К.А. Значение *B.cereus* в патологии человека. / К.А. Ахундова // ЖМЭИ. – 1967. – № 10. – С. 129–132.
7. Бакулов, И.А. Токсикоинфекции и токсикозы. Вопросы профилактики заболеваний / И.А. Бакулов, А.М. Смирнов, Д.А. Васильев. – Ульяновск: УГСХА, 2004. – С. 64 – 66.
8. Бакулов, И. А. Сибирская язва (антракс): новые страницы в изучении «старой болезни» / И.А. Бакулов, В.А., Гаврилов В.В. Селивестров Владимир: Посад, 2007. – С.8–70.
9. Буравцева, Н.П. Достижения и перспективы борьбы с сибирской язвой в СССР / Н.П. Буравцева, О.Н. Лопаткин // Материалы X Пленарного заседания междугосударственной комиссии по борьбе с сибирской язвой. – М., 1983. – С.105-107.

10. Вуд, У. Брожение углеводов и родственных соединений / У. Вуд // Метаболизм бактерий. – М.: Изд-во иностр. лит., 1963. – С. 92–96.

11. Глинская, Е. В., Пермякова Н. Ф. Гетерогенность свойств бактерий рода *Bacillus*, выделенных из колбасных изделий / Е. В. Глинская, Н. Ф. Пермякова // Успехи современного естествознания. – 2004. – № 2 – С. 123-125.

12. Груз, Е.В. Изучение и рационализация некоторых лабораторных методов индикации и идентификации *Bac.anthraxis*: автореф. дис. ...канд. мед. наук: 03.00.07 / Груз Евгений Владимирович – Одесса, 1965. – 19 с.

13. Давиденко, Г.П. Микрофлора ожоговой раны и ее чувствительность к антибиотикам / Г.П. Давиденко, Н.Р. Назарметова, Н.Ш. Хусаинова // Кратк. тез. докл. 1 съезда мол. ученых у медиков и врачей Узбекистана. – Андижан, – 1991. – С.160.

14. Динчева, Е.Н. Микробиологическое изучение мясного фарша / Е.Н. Динчева // Науч. тр. Высш. ветеринарно-мед. ин-та. – 1970. – Т.22. – С.139-146.

15. Донецкая, Э.Г. Основы санитарной микробиологии / Э.Г. Донецкая, В.И. Корженевич, И.Г. Швиденко. – Саратов: Изд. СГМУ, 2008. – 221с.

16. Езепчук, Ю.В. О токсических и некоторых биохимических свойствах фильтратов *B. cereus* и *B. anthracis* / Ю.В. Езепчук, Е.Д. Бобкова, Н.К. Просветова // ЖМЭИ. – 1969. – №6. – С. 119-123.

17. Езепчук, Ю.В. Патогенность как функция биомолекул / Ю.В. Езепчук. – М.: Медицина, 1985. – 240 с

18. Еременко, Е.И. Новые методы исследования штаммов *B. anthracis* / Е.И. Еременко, О.И. Цыганкова, Н.П. Буравцева // I Материалы науч.-практ. конф., посвящ. 100-летию образования противочумной службы России. – Саратов, 1997. - Т.1.- С. 43.

19. Ефимочкина, Н.Р., Новые бактериальные патогены в пищевых продуктах: экспериментальное обоснование и разработка системы контроля с применением методов микробиологического и молекулярно-генетического анализа: автореф. дис. ...канд.

биол. наук: 14.02.01 / Ефимочкина Наталья Рамозановна. – Москва, 2010. – С.28

20. Заварзин, Г.А. Фенотипическая систематика бактерий: Пространство логических возможностей / Г.А. Заварзин. – М.: Наука, 1974. – С.137.

21. Затула, Д.Г. Влияние метаболитов споровых сапрофитных бактерий на организм человека / Д.Г. Затула, С.Р. Резник С.Р. – Киев: «Наукова Думка», 1973. – С. 10-12.

22. Ипатенко, Н.Г. Лабораторные методы исследований при сибирской язве / Н.Г. Ипатенко // Ветеринария. – 1983. – № 7. – С.74-75.

23. Ипатенко, Н.Г. Сибирская язва сельскохозяйственных животных. / Н.Г. Ипатенко, В.А. Седов. – Покров: ВНИИВВиМ, 1987. – С.256.

24. Калдыркаев, А.И. Методика выделения фагов бактерий вида *Bacillus cereus* и *Bacillus subtilis*, перспективы их применения / А.И. Калдыркаев, Н.А. Феоктистова, А.Х. Мустафин, Д.А. Васильев // Естественные и технические науки. – 2011. – №2 (52). – С. 83–84.

25. Костенко, Ю.Г. Изучение остаточной аэробной мезофильной микрофлоры в пастеризованных консервах «Шейка ветчинная» / Ю.Г. Костенко, П.П. Степаненко, С.Я. Любашенко // Тр. ВНИИ мясо-молоч. пром-сти. – 1978. – № 41. – С.28-29.

26. Красильников, Н.А. Определитель бактерий и актиномицетов / Н.А. Красильников. – М.: Изд-во АН СССР, 1949. – С. 786.

27. Манина, Е.Г. Антигенные особенности клеток четырех вариантов *Bacillus brevis* var. / Е.Г. Манина, И.Н. Полякова, Е.В. Езепчук // Микробиология. – 1975. – № 6. – С. 1086–1089.

28. Мерчина, С.В. Обоснование необходимости в разработке технологических параметров, исключаящих контаминацию пищевых продуктов *Bacillus cereus*: автореф. дис. ...канд. биол. наук: 03.00.07, 03.00.23 / Мерчина Светлана Васильевна. – Ульяновск, 2003. – 21с.

29. Мирзоева, В.А. Бактерия группы сенной и картофельной палочек. / В.А. Мирзоева. – М.: Изд-во АН СССР, 1959. – С.176.

30. Павлова, И.П. Изучение морфологии и биологических свойств фагов *Bac. anthracis* и *Bac. cereus* / И.П. Павлова // ЖМЭИ. – 1971. – № 7. – С.147.

31. Петрова, Л.Н. Дифференциране на культуры от род *Bacillus* изолирани от местных полуконсервов / Л.Н. Петрова // Ветеринарно-медицинские науки. – 1975. – № 8. – С.12.

32. Пивоваров, Ю.А. Распространение *Bacillus cereus* во внешней среде / Ю.А. Пивоваров, Р.С. Волкова, В.В. Шелакова // Актуальные вопросы гигиены. – Москва, 1970. – С.98–103.

33. Полховский, В.А. Биохимические типы *Bacillus cereus*, выделенных из различных природных источников // Журн. микробиол. - 1970. - № 2. - С.82-86.

34. Полховский, В.А. Биохимические типы *Bacillus cereus*, выделенных из различных природных источников / В.А. Полховский // Журн. микробиол. – 1970. – № 2. – С.82–86.

35. Полховский, В.А. Нуклеотидный состав ДНК аэробных спорообразующих бактерий: в кн.: Вопросы инфекционной и неинфекционной патологии / В.А. Полховский. – Ташкент: Ташк. книж. изд-во, 1975. – С.183–185.

36. Полховский, В.А. Реакция агглютинации как метод серологической дифференциации *Bacillus cereus* // В.А. Полховский // Докл. АН БССР. – 1967. – № 5. – С.436–438.

37. Резник, С.Р. Дополнительный подход к дифференциации споровых бактерий *Bac. subtilis* и *Bac. cereus* / С.Р. Резник, И.Б. Сорокулова, А.Ф. Качан // Микробиол. журн. – 1978. – № 4. – С.448–453

38. Салтыков, Р.А. Характеристика сибиреязвенного вакцинного штамма СТИ-1, хранившегося 30 лет в виде лиофилизированных спор / Р.А.Салтыков, И.А. Бакулов, В.А. Гаврилов// ЖМЭИ. – 1976. – № 6. – С.62-65.

39. Селянинов, Ю.О. Об ошибках при индикации и идентификации *B.anthraxis* / Ю. О. Селянинов, И. Ю. Егорова // Ветеринария. - 2008. - N 10. - С. 30-33 .

40. Сергиенко, Ф.Е. Новый метод бактериологично диагностики за допомогою бактериофага // Мікробіол. журн. АН УССР. – 1936. – №1. – С. 85-112.
41. Сидоров, М.А. Определитель зоопатогенных микроорганизмов: справочник / М.А. Сидоров. – М.: Колос, 1995. – С.104–112.
42. Смирнов, В.В. Методические рекомендации по выделению и идентификации бактерий рода *Bacillus* из организма человека и животных / В.В. Смирнов, С.Р. Резник, И.Б. Сорокулова. – Киев: Наукова думка, 1983. – С. 51.
43. Смирнов, В.В. Спорообразующие аэробные бактерии – продуценты биологически активных веществ / В.В. Смирнов, С.Р. Резник, И.А. Василевская. – Киев: Наукова Думка, 1982. – С.117–120.
44. Станчева, Н. Состав липолитических микроорганизмов, выделенных из свежего овечьего молока // Животноводческие науки. - 1997. - №1-2. - С.72-75.
45. Шляхов, Э.Н. Сибирская язва (очерки эпидемиологической, лабораторной диагностики и профилактики) / Э.Н. Шляхов, Е.В. Груз, В.И. Присакаръ. – Кишинев: Штинца, 1975. – 162 с.
46. Abusin, S. *Bacillus cereus* endocarditis in a permanent pacemaker / S. Abusin, A. Bhimaraj and S. Khadra // Cases Journal. – 2008. – №1. – P. 95 -98
47. Adam, W. Über Massenerkrankung an Lebensmittelvergiftung durch Pudding infolge Befalls mit *Clostridium perfringens* / W. Adam. // Desinfekt. – 1958. – №2. – P.50-56.
48. Adeyanju, S. A., Ikotun T. Microorganisms associated with mouldiness of dried yam chips and their prevention // Nahrung. - 1988. - V.32. - №8. - P.777-781.
49. Ahmed, A.H. Incidence of *Bacillus cereus* in milk and some milk products / A.A.H. Ahmed, M.K. Moustafa, E.H. J. Marth // Food Prot. – 1983. – № 46. – P. 126-128.
50. Akiyama, N. Fulminant septicemic syndrome of *Bacillus cereus* in a leukemic patient / N. Akiyama, K. Mitani, Y. Tanaka // – 1997. – № 36. – P.221–226.

51. Arnesen, L. P. S. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins / L. P. S. Arnesen, A. Fogerlund, P. E. Granum // FEMS Microbiol. – 2008. – №32. – P. 579-606.

52. Auger, S. Biofilm formation and cell surface properties among pathogenic and nonpathogenic strains of the *Bacillus cereus* group / S. Auger, N. Ramarao, C. Faille, A. Fouet, S. Aymerich, M. Gohar // Appl. Environ. Microbiol. – 2009. – № 10. – P. 1128.

53. Avashia, S. B. Fatal pneumonia among metalworkers due to inhalation exposure to *Bacillus cereus* containing *Bacillus anthracis* toxin genes / S. B. Avashia, W. S. Wiggins, C. Lindley, A. H. Hoffmaster, R. Drumgoole, T. Nekomoto, P. J. Jackson, K. K. Hill, K. Williams, L. Lehman, M. C. Libal, P. P. Wilkins, J. Alexander, A. Tvaryanas, and T. // Betz.Clin. Infect. – 2007. – № 44. – P.414–416.

54. Banerjee, C. *Bacillus* infections in patients with cancer / C. Banerjee, C.I. Bustamante, R. Wharton, E. Talley, C. Wade J.C. // Arch Intern Med. – 1988. – № 148. – P.1769–1774.

55. Baptis, J.N. Comparative zone electrophoresis of enzymes in the genus *Bacillus* / J.N. Baptis, M. Mandel, R.L. Gherna // Int. J. Syst. Bacteriol. – 1978. – V. 28. – N 2. – P.229-244.

56. Barjac, H. Mise au point sur la classification des *Bacillus thuringiensis* / H. Barjac // Entomophaga. – 1973. – V.18. – № 1. – P.5-17.

57. Bergey's manual of determinative bacteriology. – Baltimore: Williams and Wilkins Co, – 1993. – 9th ed. – P.1258.

58. Berkel H. Lecithinase und Toxinbildung durch Stamme der Gattung *Bacillus* / H. Berkel и R. Hodlok // Lebensm. Hygiene. – 1976. – V.27. – № 2. – P.63-65.

59. Bodnar, S. Ueber durch *Bacillus cereus* verursachte Lebensmittelvergiftungen / S. Bodnar // Ges. Hyg. Grenzeb – 1962 – №8: – P. 368

60. Boeye, A., Aerts M. Numerical taxonomy of *Bacillus* isolates from North Sea sediments / A. Boeye, M. Aerts // Int. J. Syst. Bacteriol. 1976. – 26. – N 4. – P.427-441.

61. Bonde, G. The genus *Bacillus*. An experiment with cluster analysis / G. Bonde // Dan. Med. Bull. – 1975. – V.22. – N 2. – P.41–61.

62. Breed, R.S. *Bergey's manual of determinative bacteriology* / R.S. Breed, E.G.D. Murray, N.R. Smith. – Baltimore: Williams and Wilkins Co, – 1957. – 7 ed. – P.1098 p.
63. Brekenfeld, H. *Lebensmittelbakterien und Vergiftungen* / H. Brekenfeld // *Zentralbl Bakt I.* – 1926. – № 99, – P.353-385 .
64. Brett, M. M. Soft tissue infections by spore-forming bacteria in injecting drug users in the United Kingdom / M. M. Brett, J. Hood, J. S. Brazier, B. I. Duerden, J. M. Hahné // *Epidemiol. Infect.* – 2005. – № 133.–P.575–582.
65. Brison, F. *Les quelques Bacillus isoles en nur Mediterranee* / F. Brison // *Rev. cytol. ei. biol.veg. Bol.* – 1978. – V.1. – P.405–412.
66. Candel, A. Sensitivity to lytic agents and DNA base composition of several aerobic spore-bearing Bacillis / A. Candel, V. Mastrandrea, G. Cenci, A. Bartolomeo // *Bacteriol. Parasitenk., Infektionskrankh. und Hyg Abt. 2 .* – 1978. – V.133. – № 3. – P.250-260.
67. Carretto, E. *Bacillus cereus fatal bacteremia and apparent association with nosocomial transmission in an intensive care unit* / E. Carretto, D. Barbarini, F. Poletti // *Scand J Infect* – 2000. – №32: – P.98–100.
68. Chan, K.-Y. Inhibitory effect and differentiating capacities of selected dyes on bacteria / Kwong-Yu Chan, Kwai-Ming Ko // *Geobios.* – 1978. – V.5. – N 6. – P.241-250.
69. Clarenburg, A. *Bacillus cereus alsoorsaak van voedselvergiftiging* / A. Clarenburg, E. H. Kampelmacher // *Voeding.* – 1957. – №18, – P. 384.
70. Claus, D. *Genus Bacillus.* In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* / Claus, D., R.C.W. Berkeley, R.C.W. // Baltimore: Williams & Wilkins. – 1986. P. 1105-1139.
71. Cotton, D. J. Clinical features and therapeutic interventions in 17 cases of *Bacillus* bacteremia in an immunosuppressed patient population / D.J. Cotton, V.J. Gill, D.J. Marshall, J. Clin // *Microbiol.* – 1987. – №25. – P.672–674.
72. Darbar, A. *Necrotizing infection due to Bacillus cereus mimicking gas gangrene following penetrating trauma* / A. Darbar, I. A. Harris, I. B. Gosbell // *J. Orthop. Trauma.* – 2005. – №19. –P. 353–355.

73. Dierick, K. Fatal family outbreak of *Bacillus cereus*–associated food poisoning / K. Dierick, E.V. Coillie, I. Swiecicka // J Clin Microbiol. – 2005: – №43: –P. 4277–4279.

74. Dohmae, S. *Bacillus cereus* nosocomial infection from reused towels in Japan / S.Dohmae, T. Okubo, W. Higuchi, T. Takano, H. Isobe, T. Baranovich, S. Kobayashi, M. Uchiyama, T. Tanabe, M. Itoh, T. Yamamoto // J. Hosp.Infect. – 2008. –№ 69. – P.361–367.

75. Dominici, S. Identificazione rapida del *B. cereus* mediante immunofluorescenza / S. Dominici, K. Sarris, A. Morozzi, P.Cadaras // Atti. Soc. ital. sci. vet. – 1972. – V.25. – P.418-421.

76. Drobniewski, F. A. *Bacillus cereus* and Related Species / F. A. Drobniewski // Clin. Microbiol. – 1993. – Vol. 6. – P. 324–338.

77. Durand, M. Nutrition carbonée et étude taxonomique de *Bacillus subtilis* et *B. licheniformis* / M. Durand, F. Pichinoty, C. Job, M. Mandel // Microbiol. –1979. – V.24. – № 4. – P.491-498.

78. Edward, J. B. *Bacillus cereus*, a Volatile Human Pathogen / J. B. Edward // Clinical Microbiology. – 2010. –V. 23– P. 382–398.

79. Ezzell, J.W. Association of *Bacillus anthracis* capsule with lethal toxin during experimental infection / J.W. Ezzell, T.G. Abshire, R. Panchal, D. Chabot, S. Bavari, E.K. Leffel, B. Purcell, A.M. Friedlander, W.J. Ribot // J. Clin. Microbiol. – 1990. – V.28. –№ 2. – P.223-231.

80. Frankland, G.C. Studies on some new micro-organisms from air / G.C. Frankland, P.F. Frankland // Royal Society London, Philosophical Transactions, Series B, Biological Sciences. – 1887. –№178. – P. 257–287.

81. Funada, H. *Bacillus cereus* bacteremia in an adult with acute leukemia / H. Funada, C. Uotani, T. Machi // Jpn J Clin Oncol. – 1988. – 18. – P. 69–74.

82. Gaillard, S. Modelling combined effects of temperature and pH on the heat resistance of spores of *Bacillus cereus* / S. Gaillard, I. Lequerinel, P. Mafart // J. Food Sci. –1998. – V.63. – P.887-889.

83. Garry, P. Influence de la rugosité de surfaces en polyuréthane sur l'adhésion de *Bacillus subtilis* et de *Bacillus cereus* / P. Garry, L.Vendeuvre, M. Bellon-Fontaine // J. Dispers. Sci. and Technol. – 1998. –V.19. –P. 1175-1197.

84. Ghelardi, E. Swarming behavior of and hemolysin secretion by *Bacillus cereus* / E. Ghelardi, F. Celandroni, S. Salvetti, M. Ceragoli, D. J. Beecher, S. Senesi, A. C. L. Wong // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2007. – №73. – P.4089–4093.
85. Gibson, T. Genus *Bacillus* «Bergey's manual of determinative bacteriology» / T. Gibson, R.F. Gordon // Baltimore. – 1974. – P.529–550.
86. Glatz, B. Alteration of vascular permeability in rabbits by culture filtrates of *Bacillus cereus* and related species / B. Glatz, W. Spira, J. Goepfert // *Infect. and Immunol.* – 1974. – № 2. – P. 299–303.
87. Gordon, R. The genus *Bacillus* / R. Gordon // In *Handb. Microbiol. Cleveland (Ohio)*. – 1973. – V.1. – P.71–88.
88. Graham, K. Enzyme-linked lectinosorbent assay (ELLA) for detecting *Bacillus anthracis* / K. Graham, K. Keller, J. Ezzell, R. Doyle // *Eur. J. Clin. Microbiol.* – 1984. – V.3. – № 3. – P.210–212.
89. Han, C. S. Pathogenomic sequence Analysis of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* Isolates Closely Related to *Bacillus anthracis* / C. S. Han, G. Xie, J. F. Challacombe, M. R. Altherr, S. S. Bhotika, N. Brown, D. Bruce, C. S. Campbell, M. L. Campbell, J. Chen, O. Chertkov, C. Cleland // *Journal of Bacteriology*. – 2006. – V. 188(900). – P. 3382–3390.
90. Hauge, S. Food poisoning by aerobic spore-forming bacilli / S. Hauge // *J Appl Bact* – 1955. – №18.P –591 –595.
91. Heral, V. *Bacillus cereus* as a cause of alimentary intoxication / V. Heral // *Cesk Hyg.* – 1963 –№ 8. – P.303–307.
92. Ihde, D.C. Clinical spectrum of infection due to *Bacillus* species / D.C. Ihde, D.Armstrong // *Am J Med.* – 1973. – №55. – P.839–845.
93. Ivanovics, G. Structure of some *Bacillus cereus-thuringiensis* bacteriophages / G.Ivanovics // *J. Bacterid.* – 1963. – V.3. –№ 4. – P.56–59.
94. Ivanovics, G. Unter welchen Bedingungen werden bei der Nährboodenzuchtung der Milzbrandbazillen Kapseln gebildet / G.Ivanovics // *Zbl. Bakteriol.* . – 1958. – V.5. – № 1. – P.89–109.
95. Jonescu, C. Identification of *Bacillus subtilis* from milk / C. Jonescu // *Microbiologia, Parasitologia, Epidemiologia*. – 1966. – V.11. – N 5. – P.322–325.

96. Jonson, C. Lethal toxin of *Bacillus cereus* / Jonson C, Bonventre F // J. Bacterid. – 1967 – № 94. – P.306.

97. Jung, M.Y. *Bacillus manliponensis* sp. nov., a New Member of the *Bacillus cereus* Group Isolated from Foreshore Tidal Flat Sediment / Min Young Jung, Joong-Su Kim, Woon Kee Paek, Jeongheui Lim, Hansoo Lee, Pyoung Il Kim, Jin Yeul Ma, Wonyong Kim, Young-Hyo Chang // The Journal of Microbiology. – 2011. – V. 49, – №. 6. – P. 1027-1032.

98. Katznelson, H. Rapid phage plaque count method for the detection of bacteria as applied to the demonstration of internalug borne bacterial infections of seed / H. Katznelson, M. Sutton // J. Bact. –1951. – V. 61. –№ 1. – P. 689.

99. Klug, C. Combined effect of temperature a(W) and pH on proteases from *Pseudomonas* and *Bacillus* spp / C. Klug, K. Fehlhaber, U. Muller, P. Braim P. // Berlin und munch tierarztl Wochenschr. –1998. –V.3. – P.9 –12.

100. Knisely R.F. Elective medium for *Bacillus anthracis* / R.F. Knisely // J. Bact. – 1966. – V.92. – № 3. – P.784-786.

101. Kotiranta, A. Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections / A. Kotiranta, K. Lounatmaa, M. Haapasalo // Microbes Infect. – 2000. – №2. – P. 189–198.

102. Kramer, J. M. *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. Foodborne Bacterial Pathogens./ J.M. Kramer, R.J. Gilbert // Marcel Dekker. – 1989. – P. 21-70.

103. Kundrat, W. Zur Differenzierung aerober sporenbildner / W. Kundrat // Zbl. Veterinarmed. – 1963. – № 5. – P.418–426.

104. Lemille, F. Essai sur la classification biochimique de 97 *Bacillus* du groupe. /Lemille F., Barjac H., Bonnefoi A. // – I Ann. Inst. Past., 1969. – V.116. – N 6. – P.808-819.

105. Lott, G. Taxonomie und Bedeutung psychrotropher Keime / G. Lott // Arch. Lebensmittelhyg. – 1972. – 23. – № 12. – P.265-268.

106. Malkov, S.V. Capacity of *Bacillus mesentericus* for certain kinds of genetic exchange / S.V. Malkov, A.A. Prozorov // Genetika. 1983. № 19. P. 1091.

107. Mastroeni, P. Immunoelectrophoretic analysis of surface antigens in vegetative cells and spores of *Bacillus cereus* / P. Mastroeni,

A. Nacci, A. Misefari // G. bacteriol., virol. et immunol. – 1974. – V.67. – №7-12. – P.180-184.

108. Mazas, M. Effects of sporulation media and strain on thermal resistance of *Bacillus cereus* spores / M. Mazas, J. Gonzalez, R. M. Sarmiento // Int. J. Food Sci and Technol. – 1995. – V.30. – №1. – P.71-78.

109. Mc Clou, E.W. Studies on a lysogenic *Bacillus* strain. A bacteriophage specific for *Bacillus anthracis* / E.W. Mc Clou // J. Hyg. Camb. 1951. Vol.49. P.14–125.

110. Mercier, P. Bacteriologie du sperme frais de larin: Etude preliminaire / P. Mercier // Prod. anim. - 1990. - №3. - P.215–221.

111. Michanie S. / S. Michanie, F. L. Bryan, P. Alvarez, A. Barros Olivo, A. Paniagua // Int. J. Food Microbiol. – 1988. - V.7. - №2. - P. 123-134.

112. Michel, C. Diagnostic bacteriologique rapide de *Bacteridium anthracis* par immunofluorescence / C. Michel, A. Poussot, C. Chabassol // Bull. Acad. Vet. France. – 1973. – V.46. – № 8. – P.333-342.

113. Molska, I. Warunki rozwoju i proby eliminacji *Bacillus cereus* z mleka pasteryzowanego / I. Molska // Przen. spoz. – 1996. – V.50. – № 12. – P.13-15.

114. Mossel, D.A., Koopman. M.J., Jongerius. E. Enumeration of *Bacillus cereus* in foods / D.A. Mossel, M.J. Koopman, E. Jongerius // Applied Microbiology. – 1953. – № 15. – P. 650-653.

115. Motoi, N. *Bacillus cereus* infection of the meninges without inflammatory reaction in a patient with acute myelogenous leukemia: a case report / N. Motoi, T. Ishida, I. Nakano // Acta Neuropathol. – 1997. – № 93. – P. 301–305.

116. Musa, M.O. Fulminant septicaemic syndrome of *Bacillus cereus*: three case reports/ M. O. Musa, A.I. Douri, M. Khan, S. Shafi, T. Al Humaidh, A. Al Rasheed // J Infect. – 1999. – № 39. – P.154–156.

117. Nikodemusz, I. Enteropathogenic activity of *Bacillus cereus* in dogs / I. Nikodemusz // Zentralbl Bak I Abt Orig. – 1959. – 202. – P. 533-538.

118. Nikodemusz, I. The effect of long-term administration of foodstuffs contaminated by *Bacillus cereus* on cats / I. Nikodemusz, G. Gonda // Zentralbl Bak I Abt Orig – 1962. – №199. – P. 64-67.

119. Nikodémusz, I. Hygienisch-epidemiologische und bakteriologische Untersuchungen bei einer durch *Bacillus cereus* verursachten Lebensmittelvergiftung / I. Nikodémusz, D. Bouquet // *Medical microbiology and immunology*. – 1961. – V. 147. – № 4. – P. 327-335.

120. Nikodémusz, I. Sur les intoxications alimentaires provoquées par des agents pathogènes non spécifiques récemment découverts / I. Nikodémusz, K. Csaba // *Arch. Inst. Pasteur Tunis*. – 1960. – № 37. P. 363.

121. Nikodémusz, I. Die Bedeutung der aeroben Sporenbildner bei Lebensmittelvergiftungen / I. Nikodémusz, K. Csaba // *Z. Hyg. Infekt.* – 1960. – P.146 – 156.

122. Nikodemusz, I. *Bacillus cereus* als Ursache von Lebensmittelvergiftungen / I. Nikodémusz // *Z Hyg Infektionskr.* – 1958. – 145. P. 335-338.

123. Noriyasu, S. *Bacillus cereus* food poisoning / S. Noriyasu, K. Haruhiko, W. Toshniko, M. Takeshi, M. Tatsujir // *Applied Microbiology*. – 1998. – V.21. – N 4. – P.311-314.

124. Norma, L. Microbiologically safe foods / L. Norma, N.L. Heredia, N.I. Wesley. – Published by John Wiley Inc. New Jersey. – 2009. – P.672

125. Norris, J.R. The genera *Bacillus* and *Sporolactobacillus* /J.R. Norris, R.C.W. Berkeley, N.A. Logan, A.G. O'Donnell // *Identification of Bacteria*. 1981. – Vol. 2. – P. 1711-1742.

126. Ottow, J.C.G. Pectinolytic-, ureolytic- and lecithinolytic activity as a diagnostic aid in the identification of species classified in the genus *Bacillus cohn* / J.C.G. Ottow // *Zbl. Bakteriол.* – 1972, – V. 127. – № 4. – P.301-312.

127. Patra, G. Proceedings of the International Workshop on Anthrax / G. Patra, P. Sylvestre, V. Ramisse // *Medical Bulletin*. – 1996. – № 87. – P.45-46.

128. Pisu, I. Intossicazione alimentare del *Bacillus cereus* / I. Pisu, L. Stazzi // *Nuovi Ann.* – 1952. – № 14. – P.325-329.

129. Rajkovic, A. Influence of type of food on the kinetics and overall production of *Bacillus cereus* emetic toxin / A. Rajkovic, M.

Uyttendaele, S.A. Ombregt, E. Jaaskelainen, M. Salkinoja-Salonen, J. Debevere // J Food Prot. – 2006. – № 69. –P. 847–852.

130. Ramisse, V. Proceedings of the International Workshop on Anthrax / V. Ramisse, G. Patra, V. Vande-Lanthier // Medical Bulletin.– 1996. - № 87. – P.51.

131. Rasko, DA. Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms / D.A. Rasko, M.R. Altherr, C.S. Han, J. Ravel // FEMS Microbiol Rev. – 2005. – № 29. – P.303–329.

132. Renata, A.C. The occurrence of *B.cereus* fast foods / A.C. Renata, C. Teresa V. Francesco, M. Gtancarlo // Int. J. Food Sci. and Nutr. – 1998. -- V.49. – №4. –P.303-308.

133. Rhodehamel, E. J. In FDA Bacteriological Analytical Manual / E.J. Rhodehamel, S.M. Harmon. – International Organization for Standartization. – 2001. –P. 793.

134. Scallan, E. Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens / E. Scallan, R.M. Hoekstra, F.J. Angulo // Emerg Infect Dis. – 2011. – №17(7) –P. 15.

135. Schulten, S.M. Evaluation of the ISO 7932 standard for the enumeration of *Bacillus cereus* in foods / S.M. Schulten, P.H. Veld, N.J.D. Nagelkerke, S. Scotter, M.L. Buyser, P. Rollier // Int. J. Food. Microbiol. – 2000. – № 57. – P.53 - 63.

136. Sechter, I. Metodika de cercetare a prezentei bacilului tifs in materufacale ajutorole bacterofagului / I. Sechter // Academje RPSH Filialr Vasi Studii si cercetari Stintifie. Ann. – 1962. – №3 4. –V.4. –P.99.

137. Seidel, G. Uber Probleme der Bekampfung des Milzbrandes und der Differentialdiagnose des *Bacillus anthracis* / G. Seidel // Ztschr. F.d.g. Hyg. u. ihre Grenzgebiete. –1963. –№.9. –P. 688-700.

138. Seidel, G. Zur bakteriologischen und serologischen Diagnose des Milzbrandes / G. Seidel, R. Strassmann // Arch. Exe. Vet. Med. – 1956. – B. 10. –№.3. – P.325-327.

139. Seki, T. Deoxyribonucleic acid and homology and taxonomy of the genus *Bacillus* / T. Seki, C.-K. Chung, H. Milami, Y. Oshima // Int.J.Syst. Bacteriol. – 1978. – 28. – N 2. – P.182-186.

140. Smith, N.R. Aerobic sporeforming bacteria / N.R. Smith, R.E. Gordon, F.E. Clark // Washington: U.S. Dept. Agric. – 1952. – P.559.

141. Snezana, B. Biološki hazard - rezistencija na antibiotike mikroorganizama izolovanih iz namirnica / B. Snezana, M. Zora // Acta vet. – 1998. – V.48. – № 1. – P.59-68

142. Somerville, H.J. DNA competition studies within the *Bacillus cereus* group of bacilli / H.J. Somerville, M.L. Jones // J. Gen. Microbiol. – 1972. – V.73. – N 2. – P.257-265.

143. Spira, W. Biological characteristics of an enterotoxin produced by *Bacillus cereus* / W.M. Spira, J.M. Goepfert // J. Microbiol. – 1975. – № 8– P. 1236- 1246.

144. Stoeva, S. Primary structure of a zinc protease from *Bacillus mesentericus* strain 76 / S. Stoeva, T. Kleinschmidt, B. Mesrob, G. Braunitzer // Biochemistry. - 1990. - № 29. - P.527–534.

145. Suttle, C.A. Use of ultrafiltration to isolate viruses from seawater which are pathogens of marine phytoplankton. / C.A. Suttle, A. M. Chan // Appl Environ Microbiol. – 1991. – P. 721–726.

146. Tallent, S. M. Efficient Isolation and Identification of *Bacillus cereus* / S. M. Tallent, K. M. Kotewicz, E. A. Strain, R. W. Bennett, // Group Journal of AOAC International. – 2012. – Vol. 95. – №. 2. – P. 446-451.

147. Tarjan, R.: Die Situation und Aufgaben der Lebensmittelhygiene / R. Tarjan // Volksgesundheit Voeding. – 1959. – № 38. P. 30.

148. Temper, K. Exitus letalis nach Lebensmittelvergiftung durch *Bacillus cereus* / K. Temper // Z Gesamte Hyg Grenzgeb. – 1963. – № 9. – P. 481-490.

149. Tetart, F. Phylogeny of the major head tail genes of the wide-ranging. / F Tetart, C. Desplats, M. Kutateladze et al // J. Bacteriol 2001. 358–366.

150. Titball, R.W. The Monitoring and Detection of *Bacillus anthracis* in the Environment / R.W. Titball, P.C.B. Turnbull, R.A. Hutson // J. Appl. Bact. Symp. Suppl. – 1991. – V.70. – P.9-18.

151. Tuladhar, R. Refractory *Bacillus cereus* infection in a neonate / R. Tuladhar, S.K. Patole, T.H. Koh // Int J Clin Pract. – 2000. – № 54. – P.345–347.

152. Weber, D.J. Clinical significance of *Bacillus* species isolated from blood cultures / D.J. Weber, S.M. Saviteer, W.A. Rutala, C.A. Thomann // South Med J. – 1989. – № 82. P. 705–709.

153. Wijnands, L. Spores from mesophilic *Bacillus cereus* strains germinate better and grow faster in simulated gastro-intestinal conditions than spores from psychrotrophic strains / L. M. Wijnands, J. B. Dufrenne, M. H. Zwietering, F. M. Leusden // International Journal of Food Microbiology. – 2006. – V. 112. – Issue 2. P. 120-128.

154. Wildfuhr, G. Medizinische Mikrobiologie, Immunologic und Epidemiologic / G. Wildfuhr. – Leipzig. – 1959. – Bd 1. – P. 300.

155. Wolf, J. The genus *Bacillus*: aids to the identification of its species. The society for applied Bacteriology technical series N 2. / J. Wolf, A.N. Barker. – London: Identification methods for microbiologists, 1968. – P.92-109.

ПРИЛОЖЕНИЕ

РЕЦЕПТУРЫ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ *BACILLUS CEREUS*

Для выделения *Bacillus cereus* использовался ряд питательных сред: желточный агар среда Донован, среда Чистовича, среда Никодемуса, полимиксиновый агар, среда Моссея, желточно-солевой полимиксиновый агар с ТТХ, РЕМВА, селективная дифференциально-диагностическая среда с натрия фенолфталеинфосфатом.

Для изготовления указанных сред использовали следующие прописи.

Желточный агар: К 500 мл стерильного мясопептонного 2,0-2,5% агара, расплавленного, а затем охлажденного до 45-48 °С, прибавляют эмульсию яичных желтков (из расчета 2 желтка на 150 мл физ. раствора). Тщательно перемешивают и разливают по чашкам Петри. Среду ставят в термостат для подсушивания и проверки стерильности на 24 ч при 37 °С. Для проверки качества

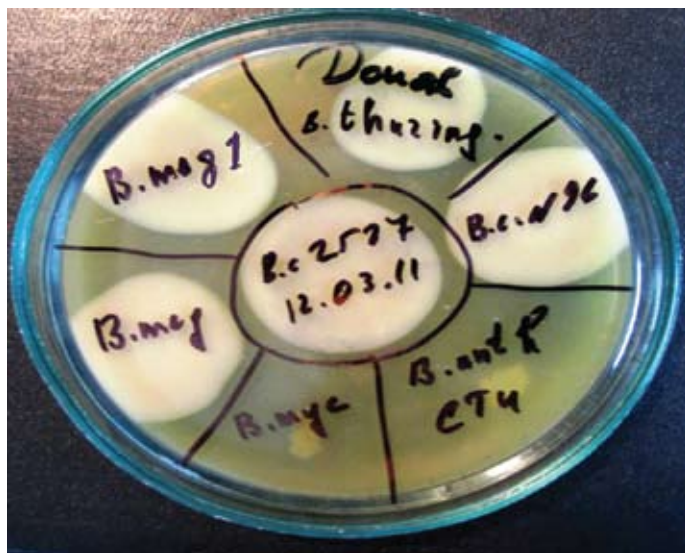


Рис. 49. Рост бактерий рода *Bacillus* на среде Донована

сред с желточной эмульсией, на одну из чашек точечно наносим штаммы *Bacillus cereus* с заведомо известной лецитиназной активностью, среда считается приготовленной правильно, если вокруг колоний через 24 часа инкубирования образуется зона белого равномерного коагулята.

Среда Донована. К 1000 мл расплавленного питательного или мясо-пептонного агара добавляют 2,5 г трехзамещенного цитрата натрия, 2,5 г хлористого лития, стерилизуют при 110 °С 30 мин, охлаждают до 45 - 48 °С, добавляют 200000 ЕД полимиксина и эмульсию двух желтков. Тщательно перемешивают и разливают в чашки Петри, для подсушивания и проверки стерильности среду ставят в термостат на 24 ч при 37 °С.

Среда Чистовича (желточно - солевой агар). Для изготовления ЖСА к стерильному, расплавленному и охлажденному до 45-48 °С МПА с 7,5- 10,0 % натрия хлорида добавляют 20 % по объему стерильной желточной эмульсии (из расчета 2 желтка на 150 мл физ. раствора). Среду быстро перемешивают и разливают в чашки Петри. Для подсушивания и проверки стерильности среду ставят в термостат на 24 ч при 37 °С.

Среда Никодемуса. К 500 мл стерильного агара, расплавленного, а затем охлажденного до 45-48 °С, прибавляют 40 мл этилового спирта и после перемешивания - эмульсию двух яичных желтков. Смесь тщательно перемешивают и разливают по чашкам Петри. Для подсушивания и проверки стерильности среду ставят в термостат на 24 ч при 37 °С.

Полимиксиновый агар. К 500 мл стерильного, расплавленного и затем охлажденного до 45-48 °С питательного 2 % агара прибавляют 200000 ЕД полимиксина и эмульсию двух яичных желтков. Смесь тщательно перемешивают и разливают по чашкам Петри. Для подсушивания и проверки стерильности среду ставят в термостат на 24 ч при 37 °С.

Среда Мосселя (модификация). К 500 мл питательного агара прибавляют 5 г маннита, 12,5 мг фенолового красного. Стерилизуют в автоклаве при 110 °С 30 минут. После охлаждения до 45-48 °С добавляют 100000 ЕД. (200 ЕД/мл) полимиксина и эмульсию

двух яичных желтков. Тщательно перемешивают и разливают по чашкам Петри.

РЕМВА (Bacillus-Cereus-Agar-Basis) – к 500 мл питательного агара прибавляют 5 г маннита, 6 мг бромтимолового синего, 5 г пирувата натрия, 1 г натрия хлорида и 1 г натрия гидрофосфат. Стерилизуют в автоклаве при 110 °С 30 минут. После охлаждения до 45-48 °С добавляют 100000 ЕД (200 ЕД/мл) полимиксина и эмульсию двух яичных желтков. Тщательно перемешивают и разливают по чашкам Петри.

Селективная дифференциально-диагностическая среда с натрия фенолфталеинфосфатом. В расплавленный питательный агар добавляют полимиксин сульфат М и триметоприм из расчета 25 мкг/мл, хорошо перемешивают. Перед розливом в чашки Петри в остуженную до 45-50 °С среду добавляют раствор натрия фенолфталеинфосфата, предварительно прогретого при 56 °С в течение 20 мин., до конечной концентрации 0,01 %. После перемешивания среду разливают в чашки Петри и подсушивают в течение 1,5 ч с открытыми крышками.

ИЗУЧЕНИЕ БИОХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ *BACILLUS CEREUS*

Изучение гемолитических и протеолитических свойств проводили на кровяном, желатиновом и молочном агаре

На кровяной агар точно, либо штрихом наносили штаммы *Bacillus cereus* с таким расчетом, чтобы на поверхности питательной среды образовались изолированные колонии. Бактерия *Bacillus cereus* чаще всего образуют β -гемолиз (вокруг колонии формируется четкая, прозрачная бесцветная зона, ширина которых зависит от гемолитической активности микроорганизма) уже в первые 18 часов, в отличие от других видов.

Определение фермента желатиназы проводили путем засева чистой культуры уколом в столбик застывшего желатина (обычно используют 12 %-ный раствор желатина в жидкой питательной среде). Засеянные пробирки, а также пробирки с незасеян-

ной желатиной инкубируют при температуре 25-30 °С. Опытные и контрольные пробирки охлаждают в холодильнике, после чего учитывают результат по «текучести» столбика желатина.

Гидролиз казеина определяют на плотных питательных средах. Основой служит питательная среда с двойной концентрацией агар-агара, к которой добавляют равный объем стерилизованного молока. Испытуемую культуру бактерий засевают штрихом в чашки Петри с питательной средой. Срок инкубации 14 дней. Перед учетом результатов поверхность среды заливают 10 % - ным раствором соляной кислоты. Положительный результат - просветление среды вокруг колоний.

Определение липазы. О наличии липазы судят по способности расщеплять твин-40 (эфирпальмитиновая кислота), твин-60 (эфирстеариновая кислота), гвин-80 (эфиролеиновая кислота). Испытуемую культуру бактерий засевают штрихом на агаровую среду с твином в чашках Петри, После инкубирования учитывают результат. Положительная реакция - помутнение среды вокруг колонии с образованием перламутрового налета на поверхности агара.

Для приготовления питательной среды твин-40, 60 или 80 стерилизуют автоклавированием при 121 °С 20 мин. Расплавленный питательный агар остужают до 45-50 °С, добавляют 1 % (по объему) твина. Среду тщательно перемешивают и разливают по чашкам Петри.

Выявление лецитиназы. Лецитиназа относится к группе ферментов фосфолипаз. Она способна расщеплять гидролизом лецитин.

Культуру бактерий засевают штрихом на желточный агар с целью получения изолированных колоний. После инкубирования учитывают результат. Положительная реакция - зона помутнения вокруг колоний. Было замечено, что лецитиназная активность выше в средах с повышенным содержанием хлорида натрия.

Оксидационно-ферментативный тест (тест Хью-Лейфсона). Данным тестом устанавливают, каким путем (окисление или ферментация) микроорганизм расщепляет тот или иной углевод

в нашем случае применяли глюкозу. В качестве индикатора использовали бромтимоловый синий. Готовая среда имеет зеленый цвет. При окислении меняет до желтого.

Перед посевом, для удаления кислорода, пробирки с полужидкой средой, углеводом и индикатором 15-20 мин кипятят в водяной бане. Затем охлаждают под струей холодной воды и сразу же две пробирки засевают уколом испытуемой культурой. В одну из пробирок после посева наливают стерильное вазелиновое масло слоем в 1 см (анаэробная пробирка). Обязательно наличие контрольной засеянной пробирки без углевода и незасеянной с углеводом. Результаты учитывают после инкубации по следующей схеме: если кислота не образуется в обеих пробирках, то микроорганизм не утилизирует данный углевод. Образование кислоты только в аэробной пробирке (без вазелинового масла) указывает на расщепление углевода путем окисления, а в анаэробной - брожения; если кислота образовалась в обеих пробирках, то микроорганизм способен расщеплять углевод путем брожения и окисления.

Тест Фогес - Проскауера. Этим тестом выявляют промежуточный продукт расщепления глюкозы - ацетоин (ацетилметил-карбинол).

Испытуемую культуру выращивают 4-5 сут на среде Кларка в двух пробирках. Одну пробирку культивируют при 37 °С, другую - при 25 °С. После окончания культивирования по 1 см³ культуры из обеих пробирок переносят в другие пробирки и добавляют 0,6 см³ 5 %-ного раствора альфа-нафтола, смесь перемешивают. Затем добавляют 0,2 см³ 40 %-ного водного раствора гидроксида калия (КОН), тщательно перемешивая, и инкубируют в наклонном положении 1 ч. Результаты учитывают через 15 и 60 мин. Положительная реакция - красное окрашивание среды.

Редукция нитратов. Бактерии рода *Bacillus* в частности *Bacillus cereus* могут восстанавливать нитраты до нитритов. Для подтверждения редукции нитратов проводят посевы в пробирки с нитратной средой (МПБ с добавлением 0,1 % KN_3 и 0,17 % агара). Посевы термостатируют при температуре $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ в

течение 24 ч, затем добавляют 0,2-0,5 см³ смеси равных объемов растворов А и Б.

Раствор А: N-(1-нафтил)-этилендиаминдигидрохлорид - 0,02 г, 1,5 н. раствор HCl - 100 см³. Растворяют при подогревании в вытяжном шкафу.

Раствор Б: сульфаниловая кислота - 1,0 г, 1,5 н. раствор HCl - 100 см³. Растворяют при осторожном подогревании/

Если в течение 15 мин не происходит покраснения, добавляют в посев немного порошкообразного цинка и выдерживают еще 10 мин. Если после добавления цинка среда краснеет, то редукция нитратов, вследствие отсутствия *Bacillus cereus*, не произошла и тест считают отрицательным. Если после добавления цинка среда не краснеет, то делают вывод о том, что редукция нитратов, вследствие присутствия *Bacillus cereus*, произошла.

Определение индола. Исследуемый микроорганизм для этой цели необходимо культивировать на плотной или жидкой питательной среде, богатой триптофаном (триптический перевар казеина, бульон Хоттингера, бульон с 0,1 % L-триптофана). После 18-24 часового культивирования на поверхность среды наносят 2-3 капли реактива Ковача, при наличии индола среда приобретает темно-фиолетовый цвет.

Гидролиз крахмала. Оптимальную для изучаемого микроорганизма агаровую питательную среду расплавляют, вносят 0,2 % растворимого крахмала, перемешивают, доводят до кипения, стерилизуют при 115 °С 10 мин. Испытуемую культуру засевают одним штрихом по диаметру чашки Петри и посевы инкубируют при оптимальной температуре. Затем на поверхность агара наливают раствор иода. Положительная реакция - вдоль штриха образуется бесцветная зона в результате расщепления крахмала. Среда не должна содержать глюкозу, так как бактерии в ее присутствии не утилизируют крахмал.

Определение уреазы. Использовали жидкую среду с мочевиной. Жидкая среда с мочевиной: пептон - 1 г, натрия хлорид - 5 г, KН₂PО₄ - 2 г, глюкоза - 1 г, 50 %-ный водный раствор мочевины - 40 см³, 0,2 %-ный водный раствор фенолового красного - 6

см³, вода дистиллированная- 1000 см³. В воде растворяют соли, пептон, кипятят 3 мин, затем добавляют глюкозу, устанавливая рН 6,8-6,9, вносят фенолрот, фильтруют и разливают по колбам, Стерилизуют при 115 °С 30 мин, добавляют до 2 % раствор мочевины и разливают готовую среду по пробиркам. Готовая среда лимонно-желтого цвета, при гидролизе мочевины приобретает красный цвет.

Определение сероводорода. Обнаружение сероводорода проводили на среде Клиглер. Агаровая среда Клиглер позволяет тестировать одновременно четыре признака: образование сероводорода, расщепление глюкозы и лактозы, а также образование газа. Готовая среда имеет красную окраску, прозрачна. При образовании сероводорода чернеет.

Каталазную активность тестируют непосредственно у выросших культур на средах. Для этого на поверхность культуры на скошенном агаре, или на колонии в чашке Петри, или на поверхность полужидкого агара наносят несколько капель 3 %-ной перекиси водорода. В бульонную культуру добавляют 0,5 мл 3 %-ной перекиси водорода. При наличии каталазы появляются пузырьки газа (атомарный кислород, отщепленный каталазой от перекиси водорода).

Определение оксидазы. Испытываемую культуру выращивают 18-20 ч на агаровой среде в чашке Петри. Поверхность среды заливают приготовленным перед употреблением 1 %ным водным раствором тетраметил-парафенилендиамина дигидрохлорида (или диметил-парафенилендиамина). Чашку наклоняют, чтобы раствор стек, и через 20-30 с учитывают результат. При наличии оксидазы колонии приобретают пурпурный цвет.

Определение фосфатазной активности. Испытуемую культуру засевают штрихом на поверхность питательного агара с натриевой солью дифосфата фенолфталеина в количестве содержания 0,01 % от объема среды. Посевы культивируют 1-3 сут. Затем, перевернув чашки Петри крышкой вниз, на внутреннюю поверхность помещают каплю 28-30 % нашатырного спирта. При наличии фосфатазы колонии приобретают красный цвет.

Обнаружение гидролиза ДНК. Испытуемую культуру засевают штрихом на агаровую среду с ДНК и толуидиновым синим или метиловым зеленым с таким расчетом, чтобы получить рост изолированных колоний. Посевы инкубируют в термостате и учитывают результат. Положительная реакция на среде с толуидиновым синим - розовая зона, с метиленовым зеленым - бесцветная зона вокруг колоний.

Утилизация натрия цитрата. Для данной цели используют нитратный агар Симмонса и Кристенсена. По причине, что не все бактерии растут на среде Симмонса, рекомендуем использовать среду Кристенсена. Готовая среда имеет оранжево-красную окраску. Учет результатов производим через 24-48 ч культивирования при 37 °С появление светло-вишневого окрашивания свидетельствует об утилизации цитрата.

Выявление лизин-, орнитиндекарбоксилаз и аргининдегидролазы. Испытуемую культуру бактерий засевают в бульон Меллера с той или иной аминокислотой. После посева в пробирки наливают стерильное вазелиновое масло до образования слоя толщиной 1 см. Пробирки инкубируют при 37-38 °С в течение 4 сут. Исходный цвет среды розовый, положительная реакция - фиолетовое окрашивание, слабая положительная - голубовато-серое.

Выявление фенилаланиндезаминазы. Метод основан на выявлении фенилпировиноградной кислоты, образующейся из фенилаланина, при помощи специального реактива, вызывающего образование соединения зеленого цвета.

Испытуемую культуру засевают в пробирки на скошенный агар с фенилаланином, инкубируют при 37-38 °С. На поверхность среды наносят 5 капель 10 %-ного водного раствора железа (III) хлорида (FeCl_3). В положительном случае наблюдается зеленое окрашивание среды.

Среда с фенилаланином: дрожжевой экстракт (сухой) - 3 г (жидкий - 100 см³), NaCl - 5 г, Na_2HPO_4 - 1 г, L-фенилаланин - 1 г (DL-форма - 2 г), агар - 12 г, вода дистиллированная - 1000 см³. Смешивают воду и дрожжевой экстракт, нагревают, затем поочередно добавляют компоненты и кипятят до расплавления агара, pH среды должен быть 7,0 - 7,2. Горячую среду фильтруют, разливают по 2-3

см³ в пробирки, стерилизуют 30 мин при 112 °С и скашивают. Готовая среда бесцветная.

Определение триптофандезаминазы. В 0,2-0,5 см³ 0,2 %-ного водного раствора DL-триптофана (рН 6,7-6,9) суспендируют бактериальную массу испытуемой культуры (колонии). Через 30 мин инкубации добавляют 1 каплю 10 %-ной соляной кислоты и 1 каплю 10 %ного раствора FeCl₃. Результат учитывают через 5 мин. Положительная реакция - красный цвет среды.

Расщепление тирозина. Для этого производят посев культуры на простой питательный агар с 0,1 % тирозина с инкубацией в течение суток при 37 °С. При расщеплении тирозина среда окрашивается в желто-коричневый цвет.

Определения гидролиза эскулина определяли на среде с добавлением эскулина. Положительным результатом считается появление черного окрашивания вокруг колоний.

Образование кислоты и газов при расщеплении углеводов. В состав углеводных сред, применяемых для дифференциации бактерий, применяли различные соединения: моносахариды, полисахариды, многоатомные спирты. Все перечисленные углеводы в лабораторной практике нередко условно обозначают одним термином «сахара». Перечень используемых углеводов, отражены в таблице 7.

Наиболее часто с этой целью используют следующие растворы индикаторов: индикатор Андреде, розоловая кислота, бромтимоловый синий, феноловый красный, бромкрезоловый пурпурный. В нашем случае применялись как коммерческие готовые среды, так и составные.

Таблица 7 - Углеводы (Сидоров М.А., 1995г.)

Химическая группа	Наименование
Пентозы	Арабиноза(L+) Ксилоза (древесный сахар) Рамноза (изодульцит)
Гексозы	Глюкоза (декстроза) Фруктоза (левулеза) Галактоза Манноза Сорбоза Сорбит
Дисахариды	Лактоза (молочный сахар) Мальтоза (солодовый сахар) Сахароза (тростниковый сахар) Мелибиоза Трегалоза (грибной сахар) Целлобиоза
Трисахариды	Раффиноза Мелицитоза
Полисахариды	Гликоген (животный сахар) Крахмал Инулин
Гликозиды	Эксулин Салицин Амигдалин Арбутин
Спирты: Трехатомные четыреатомные пятиатомные шестиатомные	Глицерин Эритрит Адонит Дульцит Маннит Сорбит
Не углеводные	Инозит

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	3
Глава I Обзор литературы	6
1.1. Систематика и идентификация бактерий рода <i>Bacillus</i> ...	6
1.2. Бактерии рода <i>Bacillus</i> , обнаруживаемые в пищевых продуктах.	16
1.3. Этиологическая роль <i>Bacillus cereus</i> в патологии человека	21
1.4. Изучение вирулентности бактерий <i>Bacillus cereus</i>	30
Глава II Изучение биологических свойств <i>Bacillus cereus</i>	35
2.1. Тинкториальные свойства <i>Bacillus cereus</i>	35
2.2. Изучение культуральных свойств <i>Bacillus cereus</i>	37
2.3. Изучение биохимических свойств <i>Bacillus cereus</i>	43
2.4. Выделение и идентификация бактерий <i>Bacillus cereus</i> ...	51
2.5. Оптимизация схемы выделения <i>Bacillus cereus</i>	62
Заключение	70
Список литературных источников.	73
Приложение.	88

Васильев Дмитрий Аркадьевич,
Калдыркаев Андрей Иванович
Феоктистова Наталья Александровна,
Алёшкин Андрей Владимирович

ИДЕНТИФИКАЦИЯ БАКТЕРИЙ *BACILLUS CEREUS*
НА ОСНОВЕ ИХ ФЕНОТИПИЧЕСКОЙ
ХАРАКТЕРИСТИКИ