

УДК 579.8

ИЗУЧЕНИЕ ВИРУЛЕНТНЫХ ФАКТОРОВ ПАТОГЕННОСТИ БАКТЕРИИ *BACILLUS CEREUS*

**Калдыркаева З.С., магистр 2 курса факультета ветеринарной
медицины и биотехнологии, zgoiyakevich@mail.ru
Научный руководитель – Калдыркаев А.И., кандидат
биологических наук, доцент
ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ**

Ключевые слова: *Bacillus*, *Bacillus cereus*, капсула, гемолиз, лецитиназа.

В работе описано выявление гемолиза, лецитиназы и капсулы *in vitro* у референс и полевых штаммов *Bacillus cereus*, а также бактерий видов *Bacillus mycoides*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus mesentericus*, *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*.

Различные виды спорообразующих бактерий рода *Bacillus* широко распространены в окружающей среде и нередко рассматривались как возбудители разнообразных видов порчи пищевых продуктов [5, 6, 7, 8, 9].

К основным факторам патогенности рода *Bacillus* относят способность микроорганизмов образовывать капсулу, образовывать гемолизины и лецитиназу. В настоящее время методы дифференциации бактерий рода *Bacillus* основаны на ряде признаков, и одним из критериев отличия считают процесс образования капсулы [4]. Долгое время считали, что бактерии *Bacillus cereus* и *Bacillus thuringiensis* не продуцируют капсулу, в отличие от бактерий *Bacillus anthracis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus licheniformis*, имеющих капсулу, содержащую поли- γ -D-глутаминовую кислоту, и *Bacillus mycoides*, *Bacillus circulans*, *Bacillus pumilus*, продуцирующих полисахаридную капсулу [1, 2, 3]. A.R. Hoffmaster, J.J. Ravel J, et al. (2004) исследовал 45 штаммов *Bacillus cereus* выделенных в США в период с 1954 по 2000 г., от людей с различным заболеванием (гнойно-воспалительные и респираторные инфекции, пищевых токсикоинфекции). Было установлено, что бактерии *Bacillus cereus* содержат сходные кольцевые плазмиды - pBCXO1, отвечающие за токсинообразование на 99,6% сходные с плазмидой *Bacillus anthracis* - pXO1, отвечающей за кодирование токсина. Гомологов плазмиды *Bacillus anthracis* - pXO2, отвечающей за капсулообразование не найдено. Но была выявлена ранее неизвестная плаزمида pBC218, отвечающая, по мнению исследователей, за образование полисахаридной капсулы

Bacillus cereus. Кроме того, 1 из 4 штаммов *Bacillus cereus*, образующих капсулу был возбудителем пневмонии с летальным исходом [2, 4].

Лизис эритроцитов или гемолиз (рис.1), который является характерным признаком *B.cereus* и широко используется исследователями в качестве фенотипического признака при анализе цитолитических токсинов. Гемолитическая активность различных штаммов *B.cereus* отличается как по количественными, так и качественными характеристиками. Гемолитическая активность определяется в основном цереолизином АВ и гемолизином BL [10].

Образование лецитиназы как биохимическое свойство было показано у многих видов бактерий *in vitro*. Лецитиназная активность *B. cereus* является важным биохимическим признаком используемый при дифференциации бактерий. На желточно-солевом агаре с полимиксином (рис.3) *B. cereus* образует восковидные колонии с изрезанными краями, окруженные радужным венчиком (положительная проба на лецитиназу).

В связи с этим нами была поставлена цель, провести эксперимент по выявлению капсулы *in vitro* у референс и плевых штаммов *Bacillus cereus*, а также бактерий видов *Bacillus mycoides*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus mesentericus*, *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*.

Материалы для исследования. Референс-штаммы *Bacillus cereus* №96, №8035, №2527, 42 полевых штамма *Bacillus cereus*, выделенных из проб почвы и пищевых продуктов, *Bacillus mycoides* №537, *Bacillus subtilis* №6633, *Bacillus megaterium* №182, *Bacillus mesentericus* №66, *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*, полученные из музея кафедры микробиологии ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ. Для получения капсул использовали питательный агар с добавлением 1% бикарбоната натрия и 12% крови барана обработанной антикоагулянтом - гепарином. Культивирование проводили при 36 °С в эксикаторе с содержанием CO₂ 15-20 %. Просматривали посева через 18-24 ч. При учете результатов все культуры имели нестандартную переходную S-R форму (рис.1), слизистых колоний не наблюдалось. Мазки окрашивали по Бурри-Гинсу (рис.2). Микроскопическая картина: фон черный, клетки бактерий красные, капсулы неокрашенные (красители не воспринимают).

В результате проведенных исследований было установлено, что бактерии *Bacillus cereus* №96, №8035, №2527 и 42 полевых штамма *Bacillus cereus*, выделенных из проб почвы и пищевых продуктов имеют явно выраженную капсулу. Описание инкапсулирующих свойств штаммов *Bacillus cereus* показывает, что классическая система типирования *Bacillus cereus*, не всегда может быть достоверной. Следует обратить внимание на неточ-



Рисунок 1 - Культуры рода *Bacillus* на 1% бикарбонатном кровяном агаре

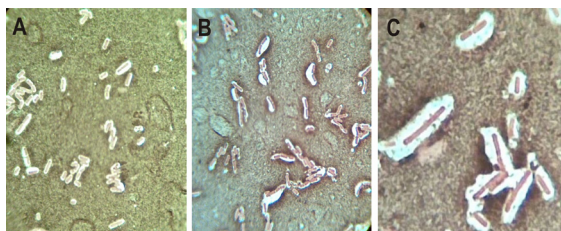


Рисунок 2 - Окраска капсулы по Бурри-Гинсу: *Bacillus cereus* № 8035 (А), *Bacillus cereus* № 96 (В) и *Bacillus cereus* № 7 (С)

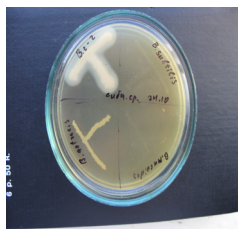


Рисунок 3 - Лецитиназная активность *B. cereus*

ность диагностики исключительно по одному или нескольким фенотипическим признакам. Бактерии *Bacillus subtilis* №6633, *Bacillus mesentericus* №66, *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*, полученные из музея НИИЦМиБ ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ также имели капсулу, четко окрашиваемую по методике Бурри-Гинсу. Однако, у штаммов бактерий *Bacillus mycoides* №537, *Bacillus megaterium* №182 не было выявлено капсул.

Гемолитические и лецитиназные свойства стабильно проявляются у всех штаммов *B. cereus*. Внутри рода гемолиз и лецитиназная активность сильно варьирует.

С учетом вышесказанного, при идентификации штаммов рода *Bacillus*, характеристику каждому выделенному изоляту, необходимо давать с использованием максимального числа дифференциальных тестов.

Библиографический список:

1. Comparative analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and related species on the basis of reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA / C. Ash, J. A. Farrow, M. Dorsch [et al.] // *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1991. V. 41. P. 343-346.
2. Capsule Production in *Bacillus cereus* Strains Associated with Severe Pneumonia / D. Sue, Al. Hoffmaster, T. Popovic, P. Wilkins // *J. Clin. Microbiol.* 2006. V. 44(9). P. 3426–3428.
3. Homoduplex and heteroduplex polymorphisms of the amplified ribosomal 16S-23S internal transcribed spacers describe genetic relationships in the «*Bacillus cereus* group» / D. Daffonchio, A. Cherif, S. Borin // *Environ. Microbiol.* 2000. V.4. P. 23.
4. Калдыркаева З.С. Изучение гемолиза и капсулообразования у бактерий рода *Bacillus* / З.С. Калдыркаева, Д.А. Васильев // АГРАРНАЯ НАУКА И ОБРАЗОВАНИЕ НА СОВРЕМЕННОМ ЭТАПЕ РАЗВИТИЯ: ОПЫТ, ПРОБЛЕМЫ И ПУТИ ИХ РЕШЕНИЯ: материалы IX Международной научно-практической конференции, посвященной 75-летию Ульяновского государственного аграрного университета имени П.А. Столыпина. 2018. С. 55-58.
5. Калдыркаев, А.И. Изучение литической активности фагов *Bacillus cereus* при хранении / А.И.Калдыркаев, З.С.Голякевич, А.С. Гранкина, Д.А.Васильев // АГРАРНАЯ НАУКА И ОБРАЗОВАНИЕ НА СОВРЕМЕННОМ ЭТАПЕ РАЗВИТИЯ: ОПЫТ, ПРОБЛЕМЫ И ПУТИ ИХ РЕШЕНИЯ: материалы VIII международной научно-практической конференции. 2017. С. 208-211.
6. Васильев, Д.А. Характеристика биологических свойств бактериофагов вида *Bacillus subtilis* / Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин, И.Н. Хайруллин, Н.А. Феоктистова, А.И. Калдыркаев, М.А. Юдина, А.Х. Мустафин // *Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии.* – 2011. – № 1. – С. 79-83.
7. Васильев, Д.А. Биоиндикация бактерий *Bacillus mycoides* в объектах санитарного надзора / Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин, Н.А. Феоктистова, М.А. Лыдина, А.И. Калдыркаев, В.А. Макеев, И.Г. Швиденко // *Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии.* – 2013. – № 3 (23). – С. 52-56.
8. Феоктистова, Н.А. Распространение *Bacillus cereus* и *Bacillus mycoides* в объектах санитарного надзора / Н.А. Феоктистова, А.И. Калдыркаев, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин // *Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии.* – 2014. – № 1 (25). – С. 68-76.
9. Голякевич, З.С. Разработка защитной среды (стабилизатора) для лиофилизации бактерий / З.С. Голякевич // *Актуальные проблемы инфекционной патологии и биотехнологии: материалы X-й Международной студенческой*

- научной конференции. 2017. С. 18-21.
10. Холодков О.А. Действие гемолизина II *Bacillus cereus* на клетки гепатоцитов / О. А. Холодков, Ж. И. Бударина, Ж. И. Андреева-Ковалевская, А. В. Сиунов, А. С. Солонин // ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ. 2015. том 51. № 2. с. 258–267.
 11. Разработка системы ПЦР для идентификации бактериофагов *Proteus* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Enterobacter* spp/ А.В. Мاستиленко, Е.В. Сульдина, Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев //Вестник ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. 2018. №2(42). с.187-192.
 12. Молекулярно-генетическая характеристика бактериофага *Bacillus cereus* FBC - 28 УГСХА/ Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев, А.В. Мاستиленко, Е.В. Сульдина //Вестник ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. 2018. №2(42). с.216-222.
 13. Феоктистова Н.А. Подбор специфических праймеров на основе гена 16s рРНК для бактерий «группы *Bacillus cereus*»/ Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев, А.В. Мاستиленко //Вестник ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. 2018. №3(43). с.196-201.
 14. Мاستиленко А.В. Изучение биологических свойств бактерий видов *B. petrii* и *B. trematum*/ А.В. Мاستиленко, А.А. Ломакин, К.Н. Пронин //Вестник ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. 2018. №3(43). с.160-165.
 15. Феоктистова Н.А. Результаты протеомного анализа бактериофага *Bacillus cereus* FBC – 28 УГСХА/ Н.А. Феоктистова, С.В. Мерчина, А.В. Мاستиленко // Вестник ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. 2018. №4(44). с.216-221.
 16. Климентова Е.Г. Фенотипические признаки патогенности у бактерий, выделенных из кишечника животных с экспериментальным дисбактериозом, вызванным применением δ -эндотоксинов *Bacillus thuringiensis*/ Е.Г. Климентова, Е.В. Рассадина, Н.А. Феоктистова //Вестник ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. 2017. №2(38). с.80-84.

STUDY OF HAEMOLYSIS AND CAPSULE FORMATION IN BACILLUS BACTERIA

Kaldyrkaeva Z.S.

Key words: *Bacillus*, *Bacillus cereus*, capsule, hemolysis, lecithinase.

The work is devoted to the identification of hemolysis, lecithinase and a capsule in vitro in the reference and field strains of Bacillus cereus, as well as bacteria of the species Bacillus mycoides, Bacillus subtilis, Bacillus megaterium, Bacillus mesentericus, Bacillus thuringiensis var. kurstaki.