

РАЗРАБОТКА И АПРОБАЦИЯ БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОЙ СХЕМЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ БАКТЕРИЙ *VACILLUS CEREOUS*

Феоктистова Наталья Александровна, кандидат биологических наук, доцент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ

432017, г. Ульяновск, бульвар Новый Венец, 1; 8(8422)55-95-47

e-mail: feokna@yandex.ru

Ключевые слова: *Vacillus cereus*, бактериологическая схема, признак, тест, идентификация, бактерии, проба

В статье представлены результаты разработки бактериологической схемы выделения из объектов ветеринарно-санитарного надзора и идентификации бактерий *Vacillus cereus* как части комплексной тест-системы по индикации и идентификации зооантропозначимых бактерий группы «*Vacillus cereus*». Модельными микроорганизмами для подбора параметров исследований и бактериологических тестов были референс-штаммы *Vacillus cereus* 8035, *Vacillus cereus* 2527, *Vacillus cereus* ATCC 14579. На основании анализа следующих признаков: форма эндоспоры, растяжение вегетативной клетки спорой, способности к движению и образованию пигмента, роста в аэробных и анаэробных условиях, наличие фермента каталазы, биохимической активности и наличию факторов патогенности, выделенные нами 102 штамма бактерии были отнесены к первой морфологической группе по Gordon (1973), к группе «*Vacillus cereus*» по «*Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*» (2015) и типированы как представители вида *Vacillus cereus*. В течение 216 часов (9 дней), применяя разработанную нами схему выделения и бактериологической идентификации бактерий *Vacillus cereus*, можно на основании 44 тестов типировать вышеуказанные бактерии. Из 536 проб объектов ветеринарно-санитарного надзора и окружающей среды (210 проб почвы, 67 - вода открытых водоемов, сточные воды, 46 - корма растительного происхождения для с/х животных, 90 - пряности и приправы, 67 - молоко и молочная продукция, 56 - мясо и мясная продукция) было выделено 398 штаммов, которые были отнесены к роду *Vacillus* и 102 – к виду *Vacillus cereus*.

Введение

По литературным данным, разграничение видов внутри рода *Vacillus* иногда представляется достаточно сложным. В частности трудно дифференцировать представителей группы «*Vacillus cereus*», среди которых наиболее часто встречаются возбудители заболеваний человека и животных. Морфологические свойства этих микроорганизмов не являются критерием для их разграничения, а, наоборот, позволяют объединить их в одну группу [1-2]. Физиолого-биохимические признаки, по которым принято дифференцировать виды этой группы часто изменчивы и ненадежны. Поэтому, пользуясь традиционными методами идентификации, исследователи далеко не всегда могут точно определить видовую принадлежность изолируемых бактерий рода *Vacillus* [3-4]. Современные методы молекулярно-генетических исследований получили широкое распространение при идентификации бацилл, однако они требуют значительных материальных и временных затрат и неприемлемы для быстрой идентификации бактерий [5-7].

По мнению некоторых исследователей, представители группы *Vacillus cereus*, *Vacillus anthracis* *Vacillus cereus* *Vacillus thuringiensis* в действительности являются патоварами (патогенны-

ми вариантами) единственного вида, и все же филогенетическое и фенетическое разграничение этой группы, вероятно, поддерживает генетический статус [8-9]. Внутреннее разграничение различных 16S рРНК групп внутри рода *Vacillus* в настоящее время далеко не ясно. Многие из его вида распадаются на несколько очевидно четких групп рРНК последовательности, таких как «*Bacillus subtilis* группа», «*Vacillus cereus* группа» и «*Bacillus sphaericus* группа», но хотя такие разделения могут также быть фенотипически отличимыми, промежуточные организмы могут сделать удовлетворительное подразделение сложным [10-12].

Цель работы - разработать бактериологическую схему выделения из объектов ветеринарно-санитарного надзора и идентификации бактерий *Vacillus cereus* как части комплексной тест-системы по индикации и идентификации зооантропозначимых бактерий группы «*Vacillus cereus*».

Объекты и методы исследований

Для разработки бактериологической схемы как части комплексной тест-системы по индикации и идентификации зооантропозначимых бактерий группы «*Vacillus cereus*» нами был использован ГОСТ 10444.8-2013 (ISO 7932:2004) Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных Горизонтальный метод подсчета презумптивных бактерий *Vacillus cereus*. Метод подсчета колоний

при температуре 36 ± 1 °C [13]. Термин «презуптивный» в данном НТД определяет рекомендуемую методику как метод, не предусматривающий дифференциацию *B. cereus* от других представителей группы «*Bacillus cereus*». В качестве дополнительных тестовых компонентов разрабатываемого алгоритма идентификации нами были использованы данные, представленные в справочнике «Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria» (2015) [14].

Модельными микроорганизмами для подбора параметров исследований и бактериологических тестов были референс-штаммы *Bacillus cereus* 8035, *Bacillus cereus* 2527, *Bacillus cereus* ATCC 14579.

В исследованиях было использовано 536 проб объектов ветеринарно-санитарного надзора и окружающей среды, из которых 210 проб почвы, 67 - вода открытых водоемов, сточные воды, 46 - корма растительного происхождения для с/х животных, 90 - пряности и приправы, 67 - молоко и молочная продукция, 56 - мясо и мясная продукция.

Питательные среды: питательный бульон ТУ 10-02-02-789-176-94 (ООО «БиоКомпас-С», РФ), эмульсия яичного желтка («HiMedia», Индия), среда Мосселя (МYP-агар) (ФБУН ГНЦ ПМБ, РФ); среда РЕМВА (ООО «Ростехнохим», РФ), среда Донована (НПЦ «Биокомпас-С», РФ), желточный агар с хлористым натрием, полимиксином В и 2,3,5-трифенилтетразолиум хлоридом («HiMedia», Индия); питательный агар для культивирования микроорганизмов сухой (ГРМ-агар) ТУ 9398-020-78095326-2006 (ФБУН ГНЦ ПМБ, РФ); Микро-ГРАМ-НИЦФ набор реагентов для окраски микроорганизмов по методу Грама ТУ 9398-002-39484474-2002 (ЗАО НИЦФ, РФ); дифференциально-диагностическая среда для выявления и культивирования сибиреязвенного микроба с фенолфталеинфосфатом натрия (ФБУН ГНЦ ПМБ, РФ); среда Гисса с бромкрезоловым пурпурным, с арабинозой (ООО «Биотехновация», РФ); среда Гисса с индикатором ВР, с глюкозой (ООО «Биотехновация», РФ); агар маннито-солевой (среда № 10) (Conda, Испания), среда Гисса с маннозой БТН (ООО «Биотехновация», РФ), среда Гисса с салицином («HiMedia», Индия), среда Гисса с ксилозой («HiMedia», Индия), среда Гисса с лактозой («HiMedia», Индия), среда Гисса с мальтозой («HiMedia», Индия), среда Гисса с рамнозой («HiMedia», Индия), среда Гисса с сорбитом («HiMedia», Индия), среда Гисса с галактозой БНТ (ООО «Биотехновация», РФ), среда Гисса с раффинозой БНТ (ООО «Биотехновация», РФ), среда Кларка (ООО «БиоКомпас-С», РФ), Urea Agar Base (Christensen) Основа уреазного агара (по

Кристенсену) («HiMedia», Индия), Urea 40% Мочевина 40 % раствор («HiMedia», Индия); нитратный агар («HiMedia», Индия); среда № 7 ISP тирозинный агар («HiMedia», Индия); Corn Meal Peptone Yeast Agar Пептонно-дрожжевой агар («HiMedia», Индия); цитратный агар Симмонса (ФГУП «НПО Микроген», РФ); Arginine Dihydrolase Broth Аргининовый бульон («HiMedia», Индия); Blood Agar Base Основа кровяного агара («HiMedia», Индия); Nutrient Gelatin Питательный желатин («HiMedia», Индия).

Реактивы: сульфаниловая кислота, альфа-нафтиламиноновый реактив, уксусная кислота, молоко цельное; 0,6 % спиртовой раствор α -нафтола, йод кристаллический CAS 7553-56-2 (Производство Чили), перекись водорода 3 % (ООО Росбио), водный раствор малахитовой зелени, 0,25%-ный водный раствор основного фуксина; Натрий хлористый (хч) (АО ЛенРеактив, РФ). Картофель; стерильная дефибрированная кровь барана, яйцо куриное диетическое.

Результаты исследований

При разработке схемы выделения и бактериологической идентификации микроорганизмов чрезвычайно важно подобрать селективную среду, характерный рост на которой мог бы стать первичным дифференциальным показателем. С этой целью нами был проанализирован рост бактерий *Bacillus cereus* на следующих средах: мясо-пептонный агар, мясо-пептонный бульон, дифференциально-диагностическая среда для выявления и культивирования сибиреязвенного микроба с фенолфталеинфосфатом натрия; желточный агар с хлористым натрием, полимиксином В и 2,3,5-трифенилтетразолиум хлоридом; агар с яичным желтком; модифицированная среда Донована; среде Мосселя (МYP-агар); среде РЕМВА.

На МПА *Bacillus cereus* образовывали «восковидные» серо-белые распластанные колонии с неровными краями, имеющими зернистую структуру размером примерно 5-10 мм, через 48 часов культивирования колонии увеличивались в диаметре до 15-20 мм.

При росте *Bacillus cereus* в МПБ в течение 18-24 часов проходят несколько стадий развития, которые визуально можно дифференцировать следующим образом: активное помутнение среды, последующее просветление и образование пленки, которая легко разбивается при встряхивании пробирки, оставляя на стенках пристеночное кольцо и ложась на дно, образует тем самым осадок. После чего в течение 7 ± 1 часов при температуре 36 ± 1 °C пленка образуется вторично. На селективных и дифференциально-диагностических средах



Рис. 1 - Бактерии *Bacillus cereus* 8035 на среде Моссея (МYP-агар) (18 часов культивирования в термостате при температуре 36 ± 1 °C)

для *Bacillus cereus*, содержащих ингибирующие рост неспецифичной микрофлоры, компонентов: натрия хлорида, лития хлорида, 2,3,5-трифенилтетразолиум хлорида (ТТХ), этанола, полимиксина В, референс-штаммы *Bacillus cereus* 8035, *Bacillus cereus* 2527, *Bacillus cereus* ATCC 14579 показали активный рост колоний.

На дифференциально-диагностической среде для выявления и культивирования сибиреязвенного микроба с фенолфталеинфосфатом натрия, бактерии *Bacillus cereus* растут в виде распластанных матовых колоний диаметром 1-1,5 см. При взаимодействии с парами аммиака *Bacillus cereus* и другие спорообразующие сапрофиты приобретают розовый или красный цвет, колонии же *Bacillus anthracis* не изменяют своего цвета, либо слабо розовеют. На желточном агаре с хлористым натрием, полимиксином В и 2,3,5-трифенилтетразолиум хлоридом (ГОСТ 10444.8-88) колонии круглые, блестящие, красные, диаметром около 5,0-15,0 мм с зоной белого преципитата диаметром около 10-30,0 мм. Рост на агаре с яичным желтком рост колоний *Bacillus cereus* характеризовался крупными белыми колониями со слегка изрезанными краями, окруженными зоной матового коагулята. На модифицированной среде Донована (селективный агент хлорид лития) бактерии *Bacillus cereus* формировали белые округлые колонии со слегка изрезанными краями, окруженные зоной белого матового коагулята. Рост *Bacillus cereus* на среде Моссея (МYP-агар) проявляется в образовании распластанных зернистых колоний розового цвета (вследствие отсутствия способности ферментировать маннит), окруженных зоной коагулята розового цвета; среда бесцветная или со слабо-розовой окраской (рис.1).

В качестве селективной среды использовали *Cereus Selective Agar* (МYP-агар), которая, на

наш взгляд, адаптирована к особенностям бактерий *B. cereus*:

1) бактерии *Bacillus cereus* – маннит-отрицательный. Присутствие маннита в среде позволяет выявлять маннит-положительные микроорганизмы. Цвет среды при этом становится желтым (индикатор феноловый красный).

2) бактерии *Bacillus cereus* устойчивы к полимиксину, который способствует подавлению роста сопутствующей микрофлоры.

Бактерии *Bacillus cereus* образуют на МYP-агар сухие шершавые колонии с красным или розовым основанием, окруженные кольцом плотного преципитата (рис. 1). Колонии, окруженные желтой или прозрачной зоной, не принадлежат к *Bacillus cereus*.

День первый. Пробоподготовка осуществлялась следующим образом: объект исследования твердой консистенции гомогенизировали, далее 1 г вносили в пробирку с 9 мл МПБ и ставили в термостат ($t = 36 \pm 1$ °C) на 20 ± 4 часа для подрашивания. Объекты исследований жидкой консистенции в объеме 1 мл вносили с пробирки с 9 мл МПБ и термостатировали при выше обозначенных параметрах. Этап подрашивания вводился нами с целью перевода спорных клеток в вегетативное состояние.

Второй день. Для изучения каждого образца брали по 3 чашки с МYP-агаром и вносили в каждую по 0,1 мл суспензии, которую распределяли по поверхности среды, не прикасаясь сторон чашки шпателем. Затем оставляли чашки на 15 минут с закрытыми крышками при комнатной температуре для впитывания суспензии. По истечении времени чашки переворачивали и инкубировали в течение 24 часов при температуре 36 ± 1 °C. Первый учет результатов проводили через сутки, второй – через двое суток.

День третий. На чашках отмечали презумптивные колонии *B. cereus* отличающиеся крупными размерами $0,8 \pm 0,3$ см розового цвета и, как правило, окруженные зоной выпадения осадка (что характеризует наличие лецитиназной активности). Для дальнейших исследований отбирались также бледно-розовые и бесцветные колонии, которые образовывали в небольшом количестве или не образовывали лецитиназу. Эти атипичные по культуральным свойствам штаммы также подлежали идентификации. С чашки отбирали по две-три одинаковые колонии для исследований. При отсутствии возможности провести отбор изолированных колоний производили повторный высеив на МYP-агар. Посевы инкубировали в течение 24 часов при температуре 36 ± 1 °C. Далее осуществ-

влялась идентификация выделенных бактерий по нижеописанному алгоритму.

Четвертый день. Окраска по Граму. При наличии роста на агаризованных средах готовили мазки выросших культур, окрашивали их по Граму.

Грамположительные споровые бактерии засеивали на МПБ. После 7 ± 1 часов при температуре 36 ± 1 °C производили высев на следующие среды:

- среду Кларка (для постановки реакции Фогес-Проскауера. Этот тест основан на выявлении ацетоина (ацетилметилкарбинола) – промежуточного продукта в превращении пировиноградной кислоты (образующейся при расщеплении глюкозы) по бутиленгликолевому пути. В присутствии кислорода и КОН ацетон окисляется в диацетил, образующий соединение красного цвета. Чувствительность теста возрастает с добавлением α -нафтола перед добавлением КОН. Для определения этих продуктов исследуемые культуры микроорганизмов засеивали на среду Кларка и инкубировали при температуре 36 ± 1 °C в течение 48 часов),

- МПБ с 2, 5, 7 % содержанием хлорида натрия,

- среду с мочевиной (для определения наличия фермента уреазы),

- две пробирки МПБ с нитратами (для определения редукции нитратов и изучения образования газа из NO_3 в анаэробных условиях) – одну заливали слоем стерильного вазелинового масла, другую не заливали и помещали в термостат на 24-72 часа,

- молочный агар (для определения разложения казеина изучаемую культуру засеивали штрихом),

- агар с тирозином (для определения тирозина),

- картофельный агар (для изучения гидролиза крахмала),

- среды с углеводами (для определения сахаролитических свойств); применяли классический метод инокуляции культуры в пробирки, содержащие субстраты и индикаторы, Расщепление углеводов, т. е. способность расщеплять сахара и многоатомные спирты с образованием кислоты или кислоты и газа,

- МПА, обогащенный 1% глюкозы (для определения наличия каталазы),

- кукурузно-пептонный агар (для быстрого выявления спорообразования),

- среду Симмонса (для изучения способности бактерий утилизировать цитрат натрия, как единственный источник углерода, входящий в состав среды, с изменением цвета среды в присутствии индикатора бромтимолового синего),

- аргининовый бульон (для определения наличия аргининдегидрогидролазы);

- анаэробный агар (для изучения роста культуры в анаэробных условиях: петлю суточной бульонной культуры засеивали уколом в столбик среды),

- 0,7 % МПА (для определения подвижности),

- селективная дифференциально-диагностическая среда с фенолфталеинфосфатом натрия для выделения возбудителя сибирской язвы и близкородственных бацилл группы «*Bacillus cereus*», включающая питательный агар любого состава, обеспечивающий рост сибиреязвенного микроба (рН 7,2-7,4), ингибиторы роста сопутствующей микрофлоры: 25 мг/л полимиксина сульфата М, подавляющего рост грамотрицательных микроорганизмов, 25 мг/л триметоприма, как ингибитора роста грамположительных бактерий, 100 мг/л натрия фенолфталеинфосфата, являющегося субстратом для действия фермента щелочной фосфатазы.

Все посева помещали в термостате при температуре 36 ± 1 °C на 22 ± 2 часа.

У выделенных культур изучали факторы патогенности в опытах *in vitro* (гемолитическую активность: исследуемую культуру засеивали в чашки Петри с 5%-м кровяным агаром, посева инкубировали при 36 ± 1 °C в течение 24 ч; наличие продукции фермента желатиназы, посева инкубировали при 36 ± 1 °C в течение 6 суток; лецитиназная активность определяется по наличию кольца преципитата по МУР-агаре и МПБ с яичным желтком).

Бактериальные штаммы также проверяли на способность роста при рН в диапазоне 6,0-7,0; выявляли температурный минимум и максимум вегетативных форм (бульонные культуры термостатировали в диапазоне температур 5, 10, 20, 30, 40 °C, высевали на МПА, где предварительно смещали рН до 6,0-7,0).

Пятый день. Производили учет результатов по определению ферментативных свойств выделенных культур. Готовили мазки культур, выросших на кукурузно-пептонном агаре, окрашивали и микроскопировали. Грамположительные палочки, образующие эндоспоры и продуцирующие каталазу, были отнесены нами к роду *Bacillus*. В наших экспериментах установлено, что число спорулирующих клеток бактерий достигает примерно 90 % на пептонно-кукурузном агаре. Форма спор оценивалась в мазках, окрашенных по методу Трухильо, приготовленных из бактериальных штаммов, которые выращивали на вышеназванной среде. Форма, характер расположения спор в

Культуральные свойства бактерий *B. cereus* []

Вид	Признак	
	Рост на МПА	Рост на МПБ
<i>Bacillus cereus</i>	колонии белые, восковидные, твердые, круглые, иногда окрашенные в желтоватый цвет	среда мутная, осадок трудно разбиваемый, крошковатый, прочные пленка и пристеночное кольцо. При образовании пленки среда просветляется

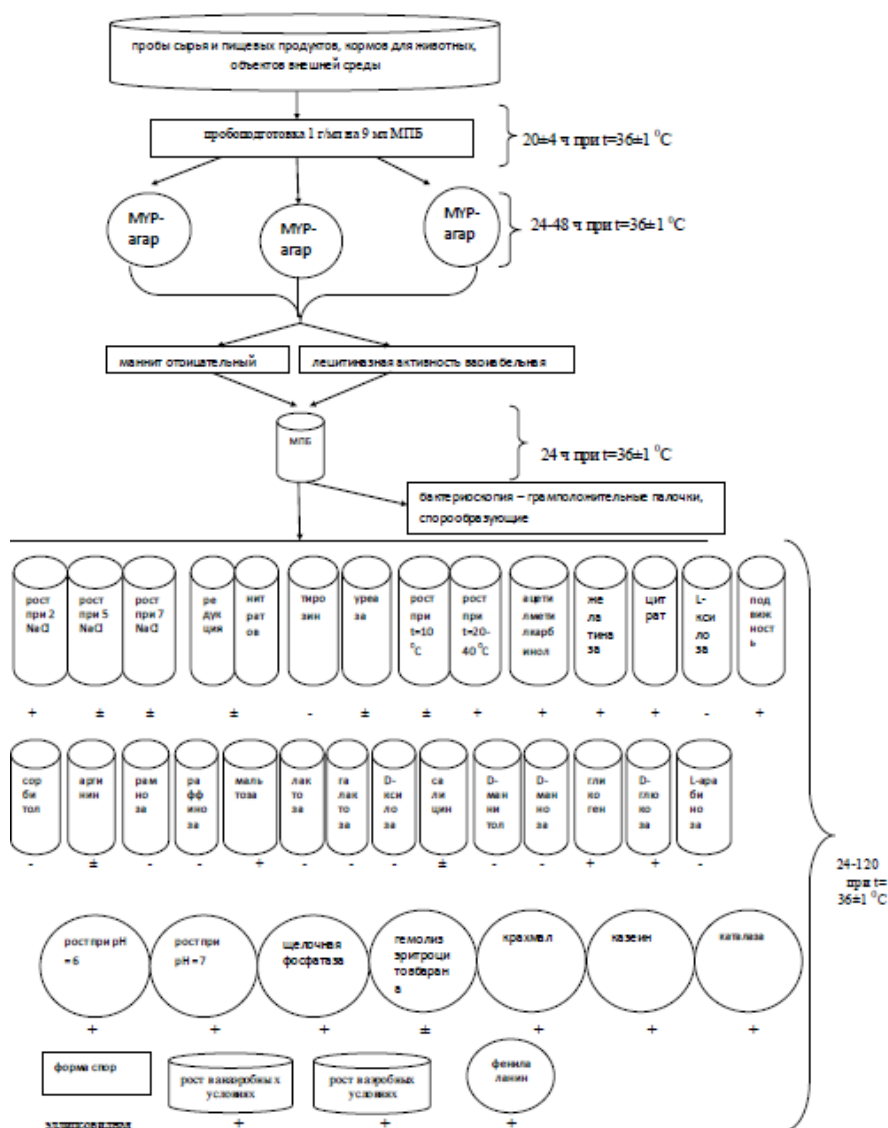


Рис. 2 - Схема выделения и бактериологической идентификации *Bacillus cereus*, составленная на основании полученных результатов исследований

клетке – признаки, используемые для группового и видового разграничения бацилл.

Возможность роста на среде с 2-7 % содержанием хлорида натрия: наблюдали рост на МПБ. Описание характерного роста некоторых представителей рода *Bacillus* представлены в таблице 1.

Определение аргининдегидрогеназы. При действии аргининдегидрогеназы бактерий на

L-аргинин среды образуются щелочные продукты реакции, индикатор pH бромкрезоловый пурпурный в щелочной среде приобретает лиловый цвет.

Утилизация цитрата натрия – если микроорганизмы в ходе размножения на среде продуцируют щелочные продукты, то происходит изменение цвета индикатора с зеленого на синий.

Гидролиз мочевины. Покраснение среды

Таблица 2

Сводные данные об основных свойствах бактерий группы «*Bacillus cereus*», анализируемых для внутриродовой дифференциации[]

Характеристика	Сводные данные об основных свойствах бактерий по «Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria»			Результаты собственных исследований 105 штаммов		
	<i>B. cereus</i>	<i>B. anthracis</i>	<i>B. mycooides</i>	+	-	±
пигментация	-	-	-		105	
подвижность	+	-	-	105		
диаметр клетки > 1 мкм	+	+	+	105		
окраска по Граму	Гр+	Гр+	Гр+	Гр+		
форма спор	эллипсоидная			эллипсоидная		
каталаза	+	+	+	105		
рост в анаэробных условиях	+	+	+	105		
рост в аэробных условиях	+	+	+	105		
Кислота из						
L-арабинозы	-	-	-	-	103	
D-глюкозы	+	+	+	105		
гликогена	+	+	+	105		
D-маннитола	-	-	-		105	
D-маннозы	-	-	-	-	105	
салицина	d	-	d	78	15	12
D-ксилозы	-	-	-		105	
галактозы	-	-	d		105	
лактозы	-	-	-		105	
мальтозы	+	+	+	105		
раффинозы	-	-	-		105	
рамнозы	-	-	-		105	
сорбитола	-	-	-		105	
L-ксилозы	-	-	-		105	
Гидролиз						
казеина	+	+	+	105		
крахмала	+	+	+	105		
тирозина	-	+	d		105	
мочевины	d	-		80	22	3
Утилизация						
цитрата	+	d	d	105		
гемолитическая активность	±	-	±	105		
желатиназная активность	+	+	+	105		
лецитиназная активность	+	-	-	105		
щелочная фосфатаза	+	d		105		
ацетил-метилкарбинол	+	+	+	105		
аргининдегидролаза	d	-	d		105	
редукция нитратов до нитритов	d	+	d	105		
Рост на МПА в присутствии NaCl						
2 %	+	+		105		
5 %	+	+		105		
7 %	d	+	d			105
Рост на МПА при pH						
6,0	+	+	+	105		
7,0	+	+	+	105		
Рост при температуре культивирования						
5 °С	-	-	-	2	103	
10°С	d	-	d	11	94	
20°С	+	+	+	105		
30°С	+	+	+	105		
40°С	+	+	d	105		

Примечание – «+» - положительный результат,
«-» - отрицательный результат,
«d» - вариабельный результат,
« » - данные отсутствуют.

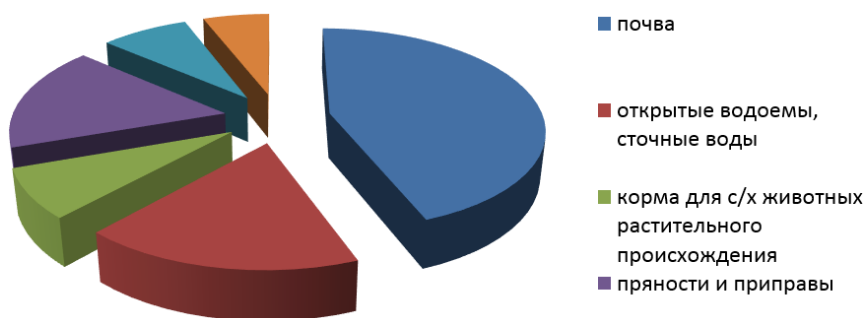


Рис. 3 - Источники выделения штаммов бактерий *Bacillus cereus*

Таблица 3
Источники выделения штаммов бактерий *Bacillus cereus*

№ п/п	Источники выделения	Количество образцов	Количество выделенных штаммов рода <i>Bacillus</i>	Количество выделенных штаммов бактерий <i>Bacillus cereus</i>
1	Почва	210	198	45
2	Вода открытых водоемов, сточные воды	67	42	18
3	Корма растительного происхождения для с/х животных	46	24	8
4	Пряности и приправы	90	61	17
5	Молоко и молочная продукция	67	28	8
6	Мясо и мясная продукция	56	45	6
Итого:		536	398	102

с мочевиной через 20-24 ч свидетельствовало о продукции изучаемыми бактериальными штаммами фермента уреазы.

Гидролиз казеина. О нем свидетельствовали прозрачные зоны вокруг колоний микроорганизмов. О разложении тирозина судили по исчезновению кристаллов тирозина в среде округ посевов.

Дополнительно летициназную активность изучаемых штаммов бактерий оценивали по появлению беловатой мути и всплывающим хлопьям в пробирках. Ферментативная активность регистрировалась по изменению цвета засеянных изучаемой культурой питательных сред с сахарами и индикаторами: L-арабинозой, D-глюкозой, D-маннитолом, D-маннозой, салицином, D-ксилозой, галактозой, лактозой, мальтозой, раффинозой, рамнозой, сорбитолом, L-ксилозой и индикаторами. Наличие гликогена определяли в маз-

ке, окрашенном 0,5 % раствором йода. Бактериальную культуру, выросшую на МПА, осматривали. Сравнивали с характерными особенностями, описанными в таблице 1. Для изучения продукции каталазы чашечную бактериальную культуру заливали 10% H_2O_2 . Образовавшие пузырьки газа свидетельствовали о наличии каталазы. Учет возможности роста изучаемых бактериальных штаммов при pH 6,0-7,0 конста-

тировали на мясо-пептонном агаре, обращая внимание на характерный рост (табл. 1). Температурный минимум и максимум вегетативных форм определяли по наличию характерного роста в диапазоне температур 5-40 °C.

Шестой день. Ставилась реакция Фогеса-Проскауэра, определяли способность выделенных штаммов к денитрификации, к гидролизу крахмала, изучали гемолитическую и желатиназную активность

Седьмой-десятый день. Определяли желатиназную активность выделенных штаммов.

В таблице 2 представлены сводные данные об основных свойствах бактерий рода *Bacillus*, отнесенных к первой морфологической группе по Gordon (1973) [15], и объединенных «Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria» в группу «*Bacillus cereus*» [14]. На рисунке 2 отражена схема выделения и бактериологической идентификации *Bacillus cereus*, составленная на основании полученных результатов исследований. Из 536 проб объектов ветеринарно-санитарного надзора и окружающей среды было выделено 398 штаммов, которые были отнесены к роду *Bacillus* и 102 – к виду *Bacillus cereus*. Результаты исследований систематизированы в таблице 2.

На основании анализа следующих признаков: форма эндоспоры, растяжение вегетативной клетки спорой, способности к движению и образованию пигмента, роста в аэробных и анаэробных условиях, наличие фермента каталазы, биохимической активности и наличие факторов патогенности, выделенные нами 102 штамма бактерии были отнесены к первой морфологической группе по Gordon (1973) [15], к группе «*Bacillus cereus*» по «Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria» (2015) [14] и типированы как представители вида *Bacillus cereus*.

Полученные результаты исследований по изучению некоторых биологических свойств вы-

деленных нами бактерий в основном не расходятся с паспортными данными референс-штаммов – *Bacillus cereus* 8035, *Bacillus cereus* 2527, *Bacillus cereus* ATCC 14579, полученных для работы из музея кафедры МВЭ и ВСЭ ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ.

На основании разработанной бактериологической схемы идентификации бактерий *Bacillus cereus* (рис. 2), включающей 45 показателей, нами было выделено 102 штамма, типированных как *Bacillus cereus*. Результаты исследований представлены в таблице 3 и на рисунке 3.

Выводы

Анализируя полученные данные можно сказать (рис. 3), что наибольший процент выделенных штаммов *Bacillus cereus* имеет ареалом распространения пробы – 44,1 %. По литературным данным, количество *Bacillus cereus* в почве зависит от содержания в ней органических веществ. Оптимальной средой являются почвы с нейтральной и слабощелочной реакцией. Известно, что частота выделения бактерий *Bacillus cereus* в пробах почвы достигает максимума в средней полосе РФ, снижаясь в северных и южных широтах [16-17].

Примерно 17,6 % культур *Bacillus cereus* было выделено нами из проб сточных вод и открытых водоемов, причем, в сточных водах вышеуказанные бактерии встречались в 92 % случаев, в воде рек и озер – в 22 %. Третье место по частоте обнаружения *Bacillus cereus* занимает группа объектов, имеющих растительное происхождение – пряности и приправы - 16,7 % и корма растительного происхождения для сельскохозяйственных животных - 7,8 % от общего числа выделенных культур.

Эмпирически установлено, что совокупный процент контаминации сырья и продуктов питания животного происхождения составил 13,7 %, из них 7,8 % приходится на молочные продукты и молоко и 5,9 % - на мясо и продукты его переработки.

Таким образом, нами было установлено, что в течение 216 часов (9 дней), применяя разработанную нами схему выделения и бактериологической идентификации бактерий *Bacillus cereus* можно на основании 45 тестов типировать вышеуказанные бактерии. Однако, вариабельность некоторых изучаемых показателей, длительность и материалоемкость исследований не позволяют нам утверждать, что данный метод эффективен для рутинных исследований.

Библиографический список

1. Toxin production in a rare and genetically remote cluster of strains of the *Bacillus cereus* group

/ A. Fagerlund, J. Brillard, R. Fürst [et al.] // BMC Microbiol. – 2007. - № 7. – P. 43.

2. Усовершенствование методов идентификации атипичных штаммов возбудителя сибирской язвы и их дифференциация от близкородственных бацилл / Е. И. Еременко, О. И. Цыганкова, А. Г. Рязанова [и др.] // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. - 2009. - № 3. - С. 76–80.

3. Еременко, Е. И. Группа бактерий «*Bacillus cereus*» - проблемы идентификации и таксономии / Е. И. Еременко // Медицинский вестник Северного Кавказа. - 2008. - № 3. - С. 57–60.

4. Slepecky, R. A. The Genus *Bacillus*-Nonmedical / R. A. Slepecky, H. T. Hemphill // Prokaryotes. – 2006. - № 4. – P. 530–562.

5. *Bacillus anthracis* diverges from Related Clades of the *Bacillus cereus* Group in 16S-23S Ribosomal DNA Intergenic Transcribed Spacers Containing tRNA Genes / A. Cerif, S. Borin, A. A. Pizzi [et al.] // Applied and Environmental Microbiology. – 2003. – Vol.69, № 1. – P. 33-40.

6. Toxi-infection alimentaire collective à *Bacillus cereus* / A/ Talarmin, E. Nicand, M. Doucet, [et al.] // Bulletin Epidemiologique Hebdomadaire Bulletin Epidemiologique Hebdomadaire August 1993. - № 33. – P. 154-156.

7. Джей, Дж. Д. Современная пищевая микробиология / Дж. Д. Джей, М. Дж. Лёсснер, Д. А. Гольден. – Москва: Бином, Лаборатория знаний, 2011. – 886 с.

8. 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.

9. Nature of polymorphisms in 16S-23S rRNA gene intergenic transcribed spacer fingerprinting of *Bacillus* and related genera / D. Daffonchio, A. Cherif, L. Brusetti [et al.] // Applied and Environmental Microbiology. – 2003. - № 69. – P. 5128-5137.

10. Бактериофаги рода *Bacillus*: биология и практическое применение / Н. А. Феоктистова, А. И. Калдыркаев, Д. А. Васильев [и др.]. – Ульяновск, 2017. – 112 с.

11. Идентификация бактерий *Bacillus cereus* на основе их фенотипической характеристики / Д. А. Васильев, А. И. Калдыркаев, Н. А. Феоктистова [и др.]. – Ульяновск: НИИЦМиБ; УГСХА им. П.А. Столыпина, 2013. – 98с.

12. Quantitative analysis of cereulide, the emetic toxin of *Bacillus cereus*, produced under various conditions / M. M. Haggblom, C. Apetroaie, M. A. Andersson, M. S. Salkinoja-Salonen // Applied and Environmental Microbiology. – 2002. – Vol. 68. –

P. 2479-2483.

13. Техэксперт. ГОСТ 10444.8-2013 (ISO 7932:2004) Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Горизонтальный метод подсчета презумптивных бактерий *Bacillus cereus*. Метод подсчета колоний при температуре 36 ± 1 °C – URL: <http://docs.cntd.ru/document/1200107307> (дата обращения 12.10.2018).

14. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria / William B. Whitman, Paul DeVos, Jonsik Chun, Sveltlana Dedysh, Brian Hedlund, Peter Kämpfer, Fred Rainey, Martha Trujillo. - Hoboken, New Jersey: Wiley, 2015. – URL: <https://onlinelibrary.wiley.com>

[com/doi/pdf/10.1002/9781118960608.gbm00530](https://doi/pdf/10.1002/9781118960608.gbm00530). (дата обращения 12.07.2018).

15. Gordon, R. The genus *Bacillus* / R. Gordon // *Handb. Microbiol.* - Cleveland (Ohio), 1973. – Vol. 1. - P. 71–88.

16. Леонтьев, В. Н. Порча пищевых продуктов: виды, причины и способы предотвращения / В. Н. Леонтьев, Х. М. Элькаиб, А. Э. Эльхедми // Труды БГУ. – 2013. – Т. 8, ч. 1. – С. 125-130.

17. Полховский, В. А. Биохимические типы *Bacillus cereus*, выделенных из различных природных источников / В. А. Полховский // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 1970. – № 2. – С.82–86.

DEVELOPMENT AND TESTING OF BACTERIOLOGICAL DIAGRAM OF *BACILLUS CEREUS* BACTERIA IDENTIFICATION

Feoktistova N.A.

FSBEI HE Ulyanovsk State Agrarian University

432017, Ulyanovsk, Novyi Venets boulevard, 1; 8 (8422) 55-95-47

e-mail: feokna@yandex.ru

Key words: *Bacillus cereus*, bacteriological scheme, sign, test, identification, bacteria, sample

The article presents results of bacteriological scheme development for isolating *Bacillus cereus* bacteria from veterinary and sanitary surveillance objects and identification of bacteria as part of a complex test system for indicating and identifying zoonanthropogenic bacteria of the *Bacillus cereus* group. Model microorganisms for selecting research parameters and bacteriological tests were reference strains of *Bacillus cereus* 8035, *Bacillus cereus* 2527, *Bacillus cereus* ATSS 14579. Based on the analysis of the following characteristics: endospore shape, spore extension of the vegetative cell, ability to move and form pigment, growth in aerobic and anaerobic conditions, the presence of catalase enzyme, biochemical activity and the presence of pathogenicity factors, 102 bacterial strains isolated by us were assigned to the first morphological group according to Gordon (1973), to *Bacillus cereus* group according to «Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria» (2015) and categorized as members of *Bacillus cereus* genus. Within 216 hours (9 days), using the developed scheme for isolation and bacteriological identification of *Bacillus cereus* bacteria, the above bacteria can be typed on the basis of 44 tests. 398 strains were isolated from 536 samples of objects of veterinary and sanitary supervision and the environment (210 soil samples, 67 - water from open reservoirs, waste water, 46 - animal feed for agricultural animals, 90 - spices and seasonings, 67 - milk and dairy products, 56 - meat and meat products) that were assigned to *Bacillus* genus and 102 to *Bacillus cereus* group.

Bibliography

1. Toxin production in a rare and genetically remote cluster of strains of the *Bacillus cereus* group / A. Fagerlund, J. Brillard, R. Fürst [et al.] // *BMC Microbiol.* – 2007. - № 7. – P. 43.
2. Improvement of methods for identification of atypical strains of anthrax causative agent and their differentiation from closely related bacilli / E.I. Eremenko, O.I. Tsygankova, A.G. Ryazanova [et al.] // *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunology.* - 2009. - No. 3. - P. 76–80.
3. Eremenko, E.I. The group of “*Bacillus cereus*” bacteria - problems of identification and taxonomy / E.I. Eremenko // *Medical vestnik of the North Caucasus.* - 2008. - No. 3. - P. 57-60.
4. Slepecky, R. A. The Genus *Bacillus*-Nonmedical / R. A. Slepecky, H. T. Hemphill // *Prokaryotes.* – 2006. - № 4. – P. 530–562.
5. *Bacillus anthracis* diverges from Related Clades of the *Bacillus cereus* Group in 16S-23S Ribosomal DNA Intergenic Transcribed Spacers Containing tRNA Genes / A. Cerif, S. Borin, A. A. Pizzi [et al.] // *Applied and Environmental Microbiology.* – 2003. – Vol.69, № 1. – P. 33-40.
6. Toxi-infection alimentaire collective à *Bacillus cereus* / A/ Talarmin, E. Nicand, M. Doucet, [et al.] // *Bulletin Epidemiologique Hebdomadaire Bulletin Epidemiologique Hebdomadaire* August 1993. - № 33. – P. 154-156.
7. Jay, J.D. *Modern food microbiology* / J.D. Jay, M.J. Lössner, D.A. Golden. - Moscow: Binom, Laboratory of Knowledge, 2011. – 886 p.
8. 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.
9. Nature of polymorphisms in 16S-23S rRNA gene intergenic transcribed spacer fingerprinting of *Bacillus* and related genera / D. Daffonchio, A. Cherif, L. Brusetti [et al.] // *Applied and Environmental Microbiology.* – 2003. - № 69. – P. 5128-5137.
10. Bacteriophages of *Bacillus* genus: biology and practical application / N.A. Feoktistova, A.I. Kaldyrkaev, D.A. Vasiliev [et al.]. - Ulyanovsk, 2017. – 112 p.
11. Identification of *Bacillus cereus* bacteria based on their phenotypic characteristics / D.A. Vasiliev, A.I. Kaldyrkaev, N.A. Feoktistova [et al.]. - Ulyanovsk: Research Innovation Center of Microbiology and Biotechnology of USAA named after P.A. Stolypin, 2013. – 98 p.
12. Quantitative analysis of cereulide, the emetic toxin of *Bacillus cereus*, produced under various conditions / M. M. Haggblom, C. Apetroaie, M. A. Andersson, M. S. Salkinaja-Salonen // *Applied and Environmental Microbiology.* – 2002. – Vol. 68. – P. 2479-2483.
13. Techexpert. State Standard 10444.8-2013 (ISO 7932: 2004) Microbiology of food and animal feed. Horizontal method for counting presumptive bacteria of *Bacillus cereus*. The method for counting colonies at 36 ± 1 °C is URL: <http://docs.cntd.ru/document/1200107307> (access date: 12.10.2018).
14. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria / William B. Whitman, Paul DeVos, Jonsik Chun, Sveltlana Dedysh, Brian Hedlund, Peter Kämpfer, Fred Rainey, Martha Trujillo. - Hoboken, New Jersey: Wiley, 2015. – URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/9781118960608.gbm00530>. (access date: 12.07.2018).
15. Gordon, R. The genus *Bacillus* / R. Gordon // *Handb. Microbiol.* - Cleveland (Ohio), 1973. – Vol. 1. - P. 71–88.
16. Leontiev, V. N. Food spoilage: types, causes and methods of prevention / V. N. Leontiev, Kh. M. Elkaib, A. E. Elkhedmi // *Scientific works of BSU.* - 2013. - V. 8, part 1. - P. 125-130.
17. Polkhovsky, V. A. Biochemical types of *Bacillus cereus* isolated from various natural sources / V. A. Polkhovsky // *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunology.* - 1970. - No. 2. - P. 82–86.