

УДК 579.674

**АПРОБАЦИЯ БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОЙ СХЕМЫ  
ВЫДЕЛЕНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИИ *BACILLUS SUBTILIS***

**Феоктистова Н.А., кандидат биологических наук, доцент,  
8(8422) 55-95-47, feokna@yandex.ru**

**Васильев Д.А., доктор биологических наук, профессор  
8(8422)55-95-47, dav\_ul@mail.ru  
ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ**

**Ключевые слова:** *Bacillus subtilis*, изоляты, бактериологическая схема, свойства, пробы, пищевое сырье, выделение, идентификация

*В статье представлены материалы исследований по апробации бактериологической схемы выделения и идентификации *Bacillus subtilis*, которая позволяет провести типирование бактерий по 51 показателю в течение 240 часов. В результате проведения апробации работы из 548 проб было выделено 68 штаммов бактерии, которые были отнесены к группе «*Bacillus subtilis*» и типированы как *Bacillus subtilis*. Предлагается при идентификации бактерий рода *Bacillus* и *Bacillus subtilis*, в частности, уделять особое внимание ферментативной активности гидролаз и характеристике целлюлозолитической активности, продукции пектатлиаз и липаз, что позволит проводить условную дифференциацию штаммов, вызывающих бактериозы растений от почвенных сапрофитов, вызывающих патологии теплокровных*

**Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Ульяновской области РФ в рамках научного проекта № 19-416-730004.**

**Введение.** Научный интерес к изучению бактерии *Bacillus subtilis* не ослабевает в течение нескольких десятилетий, что обусловлено способностью некоторых штаммов данного вида к продукции биологически активных веществ, нашедших активное применение в биотехнологической отрасли [1]. Имеется значительное количество публикаций о возможности бактерии *Bacillus subtilis* продуцировать метаболиты, которые имеют выраженную антибактериальную активность, и физиологически активные регуляторы роста растений [2-3]. Однако, имеются сообщения исследователей о роли бактерии *Bacillus subtilis* в патогенезе болезней растений (мягкая гниль у овощей, фруктов и технических культур) и хлебобулочных изделий (картофельная болезнь хлеба). Учитывая тот факт, что бактерии *Bacillus subtilis* повсеместно распространены во внешней среде и традиционно относятся к непатогенным, должного внимания к фактам об указанных выше поражениях растений и продукции их переработки не уделялось [4-5]. Разработка бактериологической схемы выделения из объектов внешней среды и идентификации бактерий *Bacillus subtilis* по авторской схеме позволит в перспективе получить ветеринарно-санитарной экспертизе качественный метод типирования вышеназванных бактерий, которые до недавнего времени не считались патогенными.

**Материалы и методы.** В научной русскоязычной литературе ранее не было описано бактериологической схемы выделения из объектов внешней среды и идентификации бактерий *Bacillus subtilis*, поэтому первым этапом наших исследований был перевод на русский язык «Определите бактерий Берджи» (2015 года) [6] и работа англоязычной литературой [1-5, 7], так как у Российской

Федерации бактерии *Bacillus subtilis* рассматриваются, в основном, как стимуляторы роста растений, а публикации об их патогенных свойствах отсутствуют. На основании проанализированной информации и работы с первоисточниками, нами были сформированы полученные сводные данные об основных свойствах бактерий группы «*Bacillus subtilis*», объединяющей 8 близкородственных видов [8]. Далее мы смоделировали бактериологическую схему выделения из объектов внешней среды и идентификации бактерий *Bacillus subtilis*. Разработанная нами бактериологическая схема выделения из объектов внешней среды и идентификации бактерий *Bacillus subtilis* позволяет провести типирование бактерий по 51 показателю в течение 240 часов.

Особенностей в пробоподготовке исследуемого материала нет: объект подлежал гомогенизации (за исключением проб муки), затем навеску массой 5 грамм добавляли в стерильный мясо-пептонный бульон в соотношении 1:10 (параметры культивирования: термостатирование ( $t = 36 \pm 1$  °C) в течение  $48 \pm 24$  часов). Проведенные контрольные высевы эталонного штамма *Bacillus subtilis* 6633 позволили нам остановить выбор на *Cereus Selective Agar* (MYP-agar), который дает возможность провести первичную дифференциацию выделенных бацилл по устойчивости к полимиксину и по способности ферментировать маннит. В исследованиях было использовано 548 проб почвы, пищевого сырья и продуктов питания. Изучение биохимической активности каждого выделенного штамма микроорганизмов в максимальном объеме начинается в четвертый день исследований и подразумевает получение и фиксацию результатов исследований в течение шести последующих дней. Это

связано с необходимостью в течение шести дней наблюдать за показателем желатиназной активности.

### **Результаты исследований и их обсуждение.**

Изучаемые биологические свойства выделенных бактериальных штаммов: окраска по методу Грама, форма эндоспоры, подвижность бактериальной клетки, продукция пигмента, возможность роста в аэробных/анаэробных условиях, продукция каталазы, особенности биохимической активности (ферментация сахаров; гидролиз казеина, крахмала, тирозина, мочевины; утилизация цитрата, протеолитические свойства: гемолитическая, желатиназная и лецитиназная активности, продукция фосфатазы, аргининдегидролазы, ацетилметилкарбинола, редукция нитратов до нитритов). Научные изыскания фитопатологов говорят о том, что одним из основных факторов, которые формируют патогенные свойства бактерий, вызывающих болезни растений, является синтез ферментов, способствующих разрушению компонентов клеточной стенки растений. При подборе тестов, составляющих бактериологическую схему выделения и идентификации бактерий *Bacillus subtilis* нами было принято решение добавить к идентификационным критериям тесты, которые ориентированы на определение продукции бактериями пектатлиаз, целлюлаз и липаз.

В результате проведенной работы нами из 548 проб было выделено 68 штаммов бактерии, которые были отнесены к группе «*Bacillus subtilis*» и типированы как *Bacillus subtilis* (таблица 1) Анализируя полученные данные о биологических свойствах выделенных изолятов, можно утверждать, что выделенные культуры не значительно, но отличаются друг от друга по большинству анализируемых показателей.

Таблица 1 – Ареал распространения изолированных штаммов бактерий *Bacillus subtilis*

№ п/п	объекты выделения	количество		%
		исследованных образцов	штаммов бактерий идентифицированных как <i>Bacillus subtilis</i>	
группа I				
1	хлеб из пшеничной муки	25	1	4,0
2	мука пшеничная	40	4	10,0
итого по группе		65	5	7,7
группа II				
1	пряности и специи	38	14	36,8
2	томаты	54	7	12,9
3	огурцы	34	6	17,6
4	картофель	44	3	6,8
5	цуккини	15	2	13,3
итого по группе		237	32	13,5
группа III				
1	пробы почвы	210	19	9,1
группа VI				
1	мясные продукты	18	6	33,3
2	молочные продукты	18	6	33,3
итого по группе		36	12	33,3
Итого:		548	68	12,4

Закключение. Совокупный процент контаминации 548 объектов ветеринарно-санитарного надзора, зарегистрированный нами, составил 12,4 %, из них процент обсеменения зерномучных товаров – 7,7 %, плодоовощных товаров – 13,5 % и проб почвы – 9,1 %, мясной и молочной продукции – 33,3 %. Установлено, что изоляты бактерии

*Bacillus subtilis* представляют относительно однородную группу по фенотипу. Однако отмечено, что целлюлолитическая активность фиксировалась у штаммов, выделенных из первой и второй групп проб (зерномучные товары) и (плодоовощные товары), но отсутствовала у 28 почвенных изолятов, выделенных из третьей и четвертой групп проб. Разработанная нами бактериологическая схема выделения из объектов внешней среды и идентификации бактерий *Bacillus subtilis* позволяет провести типирование бактерий по 51 показателю в течение 240 часов. Предлагается при идентификации бактерий рода *Bacillus* и *Bacillus subtilis*, в частности, уделять особое внимание ферментативной активности гидролаз и характеристике целлюлозолитической активности, продукции пектатлиаз и липаз, что позволит проводить условную дифференциацию штаммов, вызывающих бактериозы растений от почвенных сапрофитов, вызывающих патологии теплокровных.

### **Библиографический список:**

1. Aljumaah, M. R., Alkhulaifi, M. M., Abudabos, A. M., Aljumaah, R. S., Alsaleh, A. N., & Stanley, D. (2020). *Bacillus subtilis* PB6 based probiotic supplementation plays a role in the recovery after the necrotic enteritis challenge. *PLoS one*, 15(6), e0232781.
2. Li, A., Wang, Y., Suolang, S., Mehmood, K., Jiang, X., Zhang, L., ... & Li, J. (2019). Isolation and Identification of Potential *Bacillus* Probiotics from Free Ranging Yaks of Tibetan Plateau, China. *Pakistan Veterinary Journal*, 39(3).
3. Tang, Y., Han, L., Chen, X., Xie, M., Kong, W., & Wu, Z. (2019). Dietary supplementation of probiotic *Bacillus subtilis* affects antioxidant defenses and immune response in grass carp

under *Aeromonas hydrophila* challenge. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 11(2), 545-558.

4. Sohrabi, F., Sheikholeslami, M., Heydari, R., Rezaee, S., & Sharifi, R. (2020). Investigating the effect of *Glomus mosseae*, *Bacillus subtilis* and *Trichoderma harzianum* on plant growth and controlling *Meloidogyne javanica* in tomato. *Indian Phytopathology*, 73(2), 293-300.

5. Underwood, W. (2012). The plant cell wall: a dynamic barrier against pathogen invasion. *Frontiers in plant science*, 3, 85.

6. 6. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria / W. B. Whitman, P. DeVos, J. Chun, S. Dedysh, B. Hedlund, P. Rainey, M. Trujillo. – Hoboken, New Jersey: Wiley, 2015 – URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9781118960608> (дата обращения 12.07.2018).

7. Wang, L. T., Lee, F. L., Tai, C. J., & Kasai, H. (2007). Comparison of *gyrB* gene sequences, 16S rRNA gene sequences and DNA–DNA hybridization in the *Bacillus subtilis* group. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 57(8), 1846-1850.

8. Ghojavand, H., Vahabzadeh, F., Roayaei, E., & Shahraki, A. K. (2008). Production and properties of a biosurfactant obtained from a member of the *Bacillus subtilis* group (PTCC 1696). *Journal of Colloid and Interface Science*, 324(1-2), 172-176.

## TESTING OF BACTERIOLOGICAL SCHEME FOR ISOLATION AND IDENTIFICATION OF BACILLUS SUBTILIS

*Feoktistova N.A., Vasiliev D.A.*

**Keywords:** *Bacillus subtilis, isolates, bacteriological scheme, properties, samples, food raw materials, isolation, identification*

*The article presents the materials of studies on the testing of the bacteriological scheme of isolation and identification of Bacillus subtilis, which allows typing bacteria according to 51 indicator for 240 hours. As a result of testing, 68 bacteria strains were isolated from 548 samples, which were assigned to the group "Bacillus subtilis" and typified as Bacillus subtilis. It is proposed when identifying bacteria of the genus Bacillus and Bacillus subtilis, in particular, to pay special attention to the enzymatic activity of hydrolases and the characteristic of cellulolytic activity, the production of pectatliases and lipases, which will allow to carry out conditional differentiation of strains that cause plant bacteriosis from soil saprophytes that cause warm-blooded pathologies*