

УДК 619:578

**ВЫДЕЛЕНИЕ БАКТЕРИЙ ВИДА *BACILLUS SUBTILIS* ИЗ ОБЪЕКТОВ
САНИТАРНОГО НАДЗОРА
ALLOCATION OF BACTERIA OF TYPE *BACILLUS SUBTILIS* FROM OBJECTS
OF SANITARY INSPECTION**

**Н.А. Феоктистова, А.Х. Мустафин, А.И. Калдыркаев, Д.А. Васильев
N.A. Feoktistova, A.H. Mustafin, A.I. Kaldirkaev, D.A. Vasiliev**

**Научно-исследовательский инновационный центр микробиологии и
биотехнологии Ульяновской ГСХА
The research innovation centre of microbiology and biotechnology
Ulyanovsk state academy of Agriculture**

*In article the way of allocation of bacteria of type *Bacillus subtilis* from objects of sanitary inspection, a procedure of identification of data бацилл on some biological properties is described.*

Первоочередной задачей наших исследований стало выделение бактерий вида *Bacillus subtilis* из объектов санитарного надзора. В период с 2008 по 2010 годы было исследовано на наличие бактерий вида *Bacillus subtilis* 74 пробы пищевых продуктов, купленных на продовольственных рынках г. Ульяновска, г. Самары, г. Геленджика, г. Сочи и г. Сент-Питера.

Исследуемые пробы измельчали в ступке при помощи пестика, вносили в физиологический раствор в соотношении 1:10 и прогревали на водяной бане при температуре 70-75 °С в течение 30 минут.

Для выделения и идентификации бактерий группы *Bacillus subtilis* в Институте микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного АН УССР разработана элективная питательная среда, которая имеет преимущества перед обычными средами, применяемыми для их изолирования [1].

Состав: глюкоза - 10 г., K₂HPO₄ – 1 г., NaCl – 0,1 г., MgSO₄ x 7H₂O – 0,5 г., CaCl₂ x 6H₂O – 0,1 г., CuCl₂ x 2H₂O – 0,001 г., Na₂MoO₄ x 2H₂O – 0,005 г., CoCl₂ x 6H₂O – 0,005 г., MnCl₂ – 0,005 г., цитрат натрия – 0,5 г., d,l – α – аланин – 2,5 г., d,l – валин – 2,5 г., полимиксин – 120 000 ед., водопроводная вода – 1000 мл.

Для приготовления среды мы использовали рабочие растворы, которые готовили заранее. Глюкозу использовали в 40 % - ной концентрации и стерилизовали при давлении 0,5 атм. Растворы двузамещенного фосфорнокислого калия, хлористого натрия, сернокислого магния (гидрата), хлористого кальция (гидрата) и цитрата натрия готовили в десятикратной концентрации по сравнению с прописью, стерилизовали при 1,5 атм. Отдельно готовили растворы микроэлементов: хлорид меди (гидрат), молибденовокислого натрия (гидрат), хлористого марганца, где каждое вещество брали в десятикратном количестве. d,l – α – аланин и d,l – валин использовали в 4%-ной концентрации. Растворы микроэлементов и аминокислот стерилизовали при 1,5 атм. В стерильную колбу наливали по 10 мл растворов солей, 10 мл раствора микроэлементов, 20-30 мл раствора глюкозы; по 60 мл растворов d,l – α – аланина и d,l – валина; доводили объем смеси стерильной дистиллированной водой до 1л. Антибиотик полимиксин разводили стерильной дистиллированной водой и добавляли в среду в количестве 0.01-0,013 г/л непосредственно перед использованием. Срок хранения среды составлял пять-семь дней.

Элективную питательную среду разливали стерильно в пробирки по 5 мл и засеивали по 0,1 мл. исследуемой пробы. Посевы помещали в термостат при 33 °С на четыре-пять дней. При наличии роста посевы прогревали при 70-75 °С в течение 30

мин. и делали высевы на агаризованные питательные среды для изолирования чистых культур. Прогревание выросших культур было необходимо, так как установлено, что в отдельных случаях на элективной среде наблюдается рост отдельных штаммов *Pseudomonas*, которые при последующем высеве на твердые среды могут подавлять спорообразующие бактерии.

Выделенные культуры - грамположительные короткие палочки с закругленными концами и центрально расположенной спорой.

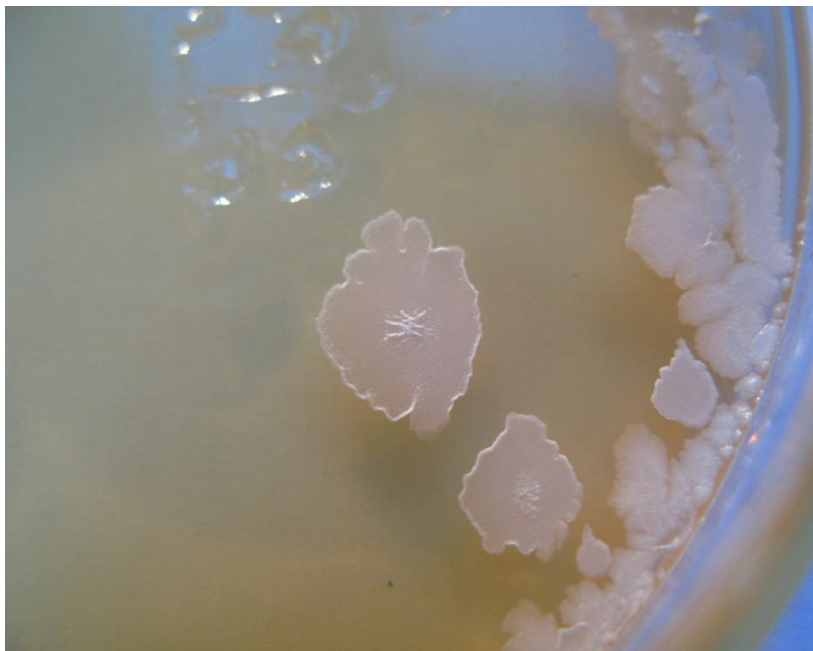


Рис. 1 – Бактерии вида *Bacillus subtilis* (рост на мясо-пептонном агаре)

Видовую принадлежность культур устанавливали на основе определения морфологических и культуральных, биохимических свойств. Ферментативные свойства изучали у агаровых культур бактерий, выделенных из одного исследуемого материала, на наборе полужидких сред с углеводами и индикатором ВР, куда входят среды с глюкозой, лактозой, сахарозой, маннитом, мальтозой, а также на среде с лизином, среде с фенилаланином и т.п. В качестве дополнительных тестов определяли подвижность микроорганизмов. Посевы инкубировали при температуре 33-34 °С в течение 24-48 часов.

Выделенные нами подвижные культуры хорошо росли в среде с 7 % хлористого натрия, разлагали глюкозу, сахарозу, не разлагали лактозу, давали положительную реакцию при взаимодействии с сорбитом, маннозой и арабинозой, уреазой, маннитом; не взаимодействовали с триптофандезаминазой, лизиндекарбоксилазой и фенилаланиндезаминазой; разжижали желатин. Также мы наблюдали гидролиз крахмала и разложение казеина; положительный результат реакции Фогеса-Проскауэра. Тест на лецитиназу не может считаться типовым, так как 55% культур давали положительный результат, а 45% - культур – отрицательный.

Полученные данные по изучению биохимических свойств выделенных нами бацилл были сравнены с результатами исследований биохимических свойств штаммов бактерий вида *Bacillus subtilis*, полученных из музея кафедры МВЭ и ВСЭ УГСХА. Выделенные нами из объектов санитарного надзора культуры обладают биохимическими свойствами, аналогичными свойствам музейных культур *Bacillus subtilis* (УГСХА).

В результате проведенных исследований нами было выделено объектов санитарного надзора 30 культур бактерий, которые мы типировали по ферментативным свойствам (на основании тестов, описанных в литературных источниках и результатах изучения биохимических свойств штаммов бактерий вида *Bacillus subtilis*, полученных из музея кафедры МВЭ и ВСЭ УГСХА) и отнесли к виду *Bacillus subtilis*.

Использование элективной среды для выделения бактерий вида *Bacillus subtilis* позволяет сократить сроки выделения культур, однако, мы считаем, что изучение биохимических свойств выделенных бактерий также обязательно, так как бациллы – это до сих пор малоизученная группа микроорганизмов.

Из данных таблицы видно, что источники выделения бактерий вида *Bacillus subtilis* различны: это мясо, мясной фарш, специи, молоко, мука, что говорит о широком распространении данных бактерий и их устойчивости к условиям окружающей среды.

Выделенные культуры бактерий вида *Bacillus subtilis*

№ п.п	Номер культуры и присвоенное название	Объект выделения культуры	Место получения пробы
1.	№1 - <i>Bacillus subtilis</i> 1	Перец черный	Прод.рынок г.Ульяновска
2.	№2 - <i>Bacillus subtilis</i> 2	Мускатный орех	Прод.рынок г.Ульяновска
3.	№3 - <i>Bacillus subtilis</i> 3	Кориандр	Прод.рынок г.Ульяновска
4.	№4 - <i>Bacillus subtilis</i> 4	Смесь специй для плова	Прод.рынок г.Ульяновска
5.	№5 - <i>Bacillus subtilis</i> 5	Смесь специй для шашлыка	Прод.рынок г.Ульяновска
6.	№6 - <i>Bacillus subtilis</i> 6	Мука пшеничная	Прод.рынок г.Ульяновска
7.	№7 - <i>Bacillus subtilis</i> 7	Мука пшеничная	Прод.рынок г.Самары
8.	№8 - <i>Bacillus subtilis</i> 8	Молоко коровье	Прод.рынок г.Сенгилей
9.	№9 - <i>Bacillus subtilis</i> 9	Молоко коровье	Прод.рынок г.Ульяновска
10.	№10 - <i>Bacillus subtilis</i> 10	Молоко коровье	Прод.рынок г.Самары
11.	№11 - <i>Bacillus subtilis</i> 11	Мясной фарш	Прод.рынок г.Ульяновска
12.	№12 - <i>Bacillus subtilis</i> 12	Лавровый лист	Прод.рынок г.Сочи
13.	№ 13 - <i>Bacillus subtilis</i> 13	Сухой чеснок	Прод.рынок г.Геленджик
14.	№ 14 - <i>Bacillus subtilis</i> 14	Смесь специй для мяса	Прод.рынок г.Ульяновска
15.	№15 - <i>Bacillus subtilis</i> 15	Перец черный	Прод.рынок г.Ульяновска
16.	№16 - <i>Bacillus subtilis</i> 16	Мясо свинина	Прод.рынок г.Самары
17.	№ 17 - <i>Bacillus subtilis</i> 17	Мясной фарш	Прод.рынок г.Самары
18.	№ 18 - <i>Bacillus subtilis</i> 18	Молоко коровье	Прод.рынок г.Самары

19.	№19 - <i>Bacillus subtilis</i> 19	Смесь специй для плова	Прод.рынок г.Геленджик
20.	№20 - <i>Bacillus subtilis</i> 20	Лавровый лист	Прод.рынок г.Ульяновска
21.	№21 - <i>Bacillus subtilis</i> 21	Мясо баранины	Прод.рынок г.Самары
22.	№22 - <i>Bacillus subtilis</i> 22	Мясной фарш	Прод.рынок г.Ульяновска
23.	№23 - <i>Bacillus subtilis</i> 23	Мясо говядина	Прод.рынок г.Самары
24.	№24 - <i>Bacillus subtilis</i> 24	Мука пшеничная	Прод.рынок г.Ульяновска
25.	№25 - <i>Bacillus subtilis</i> 25	Перец черный	Прод.рынок г.Ульяновска
26.	№26 - <i>Bacillus subtilis</i> 26	Мука пшеничная	Прод.рынок г.Ульяновска
27.	№27 - <i>Bacillus subtilis</i> 27	Корица	Прод.рынок г.Самары
28.	№28 - <i>Bacillus subtilis</i> 28	Молоко коровье	Прод.рынок г.Ульяновска
29.	№29 - <i>Bacillus subtilis</i> 29	Молоко коровье	Прод.рынок г.Ульяновска
30.	№30 - <i>Bacillus subtilis</i> 30	Сухой чеснок	Прод.рынок г.Сочи

В последнее время исследователи обращают внимание на встречаемость в пищевых продуктах токсигенных культур этой группы, наличие у них факторов патогенности. Однако вследствие недооценки возможной роли бацилл в патологии человека и животных большинство авторов не исследовали токсичность выделенных культур.

Нами были проведены исследования по изучению патогенных свойств выделенных культур бактерий. Исследования проводились биопробой на белых мышах методом внутрибрюшинного введения 0,5 млрд. микробных клеток. Для этого использовали суточные бульонные культуры бактерий. Взвешивая каждого вида бактерий заражали по три белых мыши. Культуру признавали патогенной в случае гибели двух или более мышей в течение трех суток после заражения и относили ее к возбудителям болезни. Из 30 протестированных штаммов – 34 % - культур были признаны патогенными, так как их воздействие на организм белых мышей было летальным, а после вскрытия изучаемая культура была выделена из ЖКТ мыши.

При исследовании 74 проб на элективной питательной среде нами было выделено 30 штаммов бактерий вида *Bacillus subtilis*, что составило 41 % случаев. Этот показатель свидетельствует о высокой степени контаминации объектов санитарного надзора (на территории Ульяновской, Самарской областей и Краснодарского края) бактериями вида *Bacillus subtilis*, одна треть из которых обладает явно выраженными патогенными свойствами. Употребление в пищу продуктов, обсемененных бактериями вида *Bacillus subtilis*, может привести к пищевому отравлению.

Литература

1. Смирнов В.В., Резник С.Р., Василевская И.А. Спорообразующие аэробные бактерии – продуценты биологически активных веществ – Киев: Наукова Думка, 1982. – С.106-107.