

ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ БАКТЕРИЙ *VACILLUS CEREOUS* ПО БИОЛОГИЧЕСКИМ СВОЙСТВАМ

К.В. Кудряшова, аспирант

тел. 8(8422)55-95-47, kudryashova_91@list.ru

А.И. Калдыркаев, кандидат биологических наук, ст. преподаватель

тел. 8(8422)55-95-47, usxa@yandex.ru

Н.А. Феоктистова, кандидат биологических наук, доцент

тел. 8(8422)55-95-47, feokna@yandex.ru

М.А. Лыдина, кандидат биологических наук, ст. преподаватель

тел. 8(8422)55-95-47, feokna@yandex.ru

Д.А. Васильев, доктор биологических наук, профессор

тел. 8(8422)55-95-47, dav_ul@mail.ru

ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина»

Б.И. Шморгун, кандидат ветеринарных наук

ФГБУ «ВГНКИ»,

тел. 7 (499) 253-14-68, dav_ul@mail.ru

Ключевые слова: бактерии, *Vacillus cereus*, тинкториальные свойства, культуральные свойства, биохимические свойства, дифференциация, идентификация.

Работа посвящена изучению variability биологических свойств бактерий *Vacillus cereus* с целью создания дифференциальной системы для идентификации микроорганизмов. Изучение штаммов *Vacillus cereus* проводилось более чем по 30 биохимическим показателям. Также были исследованы существующие схемы типирования данных бактерий.

Введение. Анаэробные спорообразующие бактерии объединены в род *Bacillus*, включенный в семейство *Bacillaceae*. Основными признаками этого рода являются: формирование эндоспор, присутствие каталазы, в большинстве случаев положительная окраска по Граму [6].

Спорообразующие бактерии распространены повсеместно, в большинстве это обитатели почвы. Благодаря развитому ферментативному аппарату, отличаются разнообразием ферментов участвующих в деградации сложных органических соединений. Бациллы важное звено в круговороте веществ в природе. Variability биологических свойств аэробных споровых бактерий, обусловленная их приспособляемостью к условиям обитания, на протяжении всей истории изучения бацилл была и является одной из главных причин нечеткой таксономии внутри рода и многочисленных попыток ее усовершенствования [8].

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 [9].

Материалы и методы исследований. В работе были использованы референс штаммы *Bacillus cereus*: 3 музейных референс-штамма получены из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы Ульяновской ГСХА: *Bacillus cereus* №8035, *Bacillus cereus* №96, *Bacillus cereus* №2527 и 102 полевых штаммов бактерий данного вида, полученные в ходе исследований. Культуры бактерий были выделены из разных источников и обладали типичными для данного вида культурально-морфологическими и биохимическими свойствами.

В качестве гетерологичных штаммов бактерий использованы следующие виды, получены из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ УГСХА: бактерии рода *Bacillus* – 35 штаммов: вид *Bacillus subtilis* - 8 штаммов из них 2 референс-штамма №6633 и L₂, вид *Bacillus mycoides* - 8 штаммов из них 2 референс-штамма № 537 и Н; вид *Bacillus thuringiensis* - 3 штамма из них 1 референс-штамм *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*; вид *Bacillus mesentericus* (*pumilus*) - 8 штаммов из них

1 референс-штамм № 66; вид *Bacillus megaterium* - 8 штаммов из них 1 референс-штамм № 182; вид *Bacillus pseudoanthracis* - 3 штамма из них 1 референс-штамм.

Методы исследований - ГОСТ 1044.8-88 «Продукты пищевые. Методы определения *Bacillus cereus*», схема первичной дифференциации бактерий рода *Bacillus* Gordon (1973) [13,14].

Результаты исследований и их обсуждение.

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*.

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

Культуральные свойства *Bacillus cereus*. Для изучения культуральных свойств *B.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 °С.

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

В первые сутки на мясо-пептонном агаре культуры образовывали «восковидные» серо-белые распластанные колонии с неровными краями, имеющими зернистую структуру (часто образуют коричневым пигмент) размером 5-10 мм, через 48 часов культивирования колонии увеличивались в диаметре до 1,5-2,1 см.

При росте в мясо-пептонном бульоне в первые 18-24 часов (время проявления зависит от свойств штамма) происходит помутнение, с последующим просветлением 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.

На кровяном агаре при температуре 37 °С в течение 24 ч. микроб формирует крупные шероховатые матовые колонии в R-форме, с неровными волнистыми краями, образуя четкую зону β-гемолиза.

Разжижение желатина быстрое и сильное в течение 1-4 суток (80 % штаммов), вдоль укола образует горизонтальные отростки.

На селективных и дифференциально - диагностических средах для *Bacillus cereus*, все штаммы *Bacillus cereus* показали хороший рост, 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 фенолфалеинфосфатом натрия, бактерии растут в виде распластанных матовых колоний диаметром 1,0-1,5 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 10,0-30,0 мм.

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

На модифицированной среде Донована штаммы *Bacillus cereus* формировали белые округлые колонии со слегка изрезанными краями, окруженные зоной белого матового коагулята.

На полимиксиновом агаре штаммы *Bacillus cereus* растут в виде крупных, шероховатых колоний, окруженных зоной бело преципитата. Рост штаммов *Bacillus cereus* на среде Мосселя наблюдается в виде распластанных зернистых колоний розового цвета (вследствие отсутствия способности ферментировать маннит), окруженных зоной коагулята такого же цвета, среда бесцветная или со слабо-розовой окраской.

На солевом полимиксиновом агаре с ТТХ бактерии вида *Bacillus cereus* растут в виде ярко-рубиновых колоний на фоне широкой зоны глубокого равномерного белого коагулята, колонии в первые часы роста округлые, выпуклые, через 48 часов, распластанные по поверхности агара с изрезанными краями.

Биохимические свойства *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, редуциру-

ющие, ферментативные свойства бактерий с целью создания дифференциальной системы для идентификации микроорганизмов. Изучение штаммов *Bacillus cereus* проводилось более чем по 30 биохимическим показателям (таблица 1).

Одним из важных тестов является определение подвижности. Подвижность бактерий определяли посевом «уколом» в 0,7% агар, методом Шукевича и методом «висячая капля». Все исследуемые культуры *Bacillus cereus* – подвижны.

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 данного микроорганизма.

Бактерии вида *Bacillus cereus* способны давать рост 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 микроорганизма (таблица 1).

Для фенотипического определения вирулентных факторов определяли наличие лецитиназы (по наличию зоны коагулята на средах с желтком), гемолитическую активность - на мясо-пептонном агаре с добавлением 5% крови барана. Протеолитическую активность проверяли на питательном бульоне с желатином и молочном агаре. ДНКазную активность - на среде DNA BA (Difco).

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

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

Для определения фермента уреазы использовали среду Кристенсена, содержащую мочевины.

На цитратном агаре Симмонса бактерии изменяют цвет среды с зеленого в синий, что свидетельствует о способности изучаемых штаммов *Bacillus cereus* утилизировать цитрат натрия.

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

Изучение сахаролитических свойств бактерий было продублировано по системе для ускоренного определения биохимических свойств, произведенные ФГУН НИИЭМ им. Пастера).

Изучение способности гидролиза крахмала бактериями вида *Bacillus cereus* мы проводили на мясопептонном агаре с добавлением 2 % крахмала.

Проведенный анализ всех биологических признаков 105 штаммов вида *Bacillus cereus* обобщили в таблице 1.

Таблица 1 – Дифференциальные признаки *B. cereus*.

№	Дифференциально-диагностические тесты	Реакция		
		+	±	-
1.	Рост при 55°С	5	0	100
2.	Рост при рН 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
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-Проскауера	105	0	0
18.	Нитратредуктаза	105	0	0
19.	Триптофандезаминаза	0	0	105
20.	Фениланиндезаминаза	0	0	105
21.	Лизиндекарбоксылаза	0	0	105
22.	Орнитиндекарбоксылаза	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

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

Данный ГОСТ предлагает следующую схему выделения бактерий. При диагностировании бактерии по

Таблица 2 – Типирование 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 Граму	+	+	+	+	+	+	+
Тест Фогес-Проскауера	+	±	+	+	+	+	+
Лецитиназ	+	-	+	±	+	-	+
Спорообразование	+	+	+	+	+	+	+
Маннит	±	±	±	±	±	+	±
Редукция нитратов	+	±	±	+	+	+	+

Примечание: « + » - положительны,
« - » - отрицательны,
« ± » - переменный признак.

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

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>
Окраска по Граму	+	+	+	+	+	+	+
Наличие глобул	+	+	-	+	+	-	+
Споры эллипсоидные	+	+	-	+	+	+	-
Раздувание спорангиев	-	-	-	-	-	-	-
Образование кристаллов	-	-	-	-	-	-	±
Подвижность	±	±	+	-	-	+	±
Каталаза	+	+	+	+	+	+	+
Анаэробный рост	+	-	-	+	+	-	+
Реакция Фогес-Проскауера	+	-	+	+	+	+	+
Лецитиназа	+	-	-	+	+	-	+
Устойчивость к лизоциму	+	-	±	+	+	±	+
Рост при 7% NaCl	+	+	+	+	+	+	+
Кислота из глюкозы	+	±	+	+	+	+	+
Кислота из арабинозы	-	±	+	-	-	+	-
Кислота из ксилитозы	-	±	+	-	-	+	-
Кислота из маннита	-	+	+	-	-	+	-
Гидролиз крахмал	+	+	-	+	+	+	+
Утилизация цитрата	+	+	+	±	±	+	+
Редукция нитратов	+	±	-	+	+	+	+
Гидролиз казеина	+	+	+	+	+	+	+
Гидролиз тирозина	+	±	-	±	-	-	+

Примечание: « + » - положительны,
« - » - отрицательны,
« ± » - переменный признак.

данной схеме 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.

По росту на диагностических средах *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus mycoides* морфологически очень схожи. Используя систему биохимических тестов, мы сталкиваемся с проблемой вариабельности биохимических признаков (таблица 2). При диагностике, по тестам предложенной в ГОСТ 10888.4-88 дифференциация *Bacillus cereus* не достоверна. Так аналогичными признаками обладают многие бактерии вида *Bacillus* (таблица 2).

Анализируя данную схему можно сказать, что достоверно по ней можно типировать только *Bacillus subtilis* по отсутствию лецитиназной активности и способности ферментировать маннит.

Более расширенной схемой типирования является схема предложенная Gordon R. (1973) основанная на биологических особенностях бактерий (таблица 3).

По результатам исследований референс – штаммов разных видов рода *Bacillus*, а также выделенных в последствие полевых штаммов можно сделать вывод, что представители рода *Bacillus* отличается многообразием и сходством фенотипического признаков. Из чего следует, что тесты указанные в ГОСТ 1044.8-88 «Продукты пищевые. Методы определения *Bacillus cereus*», а также тесты предложенные Гордоном Р. (1973) не дают достоверного результата (таблица 3).

Таким образом, схема исследования по ГОСТ 1044.8-88 «Продукты пищевые. Методы определения *Bacillus cereus*» занимает 4 – 5 суток, с использованием дополнительных тестов схема удлинится (схема Gordon), усложняя тем самым процесс идентификации, не улучшая результата.

В настоящее время индикация и идентификация вышеназванных бацилл на перерабатывающих предприятиях в сырье животного и растительного происхождения проводится в настоящий момент только бактериологическими методами. Это трудоемкие и материалоемкие методики, дающие результаты через 2-5 суток. Усовершенствование этих методик и изыскание простого и доступного метода индикации и идентификации названных микроорганизмов – актуальная тема для исследований, результаты которых позволят повысить эффективность применения контрольных мер по системе ХАССП на перерабатывающих предприятиях мясной, молочной, рыбной и др. продукции, а также сделать данные исследования экономически более выгодными.

Возможность фагоидентификации вытекает из специфичности действия фагов, которая может быть настолько выражена, что позволяет дифференцировать не только отдельные виды, но и серологически неотличимые штаммы в пределах одного вида [1-3, 12]. Определяя фаготипы бактерий, вызывающих пищевую токсикоинфекцию, можно не только распознать подлинный источник возбудителя инфекции, но и проследить сложный путь возбудителя от источника к восприимчивому организму [4-5,7,11].

Библиографический список:

1. Васильев, Д.А. Разработка параметров постановки реакции нарастания титра фага для индикации бактерий *Bacillus mesentericus* в объектах санитарного надзора / Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин, Н.А. Феоктистова [и др.] // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2012. - № 3. - С. 69-73.
2. Васильев, Д.А. Характеристика биологических свойств бактериофагов вида *Bacillus subtilis* / Д.А. Васильев, Н.А. Феоктистова, М.А. Юдина [и др.] // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2011. - № 1. - С. 79-83.
3. Васильев, Д.А. Биосенсорная детекция бактерий рода *Bacillus* в молоке и молочных продуктах для предупреждения их порчи / Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин, Н.А. Феоктистова [и др.] // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2013. - № 4 (24). - С. 36-43.
4. Калдыркаев, А.И. Разработка системы фаговаров бактерий *Bacillus cereus* для идентификации и мониторинга данного микроорганизма / А.И. Калдыркаев, Н.А. Феоктистова, А.В. Алешкин // В книге: «Бактериофаги микроорганизмов значимых для животных, растений и человека». - Ульяновск, 2013. - С. 211-225.
5. Калдыркаев, А.И. Разработка системы фаговаров *Bacillus cereus* / А.И. Калдыркаев, Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев [и др.] // В сборнике: Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения: материалы V Международной научно-практической конференции. – Ульяновск, ГСХА. 2013. - С. 178-185.
6. Калдыркаев, А.И. Биохимические свойства бактерий *Bacillus cereus* / А.И. Калдыркаев, А.В. Алешкин, Н.А. Феоктистова [и др.] // В сборнике: Биотехнология: реальность и перспективы в сельском хозяйстве. - 2013. - С. 186-188.
7. Садеева, Н.Т. Выделение фагов бактерий вида *Bacillus cereus* / Н.Т. Садеева, Н.А. Феоктистова, М.А. Юдина [и др.] // В сборнике: Актуальные проблемы инфекционной патологии и биотехнологии: материалы V-й Всероссийской (с международным участием) студенческой научной конференции. – Ульяновск: ГСХА, 2012. - С. 14-17.

-
8. Феоктистова, Н.А. Перспективы применения бактериофагов рода *Bacillus* / Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев, М.А. Юдина [и др.] // В сборнике: Настоящее и будущее биотехнологии в решении проблем экологии, медицины, сельского хозяйства и промышленности Научно-практический семинар с международным участием. – Ульяновск: УлГУ, 2011. - С. 136-139.
 9. Феоктистова, Н.А. Разработка схемы исследования материала с целью выделения и ускоренной идентификации бактерий видов *Bacillus subtilis* и *Bacillus cereus* / Н.А. Феоктистова, А.И. Калдыркаев, А.Х. Мустафин // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. - 2011. - Т. 4. - № 32-1. - С. 288-290.
 10. Феоктистова, Н.А. Распространение *Bacillus cereus* и *Bacillus mycoides* в объектах санитарного надзора / Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин [и др.] // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2014. - № 1 (25). - С. 68-76.
 11. Феоктистова, Н.А. Методы выделения бактериофагов рода *Bacillus* / Н.А. Феоктистова, В.А. Макеев, М.А. Юдина [и др.] // Вестник ветеринарии. - 2011. - Т. 59. - № 4. - С. 88-89.
 12. Юдина, М.А. Разработка фагового препарата *Bacillus mesentericus* и область его практического применения/ автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова. Саратов, 2012. – С. 5.
 13. Gordon, R. The genus *Bacillus* / R. Gordon // In: Handb. Microbiol. Cleveland (Ohio), 1973. V.1. P.71–88.
 14. Электронный фонд правовой и научно-технической документации - URL: <http://docs.cntd.ru/document/gost-r-51808-2001> - (дата обращения 16.10.2014).

DIFFERENTIATION OF BACTERIA OF *BACILLUS CEREUS* ON BIOLOGICAL PROPERTIES

K.V. Kudryashova, A.I. Kaldyrkayev, N. A. Feoktistova, M. A. Lydina, D. A. Vasilyev, B. I. Shmorgun

Key words: *the bacteria, Bacillus cereus, tinctorially properties, cultural properties, biochemical properties, differentiation.*

Work is devoted to the study of the variability of the biological properties of bacteria of Bacillus cereus with the aim of creating a differential system for identification of microorganisms. The study of strains of Bacillus cereus was conducted more than 30 biochemical indicators. Were also investigated existing schema typing data bacteria.