

## РАЗРАБОТКА СХЕМЫ УСКОРЕННОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ БАКТЕРИЙ *BACILLUS MEGATERIUM*

**Н.А. Феоктистова**, кандидат биологических наук, доцент  
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

**С.Н. Золотухин**, доктор биологических наук, профессор  
тел. 8(8422)55-95-47, fvm.zol@yandex.ru  
ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина»

**Е.Г. Климентова**, кандидат биологических наук, доцент  
ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный университет»  
тел. 8(902)123-10-68, kloushel@mail.ru

**Н.А. Петрукова**, аспирант  
ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина»  
тел. 8(8422)55-95-47, romawecka89@mail.ru

**Ключевые слова:** бактерии, *Bacillus megaterium*, бактериофаги, биопрепарат, штаммы, пробы, биохимические свойства, метод «стекающая капля».

Работа посвящена разработке схемы ускоренной идентификации бактерий *Bacillus megaterium*. При проведении исследований разработана схема идентификации бактерий *Bacillus megaterium* с помощью сконструированного биопрепарата, позволяющая идентифицировать микроорганизмы за 29 часов при постановке реакции «стекающая капля» и 77 часов при использовании фагового биопрепарата и «Ключа для первичной дифференциации бактерий рода *Bacillus*» (R.A. Slepescu, H.T. Hemphill, 2006).

**Введение.** Бактерии вида *Bacillus megaterium* – почвенные сапрофиты, факультативные анаэробы, развивающиеся в диапазоне температур 28–37°C. **И хотя, данный вид бацилл** современная микробиология четко **относит к почвенным сапрофитам, его ближайшим родственником является патогенный для человека вид – *Bacillus cereus*, фитопатогенный – *Bacillus pumilus*.** В исследовании 16S рРНК каталогизации было показано, что *Bacillus subtilis* и другие эллипсоидные спорообразующие виды *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus*, формируют когерентный кластер. Генетическое родство вышеназванных микроорганизмов подразумевает и наличие аналогичных токсигенных свойств, проявляющихся при определенных условиях [3,4].

По литературным данным, бактерии *Bacillus megaterium* сложно поддаются идентификации на основе фенотипических характеристик. В настоящее время в бактериологических лабораториях на территории Российской Федерации идентификация *Bacillus megaterium*, основана на выделении чистой культуры микроорганизма и изучении его биохимических свойств. Этот метод трудоемок и не достаточно эффективен из-за выраженного полиморфизма ферментативных свойств данного вида бактерий [5].

В этой связи вызывает интерес практическое применение бактериофагов в процедуре биоконтроля продуктов питания, в том числе и молочных, подразумевающее их использование не только в качестве средств лечения животных и сельскохозяйственных культур и деконтаминационной обработке пищевого сырья и оборудования производств, но и в диагностических целях для идентификации пищевых патогенов. Создание отсутствующего на сегодняшний день в Российской Федерации специфического биопрепарата на базе бактериофагов активных в отношении *Bacillus megaterium*, позволит в сжатые сроки проводить надежную идентификацию данного вида бактерий.

### **Материалы и методы исследований.**

**Объекты исследований.** 22 штамм бактерий *Bacillus megaterium*, из них 1 референс-штамм *Bacillus megaterium* 182 из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина», 21 штамм был выделен в процессе диссертационного исследования из проб пищевых продуктов и других объектов санитарного надзора.

Штаммы бактериофагов – 18 изолятов бактериофагов *Bacillus megaterium*, выделены из проб почвы Приволжского Федерального округа [6]. В

Таблица 1 – Ключ для первичной дифференциации бактерий родов *Bacillus* и *Paenibacillus* [11]

1. Каталаза: положительный .....	2
отрицательный.....	17
2. Voges-Proskauer: положительный .....	3
отрицательный .....	10
3. Рост в анаэробном агаре: положительный.....	4
отрицательный.....	9
4. Рост при 50°C: положительный .....	5
отрицательный .....	6
5. Рост в 7% NaCl: положительный .....	<i>B. licheniformis</i>
отрицательный .....	<i>B. coagulans</i>
6. Кислота и газ из глюкозы (неорганический N): положительный.....	<i>B. polymyxa</i>
отрицательный.....	7
7. Редукция NO <sub>3</sub> до NO <sub>2</sub> : положительный.....	8
отрицательный .....	<i>Paenibacillus alvei</i>
8. Параспоральное тело в спорангии: положительный .....	<i>B. thuringiensis</i>
отрицательный .....	<i>B. cereus</i>
9. Гидролиз крахмала: положительный.....	<i>B. subtilis</i>
отрицательный.....	<i>B. pumilus</i>
10. Рост при 65°C: положительный .....	<i>B. stearothermophilus</i>
отрицательный .....	11
11. Гидролиз крахмала: положительный.....	12
отрицательный.....	15
12. Кислота и газ из глюкозы (неорганический N): положительный.....	<i>B. macerans</i>
отрицательный .....	13
13. Ширина палочки 1.0µм или больше: положительный.....	<i>B. megaterium</i>
отрицательный.....	14

Таблица 2 – Количество выделенных штаммов бактерий *Bacillus megaterium*

№ п.п	Название объектов санитарного надзора	Количество проб	Количество бактерий <i>Bacillus megaterium</i>
1.	Молочных и молоко содержащих продуктов	48	8
2.	Почва	32	6
3.	Молока из частных хозяйств	16	4
4.	Мясная продукция	11	3
Общее количество		107	21

качестве объектов исследований использовали пищевые продукты, приобретенные на продовольственных рынках населенных пунктов Приволжского Федерального округа.

Для выделения бактерий *Bacillus megaterium* использовали схему дифференциации бактерий рода *Bacillus*, которая составляла обширный список фенотипических признаков большинства представителей рода, были представлены процедуры для индикации и идентификации единичных видов (табл. 1) [10,11].

Изучение морфологических, культуральных, биохимических свойств выделенных бактерий проводили по методам Gordon et al. [10]. Выделение и изучение биологических свойств бактериофагов проводили по методикам, модифицированным

Васильевым Д.А. с соавтр. [1,2,9]. Статистическую обработку результатов опытов проводили с применением пакета прикладных программ Statistica 6.0. (for Windows; «Stat Soft Ins.», США), Microsoft Excel 2003 (for Windows XP).

**Результаты исследований и их обсуждение.**

Первой задачей наших исследований стало выделение бактерий *Bacillus megaterium* из объектов санитарного надзора. В период с 2012 по 2014 год было исследовано на наличие бактерий *Bacillus megaterium* пробы пищевых продуктов: 48 - молочных и молоко содержащих продуктов (сыр, творог, сырки, мороженое и др.), 32 - пробы почвы различного хозяйственного значения Ульяновской и Самарской областей, 16 - молоко из частных хозяйств, 11 - мясная продукция.

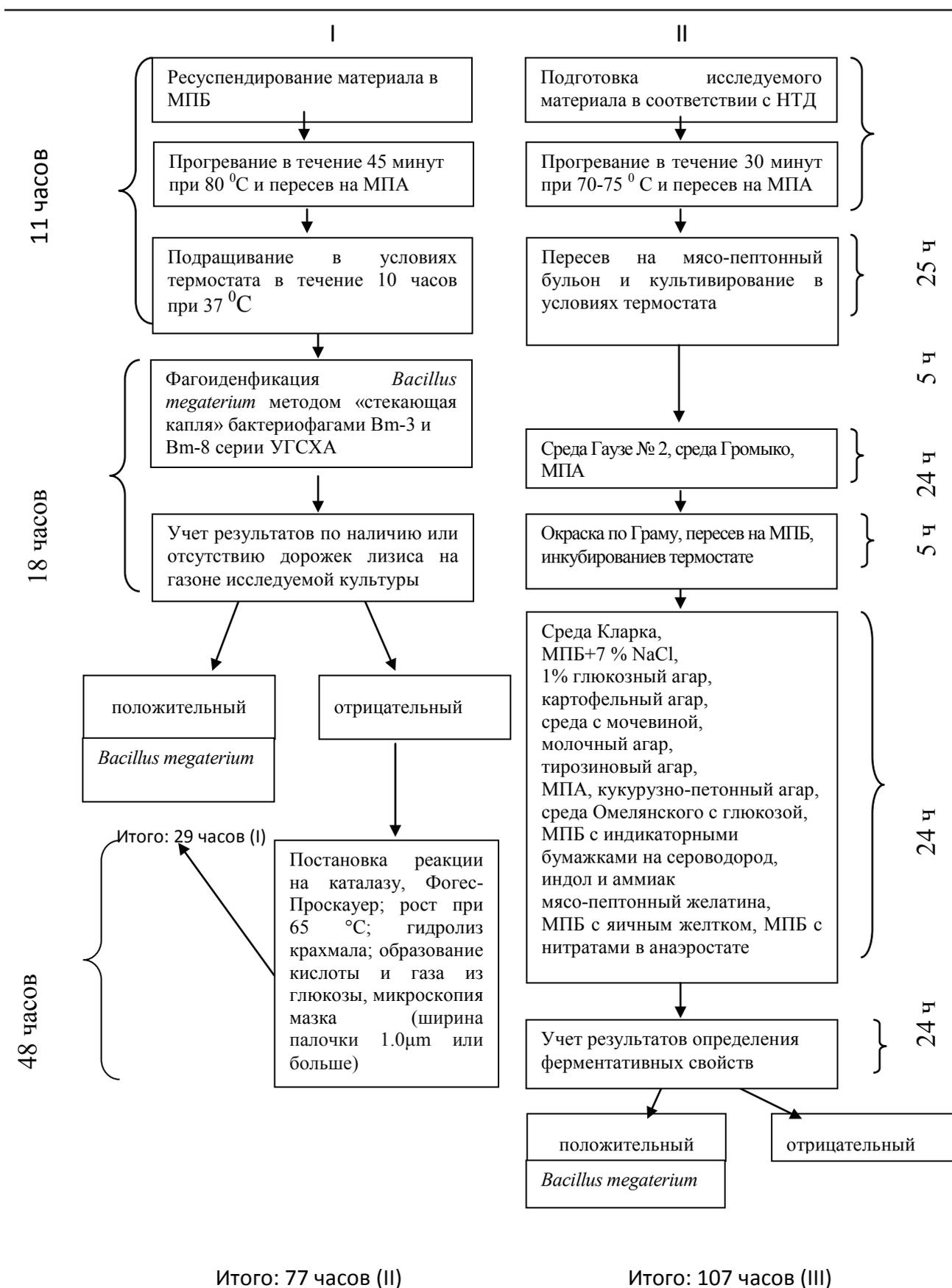


Рисунок 1 - Схема ускоренной идентификации бактерий *Bacillus megaterium* с помощью селекционированных нами бактериофагов (I) в сравнении со схемой выделения и дифференциации бацилл первой морфологической группы (III) и «Ключом для первичной дифференциации бактерий рода *Bacillus*» (II)

По результатам проведенных опытов было выделено 21 культура бактерий, которые были классифицированы по биохимическим свойствам, согласно схеме идентификации бактерий рода *Bacillus* первой морфологической группы по R. Gordon [10] и отнесли к виду *Bacillus megaterium* (табл. 2).

Уровень контаминации всех исследованных проб бактериями *Bacillus megaterium* составил 19,6 %.

Выделенные нами бактерии палочкообразной формы, спорообразующие, капсул не образуют. Бактерии вырастают на мясо-пептонном агаре в виде резко окаймленные колонии грязновато-белого цвета, не выделяют пигменты в питательную среду. *Bacillus megaterium* на мясопептонном бульоне растет в виде осадка на дне пробирки с помутнением среды; формируют белые глянцевые колонии на твердой питательной среде. Наблюдаются положительные реакции на казеин и желатин. Каталаза положительная. Ферментация глюкозы и лактозы – положительная. Выделяет газ из ксилозы. Гидролизует крахмал, казеин. Культивируются на агаре в анаэробных условиях и в мясо-пептонном агаре. Максимальная температура 35 - 40°C, минимальная 10 - 15°C. Споры отмирают через 3 – 10 мин при 100°C. Оптимальный рН среды равен 6,5. Возможно выращивание в среде от 2- 7% NaCl. Используя строгую специфичность биопрепарата, нами был разработан экспресс-метод идентификации бактерии *Bacillus megaterium* по показателям лизиса культур на плотной питательной среде («метод стекающей капли»). Подготовку и посев пище-

вых продуктов, подлежащих исследованию, проводили в соответствии ГОСТ 26669 – 85 «Продукты пищевые и вкусовые. Подготовка проб для микробиологических анализов». Срок бактериологического исследования по традиционной схеме выделения и дифференциации бацилл первой морфологической группы (Gordon, 1973), составил 107 часов при значительных экономических затратах. Модифицированная схема ускоренной идентификации бактерий *Bacillus megaterium* с применением «Ключа...» составляет 77 часов.

**Заключение.** Разработанная нами схема (рис. 1) позволяет идентифицировать бактерии *Bacillus megaterium* за 29 часов. Эффективность применения фагового биопрепарата в методике «стекающая капля» значительно экономит питательные среды и реактивы, снижает трудозатраты и повышает эффективность идентификационной методики.

Схема идентификации бактерий *Bacillus megaterium* с помощью сконструированного биопрепарата на основе специфичных бактериофагов, позволяет идентифицировать микроорганизмы за 29 часов при постановке реакции «стекающая капля» и 77 часов при комплексном применении фагового биопрепарата и «Ключа для первичной дифференциации бактерий рода *Bacillus*» (R.A. Slepescu, H.T. Hemphill, 2006). Введение фаговых тестов в систему идентификации бактерий рода *Bacillus* позволяет исследователям получить четкий результат, основанный на биологическом взаимодействии системы «фаг-бактерия».

### Библиографический список:

1. Васильев, Д.А. Характеристика биологических свойств бактериофагов вида *Bacillus subtilis* / Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин, Н.А. Феоктистова [и др.] // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2011. - № 1. - С. 79-83.
2. 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.
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. Петрукова, Н.А. Биоиндикация содержания бактерий *Bacillus megaterium* в молоке и молочных продуктах / Н.А. Петрукова, Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев [и др.] // «Экология родного края: проблемы и пути их решения»: материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. – Киров, 2014. - С. 375-377.
6. Романова, Н.А. Сравнительная эффективность методов выделения фагов бактерий *Bacillus megaterium* / Н.А. Романова, Н.А. Феоктистова, С.Н. Золотухин [и др.] // Вестник ветеринарии. - 2013. - № 1 (64). - С. 26-27.
7. 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.
8. Феоктистова, Н.А. Выделение и изучение биологических свойств бактериофагов рода *Proteus*, конструирование на их основе биопрепарата и разработка параметров практического применения / автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова. Саратов, 2006. – С. 6.
9. 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.

- 
10. Gordon, R. The genus *Bacillus* / R. Gordon // In: Handb. Microbiol. Cleveland (Ohio), 1973. V.1. P.71–88.  
11. Slepecky, R.A. The Genus *Bacillus*-Nonmedical / R.A. Slepecky, H.T. Hemphill // Prokaryotes. – 2006. - № 4. – P. 530–562

## DEVELOPMENT OF THE SCHEME OF THE ACCELERATED IDENTIFICATION OF BACTERIA OF *BACILLUS MEGATERIUM*

N. A. Feoktistova, D. A. Vasilyev, S. N. Zolotukhin, N. A. Petrukova,

**Key words:** *bacteria, Bacillus megaterium, bacteriophages, biological product, strains, tests, biochemical properties, “flowing-down drop” method.*

*Work is devoted to development of the scheme of the accelerated identification of bacteria of Bacillus megaterium. When carrying out researches the scheme of identification of bacteria of Bacillus megaterium by means of the designed biological product allowing to identify microorganisms in 29 hours at reaction statement “the flowing-down drop” and 77 hours when using a fagovy biological product and “A key for primary differentiation of bacteria of the sort Bacillus” is developed (R.A. Slepecky, H.T. Hemphill, 2006).*

УДК 57: 579.2

## ОЦЕНКА CRA-МЕТОДА В ОБНАРУЖЕНИИ БИОПЛЕНОК ОБРАЗОВАННЫХ БАКТЕРИЯМИ РОДА *KLEBSIELLA*

Научные исследования проведены при финансовой поддержке  
«Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере»

**Г.Р. Садртдинова, аспирант**

Тел: 89276349640, sadrtdinova-guzlik@rambler.ru

**Е.А. Ляшенко, к.б.н., доцент**

Тел: 89278295485, elena-l18@mail.ru

**А.Г. Шестаков, к.б.н., с.н.с.**

Тел: 89510936434, andrewsh@newmail.ru

**Д.А. Васильев, д.б.н., профессор**

Тел: 8 (8422)49-55-63, dav\_ul@mail.ru

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

**Ключевые слова:** биопленки, детекция, бактерия, штамм, матрикс.

*В статье рассматриваются особенности роста и возможность визуализации образования биопленки бактерий рода *Klebsiella* spp. на дифференциально-диагностической твердой среде.*

Биопленка - представляет собой достаточно сложно организованные микробные сообщества [2]. Основным элементом биопленок является экзополимерный матрикс, адгезированный на поверхностях различных материалов: абиотического происхожде-

ния (трубы водоканалов, катетеры, протезы, различного рода медицинские устройства и др.) и биотических (образование налета на деснах, почечные камни, альвеолы легких) [1]. Формирование биопленки - способ бактерий перейти от «кочевого» образа жиз-