

УДК 579.64

ИЗУЧЕНИЕ НЕКОТОРЫХ БИОХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ОБЪЕКТОВ САНИТАРНОГО НАДЗОРА

К.В. Белова, аспирант

тел. 8(8422)55-95-47, belova_ksenya@mail.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

С.Н. Золотухин, доктор биологических наук, профессор

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

ФГБОУ ВО Ульяновская ГСХА

Б.И. Шморгун, кандидат ветеринарных наук

ФГБУ «ВГНКИ»,

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

Ключевые слова: *бациллы, штаммы, биохимические тесты, Bacillus coagulans, схема Гордона.*

Работа посвящена изучению биохимических свойств бактерий, выделенных из объектов санитарного надзора.

Экспериментальным путем было доказано, что референс-штаммы бактерий рода *Bacillus* и выделенные нами культуры бацилл обладают некоторыми сходными биохимическими свойствами. На основании полученных данных мы предварительно относим выделенные нами 21 штаммов (из 35 выделенных) к виду *Bacillus coagulans*

Введение. Из литературных данных известно, что спорообразующие аэробные бактерии, к которым относятся бактерии *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus (mesentericus)*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus megaterium*, являются активными продуцентами разнообразных гидролитических ферментов и используют в качестве питательных вещества белки, жиры, углеводы, глюкозиды, спирты и органические кислоты [3,7-9,11]. Типирование вышеназванных бактерий основано на изучении их биологических свойств, что является чрезвычайно трудоемким процессом [4-6].

Материалы и методы исследований. Для идентификации бактерий использовали схему Гордона [1-2,10]. Выделенные в результате

бактерии проверяли на каталазную активность и подвижность. Затем сделали пересев с МПА в МПБ, и через 24 часа инкубирования в термостате при 37°C посеяли на среды:

- мясо-пептонная желатина,
- картофельный агар,
- МПБ с яичным желтком,
- среда Кларка,
- МПБ с индикаторными бумажками на аммиак, сероводород и индол,
- МПА.

Оценка результатов посевов проводилась через 24-48 часов инкубирования в термостате (37°C).

Методика определения биохимических свойств выделенных штаммов бактерий рода *Bacillus* по Gordon.

1. Подвижность микроорганизмов изучали в препаратах «висячая капля» и «раздавленная капля», а также при посеве культуры в полужидкий агар (0,45-0,75% агара) уколом.

Определение подвижности бактерий методом «висячая капля».

Висячую каплю готовили на специальных предметных стеклах с лункой. На покровное стекло наносили маленькую каплю суспензии из физраствора и микробов. Эту каплю закрывали предметным стеклом с лункой, вокруг которой предварительно наносили тонкий слой вазелина. Покровное стекло накрывали так, чтобы капля оказалась в центре лунки. Благодаря вазелину покровное стекло прилипло к предметному. После этого предметное стекло перевернули, и капля оказалась висячей.

Установка висячей капли под микроскопом требует выполнения определенных правил, иначе покровное стекло будет раздавлено объективом. Сначала при слабом увеличении, (с опущенным конденсором и полужакрытой диафрагмой) отыскивали край капли, который ставили в центре поля зрения. В таком положении стекло закрепляли зажимами. После этого на покровное стекло наносили каплю кедрового масла, в которую под контролем глаза опускали иммерсионный объектив до соприкосновения со стеклом, затем, медленно поднимая конденсор и усиливая освещение частичным раскрытием диафрагмы, устанавливали фокус. Край капли позволил быстрее установить иммерсионный объектив в фокусе.

Определение подвижности бактерий методом «раздавленная капля».

Раздавленную каплю готовили, накрывая покровным стеклом каплю из смеси физиологического раствора и микробов, помещенную на предметное стекло. На покровное стекло наносили каплю кедрового масла и препарат рассматривали под иммерсионной системой микро-

скопа при слегка затемненном конденсоре.

В результате проведенных исследований было установлено, что штамм бактерий вида *Bacillus coagulans подвижен*.

2. Для изучения продукции каталазы чашечную культуру заливали 10% H_2O_2 . Образовавшие пузырьки газа свидетельствовали о наличии каталазы.

3. Гидролиз крахмала наблюдали на картофельном агаре. Чашки Петри с засеянным картофельным агаром через 24ч. заливали раствором Люголя. Светлые зоны вокруг посевов свидетельствовали о гидролизе крахмала.

4. Образование аммиака, сероводорода и индола определяли с помощью индикаторных бумажек, помещенных под пробку пробирок с МПБ. При образовании индола бумажка приобретала сиреневый или малиновый цвет различной интенсивности.

Об образовании сероводорода судили по почернению индикаторной бумажки. При образовании аммиака индикаторная бумажка краснеет.

5. Продукцию летициназы изучали на бульоне с яичным желтком. О летициназной активности судили по появлению беловатой мути и всплывающим хлопьям.

6. Рост в анаэробных условиях изучали на анаэробноагаре. Петлю суточной бульонной культуры засеивали уколом в столбик среды. Рост культуры по всей длине укола свидетельствовали об анаэробном росте.

7. О разжижении желатина судили по разжижению мясо-пептонной желатине.

8. С помощью реакции Фогес-Проскауэра устанавливали в среде ацетон, промежуточный продукт, образующийся при распаде глюкозы. Для постановки реакции Фогес-Проскауэра (в модификации Барита) культуры выращивали на среде Кларка 1-3 суток при 37 °С. Затем 1 мл культуральной жидкости переносили в пробирку и прибавляли 0,6 мл α – нафтола (5% раствор в абсолютном спирте) и 0,2 мл 40% КОН, взбалтывали. При положительной реакции через 2-5 мин наблюдали розовое окрашивание. У штаммов, дающих сильную реакцию, окраска становится интенсивной и через 30 мин, а через 1 час переходит в малиновую.

В случае отрицательной реакции розового окрашивания не наблюдается, и раствор принимает цвет меди.

Результаты исследований и их обсуждение. Все выделенные бактерии палочкообразной формы, спорообразующие, капсул не образуют. На мясо-пептонном агаре вырастают в виде сочных, с морщинистой поверхностью, слизистых матовых колоний серо-белого цвета с

Таблица 1–Характеристика свойств референс-штаммов и выделенных бактерий

Наз-вание куль-тур	Свойства							
	Каталаза	Желатиновая среда	Картофельный агар	Яичный желток	Среда Кларка	Аммиак	Сероводород	Индол
566	+	+	+	-	-	-	-	+
10468	+	+			-			
10473	+	+			-			
34 F ₂	+	+	+	+	-	-	-	+
Шуя - 15		+	+		-	+		
66	+	+	+	+	-	+	-	+
182	+	+	+	+	-	-	-	-
1	+	+	+		-	-	-	+
2	+	+	+		-	-	-	+
3	+	+	+	-	-	+	-	+
4	+	+	+	+	-	+	-	+
5	+	+	+	+	-	+	+	+
6	+	+	+	+	-	+	+	-
7	+	+	+	+	-	+	-	+
8	+	+	+	+	-	-	-	+
9.1	+	+	+	+	-	-	+	-
9.2	+	+	+	+	-	+	-	-
10			+	-	-			
11	+	+	+	+	-	+	+	-
12	+	+	+	-	-	+	-	-
13	+	+	+	+	-	+	-	-
14	+	+	+	+	-	+	-	+
15.1			-	-	-			
15.2			-	-	-			
15.3			-	-	-			
16			+	-	-			
16.1			-	-	-			
16.2			+	-	-			
17	+	+	+	+	-	-	-	-
18	+	+	+	+	-	+	-	+
20			+	-	-			
22			+	+	-			
24				+	-			
25	+		+	-	-			
26.1	+		+	-	-	+	-	
26.2	+		+	-	-	-	+	
28.2	+		+	-	-	+	+	
28.3	+		+	-	-	-	+	
29	+		+	-	-	-	+	
30.1	+		+	-	-	+	-	
30.2	+		+	+	-	+	-	
32	+		+	+	-	+	-	

**Таблица 2 – Результаты изучения биологических свойств
бактерий рода *Bacillus*, выделенных из объектов санитарного
надзора**

№ куль-туры	№ про-бы	Объект выделения
1	1	1) Имбирь молотый. ООО «Сантус ЛТД» 2) Приправа для плова. ООО «ПрофАгроТехника» 3) Приправа универсальная. Восточный гость. ООО «ТД Холдинг» 4) Куркума. Galeo. KAMISS.A. 5) Корица молотая. ООО «ПрофАгроТехника»
2	2	1) Приправа для плова. CYKORIAS.A. 2) Приправа для гриля. ООО «ПрофАгроТехника» 3) Корица. ООО «ПрофАгроТехника» 4) Мускатный орех молотый. ООО «Сантус ЛТД» 5) Имбирь. Молотый. ООО «ПрофАгроТехника»
3	3	1) Петрушка. ООО «ПрофАгроТехника» 2) Хмели-сунели. Спецсервис. 3) Прянич. Приправа для пельменей. ООО «Производственная компания РЕКА» 4) Перец черный молотый. CYKORIAS.A. 5) Приправа из смеси перцев. CYKORIAS.A.
4	4	1) Корица молотая. Galeo. KAMISS.A. 2) Куркума молотая. ООО «Сантус ЛТД» 3) Приправа для курицы. CYKORIAS.A. 4) Черный молотый перец. ООО «Пищевые технологии» 5) Корица молотая. ООО «Аллегро специи»
5	5	Почва различного хозяйственного значения (р.п.Гловтовка Ульяновская область): 1) проба взятая рядом с туалетом 2) около дороги 3) проба около речки
6	6	Овощные консервы (томатный сок) домашнего приготовления
7	7	Почва различного хозяйственного значения (г. Инза Ульяновская область): 1) проба почвы около яблони 2) проба почвы с мусором
8	8	Почва различного хозяйственного значения (г. Сенгилей Ульяновская область): 1) около бани 2) проба с костра

Продолжение таблицы 2

№ куль-туры	№ про-бы	Объект выделения
9	10	Почва различного хозяйственного значения (р.п.Кузоватово Ульяновская область)
10	11	Почва различного хозяйственного значения (р.п.Радищево Ульяновская область)
11	14	Маринованные помидоры домашнего приготовления
12	16	Почва различного хозяйственного значения (р.п.Павловка Ульяновская область)
13	17	Почва различного хозяйственного значения (р.п.Николаевка Ульяновская область)
14	18	Овощные консервы домашнего приготовления на основе томатного сока
15	20	Торфосорбент «OSLANSORB»
16	25	Морковь
17	26.1	1) Мята перечная 2) Перец черный горошком «Фарсис» 3) Фитогастрол (желудочно-кишечный сбор) «КРАСНО-ГОРСКЛЕКАРСТВА. МАРКА КАЧЕСТВА»
18	28.3	1) Nestle Nesquik 2) Какао порошок. Люкс 3) Шоколадные реки
19	29	1) Смесь перцев 2) Перец черный горошком 3) Корица молотая
20	30.1	1) Кулинар. Макароны по-флотски 2) Перец черный молотый 3) Красный перец
21	32	1) Мука пшеничная хлебопекарная. Сорт высший ПОДГОРЕНСКАЯ. Лимак. ОАО «ЛИПЕЦКХЛЕБМАКАРОНПРОМ» 2) АЛАДУШКИН. Мука пшеничная хлебопекарная высший сорт. ОАО «Петербургский мельничный комбинат» 3) Плюшечка-Ватрушечка. ЗАО «Магнитогорский комбинат хлебопродуктов - СИТНО» 4) WHEAT FLOUR. МАКФА. ОАО «Макфа» 5) Алейка. ЗАО «АЛЕЙСКЗЕРНОПРОДУКТ имени С.Н. Старовойтова»

волнистым краем. Все штаммы *Bacillus coagulans* вызывают слабое помутнение мясо-пептонного бульона и образуют пленку на поверхности среды; гемолитическая активность не выявлена. Оптимальная температура роста 37°C. При разложении белков выделяют много сероводорода. Вызывают гидролиз крахмала.

Экспериментальным путем было доказано, что музейные штаммы бактерий *Bacillus coagulans* 566, *Bacillus coagulans* 10468, *Bacillus coagulans* 10473 и выделенные нами культуры бацилл обладают аналогичными биохимическими свойствами. Результаты исследований представлены в таблице 1.

Заключение. На основании тестов схемы Gordona [7] мы предварительно относим выделенные нами 21 штамм (из 35 выделенных) к виду *Bacillus coagulans* Результаты исследований представлены в таблице 2.

Библиографический список

1. Белова, К.В. Характеристика биологических свойств бактерий *Bacillus coagulans* / К.В. Белова, Н.А. Феоктистова // Актуальные проблемы инфекционной патологии и биотехнологии. Материалы VII-й Международной студенческой научной конференции. - том 2. - Ульяновск, 2015. - с. 197. - URL: http://old.ugsha.ru/index.php?option=com_content&task=view&id=7215&Itemid=1413 – дата обращения 15.12.2015.
2. 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.
3. 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.
4. Клевакин, В. М. Санитарная микробиология пищевых продуктов / В.М. Клевакин, В.В. Карцев. - Л.: Медицина, 1986. - с. 34-45.
5. Сидоров, М.А. Определитель зоопатогенных микроорганизмов: справочник / М.А. Сидоров. - М. Колос, 1995. - с. 104-112.
6. Смирнов, В.В. Методические рекомендации по выделению и идентификации бактерий рода *Bacillus* из организма человека и животных / В.В. Смирнов, С.Р. Резник, И.Б. Сорокулова. - Киев: Наукова думка, 1983. - с. 51.
7. Феоктистова, Н.А. Разработка схемы исследования материала с целью выделения и ускоренной идентификации бактерий видов

- Bacillus cereus* и *Bacillus subtilis* / Н.А. Феоктистова, А.И. Мустафин, А.И. Калдыркаев // Известия Оренбургского государственного аграрного университета, 2011. - № 4(32). - с. 288-291.
8. Феоктистова, Н.А. Выделение и изучение биологических свойств бактериофагов рода *Proteus*, конструирование на их основе био-препарата и разработка параметров практического применения/ диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова. - Саратов, 2006. – С. 53.
 9. Феоктистова, Н.А. Выявление бацилл, вызывающих порчу продуктов питания (БВП) бактериологическими методами / Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев, Т.Г. Юдина, С.Н. Золотухин // В сборнике: Актуальные вопросы ветеринарной науки: материалы Международной научно-практической конференции. – Ульяновск, 2015. - С. 103-110.
 10. Феоктистова, Н.А. Результаты сравнительного анализа бактериологических методов исследований какао-порошка на наличие бацилл, вызывающих порчу продуктов питания (БВП) / Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2015. - № 1 - (29). - С. 69-76.
 11. Феоктистова, Н.А. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов бактерий *Bacillus subtilis* / Н.А. Феоктистова // В книге: «Бактериофаги микроорганизмов значимых для животных, растений и человека». - Ульяновск, 2013. - С. 186-197.

STUDYING OF SOME BIOCHEMICAL PROPERTIES OF THE BACTERIA ALLOCATED FROM OBJECTS OF SANITARY INSPECTION

Belova K.V., Lydina M. A., Vasilyev D. A., Zolotukhin S. N., Shmorgun B. I.

Keywords: bacilli, strains, biochemical tests, *Bacillus coagulans*, Gordon's scheme.

Work is devoted to studying of biochemical properties of the bacteria allocated from objects of sanitary inspection. It was experimentally proved that referens-strains of bacteria of the sort *Bacillus* and cultures of bacilli allocated with us possess some similar biochemical properties. On the basis of the obtained data we carry previously allocated with us 21 strains (from 35 allocated) to a type of *Bacillus coagulans*.