

РАСПРОСТРАНЕНИЕ БАКТЕРИЙ *VACILLUS PUMILIS* В ОБЪЕКТАХ ВЕТЕРИНАРНО-САНИТАРНОГО НАДЗОРА

Феоктистова Наталья Александровна, кандидат биологических наук, доцент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»
ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ
432017, г. Ульяновск, бульвар Новый Венец, 1; 8(8422)55-95-47
e-mail: feokna@yandex.ru

Ключевые слова: идентификация, *Vacillus pumilus*, бактерии, пробы, биохимические свойства, изоляты, фитопатогены

В статье представлены результаты разработки схемы выделения и идентификации бактерий *Vacillus pumilus* и ее апробации. С учетом рекомендаций «Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria» (2015), подвергая анализу следующие биологические характеристики выделенных штаммов бактерий: тинкториальные и морфологические свойства, продукция пигментов и каталазы, возможности роста в аэробных/анаэробных условиях, особенности биохимической активности и включая выделение ферментов, разрушающих клеточные стенки растений, выделенные нами 74 штамма бактерии были отнесены к группе «*Vacillus subtilis*» и типированы как *Vacillus pumilus*. Экспериментально было установлено, что все выделенные культуры по анализируемым фенотипическим показателям не значительно отличаются друг от друга. Пектолитическая активность у всех изолированных штаммов наглядно регистрировалась только через 72-96 часов в виде ореолов вокруг бактериальных колоний. Анализ воздействия неблагоприятных факторов на выделенные бактерии показал, что все изолированные штаммы проявляли способность к росту на МПА, содержащем 10 % р-р NaCl и при понижении температуры культивирования (зафиксирован рост при $t +10$ °C). Однако отмечено, что целлюлозолитическая активность фиксировалась у штаммов, выделенных из первой и второй групп проб (зерномучные товары – 95 проб) и (плодоовощные товары – 237 проб), но отсутствовала у 22 почвенных изолятов, выделенных из третьей группы проб (210 проб). Совокупный процент контаминации 542 объектов исследований, зарегистрированный нами, составил 13,7 %, из них процент обсеменения зерномучных товаров – 12,6 %, плодоовощных товаров – 16,8 % и проб почвы – 10,5 %.

Исследования проводятся в соответствии с Тематическим планом научно-исследовательских работ, выполняемых по заданию МСХ РФ в 2019 году.

Введение

На сегодняшний момент ряд исследователей выбрали объектом своего научного интереса бактерии *Vacillus pumilus*, что обусловлено способностью некоторых штаммов данного вида к продукции биологически активных веществ, которые находят свое применение в биотехнологической отрасли [1-5]. Литературные данные о возможности продуцировать вторичные метаболиты, имеющие выраженную антибактериальную активность и физиологически активные регуляторы роста растений, делают бактерии *Vacillus pumilus* актуальными для разработки препаратов-стимуляторов роста растений и препаратов для биоконтроля [6-10]. Однако, есть сообщения ученых, где описаны патологические процессы у теплокровных, вызываемые *Vacillus pumilus*, например бактериемия, пищевые отравления, сепсис, карбункулоподобные поражения кожи [11-15].

Есть сообщения о *Vacillus pumilus* как о фитопатогенных бактериях, способных вызывать мягкую гниль у овощей, фруктов и технических культур (хлопчатника и льна) [16 - 19]. Однако в связи с по-

всеобщим распространением бактерий *Vacillus pumilus* во внешней среде и традиционным отношением к непатогенным особому вниманию к фактам об указанных выше поражениях растений не уделялось.

Нами не обнаружены публикации, описывающие механизмы патогенеза и изменения физиолого-биохимических свойств фитопатогенных представителей *Vacillus pumilus* в сравнении с почвенными сапрофитами. Выделение бактерий *Vacillus pumilus* из объектов внешней среды, сельскохозяйственного сырья растительного происхождения и продуктов питания с последующей идентификацией по авторской схеме позволит расширить информационную базу по данному вопросу.

Цель работы - разработать схему выделения на основе изучения культуральных, тинкториальных и биохимических свойств бактерий *Vacillus pumilus*, используя в качестве объектов исследований пробы муки, пряностей, овощей и корнеплодов, почвы.

Объекты и методы исследований

Бактериологическая схема идентифика-

ции бактерий *Bacillus pumilus* разрабатывалась с учетом биологических характеристик представителей рода *Bacillus*, описанных в «Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria» (2015) [20], методическое обеспечение исследований [21]. Эталонный микроорганизм - *Bacillus pumilus* 66 получен в лиофилизированном виде из музея НИИЦ-МиБ ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ.

На наличие бактериальной контаминации *Bacillus pumilus* было исследовано 542 пробы, из которых сформировали три группы образцов: первая – это 55 проб хлеба из муки пшеничной высшего и первого сортов, 40 проб муки пшеничной высшего и первого сортов; вторая - 90 проб пряностей и специй, 54 пробы томатов, 34 пробы огурцов, 44 пробы картофеля, 15 проб цуккини; третья – 210 проб почвы различного хозяйственного значения Приволжского Федерального округа (рис. 1). Для исследований отбирали пробы плодоовощной продукции с признаками бактериоза; из 55 проб хлеба 8 было с признаками «картофельной болезни хлеба». Пробы почвы отбирались в соответствии с НТД [22].

Питательные среды: питательный бульон ТУ 10-02-02-789-176-94 (ООО «БиоКомпас-С», РФ), эмульсия яичного желтка («HiMedia», Индия), среда Мосселя (МYP-агар) (ФБУН ГНЦ ПМБ, РФ); питательный агар для культивирования микроорганизмов сухой (ГРМ-агар) ТУ 9398-020-78095326-2006 (ФБУН ГНЦ ПМБ, РФ); Микро-ГРАМ-НИЦФ набор реагентов для окраски микроорганизмов по методу Грама ТУ 9398-002-39484474-2002 (ЗАО НИЦФ, РФ); среды Гисса с бромкрезоловым пурпурным; с арабинозой с индикатором ВР (с глюкозой); среда Гисса с маннозой БНТ, с галактозой БНТ, раффинозой БНТ (ООО «Биотехновация», РФ); агар маннито-солевой (среда № 10) (Conda, Испания), среда Гисса с салицином, с ксилозой, с лактозой, с мальтозой, с рамнозой, с сорбитом («HiMedia», Индия), среда Кларка (ООО «БиоКомпас-С», РФ), Urea Agar Base (Christensen) («HiMedia», Индия), Urea 40% («HiMedia», Индия); Nutrient Gelatin («HiMedia», Индия); нитратный агар («HiMedia», Индия); среда № 7 ISP тирозиновый агар («HiMedia», Индия); Corn Meal Peptone Yeast Agar («HiMedia», Индия); Arginine Dihydrolase Broth («HiMedia», Индия); цитратный агар Симмонса (ФГУП «НПО Микроген», РФ); Blood Agar Base («HiMedia», Индия). Реактивы: водный раствор малахитовой зелени, сульфаниловая кислота, альфа-нафтиламинный реактив, уксусная кислота, перекись водорода 3 % (ООО Росбио), 0,6 % спиртовой раствор α-нафтола, йод



Рис. 1 – Образцы исследований

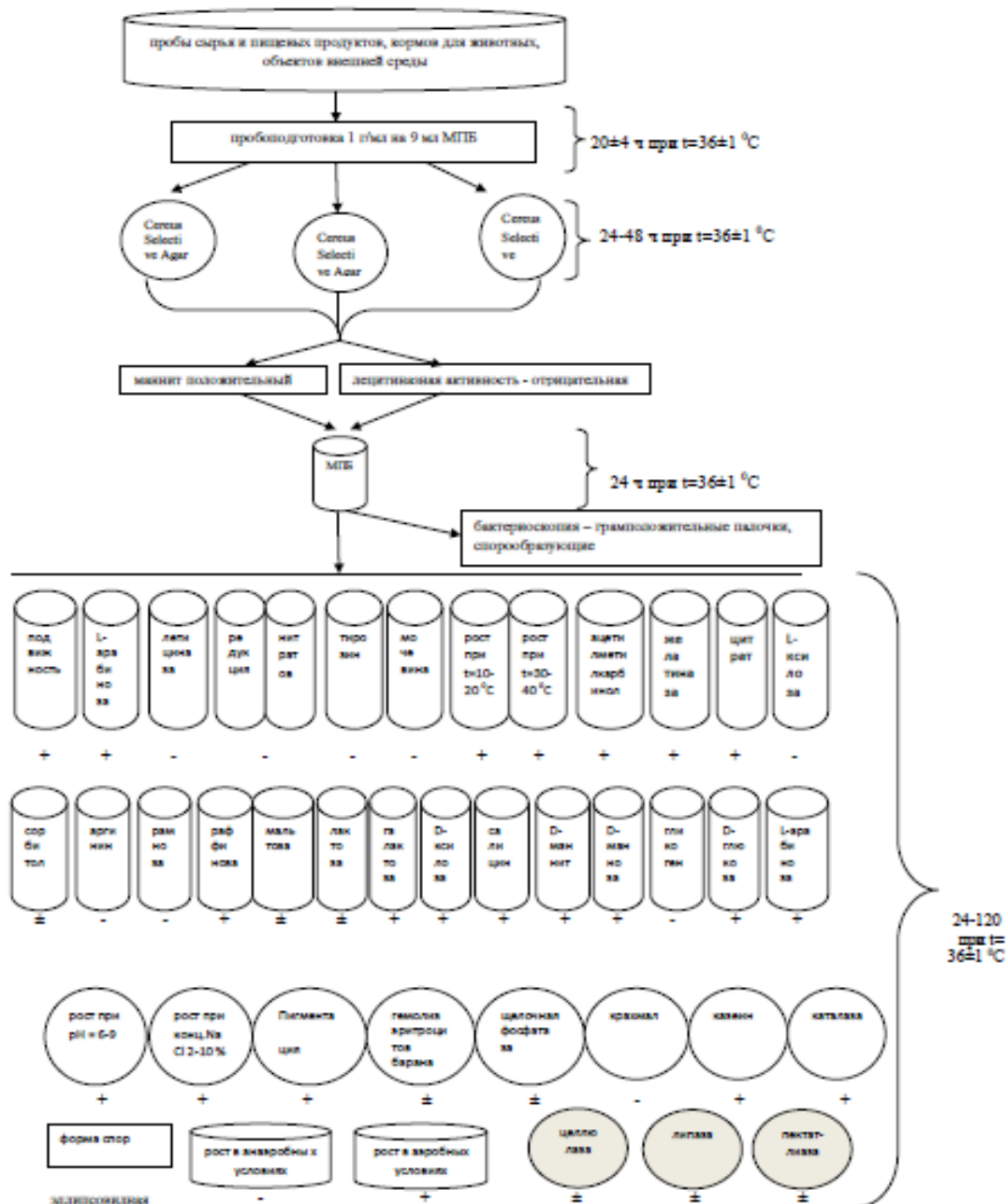
кристаллический CAS 7553-56-2 (производство Чили), 0,25%-ный водный раствор основного фуксина, натрий хлористый (хч) (АО ЛенРеактив, РФ), 0,1 % водный раствор Конго красного (АО ЛенРеактив, РФ), карбоксиметилцеллюлоза (КМЦ) (ФКП «Комбинат «Каменский», РФ), 1 М раствор CaCl₂ фосфатный буфер (ОАО «Агат-Мед», РФ), Твин - 80 бактериологический («HiMedia», Индия), Pectin Dipecta (Agdia). Картофель, молоко цельное, яйцо куриное диетическое, стерильная дефибрированная кровь барана.

Исследования проводились на кафедре микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ.

Результаты исследований

Первый этап исследований был связан с подбором питательной среды для первого блока исследований, посвященного изолированию бактериальных культур и возможной идентификации. В качестве селективной среды мы использовали Cereus Selective Agar (MYP-agar), позволяющая провести первичную селекцию выделенных бактерий по устойчивости к полимиксину и дифференцировать по манниту, так как «Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria» не указывает детального метода для выделения и идентификации представителей вида *Bacillus pumilus* [20]. Единственными рекомендациями для исследователей был временной фактор (24-72 часа) и температура культивирования (t = 37 °C) разведения взвеси почвы.

Согласно литературным данным группа «*Bacillus subtilis*» включает 8 видов: *B. subtilis*, *B. amiloliquefaciens*, *B. atrophaens*, *B. licheniformis*, *B. mojavensis*, *B. pumilus*, *B. sonorensis*, *B. vallismortis* [4, 20]. С учетом изучения биологических свойств *Bacillus pumilus*, указанных в вышеназванном справочнике, нами был произведен отбор тестов для идентификации бактерий на основании их группо-



1

Рис. 2 – Разработанная схема выделения и идентификации бактерий *Bacillus pumilus*, основанная на изучении бактериологических характеристик

вой принадлежности (группа «*Bacillus subtilis*») и интерпретации результатов (для некоторых из рекомендуемых для рода *Bacillus* тестов не указаны результаты дифференциации).

Основная схема исследований представлена на рисунке 2. Согласно подобранным нами бактериологическим тестам можно идентифицировать бактерии *Bacillus pumilus* в течение десяти

дней. Особенностей при подготовке пробы к исследованиям не было: объект гомогенизировали (за исключением проб муки), далее навеску внесли в стерильный мясо-пептонный бульон в соотношении 1:10, посеы термостатировали ($t = 36 \pm 1$ °C) 20±4 часа. Проведенные нами эксперименты показали, что термостатирование в течение 48-72 часов проб почвы увеличивает время исследова-

ний, не повышая эффективность исследований. Этап подращивания необходим для активизации процесса вегетации спорных клеток.

На плотной питательной среде бактерии эталонные штаммы *Bacillus pumilus* формировали морщинистые, неправильной формы колонии с неровными краями.

Основной объем исследований начинался с четвертого дня исследований и включал изучение биохимических свойств выделенной культуры в течение 6 последующих дней. Длительность исследований связана с учетом показателя желатиназной активности.

Анализируя данные по исследованиям в области фитопатологии, одним из факторов, формирующим фитопатогенные свойства бактерий, является продукция тех ферментов, которые разрушают компоненты клеточной стенки растений [16]. Поэтому при изучении физиолого-биохимических свойств бактерий *Bacillus pumilus* мы посчитали целесообразным использовать еще тесты, ориентированные на определение продукции пектат-лиаз, целлюлозолитической и липолитической активности. Вышеназванные показатели мы определяли для всех выделенных культур, независимо от группы объекта выделения.

Определение целлюлозолитической активности – посев выделенных культур «медальонами» на поверхность глюкозо-солевой среды с содержанием 0,2 % карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ). Время культивирования посевов – 72-120 часов. По истечении времени инкубирования посевов на поверхность среды на 10 минут наносили 0,1 %- водный раствор Конго красного. Далее краситель сливали, а чашки несколько раз промывали 8 % раствором NaCl с целью удаления Конго красного. О продукции целлюлаз свидетельствовали светлые зоны вокруг колоний.

Изучение пектолитической активности: на поверхность агаризованной, содержащей ионы Ca^{2+} , наслаивали 4,0 мл 1 % раствора полипектата натрия. После его полимеризации на поверхность образовавшегося геля «медальонами» засевали выделенные культуры. Продукция пектат-лиаз выделенными культурами визуально регистрировалась как разжижение полипектатного геля вокруг колоний бактерий через 72-96 часов культивирования.

Определение липолитической активности проводили на МПА, обогащенных маслами. Об активности фермента судили по наличию зоны просветления вокруг колонии бактерий.

С учетом рекомендаций «Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria» (2015) [20],

подвергая анализу следующие биологические характеристики выделенных штаммов бактерий: окраска по Граму, форма эндоспоры, подвижность и наличие пигмента, возможности роста в аэробных/анаэробных условиях, продукция каталазы, особенности биохимической активности и наличие фитопатогенных свойств, выделенные нами 74 штамма бактерии были отнесены к группе «*Bacillus subtilis*» и типированы как *Bacillus pumilus*. Экспериментально нами было установлено, что все выделенные культуры практически не отличаются друг от друга по большинству анализируемых показателей (табл. 1). Однако, те штаммы, которые были изолированы из объектов первой и второй группы (зерномучной и плодоовощной продукции) и проявляли повышенную целлюлозолитическую активность, в отличие от части бактерий, изолированных из проб почвы.

Продукция пектат-лиаз установлена нами у всех выделенных нами штаммов *Bacillus pumilus*. Необходимо также отметить, что пектолитическая активность у изолированных штаммов явно регистрировалась только через 72-96 часов в виде ореолов вокруг колоний бактерий.

Анализ воздействия неблагоприятных факторов на выделенные бактерии показал, что все изолированные штаммы проявляли способность к росту на МПА, содержащем 10 % р-р NaCl и при понижении температуры культивирования (зафиксирован рост при $t +10$ °C).

Полученные результаты исследований по изучению биологических свойств выделенных нами бактерий в основном не критично расходятся с паспортными данными эталонного штамма *Bacillus pumilus* бб, учитывая полиморфизм биохимических свойств бактерий рода *Bacillus*.

Из 542 проб объектов ветеринарно-санитарного надзора и окружающей среды было выделено 74 штамма, которые были отнесены к виду *Bacillus pumilus*. Результаты исследований представлены в таблице 2 и графически изображены на рисунке 3.

Полученные нами данные не расходятся со сведениями других авторов [10, 13, 16]. Сформированная коллекция полевых штаммов бактерий *Bacillus pumilus* лиофилизирована и в дальнейшем была использована в качестве панели индикаторных штаммов при выделении специфических бактериофагов.

Выводы

В результате проведенных исследований установлено, что из 542 проб было изолировано 74 культуры, которые были типированы как *Bacillus pumilus*. Основу бактериологической схе-

Таблица 1

Сводная таблица с информацией об основных свойствах бактерий *Bacillus pumilus* (по литературным данным [20] и результаты собственных исследований)

Характеристика	Данные об основных свойствах бактерий по «Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria»		Результаты исследований 74 штаммов, выделенных в экспериментах		
	<i>B. subtilis</i>	<i>B. pumilus</i>	+	-	±
пигментация	+	-	4	70	
подвижность	+	+	74		
диаметр клетки > 1 мкм	-	-		74	
окраска по Граму	Гр+	Гр+	Гр+		
форма спор			эллипсоидная		
эллипсоидная	+	+	цилиндрическая		
цилиндрическая	+	+			
каталаза	+	+	74		
рост в анаэробных условиях	-	-		74	
рост в аэробных условиях	+	+	74		
Кислота из					
L-арабинозы	+	+	74		
D-глюкозы	+	+	74		
гликогена	+	-		74	
D-маннита	+	+	74		
D-маннозы	+	+	74		
салицина	+	+	74		
D-ксилозы	+	+	74		
галактозы	d	+	74		
лактозы	d	d	63	4	7
мальтозы	+	d	57	6	11
раффинозы	+	+	74		
рамнозы	-	-		74	
сорбитола	+	d	54	8	12
L-ксилозы	-	-		74	
Гидролиз					
казеина	+	+	74		
крахмала	+	-	74		
тирозина	-	-		74	
мочевины	-	-			
Иные биохимические свойства					
утилизация цитрата	+	+	74		
гемолитическая активность			12	36	26
желатиназная активность	+	+	74		
лецитиназная активность	-	-		74	
щелочная фосфатаза			31	20	23
ацетил-метилкарбинол	+	+	74		
аргининдегидролаза	-	-		74	
редукция нитратов до нитритов	+	-	74		
пектолитическая активность			59	9	16
липолитическая активность			74		
целлюлозолитическая активность			52	22	
Рост на МПА в присутствии NaCl					
2 %	+	+	74		
5 %	+	+	74		
7 %	+	+	74		
10 %	d	+	74		
Рост на МПА при pH					
6,0	+	+	74		
7,0	+	+	74		
8,0	+	+	74		
9,0		+	74		
Рост при температуре культивирования					
10°C	d	+	74		
20°C	+	+	74		
30°C	+	+	74		
40°C	+	+	74		

Примечание – «+» - положительный результат,
«-» - отрицательный результат,
«d» - варибельный результат,
« » - данные отсутствуют.

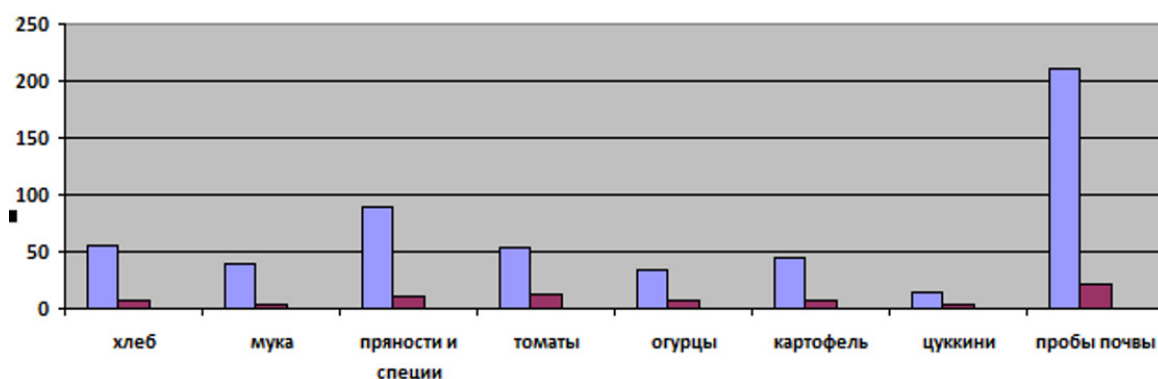


Рис. 3 – Результаты исследований по изучению ареала распространения бактерий *Bacillus pumilus*

Таблица 2

Ареал распространения изолированных штаммов бактерий *Bacillus pumilus*

№ п/п	Объект выделения	Количество		%
		исследованных образцов	штаммов бактерий идентифицированных как <i>Bacillus pumilus</i>	
группа I				
1	хлеб из пшеничной муки	55	8	14,5
2	мука пшеничная	40	4	10,0
итого по группе		95	12	12,6
группа II				
1	пряности и специи	90	10	11,1
2	томаты	54	12	22,2
3	огурцы	34	8	23,5
4	картофель	44	7	15,9
5	цуккини	15	3	20,0
итого по группе		237	40	16,8
группа III				
1	пробы почвы	210	22	10,5
Итого:		542	74	13,7

мы выделения и идентификации составили рекомендации «Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria» (2015) [20]. Установлено, что изоляты бактерии *Bacillus pumilus* представляют относительно однородную группу по фенотипу. Однако отмечено, что целлюлозолитическая активность фиксировалась у штаммов, выделенных из первой и второй групп проб (зерномучные товары) и (плодоовощные товары), но отсутствовала у 22 почвенных изолятов, выделенных из третьей группы проб. Совокупный процент контаминации 542 объектов исследований, зарегистрированный нами, составил 13,7 %, из них процент обсеменения зерномучных товаров – 12,6 %, плодоовощных товаров – 16,8 % и проб почвы – 10,5 %. При идентификации бактерий рода *Bacillus* и *Bacillus pumilus*, в частности, необходимо уделять особое внимание ферментативной активности гидролаз и характеристике целлюлозолитической активности, продукции пектат-лиаз и липаз, что позволит проводить условную дифференциацию штаммов,

вызывающих бактериозы растений от почвенных сапрофитов, вызывающих патологии теплокровных.

Библиографический список

1. Asha Poorna, C. Production of cellulase-free endoxylanase from novel alkalophilic thermotolerant *Bacillus pumilus* by solid-state fermentation and its application in wastepaper recycling / C. Asha Poorna, P. Prema // Bioresource Technology - 2006. - Vol. 98, issue 3. - P. 485– 490.
2. Purification and characterization of an extracellular alkaline serine protease with dehairing function from *Bacillus pumilus* / Q. Huang, Y. Peng, X. Li [et al.] // Current Microbiology. - 2003. - Vol. 46, issue 3. - P. 169 –173.
3. Zang, H. A novel thermostable GH5_7 β -mannanase from *Bacillus pumilus* GBSW19 and its application in manno-oligosaccharides (MOS) production / H. Zang, S. Xie, H. Wu // Enzyme and Microbial Technology. - 2015. - Vol. 78. - P. 1-9.

4. Balasubramanian, N. *Bacillus pumilus* S124A carboxymethyl cellulase; a thermo stable enzyme with a wide substrate spectrum utility / N. Balasubramanian, N. Simões // International Journal of Biological Macromolecules. - 2014. - Vol. 67. - P. 132–139.
5. Efficient secretory production of CotA-laccase and its application in the decolorization and detoxification of industrial textile wastewater / Z.-B. Guan, Y. Shui, C. M. Song [et al.] // Environmental Science and Pollution Research. - Vol. 22, issue 12. - P. 9515–9523.
6. Aunpad, R. Pumilicin 4, a novel bacteriocin with anti-MRSA and anti-VRE activity produced by newly isolated bacteria *Bacillus pumilus* strain WAPB4 / R. Aunpad, K. Na-Bangchang // Current Microbiology. - 2007. - Vol. 55, issue 4. - P. 308–313.
7. The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins / F. J. Gutiérrez-Mañero, B. Ramos-Solano, A. Probanza [et al.] // Physiologia Plantarum - 2001. - Vol. 111, issue 2. - P. 206–211.
8. Antibacterial metabolites and bacteriolytic enzymes produced by *Bacillus pumilus* during bacteriolysis of *Arthrobacter citreus* / C. Brack, A. Mikolasch, R. Schlueter [et al.] // Marine Biotechnology. - 2015. - Vol. 17, issue 3. - P. 290–304.
9. Bentur, H. N. Central venous catheter infection with *Bacillus pumilus* in an immunocompetent child: a case report / H. N. Bentur, A. Dalzell, F. A. I. Riordan // Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials. - 2007. - Vol. 6. - P. 12.
10. From, C. Food poisoning associated with pumilacidin-producing *Bacillus pumilus* in rice / C. From, V. Hormazabal, P. E. Granum // International Journal of Food Microbiology. - 2007. - Vol. 115, issue 3. - P. 319–324.
11. Two cases of severe sepsis caused by *Bacillus pumilus* in neonatal infants / M. Kimouli, G. Vrioni, M. Papadopoulou [et al.] // International Journal of Medical Microbiology. - 2012. - Vol. 61. - P. 596–599.
12. Genome sequence of *Bacillus pumilus* strain bonn, isolated from an anthrax-like necrotic skin infection site of a child / G. Grass, G. Bierbaum, E. Molitor [et al.] // Genome Announcements. - 2016. - Vol. 4, issue 1. P. 1715-1741.
13. Galal, A. A. *Bacillus pumilus*, a new pathogen on Mango plants / A. A. Galal, A. El-Bana, J. Janse // Egyptian Journal of Phytopathology. - 2006. - Vol. 34, № 1. - P. 17–29.
14. Bathily, H. *Bacillus pumilus* a new pathogen on potato tubers in storage in Mali / H. Bathily, A. H. Babana, F. Samaké // African Journal of Microbiology Research. - 2010. - Vol. 4, issue 20. - P. 2067–2071.
15. Kotan, R. Identification and pathogenicity of bacteria isolated from pome fruit trees in the Eastern Anatolia region of Turkey / R. Kotan, F. Sahin, A. Ala // Journal of Plant Diseases and Protection. - 2006. - Vol. 113, № 1. - P. 8–13.
16. Евдокимова, О. В. Биохимическая и молекулярно-генетическая характеристика бактерий *Bacillus pumilus*, изолированных на территории Беларуси / О. В. Евдокимова, В. Е. Мямин, Л. Н. Валентович // Журнал Белорусского государственного университета. Биология. - 2018. - № 1. - С. 38–49.
17. Gabr, M. R. Gabbage head rot due to sporeforming bacteria [*Bacillus polymyxa* and *Bacillus pumilus*; Egypt] / M. R. Gabr, A. A. Gazar // Annals of Agricultural Sciences. - 2012. - Vol. 28. - P. 1163–1185.
18. Saleh, O.I. *Bacillus pumilus*, the cause of bacterial blotch of immature balady peach in Egypt / O. I. Saleh, P.-Y. Huang, J.-S. Huang // Journal of Phytopathology. - 1997. - Vol. 145. - P. 447–453.
19. Гигиеническая оценка контаминации муки возбудителями картофельной болезни / О. В. Пельц, Е. Я. Долгушина, Н. Н. Аксенова [и др.] // Медицина в Кузбассе, спецвыпуск. – 2003. - № 5. - С.74–75.
20. 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).
21. Идентификация бактерий *Bacillus cereus* на основе их фенотипической характеристики / Д. А. Васильев, А. И. Калдыркаев, Н. А. Феоктистова [и др.]. – Ульяновск: НИИЦМиБ УГСХА им. П. А. Столыпина, 2013. – 98с.
22. Техэксперт. Методические рекомендации. 4.1. методы контроля. биологические и микробиологические факторы методы микробиологического контроля почвы. - URL: <http://docs.cntd.ru/document/1200087788>. (дата обращения 12.02.2017).

EXPANSION OF *BACILLUS PUMILIS* BACTERIA IN VETERINARY AND SANITARY OBJECTS

Feoktistova N.A.

FSBEI HE Ulyanovsk State Agrarian University
432017, Ulyanovsk, Novyi Venets boulevard, 1; 8 (8422) 55-95-47
e-mail: feokna@yandex.ru

Key words: identification, *Bacillus pumilis*, bacteria, samples, biochemical properties, isolates, phytopathogens

The article presents results of a scheme development for isolation and identification of *Bacillus pumilis* bacteria and its testing. Based on recommendations of Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria (2015), 74 strains of bacteria which we isolated were relegated to *Bacillus subtilis* group and typed as *Bacillus pumilis* after analyzing the following biological characteristics of the isolated bacterial strains: tinctorial and morphological properties, pigment and catalase production, growth potential under aerobic / anaerobic conditions, features of biochemical activity, including excretion enzymes that destroy the cell walls of plants. It was experimentally established that all selected cultures do not significantly differ from each other according to the phenotypic parameters analyzed. However, those strains that were isolated from objects of the first and second groups (grain-flour and fruit-vegetable products) showed increased cellulolytic activity, in contrast to bacterial strains isolated from soil samples. Pectolytic activity of all isolated strains was visually recorded only after 72-96 hours in the form of halos around bacterial colonies. Analysis of the impact of adverse factors on the isolated bacteria showed that all isolated strains showed the ability to grow on meat-and-peptone agar containing 10% NaCl solution and in case of cultivation temperature decrease (growth was recorded at $t + 10^{\circ} \text{C}$). However, it was noted that cellulolytic activity was actively represented in strains isolated from the first and second groups of samples (grain-flour products - 95 samples) and (fruit-vegetable products - 237 samples), but was absent in 22 soil isolates isolated from the third group (210 samples). The total percentage of contamination of 542 registered research objects amounted to 13.7%, where the percentage of insemination of grain-flour products is 12.6%, fruit-vegetable products - 16.8% and soil samples - 10.5%.

Bibliography

1. Asha Poorna, C. Production of cellulase-free endoxylanase from novel alkalophilic thermotolerant *Bacillus pumilis* by solid-state fermentation and its application in wastepaper recycling / C. Asha Poorna, P. Prema // *Bioresource Technology* - 2006. - Vol. 98, issue 3. - P. 485–490.
2. Purification and characterization of an extracellular alkaline serine protease with dehairing function from *Bacillus pumilus* / Q. Huang, Y. Peng, X. Li [et al.] // *Current Microbiology*. - 2003. - Vol. 46, issue 3. - P. 169–173.
3. Zang, H. A novel thermostable GH5_7 β -mannanase from *Bacillus pumilus* GBSW19 and its application in manno-oligosaccharides (MOS) production / H. Zang, S. Xie, H. Wu // *Enzyme and Microbial Technology*. - 2015. - Vol. 78. - P. 1-9.
4. Balasubramanian, N. *Bacillus pumilus* S124A carboxymethyl cellulase; a thermo stable enzyme with a wide substrate spectrum utility / N. Balasubramanian, N. Simões // *International Journal of Biological Macromolecules*. - 2014. - Vol. 67. - P. 132–139.
5. Efficient secretory production of CotA-laccase and its application in the decolorization and detoxification of industrial textile wastewater / Z.-B. Guan, Y. Shui, C. M. Song [et al.] // *Environmental Science and Pollution Research*. - Vol. 22, issue 12. - P. 9515–9523.
6. Aunpad, R. Pumilicin 4, a novel bacteriocin with anti-MRSA and anti-VRE activity produced by newly isolated bacteria *Bacillus pumilus* strain WAPB4 / R. Aunpad, K. Na-Bangchang // *Current Microbiology*. - 2007. - Vol. 55, issue 4. - P. 308–313.
7. The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins / F. J. Gutiérrez-Mañero, B. Ramos-Solano, A. Probanza [et al.] // *Physiologia Plantarum* - 2001. - Vol. 111, issue 2. - P. 206–211.
8. Antibacterial metabolites and bacteriolytic enzymes produced by *Bacillus pumilus* during bacteriolysis of *Arthrobacter citreus* / C. Brack, A. Mikolasch, R. Schlueter [et al.] // *Marine Biotechnology*. - 2015. - Vol. 17, issue 3. - P. 290–304.
9. Bentur, H. N. Central venous catheter infection with *Bacillus pumilus* in an immunocompetent child: a case report / H. N. Bentur, A. Dalzell, F. A. I. Riordan // *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. - 2007. - Vol. 6. - P. 12.
10. From, C. Food poisoning associated with pumilicidin-producing *Bacillus pumilus* in rice / C. From, V. Hormazabal, P. E. Granum // *International Journal of Food Microbiology*. - 2007. - Vol. 115, issue 3. - P. 319–324.
11. Two cases of severe sepsis caused by *Bacillus pumilus* in neonatal infants / M. Kimouli, G. Vriani, M. Papadopoulou [et al.] // *International Journal of Medical Microbiology*. - 2012. - Vol. 61. - P. 596–599.
12. Genome sequence of *Bacillus pumilus* strain bonn, isolated from an anthrax-like necrotic skin infection site of a child / G. Grass, G. Bierbaum, E. Molitor [et al.] // *Genome Announcements*. - 2016. - Vol. 4, issue 1. P. 1715–1741.
13. Galal, A. A. *Bacillus pumilus*, a new pathogen on Mango plants / A. A. Galal, A. El-Bana, J. Janse // *Egyptian Journal of Phytopathology*. - 2006. - Vol. 34, № 1. - P. 17–29.
14. Bathily, H. *Bacillus pumilus* a new pathogen on potato tubers in storage in Mali / H. Bathily, A. H. Babana, F. Samaké // *African Journal of Microbiology Research*. - 2010. - Vol. 4, issue 20. - P. 2067–2071.
15. Kotan, R. Identification and pathogenicity of bacteria isolated from pome fruit trees in the Eastern Anatolia region of Turkey / R. Kotan, F. Sahin, A. Ala // *Journal of Plant Diseases and Protection*. - 2006. - Vol. 113, № 1. - P. 8–13.
16. Evdokimova, O.V. Biochemical and molecular genetic characteristics of *Bacillus pumilus* bacteria, isolated on the territory of Belarus / O.V. Evdokimova, V. E. Myamin, L. N. Valentovich // *Journal of Belarussian State University. Biology*. - 2018. - No. 1. - P. 38–49.
17. Gabr, M. R. Gabbage head rot due to sporeforming bacteria [*Bacillus polymyxa* and *Bacillus pumilus*; Egypt] / M. R. Gabr, A. A. Gazar // *Annals of Agricultural Sciences*. - 2012. - Vol. 28. - P. 1163–1185.
18. Saleh, O.I. *Bacillus pumilus*, the cause of bacterial blotch of immature balady peach in Egypt / O. I. Saleh, P.-Y. Huang, J.-S. Huang // *Journal of Phytopathology*. - 1997. - Vol. 145. - P. 447–453.
19. Hygienic evaluation of flour contamination by pathogens of potato disease / O.V. Pelts, E.Ya. Dolgushina, N.N. Aksenova [et al.] // *Medicine in Kuzbass, special issue*. - 2003. - No. 5. - P.74–75.
20. *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> (access date: 12.07.2018).
21. Identification of *Bacillus cereus* bacteria based on their phenotypic characteristics / D.A. Vasiliev, A.I. Kaldyrkaev, N.A. Feoktistova [et al.]. - Ulyanovsk: Research Innovation Center of Microbiology and Biotechnology of USAA named after P.A. Stolypin, 2013. —98 p.
22. Techexpert. Guidelines. 4.1. control methods. biological and microbiological factors; methods of microbiological soil control. - URL: <http://docs.cntd.ru/document/1200087788>. (access date: 12.02.2017).