

ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО –ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ВЕТЕРИНАРНОЙ ВИРУСОЛОГИИ И МИКРОБИОЛОГИИ
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИННОВАЦИОННЫЙ ЦЕНТР
ПО МИКРОБИОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ
УЛЬЯНОВСКОЙ ГОСУДАРСТВЕННОЙ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ АКАДЕМИИ



Д.А. Васильев, Г.Ф. Архипова, Л.Ф. Николайчук

БАКТЕРИИ *BACILLUS CEREUS*
И МЕЖВИДОВАЯ РЕКОМБИНАЦИЯ
С *BACILLUS ANTHRACIS*
КАК УГРОЗА ЗДОРОВЬЮ ЧЕЛОВЕКА

УДК 616.981.51

ББК П 873.2

Б 19

Васильев Д.А., Архипова Г.Ф., Николайчук Л.Ф.

БАКТЕРИИ *BACILLUS CEREUS* И МЕЖВИДОВАЯ РЕКОМБИНАЦИЯ С *BACILLUS ANTHRACIS* КАК УГРОЗА ЗДОРОВЬЮ ЧЕЛОВЕКА

В течение нескольких лет в лаборатории микробиологии и биотехнологии Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии проводились исследования по выяснению возможной степени опасности для животных и человека бактерий вида *Bacillus cereus*, как инфекционного агента, способного вызвать пищевое отравление бактериальным токсином, схожим по патогенезу действия с сибиреязвенным. В монографии представлены материалы по распространению *Bacillus cereus* в пищевых продуктах, а также результаты получения межвидовых рекомбинантных штаммов рода *Bacillus*, в частности *Bacillus cereus* и *Bacillus anthracis*, что в естественных условиях может привести к возникновению бактерий-«химер» и создавать трудности при установлении диагноза. Наличие механизма рекомбинации у бактерий создаёт предпосылки для передачи некоторых биологических свойств от сибиреязвенного микроорганизма к бациллам других видов, в частности, *Bacillus cereus*, что может значительно усложнять диагностику и лечение заболеваний (пищевых отравлений) у человека.

ВВЕДЕНИЕ

С середины шестидесятих годов 20 века в литературе появились сведения о пищевых отравлениях, вызываемых бактериями рода *Bacillus* и, в частности, *Bacillus cereus*. Как итог этих наблюдений, в 1988 г. в обзоре Foot Technol *Bacillus cereus* вошел в список 10-ти основных инфекционных агентов, вызывающих кишечные заболевания людей в Северной Америке. По мнению В. Amodio-Cocchieri et al., et al. (1998), *Bacillus cereus* входит в группу 4-х наиболее опасных микроорганизмов - источников пищевого отравления людей. Считается, что патогенез заболеваний, вызываемых *Bacillus cereus*, полностью опосредован действием энтеротоксина. В материалах семинара, состоявшегося в 1990 году, опубликована работа Ю.В. Езепчука и А.Р. Битцаевой «Структурное сходство токсинов *Bacillus cereus* и *Bacillus anthracis*». Авторы считают, что существует структурное и функциональное сходство между диареогенным - летальным токсином (DLT) *Bacillus cereus* и экзотоксином *Bacillus anthracis*. Заболевание чаще всего происходит при употреблении контаминированных *Bacillus cereus* растительных продуктов и молока (40-55%), а также мясных (25%) и других продуктов.

Общеизвестно, что бациллы являются почвенными микроорганизмами. Практически все их виды обитают в сходных биотопах, поэтому можно принять как предположение, что частичное сходство токсинообразования, механизма его продуцирования и патогенеза обусловлено наличием обмена генетическим материалом между ними с последующей его реализацией. В результате возрастает опасность последствий контаминации пищевых про-

дуктов бактериями вида *Bacillus cereus*, несущих часть генома, полученного от *Bacillus anthracis* с последующим проявлением им ряда свойств, характерных для возбудителя сибирской язвы. Геномный анализ свыше 5000 хромосомных генов сибиреязвенной палочки показал, что существует около 150 отличий между геномом этого микроорганизма и геномом *Bacillus cereus*. Выявлено, что практически все гены, кодирующие вирулентность *Bacillus anthracis*, имели гомологи в геноме *Bacillus cereus*.

Целью настоящей публикации является анализ результатов работы по изучению степени контаминации пищевых продуктов (в частности специй) бактериями вида *Bacillus cereus*. Возможная опасность, которую несет эта контаминация здоровью людей за счёт вероятного получения межвидовых рекомбинантных штаммов рода *Bacillus*, в частности *Bacillus cereus* и *Bacillus anthracis*, велика. В результате рекомбинации создаются предпосылки для передачи некоторых биологических свойств от сибиреязвенного микроорганизма к бациллам других видов, к примеру *Bacillus cereus*.

Значительная доля публикаций по инфекционным заболеваниям человека в отечественной научной литературе посвящена в основном *Bacillus anthracis*. Роль бацилл других видов в заболеваниях людей до конца не выяснена. Зарубежные публикации позволяют расширить наше представление в данной области. S. Gaillard, et al.,(1998), определяя содержание спорообразующих бактерий в пробах молока, установили, что после термической обработки в молоке чаще выявлялись *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus coagulans*. H. Berkel и R. Hodlok (1976) выделяли *Bacillus cereus* из вареных колбас. По данным S. Noriyasu et al.,(1998), при изучении более 100 образцов пастеризованной ветчины в 21% проб обнаружены бактерии рода *Bacillus*, наиболее распространенными являлись *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*. P. Garry et al.,(1998) приводят результаты анализа микрофлоры, содержащейся в тесте, и оказалось, что из 53 выделенных ими штаммов 17 – *Bacillus cereus*. I. Molska (1996) установила, что одной из причин порчи пищевых продуктов яв-

ляется контаминация их *Bacillus cereus*. В сообщении С. Klug et al., (1998) имеются данные о наличии спорообразующих аэробных бактерий в некоторых партиях колбас различных сортов. Авторы высказывают мнение, что причиной контаминации колбас являются добавляемые специи. Проведенное ими специальное бактериологическое исследование более 100 проб различных специй (лавровый лист, перец, корица, сухой чеснок, сухая горчица) показало, что спорообразующие аэробные бактерии обнаруживаются более чем в половине случаев в количестве до 8500 бактерий на 1 г пробы. Проведя бактериологический анализ более 6300 проб продуктов, М. Mazar et al.,(1995) обнаружили достаточно частое по сравнению с другими родами бактерий выделение штаммов бацилл, и они связывают с ними определенный процент зарегистрированных пищевых токсикоинфекций.

Материал, положенный в основу предлагаемой публикации, получен достаточно давно и авторы осознают несовершенство или незаконченность результатов своих исследований и отсутствие ответов на многие вопросы, возникающие при чтении данной монографии. В связи с этим авторы не торопились с публикацией этих результатов. Однако или из-за угасания интереса к данному направлению НИР, или из-за угасания научных школ, коллективов работающих в данной области, а может быть из-за отсутствия финансирования по данной тематике, как ненужной, они не дождались подобной работы и решили опубликовать имеющийся материал. Авторы надеются, что в стране найдутся коллективы исследователей, которые осветят данную проблему более детально. Отсутствие более полных работ по этой тематике позволило им согласиться с фразой «что за неимением гербовой пишут на простой». Мы надеемся, что наша монография привлечёт внимание микробиологов к исследованиям в данной области.

СИСТЕМАТИКА И ИДЕНТИФИКАЦИЯ БАКТЕРИЙ РОДА *BACILLUS*

Аэробные спорообразующие бактерии объединены в род *Bacillus*, включенный в семейство *Bacillaceae*. Основными признаками этого рода являются образование эндоспор, наличие каталазы, в большинстве случаев положительная окраска по Граму (Bergey's manual, 1993).

Бациллы распространены повсеместно, большинство их обитает в почве. Они участвуют в круговороте веществ в природе. Благодаря наличию разнообразных ферментов вызывают деградацию сложных органических соединений. Нестабильность биологических свойств аэробных споровых бактерий, возможно обусловлена пластичностью генома, частотой обмена между различными видами генетическим материалом, и как следствие приспособляемостью к разнообразным условиям обитания. На протяжении более чем столетней истории изучения бацилл этот фактор был и остается одной из главных причин нечеткой внутриродовой таксономии *Bacillus* и многочисленных попыток ее усовершенствования. Для организмов этого рода предлагалось более 150 наименований. Многие виды переименовывались четыре-пять раз (Bonde, 1975).

Классификация Форда, по которой аэробные спорообразующие бактерии подразделялись на 9 групп с 28 видами, была положена в основу внутриродового разграничения бацилл в первых изданиях определителя Берджи и строилась главным образом на морфологических признаках (Мирзоева, 1959). Классификация Т. Gibson и R.F. Gordon (1974) основывалась на способности ферментировать глюкозу, образовывать ацетилметилкарбинол.

Однако, как теперь известно, деление только по механизму углеводного обмена не совпадает с общепринятым таксономическим делением, так как «конкретные механизмы брожения развивались в ходе эволюции в некоторых группах бактерий независимо друг от друга» (Вуд, 1965).

Классификация N.R. Smith et al.,(1952) базируется на всестороннем изучении биологических свойств аэробных бацилл с учетом стандартизации условий их выращивания и методов исследования. Эта классификация включает описание 25-ти видов, что отражено в 7-м издании определителя Берджи. Авторы подразделяют спорообразующие бактерии на три группы по форме спор, соотношению поперечника спор и вегетативных клеток. Этим признакам придавал первостепенное значение при видовом и групповом разграничении спорообразующих бактерий Н.А. Красильников (1949).

Попытка дальнейшего совершенствования классификации бактерий рода *Bacillus* предпринята в работе F. Lemille et al.,(1969), которые использовали 64 биохимических теста при изучении как музейных, так и выделенных аэробных бацилл. Авторы расширили спектр источников углерода и ввели такие тесты, как проба на оксидазу, обнаружение лизиндекарбоксилазы, галактозидазы, триптофандезаминазы. Предложена схема, позволяющая разграничить виды 1-й морфологической группы. Данная схема подтвердила правильность принципа идентификации N.R. Smith et al., (1952).

Схема для идентификации бацилл, предлагаемая J. Wolf и A.N. Barker (1968), кроме биохимических признаков для разграничения некоторых видов, включает и такие морфологические признаки, как размеры клеток, наличие вакуолей. Например, рекомендуется дифференцировать виды *Bacillus cereus* и *Bacillus subtilis* по размерам клеток, наличию или отсутствию вакуолей и лецитиназной реакции. Однако некоторые штаммы *Bacillus cereus* не образуют лецитиназы; по данным F. Lemille et al., (1969), этот признак считается переменным. Известно, что клетки *Bacillus cereus* отличаются большими размерами (длина их превышает

0,9 мкм), но появились сведения о крупноклеточных штаммах *Bacillus subtilis* (Bergeys manual. 1993). Нестабильность признака вакуолеобразования также затрудняет дифференциацию указанных видов бацилл.

В основу классификационной схемы W. Kundrat (1963) положен принцип разделения на морфологические группы, а также биохимический подход к разграничению видов; из новых тестов, предлагаемых автором, можно отметить тест на чувствительность к сульфаниламиду, выявление способности к росту при 56,6 С, реакцию на аргиназу.

J.C. Ottow (1972) предложил использовать в качестве дифференциально-диагностических признаков для разграничения некоторых видов три свойства: наличие пектиназы, уреазы, лецитиназы. Виды *Bacillus brevis*, *Bacillus firmus*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus stearothermophilus* на основании отсутствия указанных ферментов объединены в одну группу.

В издании определителя «Bergey's manual (1997)» дано описание 22 видов рода *Bacillus*, составляющих I группу. Во II группу включены 26 видов, нуждающихся в дальнейшем изучении с целью уточнения их систематического положения. В качестве первого ключа для дифференциации бацилл I группы предлагают морфологические признаки: форма и расположение спор в клетках, соотношение их размеров, способность к образованию кислоты и газа на средах с глюкозой. Описание видов спорообразующих бактерий завершается таблицами, в которых приведены дифференцирующие признаки для близких в фенотипическом отношении видов, например *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus megaterium*.

Несколько отличается принцип определения вида по R.E. Gordon (1973). Для определения видов предложены два ключа. Первый построен на использовании 18 признаков и позволяет идентифицировать только наиболее типичные штаммы. Второй ключ предусматривает отнесение идентифицируемого штамма к одной из трех морфологических групп с дальнейшим изучени-

ем комплекса его морфологических, биохимических признаков и отношения к факторам внешней среды. После предварительной идентификации выделенного штамма пользуются таблицами, в которых перечислены свойства данного вида в сравнении со свойствами других близких в фенотипическом отношении видов. Автор подчеркивает необходимость использования для контроля правильности идентификации типовых штаммов данного вида. Предлагаемые ключи не позволяют идентифицировать «промежуточные» штаммы, отклоняющиеся по фенотипическим признакам от типичных представителей данного рода.

М. Durand et al.,(1979) проверили способность 14 штаммов *Bacillus subtilis* и 15 штаммов *Bacillus licheniformis* к утилизации в качестве единственного источника углерода и энергии в среде 60 соединений (моно-, ди- и трисахаридов, глюкозидов, полисахаридов и аминокислот). По этим характеристикам исследуемые штаммы разделились на две группы. В одну из них входят представители как *Bacillus licheniformis*, так и *Bacillus subtilis*. Один из штаммов сенной палочки не укладывался в рамки этих групп. Таким образом, утилизацию источников углерода нельзя считать достаточно достоверным признаком при идентификации бацилл. Предложен ряд дополнительных тестов для видовой дифференцировки представителей рода *Bacillus*.

Так, при видовой идентификации бацилл Н. Varjas и V. Cosmao-Dumanoir (1975) рекомендуют использовать в качестве дополнительных таксономических критериев способность разлагать хитин, мелибиозу, аминдалин. Для разграничения *Bacillus subtilis* и *Bacillus cereus* наряду с общепринятыми тестами проводится изучение особенностей потребления аминокислот бациллами при культивировании на сыворотке крови (Резник и др., 1978).

Для дифференциации некоторых видов используют тест на чувствительность бактерий к красителям, в частности, к основному фуксину и нейтральному красному. Эти красители, по данным К.-Y.Chan, К.-М. Ко (1978), подавляют рост *Bacillus megaterium* и не действуют на *Bacillus firmus*. В основу метода ускоренной дифференциации возбудителя сибирской язвы от сапрофитных

видов *Bacillus megentericus* и *Bacillus cereus* положена различная регулирующая способность этих бактерий к лакмусу и индигокармину (Ильина, 1977).

В Ставропольском научно-исследовательском институте вакцин и сывороток для выделения и идентификации возбудителя сибирской язвы из объектов внешней среды разработана питательная среда с добавлением в качестве ингибиторов роста посторонней микрофлоры антибиотиков полимиксина, налидиксовой кислоты, триметоприма, гризеофульвина, а также моющего средства «Прогресс» (Буравцева, 1984; Еременко, 1984).

Несмотря на подавление роста сопутствующей микрофлоры на средах с антибиотиками, близкородственные спорообразующие микроорганизмы, особенно *Bacillus cereus* давали рост, и поэтому не всегда была возможность их дифференциации с возбудителем сибирской язвы.

Хорошие результаты при выделении *Bacillus anthracis* из почвы и дифференциации от близкородственных бацилл показала селективная питательная среда PLET на основе сердечного агара, содержащая полимиксин В, лизоцим, ЭДТА и ацетат таллия (Knisely, 1966; Titball et al., 1991). Среда подавляла рост большинства штаммов *Bacillus cereus*, однако на ней росли некоторые лизоцимустойчивые штаммы *Bacillus megaterium*.

Перспективным направлением при дифференциации возбудителя сибирской язвы явилось использование его биохимических особенностей. Наиболее простым и доступным тестом дифференциации *Bacillus anthracis* от близкородственных бацилл можно было бы считать выращивание на среде Эндо (Ипатенко, Антонюк, 1983). При росте сибиреязвенного микроба цвет среды не изменяется, а при росте антракоидов она краснеет. Но этот признак не всегда достоверен и надежен.

Некоторые исследователи при выделении сибиреязвенного микроба используют агаровую среду с добавлением 5% крови или 1% эритроцитов барана, что позволяет получать не только рост культуры, но и дифференцировать ее от близкородственных микробов по отсутствию зоны гемолиза (Morris, 1955). Од-

нако, известны сибирезвенные штаммы, способные гемолизировать эритроциты, а также штаммы споровых сапрофитов, не обладающие гемолитическими свойствами (Груз, 1965; Мелихов, 1957; Seidel, 1963).

Для выделения и дифференциации возбудителя сибирской язвы предлагалась яично-желточная питательная среда, иногда с добавлением этилового спирта. На такой среде грамотрицательная флора не развивалась, а колонии *Bacillus anthracis* и *Bacillus cereus* различались по способности расщеплять лецитин яичного желтка и образованию вокруг колоний зоны преципитации (Полховский, 1970). Однако у других исследователей использование такой среды осложнялось идентичным поведением на ней сибирезвенного микроба и некоторых споровых аэробов (Шляхов, 1975). На использовании редуцирующей способности сибирезвенного микроба в отношении метиленовой синьки основана агаровая среда, содержащая глицерин, водный раствор метиленовой синьки и экстракт хрена. На этой среде удавалось дифференцировать сибирезвенные и близкородственные бациллы, но не все штаммы *Bacillus anthracis* обладали редуцирующей активностью (Груз, 1965; Шляхов и соавт., 1975; Ivanovics, 1963; Seidel, 1963). На различиях в редуцирующей способности возбудителя сибирской язвы и сходных близкородственных микробов основаны рекомендации по использованию питательной среды с индигокармином и лакмусом, позволяющей в течение 6-10 ч. дифференцировать *Bacillus anthracis* от *Bacillus cereus*, *Bacillus mesentericus* (Ильина, 1975). *Bacillus anthracis* и близкородственные микробы удавалось дифференцировать при выращивании на агаре, содержащем желчь и бриллиантгрюн (Шуляк, 1956). Для дифференциации бацилл сибирской язвы и сходных с ними спорообразующих сапрофитов могут быть использованы морфологические особенности роста на плотной синтетической среде, содержащей натрий-аммоний-фосфат в качестве единственного источника азота (Акимович, Самойлова, 1967).

Известно, что в отличие от близкородственных микробов *Bacillus anthracis* не обладает способностью вырабатывать ще-

лочную фосфатазу (Груз, 1965; Иванова, 1957; Ivanovics, Fuldes, 1958). На этом принципе с учетом методов определения микробных фосфатаз основано использование питательной среды Ставропольского научно-исследовательского института вакцин и сывороток для выделения и одновременной дифференциации возбудителя сибирской язвы (Буравцева, 1997). В агаровую питательную среду при температуре 45-55 °С добавляют прогретый до 65 °С в течение 20 мин. фенолфталеинфосфат натрия до конечной концентрации 0,01% в среде. На агаре через 16-20 часов вырастают серовато-матовые колонии. Для дифференциации сибиреязвенного микроба и сапрофитных микроорганизмов на крышку чашки Петри наносят 2-3 капли 10% водного раствора аммиака и чашку закрывают. Сапрофиты, особенно *Bacillus cereus*, вырабатывают щелочную фосфатазу, которая разлагает фенолфталеинфосфат натрия с образованием индикатора фенолфталеина. Поэтому при добавлении аммиака, имеющего щелочную реакцию, колонии через 10-20 с. окрашиваются в яркий красный или малиновый цвет. Колонии *Bacillus anthracis* остаются серыми или слегка розовеют и их отбирают для пересевов и дальнейшей идентификации. Некоторые исследователи считали тест на щелочную фосфатазу одним из наиболее достоверных для отличия *Bacillus anthracis* от *Bacillus cereus* (Груз, 1965; Ivanovics, Fuldes, 1958). Однако признак обнаруживался не постоянно (Хвацева, 1978; Шуляк, 1956; Seidel, 1963). Отдельные слабовирулентные и вакцинные сибиреязвенные штаммы с трудом отличались от близкородственных микробов *Bacillus cereus*, *Bacillus mesentericus* (Шляхов, Груз, 1975).

Таким образом, изложенные данные свидетельствуют об отсутствии единых критериев дифференциации аэробных бацилл и трудностях их идентификации.

В настоящее время наблюдается тенденция к выделению и описанию новых видов. Это объясняется тем, что в пределах каждого вида встречаются многочисленные разновидности, биотипы и штаммы, являющиеся естественными вариантами или

искусственными мутантами со свойствами, отличающимися от свойств материнского штамма.

Благодаря развитию нумерической таксономии стало возможным группировать организмы на основе взаимного сходства с учетом не менее 40-50 признаков. Такой подход позволяет определить положение особи, даже если она находится в промежулке между известными систематическими группами. Указанный принцип нашел применение в таксономических исследованиях рода *Bacillus*. G. Bonde (1975) подверг нумерическому анализу 460 штаммов, использовав 68 тестов из числа обычно применяющихся.

Нумерический анализ (Bonde, 1975) продемонстрировал несовершенство традиционной классификации бацилл. Так, в результате группового анализа оказалось, что 35% типичных штаммов, среди которых большинство было нетиповыми, необходимо было переименовывать; 47% идентифицируемых штаммов отнесены к одним и тем же видам по обоим ключам, ряд штаммов удалось отнести к определенному виду только при использовании одной из классификационных схем.

Преимущество нумерического подхода при классификации спорных бактерий по сравнению с традиционным методом демонстрируют А. Воеуе и М. Аертс (1976). Авторам с помощью обычных методов не удалось классифицировать 138 культур, выделенных в Северном море. В результате применения нумерического анализа при изучении 63 морфологических и биохимических признаков все штаммы разделены на две большие группы и ряд подгрупп, внутри которых штаммы группировались при высоком коэффициенте подобия (78-82%). В отдельные группы объединены штаммы с меньшим коэффициентом подобия (63-68%). Большая часть штаммов идентифицирована как *Bacillus licheniformis*, отдельные штаммы - как *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus firmus*. Часть штаммов оставалась неидентифицированной.

Таким образом, в основе нумерической таксономии лежит «чисто статистическая процедура определения сходства организмов,

а, следовательно, и родства организмов» (Заварзин, 1974). Это трудоемкий метод, предусматривающий изучение большого числа признаков и использование вычислительной техники.

В таксономических исследованиях рода *Bacillus* используются и методы генетического анализа. Определяя количественное содержание оснований в ДНК разных организмов, можно получить представление о сходстве генетического аппарата этих организмов. Обычно сравнивается молярное содержание ГЦ-оснований ДНК у разных объектов. В клетках аэробных споровых бактерий молярное содержание ГЦ-оснований составляет 32-65% общего количества оснований ДНК (Африкян, 1973).

По молярному содержанию ГЦ-оснований в молекуле ДНК аэробных бацилл А. Candell et al., (1978) объединили изученные ими виды в следующие группы: I группа (41,5-47,7%) - *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus firmus*; II группа (32,5-34,3%) - *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*; к III группе отнесены штаммы, которые не удалось объединить по принципу сходства нуклеотидного состава ДНК.

Другие исследователи (Baptist et al., 1978) также группируют отдельные виды споровых бактерий на основе содержания ГЦ-оснований. *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* составляют одну группу с молярным содержанием ГЦ 35,2-36,7% к общему составу азотистых оснований в молекуле ДНК.

Используют и метод гибридизации ДНК-ДНК для разграничения организмов на внутривидовом уровне. В основе метода гибридизуемости ДНК-ДНК лежит способность денатурированной одноцепочечной ДНК в определенных условиях соединяться с комплиментарной нитью с образованием двухцепочечной молекулы ДНК.

При изучении бактерий рода *Bacillus* было установлено, что в каждом случае гибридизации с гомологичной ДНК гибридизуемость достигает 100% (Somerville, Jenes, 1972). В большинстве случаев гомология молекул ДНК разных видов очень низкая и составляет 2-10% (Seki, 1975, 1978). Для штаммов внутри вида степень гомологии ДНК - 50% и выше. Авторы обнаружили генетическую

однородность представителей отдельных видов, таких как *Bacillus pumilus*, *Bacillus coagulans*. Однако существуют гетерогенные виды бацилл, к которым отнесены *Bacillus sphaericus* и *Bacillus circulans*. Степень гомологии ДНК разных штаммов этих видов составляет соответственно 18-98 и 2-3% (Seki, Chung, 1978).

Среди представителей рода *Bacillus* можно выделить виды, которым свойственна высокая степень гибридизуемости. К ним относятся *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus anthracis* (Somerville, Jenes, 1972). Т. Seki et al., (1978) указывают на высокую степень гомологии ДНК *Bacillus cereus* и *Bacillus thuringiensis* (54-80%) и предлагают рассматривать их как один вид. Эту точку зрения поддерживает на основе аналогичных результатов В.А. Полховский (1975). Некоторые штаммы *Bacillus megaterium* обладают большим сходством с *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*. Гибридизуемость ДНК различных серотипов *Bacillus thuringiensis* колеблется в пределах 68-88% (Somerville, Jenes, 1972).

Таким образом, результаты идентификации на основе методов молекулярной биологии, несомненно, дают ценную информацию о сходстве генотипов. Следует признать, что данные различных авторов не совпадают вследствие применения ими различных методических приемов.

Фаготипирование является надежным методом дифференциации бактерий. В ряде случаев фаги используются для быстрого определения видовой принадлежности бацилл, в частности, *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* (Раутенштейн и др., 1975). Однако проведенные Э. К. Африкяном (1975) исследования показали, что специфика фаголизиса может быть использована для разграничения и идентификации сводных видов – подродов. Фаги спорообразующих бактерий изучены недостаточно, несмотря на их большое значение в идентификации и типировании отдельных видов бацилл, а также в эволюции бактерий. Детальное исследование по фагоидентификации *Bacillus anthracis*, проведённое В.С. Русалеевым в 80-х – 90-х годах, создание биопрепарата из моно – и трёх фагов, показало перспективность использования последних для целей таксономии и идентификации.

Нередко для идентификации отдельных видов используются иммунологические методы - реакция агглютинации, иммуноэлектрофоретический анализ антигенных компонентов, методы иммунофлюоресценции и другие (Полховский, 1967; Dominici, 1972; Michel, 1973; Barjac, Bonefoi, 1973; Mastroeni, 1974; Манина 1975; Katsaras, 1979).

В вышеуказанную первую группу бацилл входят наиболее близкие к *Bacillus anthracis* виды: *Bacillus cereus* (*Bacillus anthracoides*, *Bacillus pseudoanthracis*) - восковая бацилла, *Bacillus mycoides* - корневидная бацилла, *Bacillus megaterium* - капустная бацилла, *Bacillus subtilis* - сенная бацилла, *Bacillus pumilus* (*Bacillus mesentericus*) - картофельная бацилла. Все они имеют ряд сходных морфологических и культуральных свойств. Наряду с наличием общих свойств для основных видов - представителей первой группы - существует ряд дифференциальных признаков, которые позволяют проводить идентификацию аэробных бацилл на уровне вида (Турова, Бакалдина, 1988; Ezzell, 1990; Graham, 1984; Ramisse, 1996), а также дифференцировку штаммов сибиреязвенного микроба (Patra, 1996). Однако 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.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ БАКТЕРИЙ BACILLUS ANTHRACIS И BACILLUS CEREUS

По современным представлениям *Bacillus anthracis* и *Bacillus cereus* являются настолько близкородственными видами бактерий рода *Bacillus*, что справочник Берджи (1997) указывает на трудности при их дифференциации по культуральным свойствам. Два представителя аэробных споровых бацилл *Bacillus anthracis* и *Bacillus cereus*, несмотря на то, что один является паразитом, а второй - выраженным сапрофитом, имеют много общего в морфологии, физиологических и биохимических свойствах, в антигенной структуре (Ivanovics, 1937). Это послужило основанием для некоторых авторов (Smith, 1953; Clark, 1937) отнести их к одному виду, рассматривая *Bacillus anthracis* как патогенный вариант *Bacillus cereus*. Подтверждением этой точки зрения служат также данные McDonald (1963), который в результате изучения нуклеотидного состава некоторых штаммов *Bacillus anthracis* и *Bacillus cereus* приходит к выводу об их генетическом родстве. И, хотя имеются исследования, показывающие принципиальные различия между этими двумя видами микроорганизмов (Burdon, Wendel, 1960), сходство их так велико, что во многих случаях надежная дифференциация затруднена.

Возбудитель сибирской язвы - *Bacillus anthracis* - грамположительная неподвижная палочка, имеет длину 3-8 мк и диаметр 1-1,5 мк (рис 1). В зависимости от условий обитания сибиреязвенная бацилла может существовать в различных морфологических формах: вегетативной (капсульной и бескапсульной) и споровой. Характерным морфологическим признаком возбудителя сибирской язвы является отсутствие подвижности у клеток (Коляков, 1960; Рево, Дунаев, 1964)

Отечественными и зарубежными исследователями из различных субстратов был выделен сибиреязвенный бактериофаг который широко испытан в качестве индикатора культур *Bacillus anthracis*. Установлено, что бактериофаг, обладая специфическим лизирующим действием, может быть использован для диагностики и теперь уже рекомендован как надежный и быстрый метод идентификации выделенных культур. Чувствительность испытуемой культуры к видоспецифическому фагу обычно определяют чашечным методом или методом «стекающей капли» (Временное наставление по применению сибиреязвенного бактериофага «К» ВИЭВ для определения возбудителя сибирской язвы, 1986). Различия в методике у отдельных авторов заключались лишь в использовании разных фагов. Но при этом фаг должен обладать строгой видовой специфичностью и быстротой литического действия. В литературе описано применение фагов Гамма-МВА, К-ВИЭВ, ВА-9, ВА-104, З-БК2, Саратов (Груз, 1965; Коротич, Погребняк, 1976; Преснов, 1966; Преснов, 1967; Brown, Cherry, 1955; Brown, 1955), фаг ВНИИВВиМ

По мнению большинства исследователей, указанные фаги обладали высокой специфичностью. Для лабораторной практики в нашей стране рекомендовано использовать фаг К-ВИЭВ, признанный наиболее специфичным (Временное наставление по применению сибиреязвенного бактериофага «К» ВИЭВ для определения возбудителя сибирской язвы, 1986). Четко выраженный фаголизис считается важным ориентировочным критерием в идентификации сибиреязвенного микроба (Ипатенко и др., 1987).

В дополнение к указанным приемам сибиреязвенный бактериофаг может быть использован в методе флуоресцирующих антител и люминесцирующей антифаговой сыворотки (Инструкция и методические указания по лабораторной, клинической диагностике, профилактике и лечению сибирской язвы людей, 1982; Павлова, 1974; Черкасский, 1978). Все испытанные 15 штаммов *Bacillus anthracis* давали специфическое свечение. Из 14 штаммов *Bacillus cereus* только один давал специфическое свечение клеток, и он был

чувствителен к фагу. В то же время клетки спорообразующих сапрофитов не светились совершенно (Кузнецова и соавт., 1969). Однако отмечено существование штаммов *Bacillus anthracis*, устойчивых к данным фагам (Бойков, 1967; Гаврилов, 1987).

Характерным признаком *Bacillus anthracis*, отличающим его от спорообразующих сапрофитов, является отсутствие гемолиза при посеве на кровяной агар. *Bacillus anthracis* не образует фосфатазы, уреазы, аспарагиназы, не восстанавливает метиленовую синь, а также нитраты в нитриты, гидролизует крахмал, не образует индола, аммиака и сероводорода, разлагает с образованием кислоты без газа глюкозу, мальтозу, сахарозу, левулезу, фруктозу, не образует кислот на средах с арабинозой, рамнозой, лактозой и рафинозой (Ипатенко, 1983). Однако многие авторы считают, что ферментативная активность различных штаммов *Bacillus anthracis* сильно варьирует и поэтому не может служить критерием для идентификации возбудителя сибирской язвы (Гинсбург, 1964).

Широкое распространение в практике при идентификации возбудителя сибирской язвы получили методы с использованием люминесцентных сибирезвённых сывороток и реакция кольце-преципитации по Асколи.

Сущность метода с помощью люминесцентной микроскопии основана на том, что после обработки препарата люминесцирующей сывороткой в люминесцентном микроскопе выявляется специфическое свечение возбудителя. Большинство исследователей дают высокую оценку способу люминесцентной микроскопии. Однако еще не приведено точных и неоспоримых доказательств того, что свечение строго специфично только для возбудителя сибирской язвы. Некоторые другие виды спорообразующих бацилл, в частности *Bacillus cereus*, обладают такими же свойствами. Поэтому необходимы дальнейшие исследования в этом направлении.

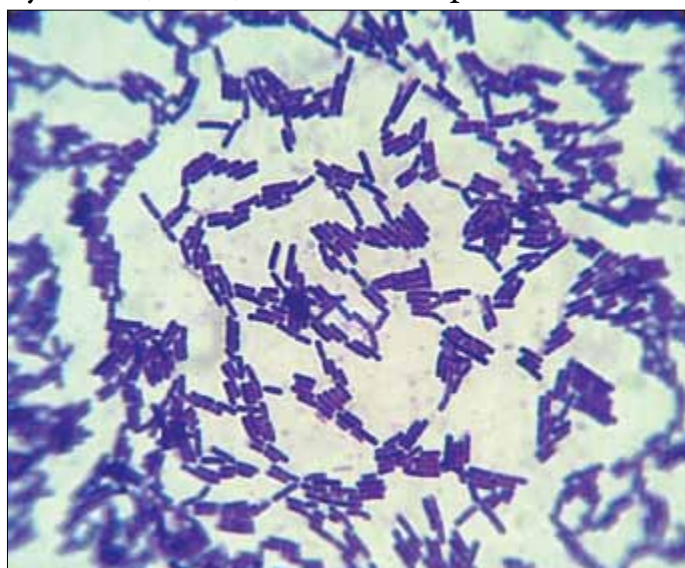
Есть сообщения о выделении аэробных спорообразующих сапрофитов, обладающих рядом свойств, характерных для возбудителя сибирской язвы. На сходство морфологических, культуральных и биохимических свойств некоторых видов аэробных

спорообразующих сапрофитов, в частности, *Bacillus cereus*, с сибирезвенным микробом указывали многие авторы (Norbero, 1953; Burdon, 1956; Brown, 1955).

Так, Н. Smith et al.,(1963) показали, что клетки *Bacillus cereus*, подобно *Bacillus anthracis*, имеют палочкоовидную форму с закругленными концами, размеры их колеблются от 0,8 до 1,3 мк в ширину и от 3 до 6 мк и более в длину, образуют короткие и длинные цепочки, подвижны, но капсулы не образуют. Некоторые исследователи указывают, что среди них встречаются и неподвижные формы (Brown, 1955).

В наших исследованиях, в мазках, приготовленных со скошенного мясопептонного агара, бактерия *Bacillus cereus* у всех референс-штаммов имеет вид крупных 1,0—1,2 x 3,0—5,0 мкм грамположительных палочек со слегка закругленными концами, лежащих в виде цепочек или штакетообразных скоплений, реже отдельно друг от друга (рис. 1, 2). *Bacillus cereus* образует субтерминальные или центральные споры (рис. 3). Некоторые штаммы образуют капсулу при выращивании на 1%-ный бикарбонатно-сывороточном агаре в атмосфере с CO₂ (рис. 4). В раздавленной капле подвижны, однако, могут встречаться штаммы со слабо выраженной подвижностью.

При выращивании бациллы *Bacillus anthracis* в мясопептонном бульоне (МПБ) отмечают образование осадка, без помутнения бу-



льона. При росте на мясопептонном агаре (МПА) возбудитель сибирской язвы образует типичные колонии R-формы, приподнятые над поверхностью агара, сероватого цвета, шероховатые на вид,

Рис. 1а. Микроскопия *Bacillus cereus* № 8035 при увеличении 1500



Рис 16. Микроскопия *Bacillus anthracis* штам-мВНИИВВМ 55 при увеличении 1500

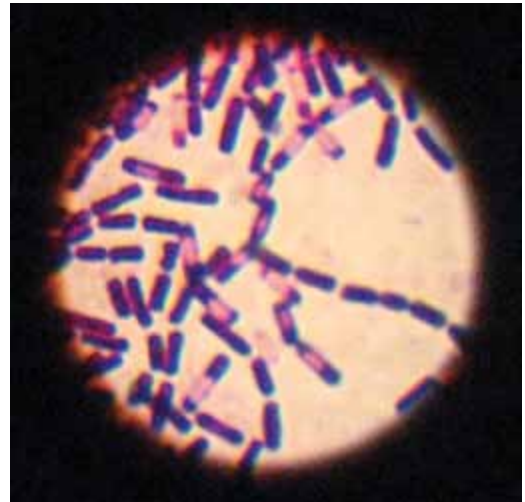


Рис.2. Окраска по Грамму, споры *Bacillus cereus* № 8035 в виде не покрашенных участков при увеличении 2500 раз

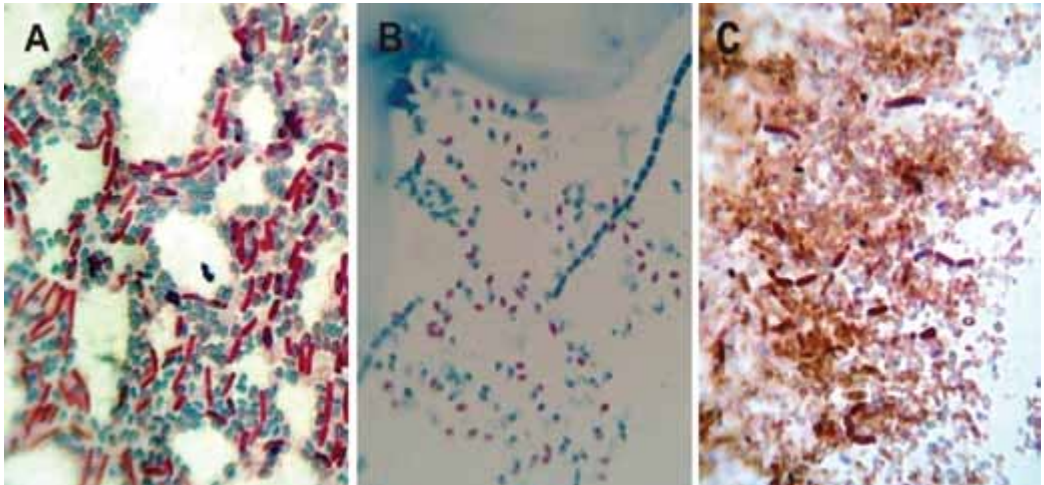


Рис.3 а. Окраска спор *Bacillus cereus* № 8035 методом Трухильо (А), Ауески (В), Пешкова (С) при увеличении 1500 - 2000 раз

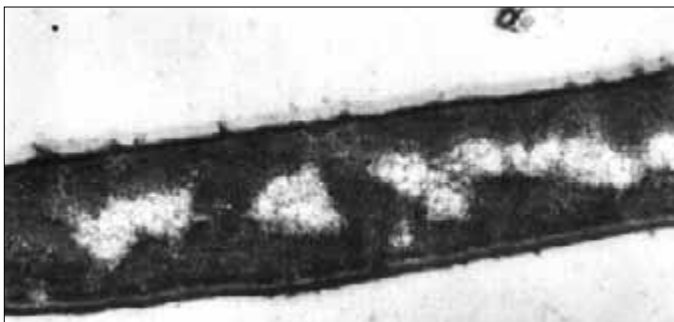


Рис.3б. Электронная микроскопия *Bacillus anthracis* 34F2. Увеличение \square 40000

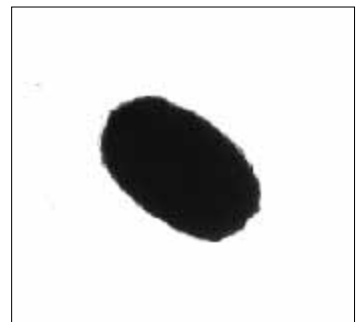


Рис..3в Спорная форма *Bacillus anthracis* штамм 34F2. Увеличение \square 20000. Бактерии обоих видов образуют овальную спору

с неровными краями и иногда с кнутообразными отростками (RR-форма) (Гаврилов, 1987; Колесов, 1962). П.Н. Бургасов, Г.И. Рожков (1984), В.А. Гаврилов (1987) также отмечают, что некоторые штаммы формируют колонии, неоднородные по форме: наряду с типичными колониями R-форм встречаются колонии RO и OO-форм. Они более округлые на вид и без видимой изрезанности по периферии.

Оптимальная температура инкубирования бациллы антракса находится в пределах 35-37 °С. Отсутствие роста при температуре 45,5 °С относят к важным диагностическим тестам при дифференциации *Bacillus anthracis* от спорообразующих сапрофитов (Езепчук, 1985; Дунаев, 1967).

При изучении культуральных свойств возбудителя сибирской язвы занимает отношение его к средам с пенициллином. Основываясь на высокой чувствительности сибиреязвенного микроба к пенициллину, I. Iensen и H. Kleemejer (1953) предложили тест «жемчужного ожерелья». Тест основан на том, что при инкубировании трехчасовой культуры *Bacillus anthracis* на среде с 0,05 и 0,5 ЕД/мл пеницилина происходит образование сферопластов, при этом цепочки под микроскопом напоминают «ожерелье». Специфичность данного теста характерна для *Bacillus anthracis* (Бойков, 1964), однако для некоторых штаммов отмечена устойчивость клеток к пенициллину (Гаврилов, 1987).

Нами в результате исследований было установлено, что *B. cereus* факультативный анаэроб, так как расщепляет глюкозу в аэробных и анаэробных условиях (рис.).

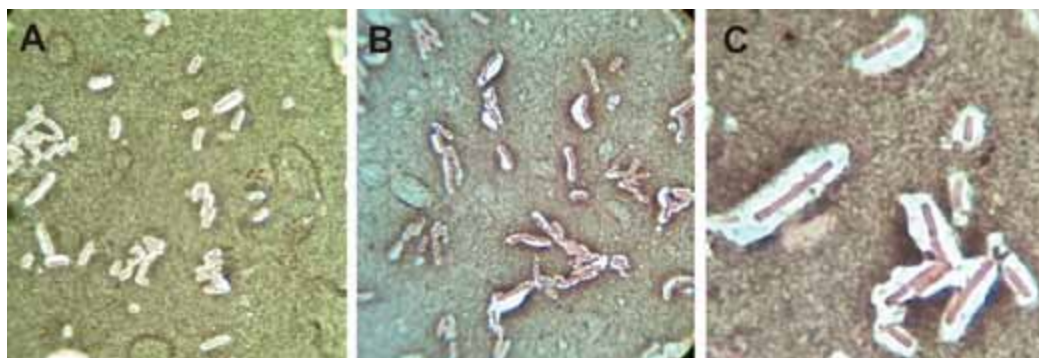


Рис. 4. Окраска капсулы по Бурри-Гинсу: *B. cereus* № 8035 (А), *B. cereus* № 96 (В) и *B. cereus* № 2527 (С)

Рис. 5. Рост бактерий *Vacillus anthracis* штамма ВНИИВВМ 55 на МПБ (ПЕРЕВЕРНУТЬ).



Рис 6 а бактерий *Vacillus anthracis* штамма ВНИИВВМ 55 на МПА



Рис. 6 б.Рост бактерий *Vacillus anthracis* штамма ВНИИВВМ 55 на МПА (увеличение).





Рис 5. Рост штамма *B.cereus* № 8035 на МПА 18 часов



Рис 6. Рост штамма *B.cereus* № 8035 на МПА 24-48 часов

В первые сутки на МПА образовывали «восковидные» серо-белые распластанные колонии с неровными краями, имеющими зернистую структуру (часто образуют коричневый пигмент) размером 5-10 мм (рис.5), через 48 часов культивирования колонии увеличивались в диаметре до 1,5-2 см (рис. 6).

При росте в МПБ в первые 18-24 часов (зависит от штамма) происходит помутнение, с последующим просветлением и образова-

нием пленки, которая легко разбивается встряхиванием, оставляя на стенках пристеночное кольцо и ложась на дно, образует тем самым осадок. После чего пленка образуется вторично (рис. 7).

На кровяном агаре при температуре 37°C в течение 24 ч. микроб формирует крупные шероховатые матовые колонии в R-форме, с неровными волнистыми краями, образуя четкую зону β -гемолиза (рис. 8).

Разжижение желатина быстрое и сильное в течение 1-4 суток (80% штаммов), вдоль укола образует горизонтальные отростки (рис.20).

На селективных дифференциально-диагностических средах для *Bacillus cereus*, все штаммы *B. cereus* показали хороший рост (рис.9 – 16), 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 фенолфталеин-фосфатом натрия, бактерии растут в виде распластанных матовых колоний диаметром 1-1,5 см. При взаимодействии с парами аммиака *B. cereus* и другие спорообразующие сапрофиты приобретают розовый или красный цвет, колонии же *B. anthracis* не изменяют своего цвета, либо слабо розовеют (рис. 9).

На желточном агаре с хлористым натрием, полимиксином В и 2, 3,

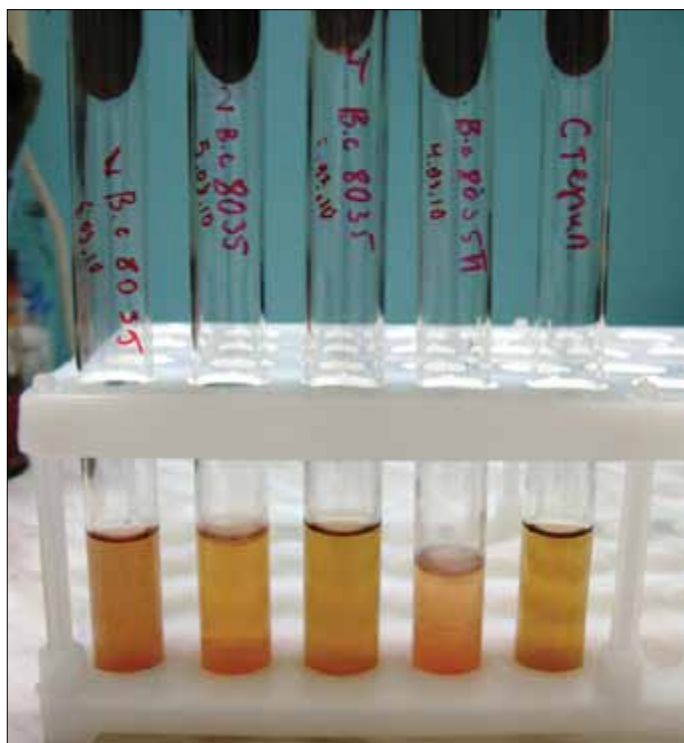


Рис.7. Рост штамма *B. cereus* № 8035 на МПБ 18 часов



Рис. 8. Рост штаммов *B. cereus* № 8035 на кровяном агаре



Рис. 9. Суточная культура *B. cereus* шт 8035 на дифференциально-диагностической среде для выявления и культивирования сибиреязвенного микроба



Рис.10. Рост *B. cereus* № 8035на среде с полимиксином и ТТХ

Рис.11 Рост *B. cereus* № 8035 на желточном агаре



Рис.12 Рост *B. cereus* № 8035 на среде Донована



Рис.13. Рост *B. cereus* №8035 на полимиксиновой среде.

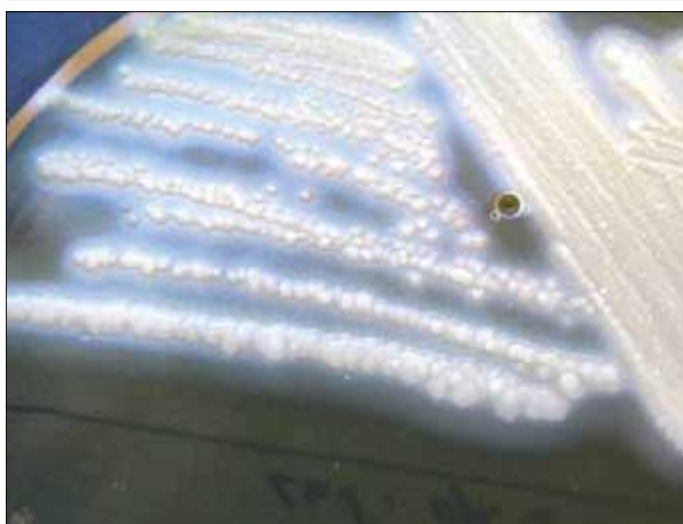




Рис.14. Рост *B. cereus* №8035 на среде Мосселя.



Рис.15. Рост *B. cereus* №8035 на солевом полимиксиновом агаре с ТТХ.



Рис.16. Рост *B. cereus* №2527 на среде PEMOVA..

5-трифенилтетразолиум хлоридом ГОСТ 10444.8-88 колонии круглые, блестящие, красные, диаметром около 5-15,0 мм с зоной белого преципитата диаметром около 10-30,0 мм (рис.10).

Рост на желточном агаре наблюдался в виде крупных беловатых распластанных колоний со слегка изрезанными краями, окруженными зоной матового коагулята (рис.11).

На модифицированной среде Донована *V. cereus* № 8035 формировал белые округлые колонии со слегка изрезанными краями, окруженные зоной белого матового коагулята (рис.12).

На полимиксиновом агаре (Пивоваров Ю.П., 1970) *V.cereus* растет в виде крупных, шероховатых колоний окруженные зоной бело преципитата (рис. 13).

Рост *V. cereus* на среде Моссея № 8035 в виде распластанных зернистых колонии розового цвета (вследствие отсутствия способности ферментировать маннит), окруженные зоной коагулята такого же цвета; среда бесцветная или со слабо-розовой окраской (рис.14).

На солевом полимиксиновом агаре с ТТХ (Пивоваров Ю.П., 1970) *Vac.cereus* № 8035 растет в виде ярко-рубиновые колонии на фоне широкой зоны глубокого равномерного белого коагулята; колонии в первые часы роста округлые, выпуклые, в дальнейшем (24 48 часов распластанные по поверхности агара с изрезанными краями (рис.15).

ИЗУЧЕНИЕ БИОХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ *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;3;4;5). Для определения биохимических особенностей были изучены протеолитические, сахаролитические, редуцирующие, ферментативные свойства бактерий с целью создания дифференциальной системы для идентификации микроорганизмом. Изучение штаммов *B. cereus* проводилось более чем по 30 биохимическим показателям (табл.1).

Одним из важных тестов является определение подвижности. Подвижность бактерий определяли посевом “уколом” в 0,7% агар, методом Шукевича и “Висячей капли”. Все исследуемые культуры *B.cereus* – подвижны (рис. 17).

Оптимум роста для *Bac. 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. *Bac. cereus* способен 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), гемолитической активности у выделенных штаммов на МПА с добавлением 5% крови барана. Протеолитическую активность проверяли на питательном бульоне с желатином и молочном агаре. ДНКазную активность на среде DNA BA (Difco) (рис.18, 19, 20, 21, 22).

Таб. 1. Дифференциальные признаки *V. cereus*

| № | Дифференциально- диагностические тесты | Реакция | | |
|-----|--|---------|----|-----|
| | | + | ± | - |
| 1. | Рост при 55°C | 5 | 0 | 100 |
| 2. | Рост при pH 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-Праскауера | 105 | 0 | 0 |
| 18. | Нитратредуктаза | 105 | 0 | 0 |
| 19. | Триптофадезаминаза | 0 | 0 | 105 |
| 20. | Фениланиндезаминаза | 0 | 0 | 105 |
| 21. | Лизиндекарбоксилаза | 0 | 0 | 105 |
| 22. | Орнитиндекарбоксилаза | 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 |

Все без исключения штаммы *Vac. cereus* дают положительную реакцию на каталазу, оксидазу, фосфатазу и реакцию на ацетил-метилкарбинол (реакция Фогес-Проскауера) разной интенсивности (рис. 23, 24, 25, 26).

На среде Хью-Ляйфсона изменение цвета наблюдалось во всех пробирках, это говорит о том, что все выделенные микроорганизма относятся к факультативным анаэробам (рис.27).

Для определения фермента уреазы использовали среду Кристенсена содержащую мочевины (рис. 28).

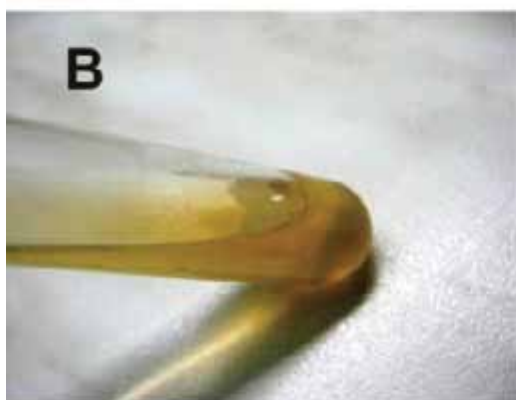
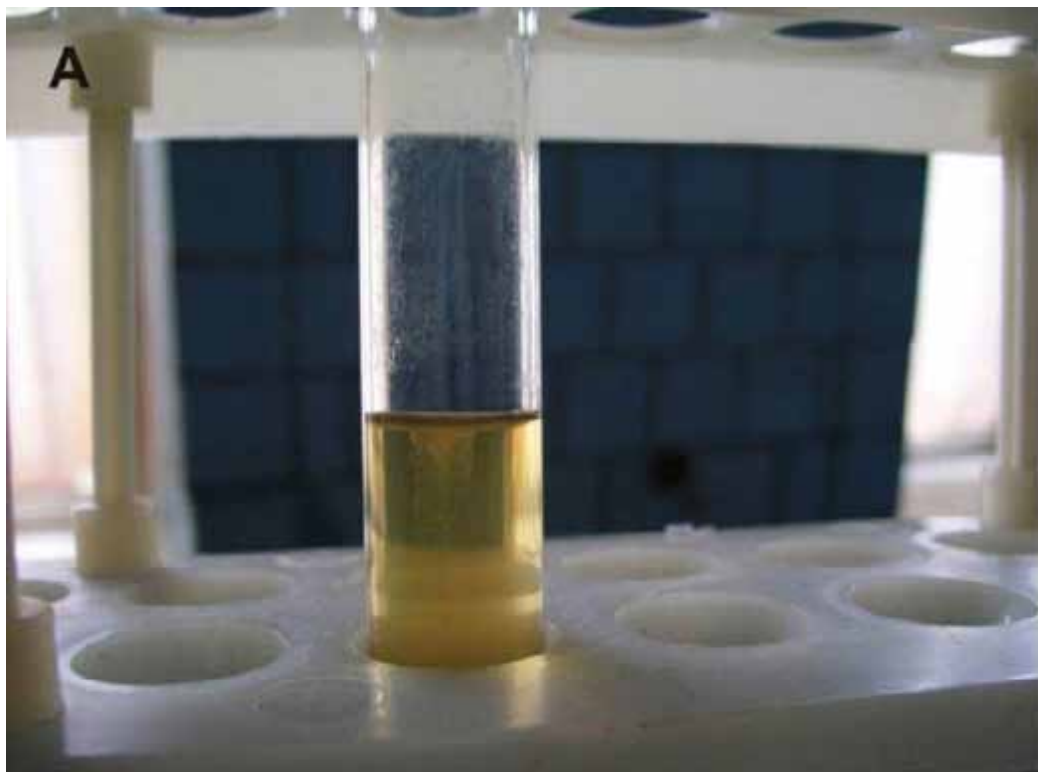


Рис. 17. Методы определения подвижности “уколом” (А), Шукевича (В), “Висячей капли” (С).

На цитратном агаре Симмонса изменяют цвета среды из зеленого в синий, что свидетельствует о способности изучаемых штаммов *V. cereus* утилизировать цитрат натрия (рис. 29).

Наличие триптофандезаминазы, фениланиндезаминазы, аргинин-дигидролазы, лизиндекарбоксилазы и орнитиндекарбоксилазы проверяли с помощью микротест-систем (рис. 30). При этом изменение цвета среды в лунках с реактивами не наблюдалось (отрицательная реакция).

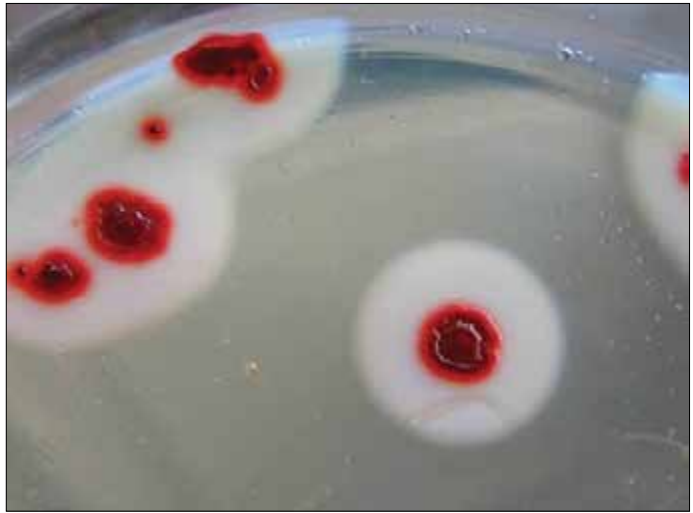


Рис. 18. Определение лецитиназной активности.



Рис. 19. Определение гемолитической активности все штаммы *V. segetis* дают β – гемолиз.



Рис. 20. Разжижение желатина в верхней пробирке, нижняя пробирка – контрольная.

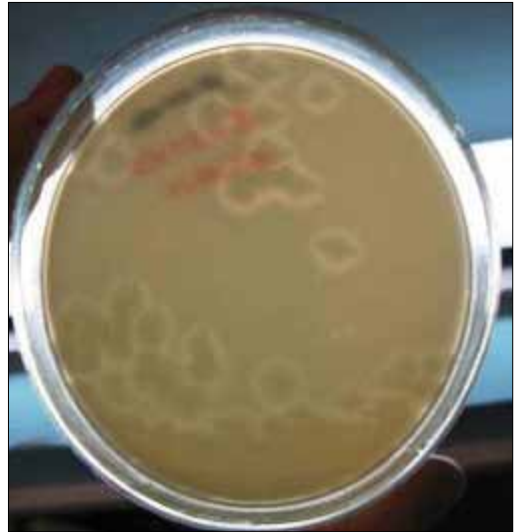


Рис. 21 Гидролиз казеина на молочном агаре (проявляется в виде просветления среды вокруг колоний).

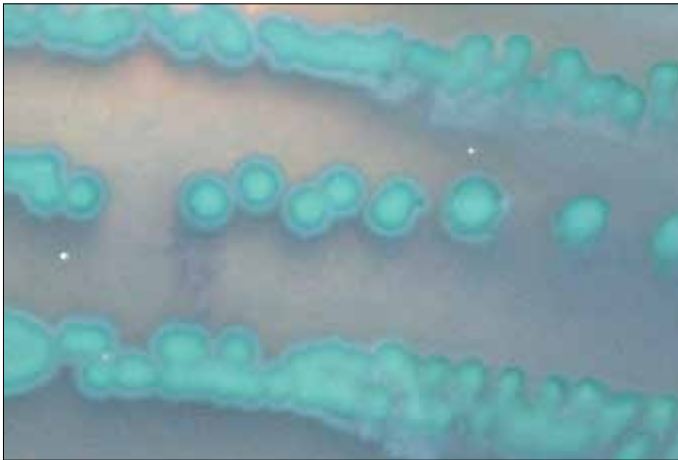


Рис. 22. Наличие зоны лизиса вокруг колоний *Vac. cereus* при определении ДНКазной активности.



Рис. 23. Определение каталазной активности.



Рис. 24. Определение оксидазы (положительная реакция).



Рис. 25. Определение фосфатазной активности (под воздействием 30% нашатырного спирта при наличии фосфатазы колонии приобретают розовый цвет).



Рисунок 26. Тест Фогес-Проскауера (при наличии ацетона среда приобретает красное окрашивание).



Рисунок 27. Обесцвечивание среды Хью-Ляйвсона в обеих пробирках.

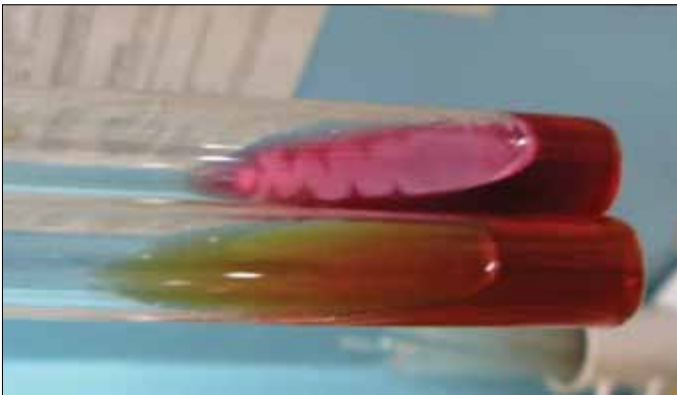


Рис. 28. Определение уреазы (при положительном результате среда Кристенсена краснеет).



Рис. 29. Рост референс-штамма *V. caryophilus* 2527 на среде Симмонса через 48 часа инкубации при 37° (нижняя пробирка) цвет среды синий, вследствие способности бактерий утилизировать цитрат и защелачивать субстрат.



Рис. 30. Фото планшета с результатами тест системы по изучению ферментативных свойств штаммов *B. cereus*.

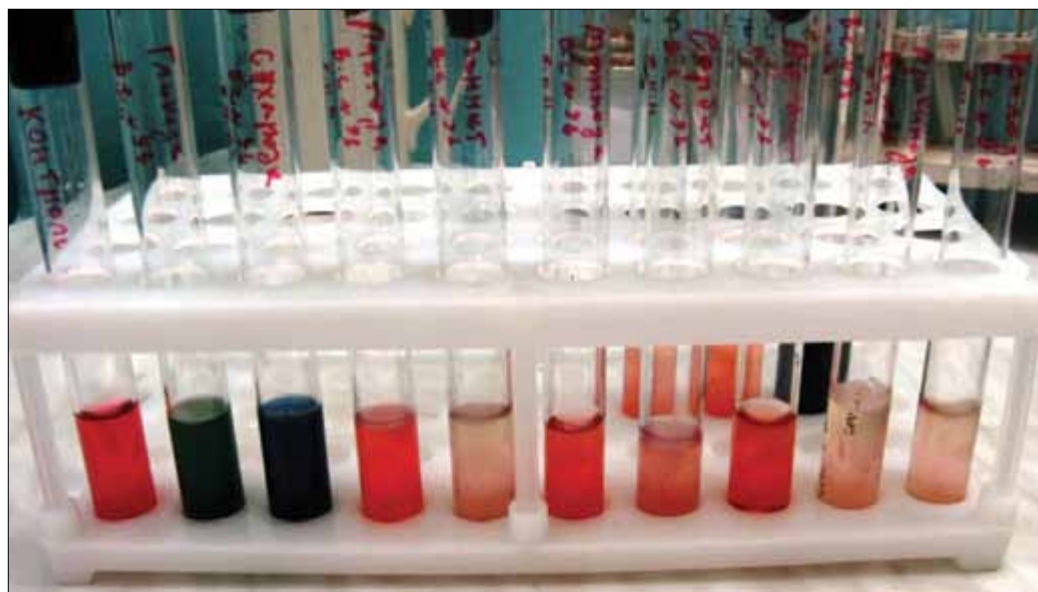


Рис. 31. Цветной ряд Гисса референс-штамм *B. cereus* 2527:
 1 – глюкоза и 2 - сахароза (в этом случае с индикатором ВР (водный голубой + розоловая кислота) – положительные); 3 - лактоза; 4 - маннит; 5 - дульцит; 6 - мальтоза; 7 – сорбит (отрицательны).



Рис. 32. Изучение сахаролитических свойств.

Изучение окислительных свойств проводилось на средах с углеводами в полужидком агаре (рис. 31), по результатам исследования было выявлено окисление следующих углеводов (табл.1).

Кроме того изучение сахаролитических свойств бактерий было продублировано по системе для ускоренного определения биохимических свойств, произведенные ФГУН НИИЭМ им. Пастера (рис. 32).

Наши исследования на средах Гисса показали, что *B. cereus* не ферментируют углеводы: мальтозу, арабинозу, ксилозу; многоатомные спирты дульцит, сорбит, маннит (табл.1).

Гидролиз крахмала проводили на мясопептонном агаре с добавлением 2 % крахмала. (рис. 33)

Штаммы *Bacillus cereus* имеет также общие биохимические свойства с возбудителем сибирской язвы, такие как редукция нитратов, ферментация с образованием кислоты без газа глюкозы, сахарозы, иногда мальтозы, трегалозы, левулезы, арабинозы,

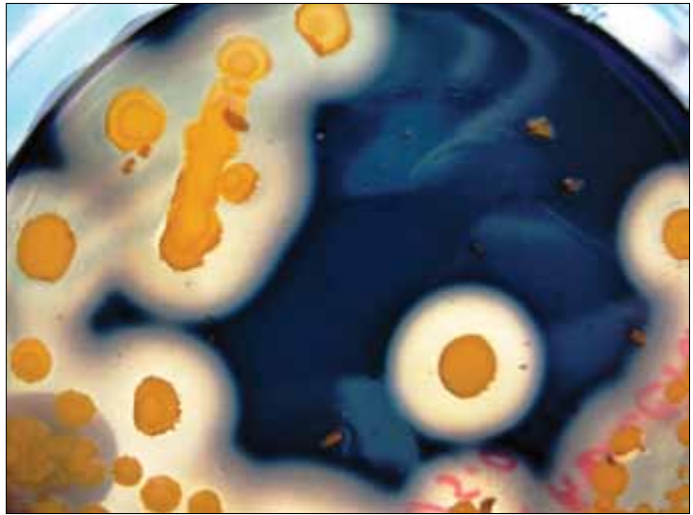


Рис. 33. Гидролиз крахмала (положительная реакция - образование бесцветной зоны вокруг колонии, на фоне общего помутнения среды).

ксилозы, маннита и салицина, гидролиз крахмала (Smith, 1963; Brown, 1955). Аналогичные биохимические признаки наблюдались и у штаммов *Bacillus cereus* var. *mycoides* (Brown, 1955).

При идентификации *Bacillus cereus* используют возможность серотипизации спорных O- и H-антигенов (Berkei, 1976).

N. Stamatini (1960) полагает, что у *Bacillus cereus* и *Bacillus anthracis*, кроме морфологических, культуральных и биохимических, имеются и другие общие свойства.

Некоторые авторы предлагают использовать для дифференциации штаммов *Bacillus cereus* и *Bacillus anthracis* следующие признаки: размеры и подвижность палочек, образование кислоты из глюкозы, ксилозы, маннита, редукцию нитратов; реакцию с яичным желтком; рост на анаэробном агаре при 0,001% лизоцима, при максимальных и минимальных значениях температур (Bergey's manual, 1997). Однако анализ этих тестов показывает, что их использование не позволяет дифференцировать *Bacillus cereus* и *Bacillus anthracis*, так как по указанным выше признакам они имеют большое сходство между собой.

Одним из наиболее специфических методов дифференциации сибиреязвенного микроба некоторые исследователи считают определение гемолитической активности (Brown et al., 1958; Коляков, Мелихов, 1960; Коротич, Погребник, 1976; Гинсбург, 1975; Бургасов, Рожков, 1984;). Гемолитические свойства определяют при выращи-

вании бактерий на агаре или в бульоне, содержащем 1-5% дефибрированной крови животных или человека. Возбудитель сибирской язвы гемолиза эритроцитов не вызывает или он происходит редко и медленно в отличие от сапрофитных бацилл, которые дают быстрый гемолиз (Груз, 1965; Инструкция и методические указания по лабораторной, клинической диагностике, профилактике и лечению сибирской язвы людей, 1982; Методические указания по лабораторной диагностике сибирской язвы, 1980; Гинсбург, 1975; Fleury, 1964; Leise, 1959; Seidel, 1963). Вокруг колоний близкородственных сапрофитов уже к 10 часам инкубирования выявляется прозрачная зона гемолиза, которая затем значительно увеличивается. Однако описаны сибиреязвенные штаммы, способные гемолизировать эритроциты в течение первых суток культивирования (Груз, 1965; Ипатенко, 1987; Мелихов, 1957; Burdon, 1956; Torsell, Nordberg, 1961). Кроме того, наблюдали редкие штаммы споровых анаэробных сапрофитов с чрезвычайно слабыми гемолитическими свойствами или вообще не обладающих ими (Груз, 1965; Мелихов, 1957; Fleury, 1963). Так, при изучении 47 сибиреязвенных штаммов и 97 штаммов сапрофитов через 18 часов культивирования наблюдали резко выраженный гемолиз у 9 штаммов *Bacillus anthracis* и отсутствие гемолиза у многих сапрофитов (Seidel, Strassman, 1956).

Противоречивость сведений о гемолитической активности сибиреязвенного микроба и близкородственных сапрофитов может быть связана с различиями в методах определения. О.И. Цыганкова (1993) показала, что большое влияние оказывают состав питательных сред, время выращивания культуры и срок инкубирования с эритроцитами, вид примененных эритроцитов, способ оценки интенсивности гемолиза и другие факторы. С помощью метода, основанного на диффузии гемолитических продуктов в двухслойный агар с эритроцитами, установлено, что для идентификации *Bacillus anthracis* целесообразно использовать эритроциты барана или морской свинки, так как по отношению к эритроцитам человека и крысы все испытанные сибиреязвенные штаммы обладали гемолитической активностью (Цыганкова, 1993), а к эритроцитам крупного рогатого скота гемолитическая активность была более выражена у

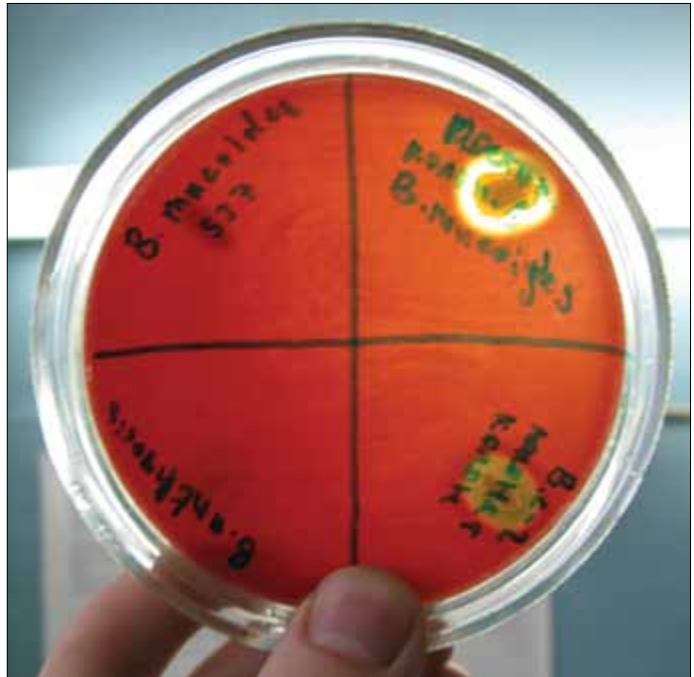


Рис а Гемолитические свойства бактерий бацилл



Рис б

Bacillus cereus, чем у *Bacillus anthracis* (Torsell, Nordberg, 1961).

Оценивая в целом пригодность использования метода определения гемолитических свойств для отличия сибиреязвенных и близкородственных микроорганизмов, следует отметить его ненадежность.

По мнению некоторых исследователей, для идентификации аэробных спорообразующих бацилл может служить наличие у

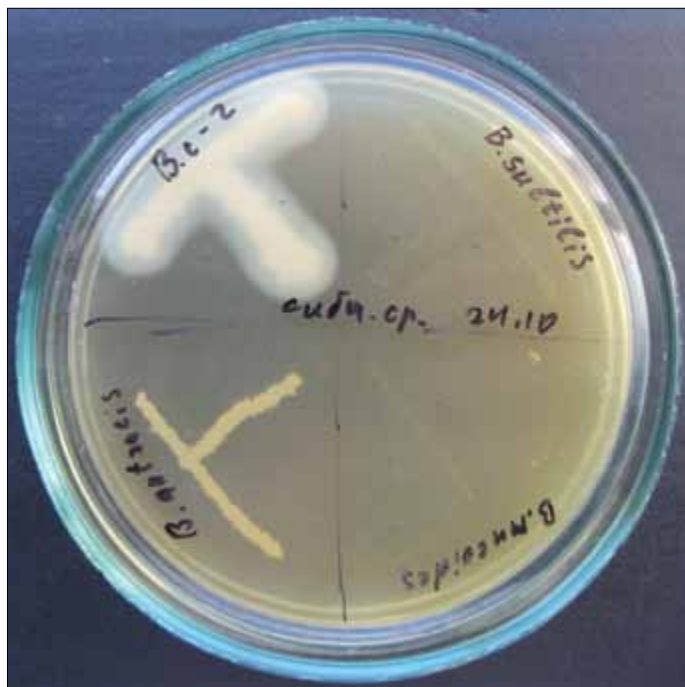
Табл. 1. Гемолитическая активность некоторых штаммов бацилл

| Штамм | Культуральная жидкость | | Клеточный лизат | |
|------------------------------------|------------------------|------------|-----------------|------------|
| | ОД, 420 | % гемолиза | ОД, 420 | % гемолиза |
| <i>Bacillus cereus</i> ВКМ-В164 | 0,9 | 75 | 1,2 | 100 |
| <i>Bacillus anthracis</i> СТИ-1 | – | – | – | – |
| СТИ-1 (рОВ12) | 0,8 | 66 | 0,7 | 58 |

Примечание: " - " признак отсутствует

них лецитиназной активности. Чаще всего лецитиназную активность определяют при выращивании микробов на плотной или в жидкой яично-желточной среде Дрожжевкиной (Калашник, Дунаев, 1974; Полховский, 1970; Bonventre, Eckert, 1963). Учет реакции производят по ореолу преципитации (помутнения) на 5% желточном агаре или по помутнению жидкой среды. Четкие результаты по определению лецитиназной активности проявляются при выращивании культуры на агаровой питательной среде, содержащей 0,2-0,4% лецитина.

Возбудитель сибирской язвы независимо от вирулентности, как правило, не обладает лецитиназной активностью, в то время как сапрофитные бациллы уже через 6-12 часов выращивания про-



являли активность (Инструкция и методические указания по лабораторной и клинической диагностике, профилактике и лечению сибирской язвы у людей, 1982; Bonventre, Eckert, 1963, Калашник, Дунаев, 1974; Коротич,

Рис..... Лецитиназная активность штаммов *Bacillus cereus*. Штаммы *Bacillus anthracis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus mycoides*, не обладали лецитиназной активностью

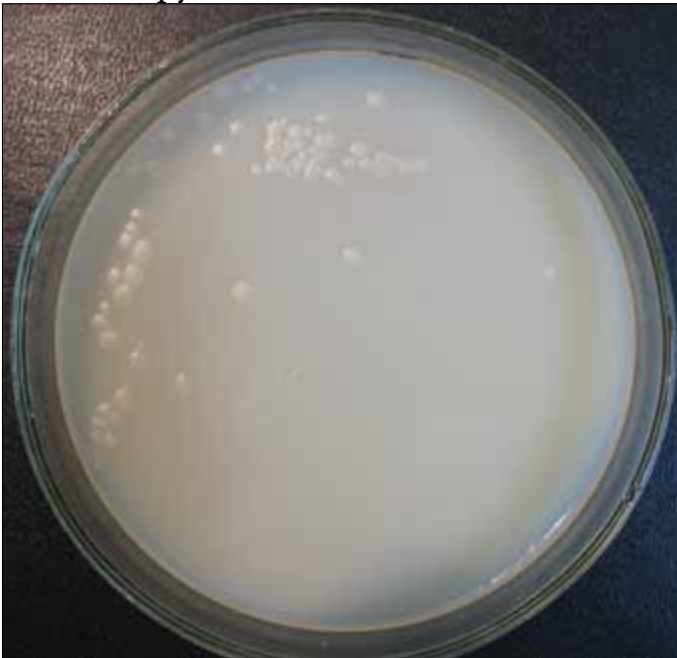
Погребняк, 1976; Полховский, 1970). Однако, некоторые штаммы сапрофитов, особенно *Bacillus subtilis*, *Bacillus mucoides*, *Bacillus mesentericus*, *Bacillus megaterium* также не обладали лецитиназной активностью (Груз, 1965). Результаты наших исследований представлены на рис Кроме того, встречаются сибиреязвенные штаммы, дающие положительную реакцию на лецитиназу (Груз, 1965; Шляхов и др., 1975; Юзвик и др., 1983). Все это затрудняет дифференциацию возбудителя сибирской язвы по лецитиназной активности.

Для идентификации возбудителя сибирской язвы предложено использовать метод определения выработки энзима, разлагающего фосфатные соединения (Груз, 1965; Шляхов и др., 1975; Ivanovics, Fyldes, 1958). В отличие от спорообразующих сапрофитов большинство штаммов *Bacillus anthracis* не способны образовывать щелочную фосфатазу. В основе теста лежит разная степень репрессорного воздействия неорганического ортофосфата в среде на синтез фермента *Bacillus anthracis* и сапрофитами. Последние синтезируют большие количества фермента, который не подвергается ингибированию, тогда как у сибиреязвенного штамма синтез фосфатазы репрессируется в присутствии ортофосфата вплоть до полной ингибиции (Еременко, 1984; Lantos, Ivanovics, 1964; Molnar, Pragai, 1974). По мнению некоторых исследователей, тест на щелочную фосфатазу настолько эффективен, что позволяет дифференцировать не только сибиреязвенные и другие виды аэробов, но даже различать высоко- и слабовирулентные штаммы *Bacillus anthracis* (Груз, 1965; Ivanovics, Fyldes, 1958). Однако данный признак обнаруживается непостоянно (Хвацева, 1978; Шляхов и др., 1975; Юзвик и др., 1983; Seidel, 1963). Кроме того, по этому тесту слабовирулентные и вакцинные сибиреязвенные штаммы с трудом отличались от близкородственных микробов (*Bacillus cereus*) (Шляхов и др., 1975). С учетом того, что фосфатообразование на плотной среде наступает быстрее (к 6-10 часам выращивания), чем на жидкой среде (Seidel, 1963), определение данного признака рекомендовано использовать в качестве ускоренного бактериологического теста идентификации сибиреязвенных бацилл (Шляхов и др., 1975). На тесте фосфатазной актив-

ности основана питательная среда, предложенная для выделения и идентификации возбудителя сибирской язвы.

Ряд исследователей указывают на возможность использования для идентификации *Bacillus anthracis* метода определения редуцирующей способности при росте на агаре с добавлением метиленовой синьки (Борисов, 1955; Груз, 1965; Лабораторные исследования в ветеринарии, 1971). Обладая редуцирующей активностью, вирулентные сибиреязвенные штаммы растут в виде серовато-белых или кремовых колоний, вокруг которых среда обесцвечивается или приобретает желтоватый оттенок. При отсутствии редуцирующей способности близкородственные бактерии цвета среды не меняют, выросшие колонии имеют голубоватый оттенок. Однако данный признак непостоянен: отдельные штаммы *Bacillus cereus* также могут обладать редуцирующей способностью (Груз, 1965), а у некоторых вирулентных и слабовирулентных (вакцинных) сибиреязвенных штаммов редуцирующая способность может отсутствовать. Это затрудняет использование данного теста для идентификации *Bacillus anthracis*.

Предлагаемый рядом авторов метод выявления желатиназной активности для дифференциации сибиреязвенного микроба, по мнению других, не может быть использован из-за непостоянства



признака (Brown, 1958; Burdon, Wende; 1960; Seidel, 1963). Штаммы *Bacillus anthracis* и близкородственных бацилл одинаково могут продуцировать желатиназу. Учитывая это, а также длитель-

Рис... Рост *Bacillus anthracis* штамм ВНИИВВМ 55 для определения протеолитической активности при выращивании на молочном агаре

ность наблюдения (5-8 суток), использование данного теста считается малопригодным для практических целей (Груз, 1965).

Не получило распространения применение для идентификации *Bacillus anthracis* определение протеолитической активности при выращивании на молочном, сывороточном или казеиновом агаре, хотя это явление подробно изучено у сибиреязвенного микроба (Бургасов, Рожков, 1984; Коротич, Погребняк, 1976; Лесняк, 1970; Гинсбург, 1975; Цыганкова, 1993).

Некоторые исследователи в качестве дополнительного признака для дифференциации *Bacillus anthracis* и *Bacillus cereus* предлагают оценивать пероксидазную активность микроорганизмов (Шастина, 1986), которая у *Bacillus cereus* значительно выше, чем у *Bacillus anthracis*. Но для окончательного заключения приведено недостаточно данных.

Таким образом, суммируя изложенные данные о биологии двух представителей рода *Bacillus*, мы можем сказать, что идентификация и дифференциация их на основе морфологических, культуральных и биохимических свойств в настоящее время затруднена в связи с их сходством у разных видов, а также в связи с изменчивостью биологических свойств штаммов в пределах вида.

Для идентификации и дифференциации микроорганизмов по их антигенным свойствам широко используются серологические методы: реакция агглютинации, преципитации, иммуноэлектрофореза, иммунофлюоресценции и другие (Полховский, 1967; Dominici, 1972; Micnel, 1973).

Но все перечисленные выше признаки, выявляемые различными методами, создают только фенотипическую характеристику той или иной группы микроорганизмов, которая может значительно варьировать у штаммов одного и того же вида. Несмотря на относительную простоту, эти методы страдают существенным недостатком в связи с тем, что они основаны на индикации фенотипических признаков, экспрессия которых обычно подвержена сильной вариабельности, поэтому часто оказывается невозможным осуществить дифференциацию исследуемых штаммов.

Табл. 2. Характеристика биологических свойств штаммов бацилл

| Штамм | Морфология | | Спорообразование | Капсулообразование | | Окраска по Грамму | Культуральные свойства | | | | | | | | Характер роста | | | | | | |
|---------------------------|--------------------------|-------------|------------------|--------------------|----------|-------------------|---------------------------------------|-----|----------|------|----------------------|-----------------|----------------|------------------|----------------|--------------|---|---|---|---|---|
| | микроскопия | Подвижность | | In vivo | in vitro | | МПБ | МПА | желатина | 45°C | "жемчужное ожерелье" | фрагментивность | Гемолитическая | Протейлитическая | Фосфотазная | Лецитиназная | | | | | |
| <i>Bacillus anthracis</i> | клетки, цепочки, палочки | - | + | - | - | + | прозрач. | R | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | |
| <i>Bacillus cereus</i> № | | + | + | - | - | + | пристеночно-кольцообразное помутнение | RR | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + |

| | Биохимическая активность | | | | | | | | | |
|---------------------------|--------------------------|----------|---------|----------|--------|----------|---------|-----------|--------|--------|
| | Лактоза | Сахароза | Глюкоза | Мальтоза | Маннит | Раминаза | Дульцит | Арабиноза | Инозит | Сорбит |
| <i>Bacillus anthracis</i> | - | + | + | + | - | - | - | - | - | - |
| <i>Bacillus cereus</i> № | - | + | + | + | - | - | - | - | - | - |

По своей природе возбудитель сибирской язвы относится к мезофильным микроорганизмам, и теряет способность развиваться при температуре выше 45 С. Большинство же сапрофитов, в том числе и *Bacillus cereus*, являются термофилами. Это свойство положено в основу дифференциально-диагностического теста (термотолерантность).

При посеве уколом в столбик с 2% МПА и последующим выращиванием при 22 С было показано, что штамм возбудителя сибирской язвы дает рост в виде «елочки», опрокинутой верхушкой вниз, разжижение желатина происходит сверху на 3-5 день. Штаммы *B. cereus* дают быстрое разжижение, рост наблюдается вдоль укола и дает горизонтальные отростки.

Особое место при изучении культуральных свойств возбудителя сибирской язвы занимает отношение к средам с пенициллином, где образу-

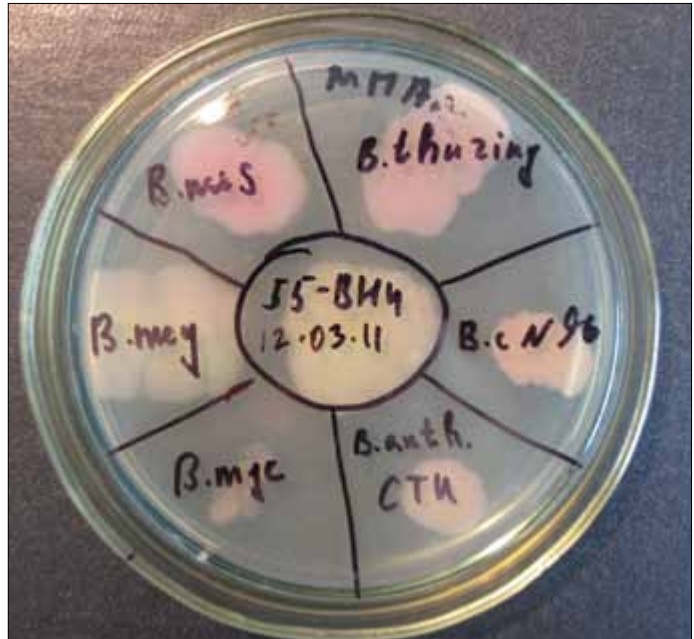


Рис. Тест с фенол фталеином, рост *Bacillus anthracis* штамм ВНИИВМ 55 при добавлении нашатырного спирта сапрофиты розовеют.



Рис. Рост *Bacillus anthracis* штамм ВНИИВМ 55 (слева) на среде PEMBA



Рис Рост *Bacillus anthracis* штамм ВНИИВМ 55 на среде СЖА с ТТХ

ются хорошо видимые под микроскопом сферопласты, напоминающие «жемчужное ожерелье». Ни один из изученных штаммов *Bacillus cereus* не образовал сферопласты на средах, содержащих пенициллин, все они устойчивы к пенициллину.

В диагностической работе ветеринарных лабораторий нашей страны широкое применение нашли сибиреязвенные бактериофаги «К-ВИЭВ» и «Гамма-МВА». Для изучения фаголитических свойств исследуемых культур мы использовали фаг «Гамма-МВА». Все исследуемые нами сибиреязвенные культуры лизировались этим фагом, в то время как штаммы *Bacillus cereus* к данному фагу устойчивы.

Возбудитель сибирской язвы разлагает с образованием кислоты без газа глюкозу, сахарозу, мальтозу, сорбит, фруктозу, крахмалинулин, маннит; медленно восстанавливает метиленовый синий; медленно коагулирует растворы желтка куриного яйца и разжижает желатину; не вырабатывает фосфатазу, не обладает гемолитическими свойствами. В то же время у штаммов *Bacillus cereus* выявлены гемолитическая (рис. 6), лецитиназная, фосфатазная активности, но они не обладают редуцирующей способностью при росте на агаре с добавлением метиленовой синьки.

МИКРООРГАНИЗМЫ РОДА BACILLUS В ОРГАНИЗМЕ ЖИВОТНЫХ

О наличии спорообразующих аэробных бактерий в организме животных сообщают многие отечественные и зарубежные исследователи, однако мнения о количестве и видовом их составе, а также о частоте их встречаемости в организме разноречивы.

В.В. Никольский (1975) указывает на то, что в пищеварительном тракте у поросят спорообразующие аэробные бактерии (*Bacillus mesentericus*) обнаруживаются уже на третий-четвертый день после рождения. Через 15 дней и позднее *Bacillus mesentericus* и *Bacillus subtilis* определяются в кишечнике животных регулярно. Очевидно, наличие бактерий рода *Bacillus* в пищеварительном тракте свиней является причиной их проникновения и во внутренние органы этих животных. Так, В.А. Безуглая (1975), обследовавшая туши свиней, которые до забоя были клинически здоровыми, обнаружила спорообразующие бактерии в лимфатических узлах у 26,3% животных, в печени - 17,86%, в селезенке - 9,21%.

М.П. Топчий (1979) считает, что бациллы следует отнести к представителям нормальной микрофлоры кишечника крупного рогатого скота. При исследовании 120 проб, полученных от 120 телят, она выделила 120 культур, сходных по морфологическим и культурным признакам с эталонными штаммами бацилл. По данным М.П. Топчий, культуры обнаружены в количестве $6 \cdot 10^{10}$ - $7 \cdot 10^{11}$ клеток в 1 мл смыва.

По данным В. И. Орловского и И.А. Бочкова (1973), спорообразующие бактерии в желудочно-кишечном тракте здоровых морских свинок уже в первые дни после рождения определя-

ются в количестве до 10^5 - 10^6 в 1 г содержимого. Такие количества бацилл обнаруживаются у морских свинок и в последующие дни. Найдены спорообразующие аэробные бактерии и в кишечнике мышей, однако количественных данных авторы не приводят.

Таким образом, организм многих животных можно рассматривать как одно из мест обитания спорообразующих аэробных бактерий.

БАКТЕРИИ РОДА *BACILLUS*, ОБНАРУЖИВАЕМЫЕ В ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ

Большое количество исследований посвящено определению спорообразующих бактерий в пищевых продуктах, в том числе и тех, которые употребляются в пищу без термической обработки. Так, В.А. Мирзоева (1959) подчеркивает существенную роль *Bacillus subtilis* и *Bacillus mesentericus* в порче молочных продуктов, кондитерских изделий, сахарных сиропов, консервов, зерновых, хлебных и других продуктов. Л.Н. Петрова (1975) приводит подробные данные о дифференциации спорообразующих аэробных бактерий, выделенных из мясных полукопченостей: 26% из числа выделенных культур составили *Bacillus subtilis*. С.П. Аскалонов и А.И. Ильченко (1962) обращают внимание на то, что *Bacillus mesentericus* может обсеменять различные пищевые продукты (хлеб, мясо и др.), вызывая нередко их порчу.

S. Afifi и J. Muller (1975) методом флюоресцентной микроскопии определяли наличие *Bacillus subtilis* в колбасах, кондитерских изделиях, рыбных продуктах. Важным обстоятельством является то, что обычные методы термической обработки не всегда устраняют из продуктов питания бактерии указанной группы, поскольку их споры не гибнут даже после обработки при 120 °С в течение 1 часа. Так, С. Jonescu (1966) установил наличие *Bacillus subtilis* в молоке в количестве 10³ микробных клеток в 1 мл. При пастеризации молока число указанных бактерий несколько уменьшилось, однако в половине исследованных бутылок даже после обработки все же оно составило 10³ микробных клеток в 1 мл. Sharez (1969), обследуя партии сырого и пастеризованного молока, обнаружил бактерии рода *Bacillus*, в частности виды

Bacillus subtilis, *Bacillus licheniformis* и др. Некоторые штаммы проявляли высокую термоустойчивость.

G. Lott (1972), рассматривая роль психрофильных бактерий, утверждает, что в молочных продуктах особенно опасны бактерии родов *Clostridium* и *Bacillus*. На 107-108 психрофиллов приходится 104-105 спорообразующих микробов. Н. Berkel и R. Hodlok (1976) выделяли спорообразующие бактерии из вареных колбас. Изолированные культуры отнесены к видам первой морфологической группы: *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis*. Ю.Г. Костенко с соавторами (1978) показали, что в пастеризованных консервах «шейка ветчинная» спорообразующим аэробным бактериям принадлежит значительный удельный вес в общей микрофлоре. Микробиологическое исследование большого количества проб мясного фарша провела Е.П. Динчева (1970) в Болгарии. При исследовании более 200 партий фарша установлено, что общее количество бактерий колебалось в пределах 106-1010 клеток/г. После хранения фарша при температуре 4 С в течение 48 ч количество бактерий увеличиваюь в два - восемь раз. Спорообразующие аэробные бактерии, преимущественно бациллы, обнаружены в трети проб (31,5%).

P.Garry et al.,(1998) приводят результаты анализа микрофлоры, содержащейся в тесте, пшеничной муке и зернах пшеницы. Из образцов охлажденного теста и пшеничной муки выделены и идентифицированы 95 штаммов бацилл. Среди 53 штаммов, выделенных из охлажденного теста, 24 штамма - *Bacillus subtilis*, 17 - *Bacillus cereus*, 10 - *Bacillus pumilus*, 2 - *Bacillus licheniformis*. В пшеничной муке найдены *Bacillus pumilus* - 11 штаммов, *Bacillus subtilis* - 10, *Bacillus brevis* и *Bacillus cereus* по два, *Bacillus coagulans*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium* - по одному. В пшенице обнаружены *Bacillus circularis* - 6, *Bacillus subtilis* - 3, *Bacillus cereus* - 1, *Bacillus licheniformis* - 1 штамм. Таким образом, исследованные продукты существенно отличались по числу и видам обнаруженных в них штаммов бацилл.

Множество проб самых различных пищевых продуктов исследовали М.Mazar et al., (1995). Проведя бактериологическое ис-

следование более 6300 проб продуктов, они обнаружили достаточно частое по сравнению с другими видами наличие бактерий рода *Bacillus*. Хотя в этой работе авторы не указывают, какое количество из выделенных бактерий данной группы обладало токсическими свойствами, однако из других публикаций известно, что именно с этими бактериями они связывают определенный процент зарегистрированных пищевых токсикоинфекций. В сообщении С. Klug et al., (1998) приводятся данные о наличии спорообразующих аэробных бактерий в некоторых партиях колбас различных сортов. Авторы высказывают мнение, что причиной контаминации колбас данной микрофлорой являются добавляемые специи. Специальное бактериологическое исследование более 100 проб различных специй (лавровый лист, перец, корица, сухой чеснок, сухая горчица) показало, что спорообразующие аэробные бактерии более чем в половине случаев обнаруживаются в количестве до 8500 бактерий на 1 г пробы. I. Molska (1996) провела бактериологическое изучение причин порчи различных пищевых продуктов. Она установила, что среди выделяемых из пищевых продуктов микробных культур определялись и спорообразующие бактерии. В их числе чаще других были изолированы *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*.

Задачей первой серии наших исследований являлось изучение количественных показателей контаминации специй, используемых в производстве колбасных изделий, бактериями *Bacillus cereus*. Для исследования взяты следующие специи различных производителей: перец черный - проба № 1, смесь с кардамоном - № 2, смесь 3 - № 3, мускатный орех - № 4, душистый перец - № 5, смесь пряностей 5 - № 6, красный перец - № 7, чаман - № 8, душистый экстракт черного перца - № 12, смесь 3 - № 13, смесь 5 - № 14, смесь 7 - № 15, мускатный орех - № 16, кардамон - № 17, душистый перец - № 18, смесь 1 - № 19, смесь 2 - № 20, смесь 3 - № 21, смесь 4 - № 22, смесь 5 - № 23, смесь 6 - № 24, смесь 7 - № 25, чеснок молотый - № 26, кориандр - № 27, перец черный - № 28, паприка - № 29, смесь 1 - № 30, смесь 2 - № 31, смесь 3 - № 32, смесь 4 - № 33, смесь 5 - № 34, смесь 6 - № 35, смесь 7 - № 36, черный перец - № 37,

чеснок молотый - № 38, чеснок сушеный - № 39, паприка - № 40, кориандр молотый - № 41, перец красный - № 42, кориандр - № 43, орех мускатный - № 44, ЕМ ФРИШ № 45, биафос - № 46. Из проб специй готовили образцы для исследований по следующей схеме: брали 1 г специй и заливали 9 мл МПБ (1:10). Затем из этой суспензии после 3-х минутного осаждения из надосадка отбирали 1 мл и добавляли 19 мл МПБ (1:20). Исследовали по двум схемам. Сразу же делали посев газоном на чашки Петри с приготовленной и разлитой в них питательной средой. Ставили в термостат на 18 часов для культивирования при температуре 37°C. 2-я схема: Приготовленные суспензии в разведении 1:10 и 1:20 выдерживали в термостате (37°C) 6 часов. Затем делали посев газоном на чашки Петри с приготовленной питательной средой. Через 12 часов инкубирования в термостате (37°C) в чашках Петри, которые были засеяны сразу после разведения, рост отсутствовал, кроме смеси № 5 и смеси № 3. При 2-м варианте после инкубирования в термостате суспензии в течение 6 часов (37°C) делали посев на чашки Петри и инкубировали в термостате 12 часов при 37°C. Бактерии *Bacillus cereus* были дифференцированы от других бацилл на селективной среде Ставропольского научно-исследовательского института вакцин и сывороток для выделения и культивирования сибиреязвенного микроба. Результаты исследований свидетельствуют, что большинство изучаемых образцов специй содержат бактерии, которые формируют мелкие, крупные и средние колонии матово-белого цвета с неровными краями в виде гривы льва. При добавлении раствора нашатырного спирта цвет колоний становился розовым.

Для определения экспозиции по времени культивирования в термостате на селективной среде Ставропольского научно-исследовательского института вакцин и сывороток сделали разведение образца пробы № 5 (смесь специй № 5) 1:10 и 1:20 и делали посев на чашки Петри с питательной средой для роста и выделения сибиреязвенного микроба с предварительным инкубированием в термостате при t 37°C в течение 15, 30, 45 и 60 минут. Затем чашки Петри с селективной питательной средой ставили в

термостат при 37°C на 16 часов. Получили одинаковые результаты для всех вариантов: сплошной рост в обоих разведениях.

Для определения времени экспозиции мы использовали 2-й вариант: суспензию в разведении 1:10 и 1:20 из смеси специй № 5 ставили в термостат при 37°C с интервалом 5 минут с последующим высевом на чашки Петри с питательной дифференциальной средой. Продолжительность инкубирования чашек с посевами культур в термостате составляла 1, 2, 3, 4, 5 и 6 часов. Результаты представлены в таблице 4.

Из таблицы 5 видно, что рост бактерий обнаружен после 7 часовой экспозиции.

Из исследованных нами таким образом 46 проб в 42-х (кроме экстракта душистого перца, экстракта чёрного перца, ЕМ ФРИШ, биафос) наблюдался рост в разведении 1:10 и 1:20 как сразу при посеве, так и после 6 часов подращивания в термостате при 37°C.

Чтобы исключить наличие неспорообразующих бактерий в исследованных пробах, суспензию прогрели на водяной бане 30 минут при 66-70°C, и поставили в термостат для подращивания на 6 часов при 37°C. Затем сделали посев на селективную среду Ставропольского научно-исследовательского института вакцин и сывороток и поместили в термостат для роста на 12-16 часов при 37°C. Через указанный промежуток времени появился рост

Табл. 4. Описание роста бактерий после культивирования в термостате при t 37°C11

| Время инкубирования | Влияние времени культивирования на рост <i>Bacillus cereus</i> | |
|---------------------|--|---|
| | Разведение | |
| | 1:10 | 1:20 |
| 1 час | рост отсутст. | рост отсутст. |
| 2 часа | - " - | рост отсутст. |
| 3 часа | - " - | рост отсутст. |
| 4 часа | - " - | рост отсутст. |
| 5 часов | - " - | рост отсутст. |
| 6 часов | - " - | рост отсутст. |
| 7 часов | слабый рост, колонии беловато-прозрачные, слизистые, края неровные в чашке с экспозицией 5 мин., в остальных роста нет | Сплошной рост беловато-прозрачных колоний, края неровные в чашке с экспозицией 5 мин. |

мелких, крупных и средних колонии матово-белого цвета. Края колоний неровные, поверхность шероховатая. При добавлении раствора нашатырного спирта колонии приобрели розовый цвет. Таким образом, мы показали, что выделенные из специй бактерии, относятся к спорообразующим (к виду *Bacillus cereus*) Данная схема исследований является наиболее оптимальной для выделения бацилл *Bacillus cereus* (рис.10).

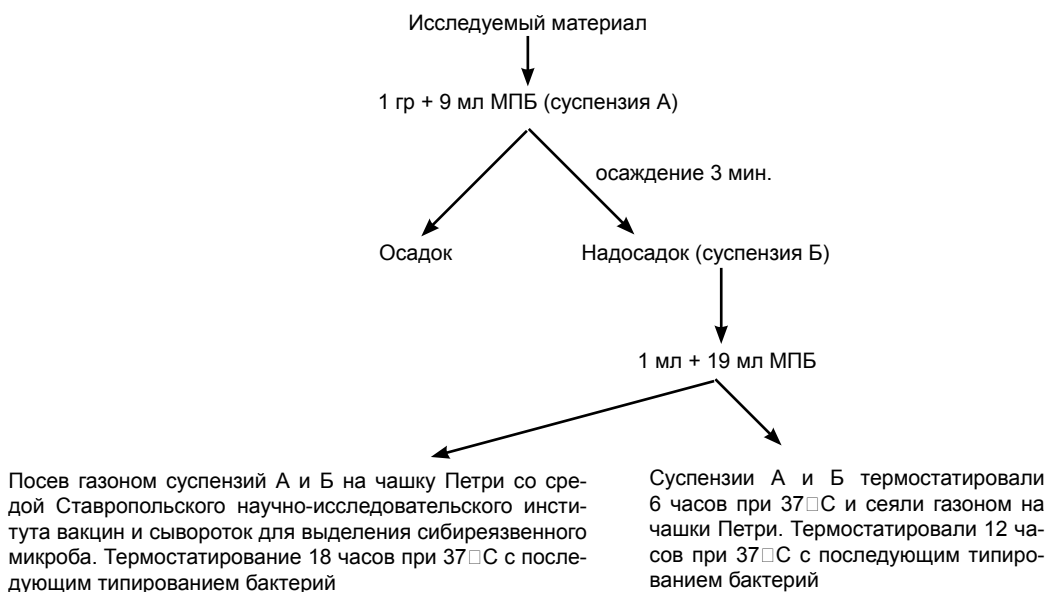


Рис.10. Схема выделения *Bacillus cereus*.

С целью исследования жизнеспособности спор *Bacillus cereus* в специях хранившихся в течение 17 лет в стеклянной посуде, пробы исследовали по вышеуказанной схеме. Результаты, представленные в таблице 5, свидетельствуют о обнаружение штаммов *Bacillus cereus*, и их жизнеспособности после 17 летнего хранения при комнатной температуре при солнечном освещении.

По результатам проведенных исследований можно сделать следующие выводы.

1. Из 20 видов специй, включающих 46 проб, 16 видов контаминированны *Bacillus cereus* (80%), это составляет 37 проб (71%) из общего количества исследуемых проб.

2. Для выделения *Bacillus cereus* пригодна селективная питательная среда для выделения и культивирования сибиреязвен-

Табл. 5. Результаты исследования на контаминацию *Bacillus cereus* образца специ, хранившегося 17 лет

| Время | I смесь | II смесь |
|----------|---|---|
| 6 часов | роста нет | Роста нет |
| 7 часов | роста нет | Роста нет |
| 8 часов | роста нет | Роста нет |
| 9 часов | роста нет | Роста нет |
| 10 часов | роста нет | Роста нет |
| 12 часов | роста нет | Роста нет |
| 14 часов | роста нет | Роста нет |
| 16 часов | рост в виде беловато-прозрачных колоний | рост в виде беловато-прозрачных колоний |

ного микроба Ставропольского НИИ с предварительным термостатированием при 37 С изучаемых образцов и 6-7 часовой инкубацией

3. После 17-летнего хранения специй в стеклянной банке с притертой крышкой споры *Bacillus cereus* сохраняют свою жизнеспособность.

Проведённые нами исследования показали, что практически 80% специй контаминировано спорами *Bacillus cereus*. Эти специи попадают непосредственно в пищевые продукты, при последующей термической обработке которых споры бацилл в них не погибают, тогда как вегетативные формы бактерий не выдерживают такого режима Поэтому задачей последующих исследований была разработка метода перевода споровой формы *Bacillus cereus* в вегетативную с целью последующей инактивации вегетативных форм термическим воздействием.

П.А. Ивашкевичем и соавторами (1959) установлено, что биологически полноценные споры бацилл при выращивании их методом микрокультур прорастают почти в 100% случаев в течение 2,5 часов. Не прорастают лишь нежизнеспособные споры, которых в большинстве популяций бывает не менее 5-10%. П.Н. Бургасов и Г.И. Рожков (1984) утверждают, что увеличение срока непрорастания спор свыше 2,5 часов является прогностическим признаком наступающей их гибели. Причиной гибели спор, по мнению Н. Halworsон (1959), является переход их в предвегета-

тивное состояние. Это явление сопровождается набуханием клеточных стенок и цитоплазмы, активацией энзиматических процессов и выходом из клеток дипиколината кальция.

Фазы споропрорастания бацилл как в жидкой, так и на плотной питательных средах проходят практически в одинаковые сроки. В процессе прорастания визуально различают набухание споры, выход протопласта из нее и перерастание (удлинение) в вегетативную клетку. Особенно наглядно это выражено при использовании метода микрокультур (Ивашкевич, 1959; Михайлов, 1960).

Исследованиями D. Davies (1960) установлено, что наиболее благоприятной для прорастания спор является температура 39°C (споры при таком режиме прорастали за 2 часа). При температуре выше 39°C и ниже 30°C сроки прорастания спор значительно удлинялись. В литературе известен процесс тепловой активации покоящихся спор, изученный N. Roth, D. Uvely, H. Hodge et al., (1954) и A. Fernelius (1960). Тепловое воздействие при 66-70°C в течение 30 минут стимулирует прорастание спор. Добавление аминокислот приводит, по мнению М.В.Земскова, М.И.Соколова, В.М.Земскова и соавторов (1972), к ускорению споропрорастания.

L. Rode, J. Foster (1963) считают, что в основе механизма прорастания спор лежит высвобождение из них протеиназ и дипиколиновой кислоты. Первой ступенью споропрорастания является нарушение клеточных стенок покоящихся спор и присущей им водонепроницаемости. Вторая ступень - проникновение воды, которая приводит к растворению «защитной» дипиколиновой кислоты и к активации энзиматических реакций, побуждающих споры к жизни и прорастанию. В результате резкого набухания спор происходит разрыв клеточных стенок в одной точке споры, откуда появляется почка протопласта. Последняя, постепенно удлиняясь, вытягивается в течение 1-1,5 часов в вегетативную клетку до обычных ее размеров (Halworsen, 1959). Образовавшаяся первичная материнская клетка отделяет от себя через 18-20 минут дочернюю особь, которая, превращаясь в материн-

скую, снова отделяет от себя дочернюю; и так идет размножение вплоть до образования бактериальной цепочки. Таким образом, вегетация и размножение клеток в бактериальной цепочке осуществляется только в однополюсном направлении от точки прорастания споры. В результате такого размножения образуются многоклеточные нити бацилл, почти сплошь состоящие из материнских клеток, объединенных между собой общей материнской субстанцией. Однако при дроблении или разрыве таких бациллярных нитей материнская клетка может вегетировать и отделять от себя дочерние клетки в той же последовательности, но в двухполюсном направлении.

Для наших исследований мы брали образцы проб пищевых добавок (специй), полученных с Ульяновского мясокомбината - смесь № 3, № 5, № 7. Для роста *Bacillus cereus* использовали селективную питательную среду для выделения сибиреязвенного микроба Ставропольского научно-исследовательского института вакцин и сывороток. Смесь пищевых добавок № 3, № 5, № 7 мы помещали в водяную баню марки «Avalier» VL-32 на 30 минут при температуре 66-70°C. После 30 минутной экспозиции в водяной бане готовили суспензию 1:20 на стерильном физиологическом растворе с пищевыми добавками: один ряд пробирок с добавлением L-аланина и L-тирозина в концентрации 0,2% и

Табл. 6. Анализ прорастания спор бактерий *Bacillus cereus* из пищевых добавок

| Пищевые добавки | Описание роста бактерий | | Количество колоний на средах | |
|------------------|---|---|------------------------------------|-----------------------------|
| | содержащих аминокислоты | не содержащих аминокислоты | содержащих аминокис-лоты | не содержащих аминокис-лоты |
| Смесь специй №3 | колонии изолированные, белые, выпуклые, края ровные, среднего размера и мелкие. При добавлении 23% р-ра нашатырного спирта окрасились в розовый цвет, что указывает на наличие <i>Bacillus cereus</i> | колонии изолированные, края ровные, среднего размера. При добавлении 23% р-ра нашатырного спирта окрасились в розовый цвет, что указывает на наличие <i>Bacillus cereus</i> | 16 | 4 |
| Смесь специй № 5 | те же признаки, что и в добавке № 3 | те же признаки, что и в добавке № 3 | 8 | 2 |
| Смесь специй № 7 | Сплошной рост окрасились в розовый цвет. | Сплошной рост окрасились в розовый цвет | Сплошной рост на поверхности чашки | 8 |

второй ряд пробирок - без добавления аминокислот. Инкубировали в термостате 2,5 часа при температуре 39°C, затем засеивали газоном в чашки Петри с селективной средой и помещали в термостат при температуре 37 С на 12-16 часов. Затем проводили оценку результатов (табл. 6).

По результатам проведенных исследований можно сделать вывод, что по методике, предложенной N. Roth, D. Lively, H. Hodge et al., (1954), A. Ferntlius et al., (1960), прорастание спор *Bacillus cereus* происходит в четыре раза менее эффективно, чем по методике, предложенной нами.

Приведенные данные свидетельствуют о том, что спорообразующие аэробные бактерии достаточно часто обнаруживаются в различных пищевых продуктах, в том числе в употребляемых в пищу без термической обработки. Ряд выше приведённых авторов обращает внимание на встречаемость в пищевых продуктах токсигенных культур этой группы, наличие у них факторов патогенности.

ПОЛУЧЕНИЕ МЕЖВИДОВЫХ РЕКОМБИНАНТНЫХ ШТАММОВ РОДА *BACILLUS*

Впервые получение гибридных клеток у бацилл путем слияния протопластов было описано для *Bacillus subtilis* (Schaeffer, Hotchkiss, 1978) и *Bacillus megaterium* (Fodor, Alfoldi, 1976). Использование этого метода стало возможным благодаря разработке способов получения протопластов бацилл (Chatterjee, 1965; Ценин, 1983) и выяснению условий, обеспечивающих их реверсию в исходные бактериальные формы (Necas, 1980; Jejnes, 1961).

Высокий уровень реверсии протопластов в бактериальное состояние является одним из условий, способствующих выявлению гибридных клонов. Эффективность регенерации для бацилл в большинстве случаев варьирует от 1 до 10% (Fodor, Alfoldi, 1976; Григорьева, Азизбемян, 1980). В опытах отдельных исследователей подбор оптимальных условий позволял повысить уровень реверсии до 50% для *Bacillus thuriangiensis* (Ценин, Рыбчик, 1983) и до 60-80% для *Bacillus megaterium* (Weibull, 1953).

Существует возможность повышения частоты образующихся рекомбинантов путем облучения протопластов бацилл ультрафиолетом до или во время слияния протопластов (Григорьева, Азизбемян, 1980), а также с помощью обработки протопластов трипсином.

Слияние протопластов для получения гибридных клеток с заданными свойствами возможно как в пределах одного вида бацилл (Mc Quillen, 1960; Fodor, Alfoldi, 1976), так и между разными видами (Schaeffer, Hotchkiss, 1978; Чернов, 1984).

Межвидовое слияние протопластов является более трудной задачей. Образование генетически стабильных межвидовых реком-

бинантов показано для ауксотрофных штаммов *Bacillus subtilis* и *Bacillus megaterium* (Schaeffer, Hotchkiss, 1978).

Попытки получить межвидовые гибриды путем слияния протопластов *Bacillus thuriengiensis* и *Bacillus megaterium* (Ценин, Рыбчик, 1983) не привели к положительным результатам. Несмотря на то, что согласно данным электронной микроскопии, слияние протопластов происходило, генетически стабильные рекомбинанты им получить не удалось.

Метод слияния протопластов позволяет осуществить и передачу внехромосомных генетических элементов, в частности плазмид, не обладающих системами собственного переноса. Продемонстрирована возможность передачи плазмид при слиянии протопластов *Bacillus subtilis* (Weibull, 1953), *Bacillus megaterium* (Хмель, 1985), а также при межвидовом слиянии протопластов бацилл (Чернов, 1984).

Обнадеживающие результаты получены в опытах по использованию протопластов для осуществления трансформации бацилл как плазмидной, так и хромосомной ДНК (Chang, Cohen, 1979; Levi, 1977).

Отсутствие клеточной стенки у протопластов облегчает проникновение ДНК в клетку, при этом отмечена высокая частота появления трансформантов. С. Levi и С. Sanchez-Rivas (1977) отмечают, что бациллы, в обычных условиях, будучи протопластированы, способны воспринимать чужеродную ДНК. Так, показана трансформация плазмидной ДНК протопластов *Bacillus thuriengiensis*(кем?). П.Ф. Рябченко и Н.О. Буканов (1980) осуществили трансформацию протопластов *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilis*, *Bacillus thuringiensis* с помощью плазмидной ДНК, определяющей устойчивость к тетрациклину.

Использование метода слияния протопластов особенно перспективно для анализа генетически мало изученных микроорганизмов, в том числе *Bacillus anthracis* и *Bacillus cereus*.

Образование и слияние протопластов возбудителя сибирской язвы изучено недостаточно. Способ обработки *Bacillus anthracis*

пенициллином (Foldes, Meretey, 1960) не позволяет получить стабильные жизнеспособные протопласты, кроме того, существование антибиотикоустойчивых штаммов ограничивает возможность применения этого метода. До сих пор считалось, что клетки *Bacillus anthracis* устойчивы к лизоциму и только комбинированное воздействие несколькими препаратами позволяет получить сибиреязвенных протопласты. Так, Е.В. Иванова (1983) использовала для приготовления протопластов возбудителя сибирской язвы сочетание ЭДТА с лизоцимом, R.E. Ruhfel (1983), а В.С. Чернов (1984) применял комбинированную обработку клеток *Bacillus anthracis* пенициллином с лизоцимом.

Слияние протопластов мутанта *Bacillus anthracis* СТИ-1, устойчивого к рифампицину и штамма *Bacillus cereus*, устойчивого к тетрациклину, наблюдалось в опытах В.С.Чернова (1984). Гибридные клетки были резистентны к обоим антибиотикам, однако стабильного наследования устойчивости к рифампицину не происходило, в 30% случаев у гибридного потомства резистентность к рифампицину утрачивалась. Нестабильность наследования признака объясняется, как правило, отсутствием оптимальных условий для слияния и реверсии протопластов. Утрата устойчивости к антибиотику, определяемая плазмидой, может происходить из-за элиминации плазмид в гибридных клетках.

Анализ данных литературы свидетельствует о том, что в настоящее время разработаны методы получения протопластов для 7 видов бацилл, осуществлено слияние протопластов при получении внутривидовых гибридов. Исследования по получению межвидовых рекомбинантов путем слияния протопластов весьма ограничены, положительные результаты получены лишь в системах *Bacillus subtilis* - *Bacillus megaterium* (Schaeffer, Hotchkiss, 1978).

Слияние протопластов доказывает возможность создания внутривидовых и межвидовых гибридных бактерий с желаемыми свойствами.

В последнее время из различных методических приемов при генетических манипуляциях с возбудителем сибирской язвы наибо-

лее часто используется описанная L. Battisti, B. Green (1985) конъюгационная система скрещивания для переноса плазмид среди клеток *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus* и *Bacillus thuringiensis*. В этой системе скрещивания требуется непосредственный контакт между клетками донора и реципиента, а бесклеточные фильтраты не способны к передаче плазмидных маркеров в реципиентные клетки. Указанный конъюгационный прием получил название мобилизации. Эти авторы впервые осуществили мобилизацию плазмиды pBC16 (TetR) плазмидами pXO11 и pXO12 *Bacillus thuringiensis* и перенос образующихся коинтегратов от *Bacillus thuringiensis* в клетки *Bacillus anthracis* и *Bacillus cereus* во время их смешанного инкубирования в бульоне. В этих случаях перенос плазмид не был связан с трансформацией или трансдукцией. Авторами также показано, что в процессе такого переноса происходит мобилизация и собственных плазмид *Bacillus anthracis* (pXO1 и pOX2) с помощью крупномолекулярных плазмид *Bacillus thuringiensis* pXO11 и pXO12. В дальнейшем было выявлено, что кроме плазмид pXO11 и pXO12 мобилизующей способностью обладают также другие плазмиды *Bacillus thuringiensis* - pXO13, pXO14, pXO15 и pXO16, обнаруженные в клетках штаммов *Bacillus thuringiensis* подвидов *morrisoni*, *toumanoffi*, *alesti*, *israelensis* и имеющие молекулярную массу 50-120 МД. При переносе этих плазмид в клетки *Bacillus anthracis* или *Bacillus cereus* последние становятся эффективными донорами. Утрата любой из этих плазмид приводит к потере фертильности. В исследованиях Reddy A. (1986) перенос плазмид от 4 подвидов *Bacillus thuringiensis* в клетки *Bacillus anthracis* и *Bacillus cereus* определялся по отбору транскрипентов, получивших плазмиду pBC16. В зависимости от подвида донора транскрипенты также содержали одну из больших плазмид (pXO13, pXO14, pXO15 и pXO16), обуславливающих плазмидную мобилизацию. Плазмида pXO14 обладает способностью к конъюгативному переносу плазмид pXO1 и pXO2 из клеток сибиреязвенного микроба в свободные от плазмид штаммы этого же вида или в *Bacillus cereus*. В дальнейшем В.Д. Green (1989) более детально изучил механизм переноса

плазмид рХО1 и рХО2 с копередачей плазмиды рВС16, обусловленного плазмидой рХО12 (112,5 т.п.о.), кодирующей продукцию инсектицидного кристаллического белка (Cry+). Трансципиенты *Bacillus anthracis* и *Bacillus cereus*, наследующие репликон рХО12, приобретали способность продуцировать параспоровые кристаллы, напоминающие таковые у *Bacillus thuringiensis*.

Другим методическим приемом, используемым для переноса генов в клетки сибиреязвенного микроба, является трансдукция. Так, Р.Е. Ruhfel (1983) осуществлял перенос хромосомных маркеров и плазмид рВС16 (из *Bacillus cereus*, 2,8 МД, TetR) и рС194 (из *Bacillus thuringiensis*, 1,8 МД, CamR) в клетки сибиреязвенного микроба с помощью бактериофага CP51. Частота трансдукции хромосомных маркеров составляла $1 \cdot 10^{-7}$ - $5 \cdot 10^{-6}$, плазмидных - $1 \cdot 10^{-5}$. Более высокая частота трансдукции плазмид по сравнению с хромосомными маркерами являлась следствием многокopianности используемых плазмид. Трансдуктанты содержали вновь приобретенную плазмиду с тем же молекулярным весом, что и доноры, сохраняя при этом селективный признак антибиотикорезистентности и способность быть эффективными донорами плазмид для других реципиентов. Авторы высказали предположение, что бактериофаг CP51 может переносить ДНК размерами до 60 МД, что соответствует размеру его собственного генома. Наиболее высокая частота трансдукции наблюдалась при соотношении фага к клеткам 1:1.

С.В. Гаврилов (1987), И.Н. Преснов (1967) для переноса плазмид рTg141 (2,8 МД, TetR), рС194 (1,8 МД, CamR), рAMB1 (17,7 МД, ErmR) и хромосомного маркера StrR из *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus cereus* и между штаммами *Bacillus anthracis* использовали бактериофаги CP54, CP54ant и Tg13ant.

Под влиянием химических, физических и биологических факторов меняются многие свойства сибиреязвенного микроба. Однако до настоящего времени генетическая основа таких изменений изучена недостаточно. В большинстве случаев исследователи лишь констатируют факты наличия изменений. В частности, Ф.А. Терентьев (1939) наблюдал шаровидные и кокковидные

формы возбудителя при действии на культуру хлористого лития. В.Р. Chatte R.P. Williams (1965) описали формирование у *Bacillus anthracis* протопластов под влиянием лизоцима (50-100 мкг см-3) и глицина (3%). Появление шарообразных форм наблюдалось под действием трихлориодипиридина (1:3000-1:5000) уже через 3 часа экспозиции (Gaiginschi, 1964). Такие измененные формы размножались либо путем простого деления, либо путем почкования. На средах без трихлориодпиридина отмечался возврат к нормальной бациллярной форме.

Из числа химических агентов, вызывающих те или иные изменения свойств сибиреязвенного микроба, можно выделить вещества как органической, так и неорганической природы. Особая роль принадлежит соединениям, обуславливающим образование у *Bacillus anthracis* протопластов или L-форм. Так, В.Р. Chatte, R.P. Williams (1966), изучая образование протопластов у сибиреязвенного микроба, показали, что клетки из шероховатых колоний через 2 часа воздействия лизоцимом (1000 мкг см-3) формируют 87% протопластов, в то время как клетки из гладких колоний при этой концентрации лизоцима лизируются. Кроме того, эти авторы установили, что более молодые клетки лучше протопластируются, нежели клетки старшего возраста (табл. 7).

Ранее эти авторы (Williams, Chatte, 1961) показали, что клетки, выращенные на бикарбонатном агаре в атмосфере углекислого газа, были также чувствительны к лизоциму после первоначальной обработки глицином. Оптимальная концентрация глицина составляла 3%, лизоцима - 50 мкг/см-3. Один глицин не вызывал образования протопластов, а лизоцим в концентрации 50 мкг/см-3 вызывал образование небольшого числа таких форм. Протопласты *Bacillus anthracis* образуются также под влиянием ЭДТА

Табл. 7. Влияние лизоцима на клетки *Bacillus anthracis* разного возраста по В.Р. Chatte (1965)

| Возраст культуры, час. | Количество протопластов, %, при концентрации лизоцима, мкг/см ³ | | |
|------------------------|--|------|------|
| | 12,5 | 25,0 | 50,0 |
| 12 | 10 | 50 | 80 |
| 24 | Мало | 20 | 63 |
| 48 | 0 | мало | 13 |

и лизоцима в конечных концентрациях соответственно 5 мг/см³ и 2 мг/см³ (Иванова, 1983). В этих случаях количество жизнеспособных клеток снижалось до 19,2% от исходного значения.

R.D. Costlow, T.S. Radziwon (1961) из культур *Bacillus anthracis* получили лизин, способный переваривать стенки вегетативных клеток этих видов микробов. При таком воздействии вегетативные клетки 6-ти из 7-ми штаммов *Bacillus anthracis* превращались в осмотически чувствительные сферические тельца с утратой клеточных стенок. Т.Д. Тарасова (1990) для получения протопластов сибиреязвенного микроба предварительно культивировала клетки в среде с уксусным ангидридом (0,05%) до середины экспоненциальной фазы роста, а в последующем обрабатывала лизоцимом (2,0 мг/см³) в течение 2-х часов. Эффективность образования протопластов составляла 90-99%.

L. Mikhailova (1970) показала, что алкалоиды капсаицин и пиперин в небольших дозах имитируют репродуктивную активность *Bacillus anthracis*, что выражается в быстрой аккумуляции больших количеств биомассы. При больших же дозах этих алкалоидов рост и репродуктивность микроба снижается и проявляется их бактерицидное действие, сопровождающееся изменением общего количества образующихся спор, диссоциацией, полиморфизмом клеток, лабильностью к окраске по Граму, уменьшением размера и дегенерацией колоний, продуцированием L-форм.

A. Gaiginschi (1964) получил L-формы *Bacillus anthracis* под влиянием трихлоридпиридина, используемого в концентрациях 1:3000 и 1:5000. При этом автор наблюдал морфологические изменения: наличие шаровидных, изогнутых бацилл, яйцевидных, розеткообразных форм, изогнутых бацилл, картину размножения шарообразных форм почкованием, бацилл со вздутиями и грануляциями. Вирулентность полученных из вегетативных клеток видоизмененных форм была снижена, а вирулентность измененных культур, полученных из спор, оставалась на исходном уровне.

Некоторые авторы, изучая межвидовой плазмидный обмен между клетками *Bacillus anthracis* и *Bacillus cereus*, использова-

ли метод слияния протопластов (Чернов и др., 1987). В.С. Чернов (1984) осуществил перенос плазмиды pBC16 от *Bacillus cereus* GP7 в протопласты штамма СТИ-1.

Т.А. Костюкова и соавторы (1991) осуществили слияние протопластов *Bacillus anthracis* KanRRifR и *Bacillus anthracis* pC194 (CamR). С частотой 10^{-5} получены клоны, содержащие плазмиды pBC16 и pC191 и растущие на агаре с 5 мкг/см³ тетрациклина и 25 мкг/см³ хлорамфеникола, а также клоны, растущие на агаре, содержащем 40 мкг/см³ рифампицина и 25 мкг/см³ хлорамфеникола, что подтверждало передачу плазмид между клетками сибиреязвенного микроба, имеющими различный генотип.

Образование протопластов сибиреязвенного микроба возможно с помощью различных агентов: глицина (0,1-1,5%), лизоцима (10,5 мг/см³) (Chate, Williams, 1965; Chate, 1961; Костюкова, 1991), мутанолизина (25-50 мкг см⁻³). Отмечены штаммовые различия в чувствительности клеточной стенки возбудителя сибирской язвы к действию глицина и лизоцима.

В наших экспериментах по получению межвидовых рекомбинантных штаммов рода *Bacillus* мы начали исследования с получения протопластов (Архипова и др., 2002).

Протопласты бактерий являются более удобной по сравнению с клеткой моделью для генетических исследований в связи возможностью проникновения генетического материала от одного вида бацилл в другой, так как отсутствие такого важного биологического барьера, как клеточная стенка облегчает слияние протопластов и проникновение в них ДНК.

Образование протопластоподобных структур было описано в литературе для некоторых грамположительных и грамотрицательных бактерий (Рябченко, 1980; Алиханян, 1981). Многие исследователи получали протопласты с помощью комбинированного действия пенициллина с лизоцимом (Чернов, 1984), глицина с лизоцимом), а также ЭДТА с лизоцимом (Иванова, 1983).. Однако уровень реверсии протопластов, полученных такими способами в исходное бактериальное состояние очень низкий (Chatte, Williams, 1964

В связи с этим задачи наших исследований заключались в разработке методов получения протопластов у штаммов *Bacillus cereus* GP-7 и *Bacillus anthracis* 34F2.

В работе использовали сибиреязвенный штамм 34F2, устойчивый к стрептомицину (1000 мкг/мл) и шт. *Bacillus cereus* GP-7, устойчивый к тетрациклину (150 мкг/мл). Штамм *Bacillus cereus* GP-7 имеет 2 плазмиды - pBC-16 и pBC-17, причем плазида pBC-17 является критической (то есть функция ее не определена), а плазида pBC-16 детерминирует устойчивость к тетрациклину (150 мкг/мл).

В основе нашей работы лежит модифицированный нами метод S. Chang, S.N. Choen (1979). Для получения протопластов клетки

Табл. 8. Состав используемых сред

| | |
|---------------------------------------|----------------|
| 1. СММ (рН ≈ 6,5): | |
| 0,5 М сахароза | |
| 0,02 М малеиновая кислота | |
| 0,02 М хлористый магний | |
| 2. ГКЯ (: расчет на 1 л) | |
| Гидролизат казеина | 5 г |
| K ₂ HPO ₄ | 3,5 г |
| KH ₂ PO ₄ | 1,5 г |
| Янтарно-кислый натрий | 135 г |
| Хлористый магний (MgCl ₂) | 4,06 г |
| Глюкоза | 10 г |
| FeSO ₄ · 6H ₂ O | 2 мг |
| MnSO ₄ · 4H ₂ O | 2 мг |
| 3. ДМ-3 (жидкая) | на 1 л |
| Сукцинат Na | 0,25М (рН-7,4) |
| Гидролизат казеина | 5% |
| Дрожжевой экстракт | 10% |
| K ₂ HPO ₄ | 3,5% |
| K ₂ HPO ₄ | 1,5% |
| Глюкоза | 50% |
| MgCl ₂ | 1 М |
| 4. Среда Алфолди | на 1 л |
| NH ₄ Cl | 1 г |
| Трис-НСl | 12 г |
| KCl | 35 г |
| NaCl | 58 г |
| Na ₂ SO ₄ | 300 мг |
| Сахароза | 68,5 г |
| MgCl ₂ | 4,26 г |

бактерий выращивали в богатой питательной гипертонической среде (ДМ-3), содержащей гидролизат казеина, дрожжевой экстракт, глюкозу и антибиотики - стрептомицин и тетрациклин. Культуры выращивали при постоянном перемешивании, затем трижды отмывали их средой для протопластирования ДМ-3.

В своих опытах проводили изучение пригодности различных сред для образования протопластов (таблица 8): СММ, содержащую сахарозу, хлористый магний и малеиновую кислоту; ГКЯ - основными компонен-

Табл. 9. Образование протопластов на разных средах и их реверсия в бактериальную форму

| Среды для протопластирования | 1 | | | 2 | | | 5 | | | 10 | | |
|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------|
| | исходные концентрации клеток | % сформированных протопластов | % реверсии протопластов | исходные концентрации клеток | % сформированных протопластов | % реверсии протопластов | исходные концентрации клеток | % сформированных протопластов | % реверсии протопластов | исходные концентрации клеток | % сформированных протопластов | % реверсии протопластов |
| ГКЯ | - | - | - | - | - | - | $3 \cdot 10^7$ | 70 | 0 | $3 \cdot 10^7$ | 91 | 0 |
| СММ | $3 \cdot 10^7$ | $99,5 \pm 0,2$ | $0,06 \pm 0,01$ | $3 \cdot 10^7$ | $98,1 \pm 0,2$ | $0,08 \pm 0,002$ | $3 \cdot 10^7$ | $96,8 \pm 0,016$ | 0 | $3 \cdot 10^7$ | $98,76 \pm 0,021$ | 0 |
| Алфолди | $1 \cdot 10^7$ | $99,80 \pm 0,3$ | $6,5 \pm 0,91$ | $1 \cdot 10^7$ | $99,62 \pm 0,11$ | $2,67 \pm 0,78$ | $1 \cdot 10^7$ | $99,7 \pm 0,13$ | $0,26 \pm 0,09$ | $1 \cdot 10^7$ | $9,96 \pm 0,15$ | $0,20 \pm 0,06$ |

тами которой являются гидролизат казеина и янтарно-кислый натрий, и среде Алфолди, в состав которой входят 1 и 2-х валентные катионы.

Исходные концентрации клеток определяли титрованием их в физиологическом растворе и высевом на мясопептонный агар из соответствующих разведений. Протопласты получали путем обработки клеток бактерий лизоцимом различных концентраций - 1, 2, 5 и 10 мг/мл. После добавления к клеткам лизоцима содержимое пробирок ресуспензировали и ставили на щуттель-аппарат при 37°C (Васильев, Архипова, 2006). Время инкубирования клеток с лизоцимом составляло 1 час. После инкубации бактериальных клеток с лизоцимом суспензию отмывали от лизоцима, титровали ее в среде для протопластообразования и из соответствующих разведений высевали на твердую регенерационную среду.

Образование протопластов контролировали с помощью фазово-контрастной микроскопии. Чувствительность протопластов к осмотическому шоку определяли следующим образом: суспензию протопластов дважды центрифугировали по 15 минут при 4000 об/мин. с ресуспендированием после каждого раза в дистиллированной воде. Затем из соответствующих разведений делали высевы на МПА. Результаты учитывали через 24 часа инкубирования при 37°C .

Рис. 16. Протопласты *Vacillus cereus* при увеличении х6000.

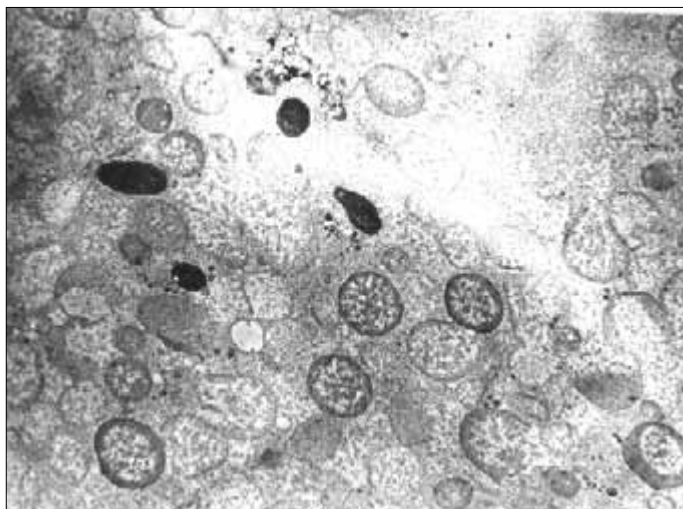


Рис. 17. Протопласты *Vacillus cereus* при увеличении 16000.

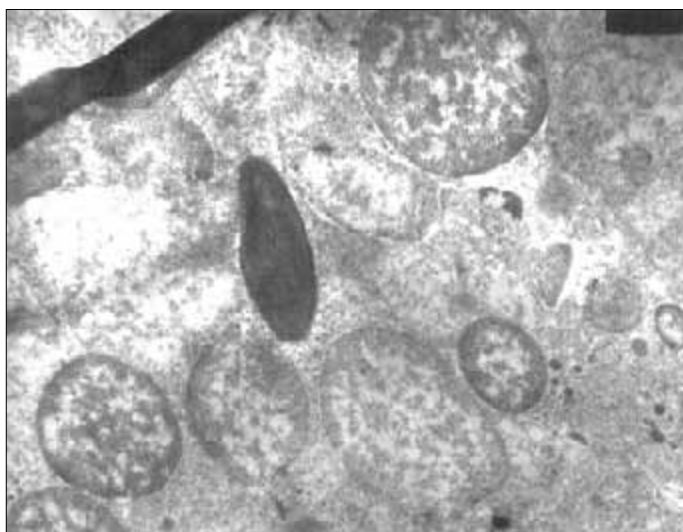


Рис. 18. Протопласты *Vacillus anthracis* при увеличении
□ 16000.





Рис. 19. Протопласты штамма *Bacillus anthracis* 34 F2 при увеличении $\times 40000$.

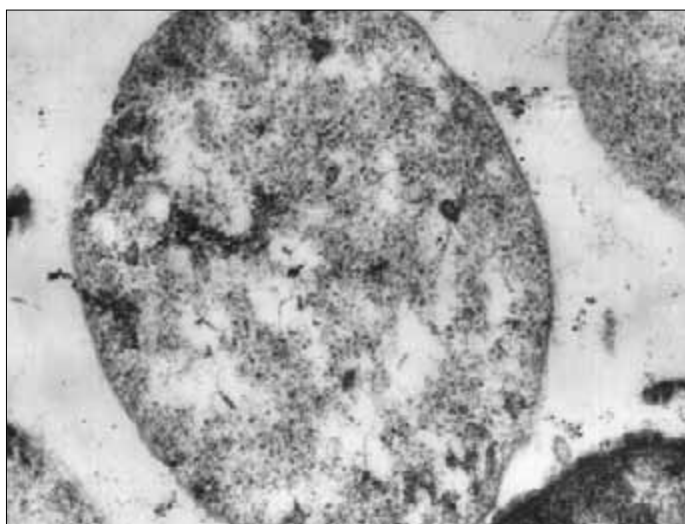


Рис. 20. Протопласты *Bacillus cereus* при увеличении $\times 60000$.

Учитывая исходную концентрацию клеток, число клеток, выросших на МПА после осмотического шока, и количество клеток, образовавшихся на регенерационной среде, определяли процент образования протопластов и процент их реверсии в исходную форму.

Выход протопластов был высоким при использовании в качестве сред для протопластирования среды СММ и составлял 99,5% и среды Алфолди, где он достигал 99,8% при концентрации лизоцима 1 мг/мл (таблица 9). При использовании среды ГКЯ протопласты не образовывались совсем при концентрациях лизоцима 1 и 2 мг/мл. Процент протопластов составлял 70% при применении лизоцима в концентрации 5 мг/мл и 91% - 10 мг/мл

(Васильев, Архипова, 2006а). В связи с этим в последующих опытах среда ГКЯ нами не использовалась.

На рисунках 18 и 19 показаны протопласты шт. 34F2, полученные на среде Алфолди, где хорошо видно отсутствие клеточной стенки бацилл.

Следующая серия экспериментов была посвящена определению способности протопластов *Bacillus cereus* и *Bacillus anthracis*, реверсировать в бактериальные формы. Для определения способности протопластов реверсировать в исходные бактериальные формы суспензию разводили в гипертонической среде и из различных разведений делали высевы на плотную агаризованную среду (ДМ-3).

По данным литературы, способность протопластов к регенерации определяется степенью гидратации среды. Регенерацию протопластов мы проводили в условиях полужидкого (0,8%) агара, так как при этом наблюдается более интенсивная аэрация и более мягкое прорастание регенерированных протопластов. Подсчет образующихся бактериальных колоний производили через 24 часа инкубирования при 37°C.

Уровень реверсии мы определяли, исходя из разницы в числе колоний, образовавшихся на регенерационной среде и формирующихся на МПА после осмотического шока, отнесенной к первоначальному количеству бактерий в культуре.

Было установлено, что наиболее высокий процент регенерации протопластов (6,5%) наблюдали при применении среды Алфолди и использовании лизоцима в концентрации 1 мг/мл. Более высокие концентрации лизоцима (5 и 10 мг/мл) снижали уровень реверсии протопластов (табл. 10). В среде СММ, несмотря на высокий процент протопластообразования, уровень реверсии протопластов в исходную бациллярную форму был низким и составлял 0,06 - 0,08% (Васильев, Архипова, 2006).

Таким образом, нами выбран оптимальный метод получения протопластов, который включает следующие основные этапы:

– Выращивание клеток бактерий в жидкой питательной среде (ДМ-3) до середины логарифмической фазы роста с применением шуттель-аппарата;

Табл. 10. Образование протопластов в среде Алфолди и их реверсия в бактериальные формы

| | Концентрация лизоцима (мг/мл) | | | |
|---------------------------------|-------------------------------|------------------|----------------|----------------|
| | 1 | 2 | 5 | 10 |
| Число кл/мл в исходной культуре | $1 \cdot 10^7$ | $1 \cdot 10^7$ | $1 \cdot 10^7$ | $1 \cdot 10^7$ |
| Число кл/мл после шока | $4 \cdot 10^4$ | $3 \cdot 10^4$ | $2 \cdot 10^4$ | $3 \cdot 10^4$ |
| Число после реверсии | $5 \cdot 10^5$ | $2,6 \cdot 10^5$ | $6 \cdot 10^4$ | $4 \cdot 10^4$ |
| % сформировавшихся протопластов | 99,8 | 99,5 | 99,87 | 99,7 |
| % реверсии | 6,5 | 3,5 | 0,4 | 0,1 |

Табл. 11. Условия образования протопластов

| | |
|------------------------------------|--|
| Среда для выращивания клеток | ДМ-3 (жидкая), Чанг-Коэн, (1979) 0,25 М сукцинат натрия, pH-7,3 0,5% гидролизат казеина 10% дрожжевой экстракт 3,5% K_2HPO_4 +1,5% KH_2PO_4 50% глюкоза IMMgCb |
| Среда для пропластирования | Алфолди (1976 г.) NH_4Cl - 1 г $Na_2SO_4 \cdot 10H_2O$ - 300 мг трис- 12 г сахароза - 69 мг KCl -35 мг $MgCl_2 \cdot 5H_2O$ - 4,20 г $NaCl$ - 38 мг |
| Концентрация лизоцима | 1-2 мг/мл |
| Время инкубации клеток с лизоцимом | 1 час, 37°C |
| Регенерационная среда | ДМ-3 (твердая), Чанг - Коэн, 1979 |

- Использование гипертонической среды Алфолди для образования протопластов;
- Обработка бактериальной суспензии лизоцимом в концентрации 1-2 мг/мл и инкубация их в течение 1 часа при 37 С;
- Контроль образования протопластов с помощью фазово-контрастной микроскопии;

Исходя из вышеизложенного, можно сделать вывод о том, что наиболее подходящими условиями для образования протопластов из бактериальных штаммов *Bacillus cereus* GP-7 и *Bacillus anthracis* 34F2 являются: среда Алфолди, концентрация лизоцима 1 мг/мл; время инкубирования с лизоцимом 1 час при 37°C. В этих условиях образование протопластов достигает 99,5 - 99,9% и процент их реверсии составляет 6,5%.

В дальнейших исследованиях необходимо было выяснить возможность межвидового слияния протопластов штаммов *Bacillus anthracis* и *Bacillus cereus*. В качестве одного из родителей использовали вакцинный сибиреязвенный штамм 34F2. Другим родителем был выбран штамм *Bacillus cereus* GP-7.

Помимо устойчивости к антибиотикам, эти бактериальные культуры имеют следующие свойства.

Штамм 34F2 обладает биологическими свойствами, характерными для штамма возбудителя сибирской язвы: типичным ростом на МПА и в МПБ, клетки его неподвижны, соединены в цепочки, чувствителен к сибиреязвенным бактериофагам «К-ВИЭВ» и (-МВА, не лизирует эритроциты барана, не обладает способностью к росту при 45°C.

Штамм *Bacillus cereus* GP-7 способен расти при 45°C, клетки его подвижны и не соединены в цепочки, гемолитически активен и не чувствителен к сибиреязвенным бактериофагам. Штамм не содержит термостабильных антигенов, характерных для *Bacillus anthracis*.

Вышеперечисленные свойства являлись маркерами, по которым определялась эффективность появления межвидовых рекомбинантных штаммов.

Метод слияния протопластов, детально описанный выше, заключается в следующем: равные объемы суспензии протопластов, полученных по вышеуказанному методу, смешивали и обрабатывали 40% полиэтиленгликолем с молекулярным весом 6000 (ПЭГ-6000), приготовленным на гипертонической среде СММ, содержащей двойные количества сахарозы и хлористого магния. Обработку ПЭГом проводили при комнатной температуре в течение короткого промежутка времени (1-2 минуты), так как адгезия протопластов происходит почти мгновенно, а увеличение времени инкубации свыше 20 минут негативно сказывается на последующем выходе рекомбинантного потомства.

После экспозиции суспензию с ПЭГом разбавляли гипертонической средой СММ, содержащей сахарозу, малеиновую кислоту, хлористый магний, Penassay бульон и центрифугировали в режиме -10 минут при 2600 q. Следует отметить, что этап центрифугирования в данном случае благоприятно сказывался на конечных результатах слияния протопластов. Затем протопласты переводили в небольшой объем гипертонической среды (СММ) и инкубировали 1,5-2 часа при 37°C до завершения этапа слияния.

После этого высевали бациллярную взвесь на селективные среды с антибиотиками. На рис. 21 представлены слияние и в последующий обмен генетической информацией протопластов *Bacillus cereus* и *Bacillus anthracis*.

Реверсию протопластов в исходные бактериальные формы осуществляли инкубацией их в жидкой среде СММ и на твердых регенерационных средах.

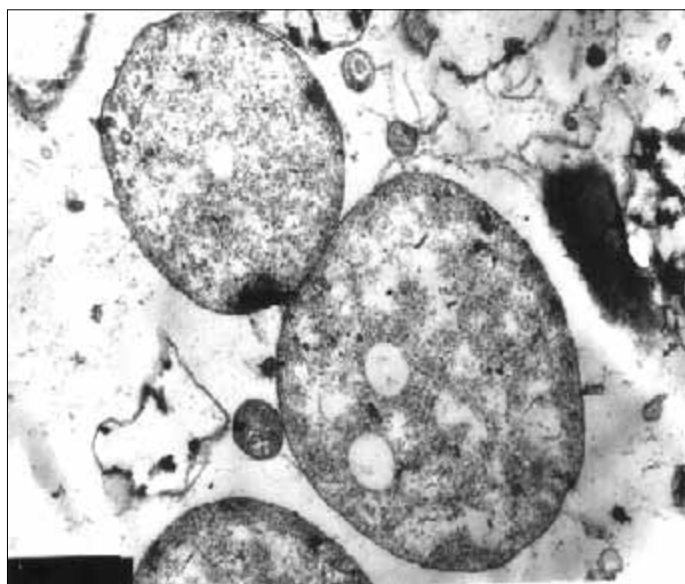
Селекцию гибридных колоний проводили 2-мя способами:

1 - прямая селекция - смесь протопластов обоих родителей после обработки ПЭГом высевали на чашки Петри с регенерационной средой, содержащей антибиотиками - стрептомицин и тетрациклин.

2 - непрямая селекция - смесь протопластов высевали на регенерационную среду без антибиотиков, инкубировали при 37°C в течение 16-18 часов и после реверсии пересеивали на МПА с антибиотиками для отбора рекомбинантных клонов.

Методом прямой селекции не удалось получить рекомбинантные клоны.

С помощью метода непрямой селекции были получены рекомбинанты, которые после реверсии на твердой регенерационной среде и пересева на МПА, содержащий смесь 2-х антибиотиков, образовывали колонии через 24 часа культивирования при 37 С.



Рекомбинантные клоны, полученные методом непрямой селекции, устойчивы к 2-м антибиотикам - стрептомицину (1000 мкг/мл) и тетрациклину (150 мкг/мл). Культуральные, морфологиче-

Рис. 21. Слияние протопластов *Bacillus cereus* и *Bacillus anthracis*. Увеличение 30000.

ские, биохимические и антигенные свойства всех рекомбинантов исследовали с использованием 11 тестов, принятых для идентификации и дифференциации штаммов *Bacillus anthracis* от штаммов *Bacillus cereus* (Архипова, Лягоскин, 2011).

Полученные нами рекомбинантные клоны по культурально-морфологическим и биохимическим свойствам можно разделить на 3 группы.

К 1-й группе были отнесены рекомбинанты, имеющие сходные культуральные, морфологические и некоторые биохимические свойства с исходным штаммом *Bacillus cereus* GP-7 (характер роста на МПА и в МПБ, морфология клеток и их подвижность, способность к росту при 45°C.)

Для рекомбинантов 2-й группы характерна способность к росту при 45°C и наличие как подвижных одиночных клеток, так и неподвижных, соединенных в длинные цепочки,

Рекомбинанты 3-й группы характеризовались отсутствием подвижности, по морфологии клеток они обнаруживали сходство с исходным штаммом *Bacillus anthracis*, но обладали способностью к росту при 45°C, характерной для *Bacillus cereus*.

Рекомбинанты всех 3-х групп имели более низкую гемолитическую активность по сравнению с исходным штаммом *Bacillus cereus* и были не чувствительны к сибиреязвенным фагам. При исследовании их иммуноферментным методом с использованием сибиреязвенных диагностикумов, разработанных во ВНИИВ-ВиМ, установлено отсутствие антигенных структур, характерных для *Bacillus anthracis* (Николайчук и др., 1998а).

Таким образом, путем слияния протопластов штаммов *Bacillus anthracis* 34F2, устойчивых к стрептомицину (1000 мкг/мл) и *Bacillus cereus* GP-7, устойчивых к тетрациклину (150 мкг/мл), получены рекомбинантные клоны, устойчивые к 2-м антибиотикам - стрептомицину (1000 мкг/мл) и тетрациклину (150 мкг/мл). Они имеют большое сходство по биологическим свойствам с родительским штаммом *Bacillus cereus* GP-7 (характер роста на МПА, способность к росту при 45°C, отсутствие чувствительности к сибиреязвенным фагам, отсутствие антигенных струк-

тур, характерных для *Bacillus anthracis*) и некоторое сходство с исходным штаммом *Bacillus anthracis* по морфологии клеток, отсутствию подвижности и гемолитической активности (Васильев, Архипова, 2006а; Архипова, Лягоскин, 2011).

В результате проведенных исследований доказана возможность получения межвидовых рекомбинантов путем слияния протопластов *Bacillus anthracis* и *Bacillus cereus*. Рекомбинантные клоны имели свойства обоих родителей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проблема контаминации пищевых продуктов патогенной и условно патогенной микрофлорой за последние полтора десятилетия приобретает лавинообразный характер. Появляются новые патогены (возбудитель кишечного иерсиниоза), или известные инфекционные агенты проявляют новые свойства (листерии, кампилобактерии).

Появилось много исследований, посвященных выявлению спорообразующих бактерий в пищевых продуктах. Так, В.А. Мирзоева (1959) подчеркивает существенную роль *Bacillus subtilis* и *Bacillus mesentericus* в порче молочных продуктов, кондитерских изделия, сахарных сиропов, консервов, зерновых, хлебных и других продуктов. Л.Н. Петрова (1975) приводит подробные данные о дифференциации спорообразующих аэробных бактерий, выделенных из мясных полукопченостей. С.П. Аскалонов и А.И. Ильченко (1962) обращают внимание на то, что *Bacillus mesentericus* может обсеменять различные пищевые продукты (хлеб, мясо и др.), нередко вызывая их порчу. Н. Berkei и R. Hodlok (1976) выделяли спорообразующие бактерии из вареных колбас. По данным S.Noriyasu и соавторов (1998), изучение более 100 образцов пастеризованной ветчины показало, что в 21% проб обнаруживаются бактерии рода *Bacillus*, наиболее распространенными являлись *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus brevis*. При исследовании более 200 партий фарша Е.Н. Динчева (1970) установила, что общее количество бактерий колебалось в пределах 106-1010 клеток/г. После хранения фарша при температуре 4 °С в течение 48 часов коли-

чество бактерий увеличиваются в два - восемь раз. В сообщении С. Klug и соавторов (1998) приводятся данные о наличии спорообразующих аэробных бактерий в некоторых партиях колбас различных сортов. Авторы высказывают мнение, что причиной обсеменения колбас являются добавляемые специи. Бактериологическое исследование более 100 проб различных специй (лавровый лист, перец, корица, сухой чеснок, сухая горчица) показало, что спорообразующие аэробные бактерии более чем в половине случаев обнаруживаются в количестве до 8500 бактерий на 1 г пробы.

Таким образом, спорообразующие аэробные бактерии достаточно часто обнаруживаются в различных пищевых продуктах, в том числе в употребляемых в пищу без термической обработки. Ряд авторов обращает внимание на встречаемость в пищевых продуктах токсигенных культур этой группы, наличие у них факторов патогенности.

По нашим данным, 80% специй, используемых для производства мясопродуктов, содержат бактерии *Bacillus cereus*, длительное время не теряющие своих свойств при хранении специй. Результаты наших исследований показали, что хранение специй при комнатной температуре в течение 17 лет не повлияло на жизнеспособность бацилл.

Идентификация и дифференциация *Bacillus anthracis* от *Bacillus cereus* до сих пор является сложной задачей. Некоторые бактериологи считают тест на щелочную фосфатазу одним из наиболее достоверных для отличия *Bacillus anthracis* от *Bacillus cereus* (Груз, 1965; Ivanovics, Fuldes, 1958). Но в исследованиях других авторов этот признак обнаруживался нерегулярно (Хвацева, 1978; Шуляк, 1956; Seidel, 1963). Однако в наших экспериментах данный метод проявлял завидное постоянство, и все выделенные нами штаммы *Bacillus cereus* мы типировали, отталкиваясь от теста с щелочной фосфатазой, что подтверждает достоверность результатов Е.В. Груз (1965).

Идентификация *Bacillus anthracis* по антигенным комплексам также проблематична, так как этот микроб имеет детерминанты,

сходные с антигенами родственных бацилл. Так, иммунохимическими и электрофоретическими исследованиями в клетках *Bacillus anthracis* и близкородственных сапрофитов выявлено до 20 общих антигенных детерминат. В основном это полипептиды с молекулярной массой 10-220 кДа, быстро мигрирующие в электрическом поле агарозы.

Высокая контаминация пищевых продуктов спорами *Bacillus cereus* привела к необходимости разработки надежного метода их обнаружения. При термической обработке споры бацилл не погибают, тогда как вегетативные формы бактерий не выдерживают этого режима. Поэтому повышение эффективности метода перевода споровой формы *Bacillus cereus* в вегетативную с целью последующей инактивации термическим воздействием является актуальным. Известно, что тепловое воздействие при 66-70°C в течение 30 минут стимулирует прорастание спор, а добавление в питательную среду аминокислот приводит к ускорению их вегетации. Разработанная нами схема перевода споровых форм бацилл в вегетативные с добавлением в питательную среду L-аланина и L-тирозина оказалась более эффективной, чем предложенная N. Roth, D. Lively, H. Hodge (1954), A. Ferntlius(1960).

Слияние протопластов разных видов бактерий используют для получения гибридных клеток с заданными свойствами. Нами разработан метод получения протопластов штаммов *Bacillus cereus* GP-7 и *Bacillus anthracis* -34F2 и показана возможность их последующей реверсии в исходные бактериальные формы. Метод состоит из следующих этапов:

- Выращивание клеток бактерий в жидкой питательной среде (ДМ-3) до середины логарифмической фазы роста с применением шуттель-аппарата;
- Использование гипертонической среды Алфолди для образования протопластов;
- Обработка бактериальной суспензии лизоцимом в концентрации 1-2 мг/мл и инкубация их в течение 1 часа при 37 С;

– Контроль образования протопластов с помощью фазово-контрастной микроскопии.

При использовании этой схемы образование протопластов достигает 99,5 - 99,9% и процент их реверсии составляет 6,5%.

Путем слияния протопластов штаммов *Bacillus anthracis* 34F2, устойчивых к стрептомицину (1000 мкг/мл), и *Bacillus cereus* GP-7, устойчивых к тетрациклину (150 мкг/мл), нами получены рекомбинантные клоны, устойчивые одновременно к 2-м антибиотикам - стрептомицину (1000 мкг/мл) и тетрациклину (150 мкг/мл). Они имеют большое сходство по биологическим свойствам с родительским штаммом *Bacillus cereus* GP-7 (характер роста на МПА, способность к росту при 45°C, отсутствие чувствительности к сибиреязвенным фагам, отсутствие антигенных структур, характерных для *Bacillus anthracis*) и некоторое сходство с исходным штаммом *Bacillus anthracis* по морфологии клеток, отсутствию подвижности и гемолитической активности.

В результате проведенных исследований доказана возможность получения межвидовых рекомбинантов, имеющих свойства обоих родителей, путем слияния протопластов *Bacillus anthracis* и *Bacillus cereus*.

По результатам наших исследований можно сделать выводы, подтверждающие наше предположение о том, что бактерии вида *Bacillus cereus* представляют серьезную угрозу для здоровья человека:

1. До 80% видов специй контаминированы бактериями *Bacillus cereus*.

2. После 17-летнего хранения при комнатной температуре споры *Bacillus cereus* сохранили свою жизнеспособность и биологические свойства, характерные для данного вида.

3. Показана возможность получения межвидовых рекомбинантов путем слияния протопластов штаммов *Bacillus cereus* и *Bacillus anthracis*, сходных по биологическим свойствам с родительскими штаммами *Bacillus cereus* GP-7 и *Bacillus anthracis* 34F2.

Неисключена возможность спонтанного появления межвидовых рекомбинантов со свойствами *Bacillus anthracis* и сапрофитных бацилл других видов, получивших признаки вирулентности от возбудителя сибирской язвы и морфологические и культуральные свойства от сапрофитных бацилл, что значительно осложнит диагностику и идентификацию возбудителей болезней животных и человека.

СПИСОК ОСНОВНОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Асколонов С.П., Ильченко А.И. Пищевые заболевания, вызываемые спорообразующими бактериями *Bacillus subtilis* и *Bacillus mesentericus*. В кн.: Вопросы питания. – Киев: Госмедиздат УССР. – 1962. – С. 226-229.
2. Африкан Э.К. Энтомопатогенные бактерии и их значение. – Ереван: Изд-во АН АрмССР. – 1973. – С.418.
3. Бойков Ю.И. Выделение *Bacillus anthracis* из почвы // Труды ВНИИВС. – 1967. – Т. 25. – С. 16-21.
4. Буравцева Н.П., Лопаткин О.Н. Достижения и перспективы борьбы с сибирской язвой в СССР // Матер. X Пленарного заседания междуведомственной комиссии по борьбе с сибирской язвой. – М., 1983. – С. 105-107.
5. Бургасов П.Н., Рожков Г.И. Сибиреязвенная инфекция. – М.: Медицина. – 1984. – С. 206.
6. Гаврилов В.А. Иммуногенетические аспекты разработки
7. противосибиреязвенных вакцин // Ветеринария. – 1987. – № 10. – С. 27-29.
8. Гинсбург Н.Н. Антрацис. – Кишинев. – 1964.
9. Гинсбург Н.Н. Сибирская язва. – М. – 1975. – С.157.
10. Григорьева Т.М., Азубекян Р.Р. Конъюгационная передача плазмиды рАМ β 1 *Bac. anthracis* // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 1980. – № 4. – С. 19-24.
11. Груз Е.В. Изучение и рационализация некоторых лабораторных методов индикации и идентификации *Bac. anthracis*. // Автореф. дис. канд. мед. наук. – Одесса. – 1965. – 19 с.
12. Динчева Е.Н. Микробиологическое изучение мясного фарша. // Науч. тр. Высш. ветеринарно-мед. ин-та. – 1970. – Т.22. – С. 139-146.
13. Езепчук Ю.В. Патогенность как функция биомолекул. – М., 1985. – С. 238.
14. 12. Езепчук Ю.В., Битцаева А.Р. Структурное сходство токсинов *Bacillus cereus* и *Bacillus anthracis*. – М., 1990. – С. 26.
15. 13. Васильев Д.А., Архипова Г.Ф. Образование протопластов у бацилл и изучение возможности их реверсии // Материалы международной конференции «Зооантропонозы» Ульяновская ГСХА. Ульяновск. 2006..
16. 14. Васильев Д.А., Архипова Г.Ф. Разработка метода получения гибридных штаммов бацилл // Материалы международной конференции «Зооантропонозы Ульяновская ГСХА. Ульяновск. 2006.
17. 14. Временное наставление по применению сибиреязвенного бактериофага «К» ВИЭВ для определения возбудителя сибирской язвы. – М., 1986. – С. 17-27
18. Заварзин Г.А. Фенотипическая систематика бактерий: Пространство логических возможностей. – М.: Наука, 1974. – С. 137.
19. Иванова Е.В. Получение протопластов и мембранных структур *Bacillus anthracis* // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. – 1983. - № 10. – С. 104.
20. Ильина Т.К., Негру-Водэ В.В., Миллер Ю.М. и др. Химизм энергетического процесса восстановления нитрата у различных представителей почвенной микрофлоры. // Микробиология. – 1977. – В.46. – № 6. – С. 1034-1036.
21. Инструкция и методические указания по лабораторной, клинической диагностике, профилактике и лечению сибирской язвы у людей. – М., 1982. – 61 с.
22. Ипатенко Н.Г. Лабораторные методы исследований при
23. сибирской язве. // Ветеринария. – 1983. – № 7. – С. 74-75.
24. Ипатенко Н.Г., Седов В.А., Зелепукин В.С. и др. Сибирская язва сельскохозяйственных животных. – М., 1987. – 256 с.
25. Калашник М.М., Дунаев Г.В. Вопросы эффективности противосибиреязвенных мероприятий // Матер. IX Пленар. засед. междуведомственной комиссии по борьбе с сибирской язвой. – М., 1974. – С.136-137.
26. Колесова С.Г. Сибирская язва. – М., 1976. – 288 с.
27. Коляков Я.Е. Ветеринарная микробиология. – М., 1960. – В.4. – С. 15-19.
28. Коляков Я.Е., Мелихов А.Д. Назв статьи // Ветеринария. – 1960. - № 3. – С. 81-84.
29. Коротич А.С., Погребняк Л.И. Сибирская язва. – Киев, 1976. – С.157.

30. Костенко Ю.Г., Степаненко П.П., Любашенко С.Я. и др. Изучение остаточной аэробной мезофильной микрофлоры в пастеризованных консервах «Шейка ветчинная». // Тр. ВНИИ мясо-молоч. пром-сти. – 1978. – № 41. – С. 28-29.
31. Костюкова Т.А., Дроздов И.Г., Еремин С.А., Ежов И.Н., Анисимов П.И. Получение протопластов сибиреязвенного микроба и использование их в слиянии. // Сб. генетика, микробиология и совер. методов лаб. д-ки особо опасн. инфекций. – Саратов, 1991. – С. 37-46.
32. Красильников Н.А. Определитель бактерий и актиномицетов. – М.-Л., Изд-во АН СССР. – 1949.
33. Левина Е.Н., Гольдин Р.Б., Носков Ф.С. и др. Люминесцирующие антитела (в изучении патогенных микроорганизмов). – М., 1972. – 144 с.
34. Методические указания по лабораторной диагностике сибирской язвы. // Лаб. исследования в ветеринарии. – М., 1986. – С. 5-9.
35. Методические указания по проведению обязательного минимума исследований в ветеринарных лабораториях при диагностике болезней животных // Ветеринарное законодательство. – М., 1972. – Т.2. – С. 181-182.
36. Мирзоева В.А. Бактерия группы сенной и картофельной палочек – М.: Изд-во АН СССР, 1959. – 176 с.
37. Николайчук Л.Ф., Бакулов И.А., Котляров В.М., Бударкова Э.Л. Индикация возбудителя сибирской язвы в объектах внешней среды и кормах иммуноферментным методом // Матер. междунар. конф. «Диагностика, профилактика и меры борьбы с особо опасными и экзотическими болезнями животных». – Покров, 1998. С. 327-328.
38. Николайчук Л.Ф., Бакулов И.А., Котляров В.М., Вишняков И.Ф., Гаврилов В.А. Идентификация возбудителя сибирской язвы кормах иммуноферментным методом // Матер. междунар. конф. «Диагностика, профилактика и меры борьбы с особо опасными и экзотическими болезнями животных». – Покров, 1998а. С. 3279-330.
39. Орловский В.И., Бочков И.А. Развитие микрофлоры в желудочно-кишечном тракте морских свинок // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунол. – 1973. – № 8. – С. 141-142.
40. Петрова Л.Н. Дифференциране на культуры от род *Bacillus* изолирани от местных полуконсервов. // Ветеринарно-мед. науки. – 1975. – № 8. – С. 12.
41. Полховский В.А. Нуклеотидный состав ДНК аэробных спорообразующих бактерий. В кн.: Вопросы инфекционной и неинфекционной патологии. – Ташкент. – 1975. – С. 183-185.
42. Раутенштейн Я.И., Талалаева Д.Г., Блохина Т.П. и др. О применении специфических фагов для дифференциации энтомопатогенных бактерий, относящихся к *Vac.thuringiensis*. // Микробиология. – 1975. – 44. – № 6. – С. 1081-1085.
43. Рево М.В., Дунаев Г.В., Новиков В.М. До питания про принцип содержания обациллярного закисного фактора против сибирки. // Ветеринария. – Киев. – 1964. – В.2. – С. 47-49.
44. Резник С.Р., Сорокулова И.Б., Качан А.Ф. Дополнительный подход к дифференциации спорных бактерий *Vac. subtilis* и *Vac. segeus*. // Микробиол. журн. – 1978. – 40. – № 4. – С. 448-453.
45. Рябченко Н.Ф., Буканов Н.О., Саканян В.А., Алиханян С.И. Трансформация протопластов *Vac. thuriengiensis* плазмидной ДНК рBC-16. // ДАН СССР. – 1980. – 253. – № 3. – С. 729-732.
46. Тарасова Т.Д., Шелохович А.И., Липницкий А.В. К вопросу о получении протопластов сибиреязвенного микроба. // Лаб. диагн. и генет. вирулентности возбудителей особо опасн. инфекций. – Всес. н.-и. противочум. ин-т – Микроб. – Саратов, 1990. – С. 138-141.
47. Терентьев Ф.А. Морфологическая изменчивость сибирской язвы. // Труды науч. конф. – Киев, Изд. Акад. Наук УССР. – 1939.
48. Топчий М.П. Применение препаратов из живых культур сенной палочки при дисбактериозах у телят: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. – Минск, 1979. – 21 с.
49. Турова Т.П., Бакалдина Н.Б. Физиология и молекулярная биология болезнетворных микроорганизмов // Сб. науч. тр. – Горький, 1988. – С. 4-8.
50. Франек Ю., Кубин В. Назв статьи // Журн. гиг., эпидемиол., микробиол. и иммунол. – Прага, 1967. - № 11. – В.3. – С. 285-289.
51. Хмель И.А. Протопласты и эволюция микроорганизмов. // Успехи современной биологии. – 1985. – 99. – № 3. – С. 323.
52. Ценин А.Н., Рыбчик В.Н. Получение рекомбинантов при смешивании протопластов *E.coli*. В кн. XIV Международный генетич. конгресс. – М., Наука. – 1983. – С. 241.
53. Цыганкова О.И. Гемолитическая и протеолитическая активность сибиреязвенного микроба. Дис. канд. мед. наук. – Саратов, 1993. – 179 с.
54. Черкасский Б.Л., Кноп А.Г., Керимова Д.Д. и др. Достижения и перспективы борьбы с сибирской язвой в СССР // Матер. X пленар. засед. межведомственной комиссии по борьбе с сибирской язвой. – М., 1978. – С. 95-97.
55. Чернов В.С. Основные этапы слияния протопластов патогенных бацилл. / В сб.: Мол. биол., генетика и иммунология возбудителей особо опасных инфекций. Тез. докл., представленных на Всес. науч. конф. по актуальным вопросам молек. биол., генетики и иммунологии возбуд. особо опасн. инфекций. – Ростов-на-Дону, 1984. – С. 69-71.

56. Чернов В.С., Малецкая О.В., Лопаткин О.Н. и др. Изучение синтеза протективного антигена у штаммов рекомбинантов, полученных путем слияния протопластов *Bac.anthraxis* и *Bac. cereus*. В кн.: Особо опасные инфекции на Кавказе. Тезисы докладов к 6 краевой науч. практ. конф. – Ставрополь, 1987. – Ч.II. – С. 142.
57. Шляхов Э.Н., Груз Е.В., Прискарь В.И. Сибирская язва (очерки эпидемиологии, лабораторной диагностики и профилактики). – Кишинев, 1975. – С. 162.
58. Шуляк Ф.С. Тр. Моск. вет.акад. – М., 1956. – Т.12. – С. 116-122.
59. Afiti S., Muller J. Fluorescence bacterioscopy, a direct method for bacteriological food analysis. // *Nahrung*, 1975. – V.19. – N 7. – P.557-567.
60. Barjac H. de, Bonnefoi A. Mise au point sur la classification des *Bacillus thuringiensis*. – *Entomophaga*, 1973. – V.18. – N 1. – P.5-17.
61. Barjac H., Cosmao-Dumanoir V. Interet de certains criteres biochemiques supplementaires pour la classification des souches de *Bacillus*. – *Ann. Microbiol.*, 1975. – V. 126. – N 1. – P.83-95.
62. Battisti L., Green B.D., Thorne C.B. Mating system for transfer of plasmids among *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. // *J. Bacteriol.* – 1985. – V.162. – № 2. – P.543-550.
63. Bergey's manual of determinative bacteriology. – 8th ed. – Baltimore: Williams and Wilkins Co. 1974. – 1258 p.
64. Berkei H., Hadlok R. Lecithinase und Toxinbildung durch Stamme der Gattung *Bacillus*. // *Lebensm. itelhygiene*, 1976. – V.27. – N 2. – S.63-65.
65. Boeye A., Aerts M. Numerical taxonomy of *Bacillus* isolates from North Sea sediments. // *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1976. – 26. – N 4. – P.427-441.
66. Bonde G.J. The genus *Bacillus*. An experiment with cluster analysis. // *Dan. Med. Bull.*, 1975. – V.22. – N 2. – P.41-61.
67. Bonventre P.F., Eckert N.J. // *Amer. J. Pathol.* – 1963. – V.43. - № 2. – P.210-212.
68. Brown E.R., Cherry W.B. Specific identification of *Bacillus anthracis* by mean of a variant bacteriophage. // *J. infect. Dis.* – 1955. – V.96. – № 1. – P.34-39.
69. Brown E.R., Cherry W.B., Moody M.D., Gordon M.A. Назв статьи // *J.Bact.* – 1955. – V.69. - № 5. – P.590-602.
70. Candel A., Mastrandrea V., Cenci G., Bartolomeo A. Sensitivity to lytic agents and DNA base composition of several aerobic spore-bearing bacilli. // *Zbl. Bacteriol. Parasitenk., Infektionskrankh. und Hyg., Abt. 2*, 1978. – V.133. – N 3. – S.250-260.
71. Chan Kwong-Yu, Ko Kwai-Ming. Inhibitory effect and differentiating capacities of selected dyes on bacteria. – *Geobios*, 1978. – V.5. – N 6. – P.241-250.
72. Chang S., Choен S.N. Sligh frequency transformation of *B. subtilis* protoplasts by plasmid DNA // *Mol. gen Genet*, 1979. – V.168. – P.111-115.
73. Chatterjee B.R. Formation of spheroplasts from *B.anthraxis* // *J. Bacteriol.*, 1965. – P. 894.
74. Chatterjee B.R., Williams R.P. Formation of spheroplasts from *Bacillus anthracis*. // *J. Bacteriol.* – 1965. – V.89, № 4. – P.1128-1133.
75. Clark I.E. // *J. Bact.*, 1937. – V.33 – P.435.
76. Clark R. Speculations on the incidence of anthrax in bovines.// *J.S. Afr. vet. med. Assoc.* – 1938. – V.9. – P.5-12.
77. Costlow R.D., Radziwon T.S. Studies on the lysis and formation of protoplasts. // *Bact. proc.* – 1961. – P.83.
78. Dominici S., Sarris K., Morozzi A., Cadaras P. Identificazion rapida del *B. cereus* mediante immunofluoreszenza. // *Atti. Soc. ital. sci. vet.*, 1972. – V.25. – P.418-421.
79. Durand M., Pichinoty F., Job C., Mandel M. Nutrition carbonnee et etude taxonomique de *Bacillus subtilis* et *B. licheniformis*. // *Can. J. Microbiol.*, 1979. – V.24. – N 4. – P.491-498.
80. Ezzell J.W., Abshire T.G., Little S.F. e.a.// *J. Clin. Microbiol.* – 1990. – V.28. - № 2. – P.223-231.
81. Fodor K., Alföldi L. Fusion of protoplast of *B.megaterium* // *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 1976. – V.73. – P.2147-2150.
82. Foldes S., Meretey K. Protoplast production induced by penicillin from the cells of *B.cereus* and *B.anthraxis*. // *Acta microbiol.*, 1960. –V.7. – N 1. – P.43-49.
83. Gaiginschi A., Timosca S., Burcoveanu C., Alexandresco M., Radu E., Petreanu V., Saicinc C. Formes "L" du *Bacillus anthracis* obtenus sous e' action de la trichloriode-pyridine. – *Arch. Roum. Pathol. Experim. Microb.* – 1964. – V.23, № 3. – P.545-554.
84. Gibson T., Gordon R.F. Genus *Bacillus* «Bergeyis manual of determinative bacteriology». // Baltimore, 1974. – P.529-550.
85. Gordon R. The genus *Bacillus*. // In: *Handb. Microbiol.* Cleveland (Ohio), 1973. – V.1. – P.71-88..
86. Green B.D. Mobilization of the *Bacillus anthracis* plasmids pX01 and pX02 by the *Bacillus thuringiensis* fertility plasmid pX012. – *Diss. Abstr. Internat.* – B.1988. – V.49, № 5. – P.1523-B.
87. Green B.D., Battisti L., Thorne C.B. Involvement of Tn 4430 in transfer of *Bacillus anthracis* plasmids mediated by *Bacillus thuringiensis* plasmid p X012. – *J. Bacteriol.* – 1989. – V.171, № 1. – P.104-113.
88. Hotchkiss R.D. Parameters governing bacterial regeneration and genetic recombination after fusion of *B.subt.* protoplasts. // *J.Bacter.*, 1978. – V.137. – P.1346.
89. Ivanovics G. Unter welchen Bedingungen werden bei der Nahrboodenzuchtung der Milzbrandbazillen Kapseln gebildet? // *Zbl. Bakteriol. 1. Orig.* 1937. – Bd. 138. – № 7/8. – S.449-455
90. Jejnes M. The growth and develops of bacterial protoplasts. // *Exp. Cell. Res.*, 1961. – V.4. – P.255-264.

91. Jensen J. Eine einfache "morphologische", streptomycin bestimmungsmethode mit milzbrandsporen. // *Klin. Wschr.* 1951. – Bd. 29. – S.519.
92. Jensen J., Kleemeyer H. // *Zbl. Bacteriol. I. Orig.* – 1953. – B.159. – H.8. – S.494-600.
93. Jonescu C. Identification of *Bacillus subtilis* from milk. // *Microbiologia, Parasitologia, Epidemiologia*, 1966. – V.11. – N 5. – P.322-325.
94. Katsaras K. Untersuchungen uber saurelosliche Antigene an verschiedenen Stammen der Gattung *Bacillus*. // Berlin und Munchen. tierartzl. Wochenschr., 1979. – V.92. – N 12. – S.243-247.
95. Knisely R.F. // *J. Bact.* – 1966. – V.92. - № 3. – P.784-786.
96. Kundrat W. Zur Differenzierung aerober sporenbildner (Genus *Bacillus* Cohn). – *Zbl. Veterinarmed*, 1963. – B.10. – N 5. – S.418-426.
97. Lachowski E., Krzyzanowski S., Wawrzekiewiczowa K. // *Med. Wet.* – 1963. – V.19. - № 8. – P.447-453.
98. Leise J.M., Carter C.H., Friedlander H.M., Freed S.W. // *J. Bact.* – 1959. – V.77. - № 5. – P.655-660.
99. Lemille F., Barjac H., Bonnefoi A. Essai sur la classification biochimique de 97 *Bacillus* du groupe I. – *Ann. Inst. Past.*, 1969. – V.116. – N 6. – P.808-819.
100. Levi C., Sanchez-Rivas C. Genetic studies on the fusion of bacterial protoplasts. // *Microbiol.*, 1977. – V.2. – P.233-236.
101. Lott G. Taxonomie und Bedeutung psychrotropher Keime. // *Arch. Lebensmittelhyg.*, 1972. – 23. – N 12. – S.265-268.
102. Mastroeni P., Nacci A., Misefari A. Immuno-electrophoretic analysis of surface antigens in vegetative cells and spores of *Bacillus cereus*. // *G. bacteriol., virol. et immunol.*, 1974. – V.67. – N 7-12. – P.180-184.
103. Mc Donald. // *J. Bact.*, 1963. – V.84. – P.1071.
104. McDonald J.C. The isolation of pulcherriminic acid from *Bacillus cereus*. // *Canad. J. Microbiol.*, 1967. – V.13. – N 1. – P.17.
105. Mc Quillen. Bacterial protoplasts. // *The Bacteria*, Acad. Press Inc. New York, 1960. – V.1. – P.283.
106. Michel G., Brouilland I., Poulet P. // *Bull. Acad. Vet. France.* – 1972. – V.45. - № 8. – P.391-399.
107. Michael C., Brouillaum J., Poulter P., e.a. Diagnostic differential entre *Bacteridi* um anthracis et *Bacillus cereus* par immunodiffusion. // *Bull. Intern. Epizoot.* 1973. – V.79. – № 3/4. – P.289-296.
108. Michel C., Poussot A., Chabassol C. et.al. Diagnostic bacteriologique rapide de *Bacteridium anthracis* par immunofluorescence. - *Bull. Acad. Vet. France*, 1973. – V.46. – № 8. – P.333-342.
109. Mikhailova L. Morphological and functional changes of *B.anthraxis* under the action of capsaicin and piperine. // I. Action of coasaicin and piperin on the reproductive activity, morphological and cultural properties of *B.anthraxis*. – *Jzv. Mikrobiol. Just., Bulg. Akad. Nauk.* – 1970. - № 21. – C.277-289.
110. Morris E.J. // *J. gen. Microbiol.* – 1955. – V.13. - № 3. – P.456-460.
111. Mazas M., Gonzalez J., Sarmiento Roberto M. // *Int. J. Food Sci and Technol.* – 1995. – V.30. – N 1. – P.71-78.
112. Nordberg B.K. Continued investigations of some important characteristics in anthrax-like microorganisms as viewed from a point of view of Differential diagnosis. *Nord. Vet.Med.* 1953. – Bd. 5. – № 11. – S.915-924.
113. Ottow J.C.G. Pectinolytic-, ureolytic- and lecithinolytic activity as a diagnostic aid in the identification of species classified in the genus *Bacillus cohn*. // *Zbl. Bakteriol. Parasitenk., Infektionskrankh. und Hyg.*, 1972, Abt.2. – 127. – N 4. – P.301-312.
114. Patra G., Sylvestre P., Ramisse V. e.a. // *Proceedings of the International Workshop on Anthrax*. Winchester. England. Ed. P.C.B. Turnbull. Salisbury Medical Bulletin. Special Supplement – 1996. - № 87. – P.45-46.
115. Ramisse V., Patra G., Vande-Lanthier V. e.a. // *Proceedings of the International Workshop on Anthrax*. Winchester. England. Ed. P.C.B. Turnbull. Salisbury Medical Bulletin. Special Supplement – 1996. - № 87. – P.51.
116. Reddy A., Battisti L., Thorne C.B. Identification of celltransmissible plasmids in four *Bacillus thuringiensis* subspecies. – *Abstr. Annu. Meet., Washington, D.C.*, 23-28 March, 1986. Washington, D.C., 1986. – P.149.
117. Reddy A., Battisti L., Thorne C.B. Identification of celltransmissible plasmids in four *Bacillus thuringiensis* subspecies. // *J. Bacteriol.* – 1987. – V.169, № 11. – P.5263-5270.
118. Ruhfel R.E., Robillard N.J., Thorne C.B. Interspecies transduction of plasmids, among *Bacillus anthracis*, *B.cereus*, and *B. thuringiensis*. // *J. Bacteriol.* – 1984. – V.157, № 3. – P.708-711. Makino S.-I., Sasakawa C., Uchida I., Teracado N., Yoshikawa M. Transformation of a cloning vector pUB 110 into *Bacillus anthracis*. – *FEMS Microbiol. Lett.* – 1987. – V.44, № 1. – P.45-48.
119. Ruhfel, R.E. Interspecies Transduction of Plasmids among
120. *B.cereus*, *B.anthraxis* and *Bacillus thuringiensis*. – V.157. – № 3. – P.708-711.
121. Ruhfol R.E., Kochler T.M., Green B.D. e.a. Plasmid-Related differences in capsule production by *Bacillus anthracis*. // *Abstr. Anny. Meet. Amer. Soc. Microbiol., Washington.* – 1989. –P.157.
122. Schaeffer P., Hotchkiss R.D. Fusion of bacterial protoplast. // *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1978. – USA. – 73. – P.2151-2155.
123. Seidel G., Strassmann R. // *Arch. Exe. Vet. Med.* – 1956. – B.10. – H.3. – S.325-327.
124. Seidel G. // *Ztsxhr. F. d.g. Hyg u. ihre Grenzgebiete.* – 1963. – Bd.9. – H.9. – S.688-700.

126. Seki T., Chung C.-K., Milami H., Oshima Y. Deoxyribonucleic acid and homology and taxonomy of the genus *Bacillus*. // *Int.J.Syst. Bacteriol.*, 1978. – 28. – N 2. – P.182-189.
127. Seki T., Oshima T., Oshima Y. Taxonomic study of *Bacillus* by deoxyribonucleic acid hybridization and inter-specific transformation. // *Int. J. Bacteriol.*, 1975. – V.95. – N 3. – P.258-280.
128. Smith N.R., Gordon R.E., Clark F.E. *Aerobic sporeforming bacteria*. // Washington: U.S. Dept. Agric. 1952. – P.559.
129. Smith H., Keppie J. // *Brit. J. Exptl. Pathol.*, 1953. – V.34. – № 5. – P.374.
130. Smith H., Tempest D.W. // *J. Gen. Microbiol.*, 1957. – P.17.
131. Smith N.R., Amer. // *J. Pathol.*, 1963. – V.43. – P.201.
132. Somerville H.J., Jones M.L. DNA competition studies within the *Bacillus cereus* group of bacilli. // *J. Gen. Microbiol.*, 1972. – V.73. – N 2. – P.257-265.
133. Stamatin N. // *Arch. Roumaln. Pathol. Exptl. et Microbiol.*, 1960. – V.19. – N 4. – P.493.
134. Titball R.W., Turnbull P.C.B., Hutson R.A. // *J. Appl. Bact. Symp. Suppl.* – 1991. – V.70. – P.9-18.
135. Torsell W., Nordberg B.K. // *Acta Veterin. Scand.* – 1961. – V.2. - № 1. – P.15-21.
136. Weibull C. The isolation of protoplasts from *Bac.megaterium* by controlled treatment with lysozyme. *J. Bacteriol.*, 1953. – V.66. – P.688-695.
137. Williams R.P., Chatte B.R. Preparation of protoplasts in *Bacillus anthracis*. // *Bact. proc.* – 1961. – P.83.
138. Wolf J., Barker A.N. The genus *Bacillus*: aids to the identification of its species. The society for applied Bacteriology technical series N 2. – In.: *Identification methods for microbiologists*. London; New York: Acad. press, 1968. – P. 92-109.
139. Wood H.Y., Stjerholm R.L. Assimilation of carbon dioxide by heterotrophic organisms. *The bacteria: a treatise on structure and function*. New York-London. 1962. – V. 3. – P. 41-43.

СОДЕРЖАНИЕ

| | |
|---|-----|
| Введение | .3 |
| Систематика и идентификация бактерий рода <i>Bacillus</i> | .6 |
| Идентификация бактерий <i>Bacillus anthracis</i> и <i>Bacillus cereus</i> | .17 |
| Изучение биохимических свойств <i>Bacillus cereus</i> | .30 |
| Микроорганизмы рода <i>Bacillus</i> в организме животных | .49 |
| Бактерии рода <i>Bacillus</i> , обнаруживаемые в пищевых продуктах | .51 |
| Получение межвидовых рекомбинантных штаммов рода <i>Bacillus</i> | .61 |
| Заключение | .79 |
| Список основной литературы | .84 |

Васильев Д.А., Архипова Г.Ф., Николайчук Л.Ф.

БАКТЕРИИ *BACILLUS CEREUS*
И МЕЖВИДОВАЯ РЕКОМБИНАЦИЯ
С *BACILLUS ANTHRACIS*
КАК УГРОЗА ЗДОРОВЬЮ ЧЕЛОВЕКА

Художественное оформление и компьютерное обеспечение Василькиной М.Н.

Отпечатано в типографии ООО "Колор-Принт"
г.Ульяновск, ул. Ленина, д.75
тел.: (8422)42-28-45, т/ф 41-82-23
www.color73.ru