

УДК 619:579

**ИЗУЧЕНИЕ БИОХИМИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ
БАКТЕРИЙ ВИДА *BACILLUS CEREBUS*,
ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ
И ОБЪЕКТОВ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ
STUDYING OF BIOCHEMICAL ACTIVITY OF
BACTERIA OF KIND *BACILLUS CEREBUS*,
SECRETED FROM FOODSTUFF AND
OBJECTS OF AN ENVIRONMENT**

Калдыркаев А.И., Юдина М.А.,* Феоктистова
Н.А.,* Васильев Д.А.,* Архипова Г.Ф. ***
*Научно-исследовательский инновационный центр
микробиологии и биотехнологии
ФГОУ ВПО «Ульяновская государственная
сельскохозяйственная академия»**

*ГНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт
ветеринарной вирусологии и микробиологии» ***

*The characteristics of biochemical properties of bacteria of kind *Bacillus cereus*, secreted of objects of environment and foodstuff is given.*

*Дана характеристика биохимических свойств бактерий вида *Bacillus cereus*, выделенных из объектов окружающей среды и пищевых продуктов.*

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).

В основу классификационной схемы W. Kundrat (1963) положен принцип разделения на морфологические группы, а также биохимический принцип разграничения 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 (1993) 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*.

В Ставропольском научно-исследовательском институте вакцин и сывороток для 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, 1983).

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

Известно, что в отличие от близкородственных микробов *Bacillus anthracis* не обладает способностью вырабатывать щелочную 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. 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 сероватоматовые колонии. Для дифференциации сибирезывенного 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).

Целью данной работы было изучение биохимической активности штаммов *Bacillus cereus*.

Материалом для выделения штаммов *Bacillus cereus* служили объекты внешней среды: почва, экскременты животных, навоз, сено, сточные воды; пищевые продукты: молоко, творог, грибы, сыр, пряности и приправы, мясорастительные консервы. Взятие проб для бактериологического исследования и

выделение культур проводилось по общепринятым методикам. Чистые культуры выделенных штаммов изучали на подвижность, окраску по Граму, рост на 75 % желточном агаре и на сибирязевающей среде (г. Ставрополь); исследовали на также ферментацию углеводов, белков. Видовую принадлежность определяли по Берджи (1993).

В процессе исследования было выделено 38 штаммов *Bacillus cereus*. Из них 6 из пряностей и приправ, 6 из молока, 2 из грибов, 1 из картофельного пюре, 1 из творога, 13 из почвы, 4 из навоза, 4 из сточных вод, 3 из сена, у которых изучались морфологические, культуральные и биохимические свойства.

Суточные бульонные культуры представляли собой грамположительные палочки диаметром около 1,5 мк и длиной около 3,5 мк; клетки одиночные или соединенные в короткие цепочки, цитоплазма клеток зернистая, клетки большей частью подвижные, споры овальные. Расположены эксцентрично. Колонии на мясо-пептонном агаре толстые, морщинистые, со складчатым центром и ворсинчатыми краями. На мясо-пептонном бульоне через 1-2 суток появлялись помутнения и, как правило, пристенное кольцо с последующим образованием крошковидной мути и пленки на поверхности среды. Хорошо разжижали желатину (полное разжижение наступало на 3-и сутки) – 100 % выделенных штаммов.

Определение сахаролитической активности проводилось по общепринятой методике (с использованием сред Гисса: концентрация углеводов 1 %, индикатор Андредда). Наиболее интенсивно штаммы *Bacillus cereus* ферментировали из углеводов сахарозу и глюкозу – 95 %. Лактозу, маннит, сорбит разлагали только 2 штамма, выделенные из пряностей и почвы. Полученные данные значительно разнятся с данными Полховского (1968). Но рост питательной среде Ставропольского научно-исследовательского института вакцин и сывороток для выделения и одновременной дифференциации возбудителя сибирской язвы с добавлением 10% водного раствора аммиака (образование малиновой окраски колоний), доказывает, что выделенные бациллы вырабатывают щелочную фосфатазу, которая разлагает фенолфталеинфосфат натрия с образованием индикатора фенолфталеина.

Сероводород не образовывал ни один выделенный штамм.

При изучении лецитиназной и гемолитической активности были получены 100 % положительные результаты.

Также у всех выделенных штаммов наличествует каталаза.

Исследования на наличие уреазы дали в 95 % случаев положительный результат.

Штаммы бактерий вида *Bacillus cereus*, выделенные из различных природных источников, характеризовались выраженными биохимическими свойствами. Наиболее постоянными являлись:

- подвижность,
- лецитиназная активность,
- гемолитическая активность,
- наличие каталазы,
- выработка щелочной фосфатазы,
- ферментация сахарозы,
- ферментация глюкозы,
- наличие уреазы,

- разжижение желатина,
- отсутствие ферментации маннита, лактозы, сорбита, адонита, арабинозы.

Однозначной зависимости между источником выделения *Bacillus cereus* и принадлежностью их к определенному биохимическому не наблюдали.

Литература:

1. 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.
2. Груз Е.В. Изучение и рационализация некоторых лабораторных методов индикации и идентификации *Bac.anthraxis*. // Автореф. дис. канд. мед. наук. – Одесса. – 1965. – 19 с.
3. Иванова С.П. // Журн. микробиол. – 1957. - № 1. – С.75-79.
4. Мелихов А.Д. // Сб. науч. тр. Московск. вет.акад. – М., 1957. – Т.19. – В.2. – Ч.1. – С.86-88.
5. Полховский В.А. Биохимические типы *Bacillus cereus*, выделенных из различных природных источников // Журн. микробиол. – 1970. - № 2. – С.82-86.
6. Bergey's manual of determinative bacteriology. – 8th ed. – Baltimore: Williams and Wilkins Co. 1993. – 1258 p.
7. Ivanovics G., Fuldes J. // Acta microbial. Acad. Sci. Hng. – 1958. – V.5. - № 1. – P.89-109.
8. Kundrat W. Zur Differenzierung aerober sporenbildner (Genus Bacillus Cohn). – Zbl. Veterinarmed, 1963. – B.10. – N 5. – S.418-426.
9. Morris E.J. // J. gen. Microbiol. – 1955. – V.13. - № 3. – P.456-460.
10. 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. Bakteriол. Parasitenk., Infektionskrankh. und Hyg., 1972, Abt.2. – 127. – N 4. – P.301-312.
11. Seidel G., Strassmann R. // Arch. Exe. Vet. Med. – 1956. – B.10. – H.3. – S.325-327.

УДК 619:579

РЕЗУЛЬТАТЫ РАЗРАБОТКИ СХЕМЫ ВЫДЕЛЕНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИИ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Шестаков А. Г. Богданов И. И. Васильев Д. А.
Научно-исследовательский инновационный центр
микробиологии и биотехнологии
ФГОУ ВПО «Ульяновская государственная
сельскохозяйственная академия»

Results of working out of the scheme of allocation and identification of bacteria of kind Pseudomonas aeruginosa are described. The presented scheme of allocation allows to define in a current 72-96 hours bacteria of this kind.