

7. Юдина, М.А. Диагностика картофельной болезни хлеба, вызываемой бактериями видов *Bacillus subtilis* и *Bacillus mesentericus* / М.А. Юдина, Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев, Е.О. Бахаровская [и др.] // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2011. – №1 (13). – С. 61–67.

CHARACTERISTICS OF SOME BIOLOGICAL PROPERTIES BACTERIOPHAGES BACILLUS MYCOIDES

Feoktistova N.A., Makeev V.A., Vasilyev D.A., Aleshkin A.V.

Keywords: bacteriophages, *Bacillus mycoides*, biological product, the lytic activity, spectrum of lytic activity, specificity, modification of lytic activity during storage.

The article provides a description of some of the biological properties of bacteriophages, *Bacillus mycoides* (lytic activity spectrum of lytic action, specificity, modification of lytic activity in storage). By studying the properties of phages were selected for the construction of a biological product for fagoindikatsii and fagoidentifikatsii bacteria *Bacillus mycoides* in food raw materials and food products.

УДК 602.3:579.8

ФАГОИДЕНТИФИКАЦИИ БАКТЕРИЙ *BACILLUS SUBTILIS* И *BACILLUS CEREUS*

*Феоктистова Н. А. **, кандидат биологических наук, доцент
тел. 8(8422) 55-95-47, feokna@yandex.ru

*Калдыркаев А. И. **, ассистент

тел. 8(8422) 55-95-47, usxa@yandex.ru

Васильев Д.А., доктор биологических наук, профессор

8(8422) 55-95-47, dav_ul@mail.ru

*Алешкин А.В. ***, доктор биологических наук

8-495-452-18-16, ava@gabri.ru

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

**Московский НИИЭиМ им. Г.Н. Габричевского»

Ключевые слова: бактериофаги, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, лизис, корма, пищевые продукты, фагоидентификация

Описана схема исследования проб пищевых продуктов и продовольственного сырья с целью выделения и ускоренной идентификации бактерий *Bacillus subtilis* и *Bacillus cereus* с использованием выделенных и селекционированных строго специфичных бактериофагов *Bacillus subtilis* и *Bacillus cereus* в сравнении с классической схемой выделения и идентификации бактерий рода *Bacillus* по Gordon (1973).

Введение. Роль бактериофага как средства терапии и профилактики некоторых инфекционных заболеваний в настоящее время невелика, а значение для лабораторной диагностики ряда инфекции этот биологический объект не только не утратил, а, наоборот, начал привлекать к себе все более пристальное внимание исследователей [1,3,5]. С каждым годом повышается значимость бактериофагов как высоко специфического

диагностического средства, позволяющего надежно дифференцировать возбудителей бактериальных видов, а порой проводить более детальную дифференциацию отдельных типов и вариантов внутри данного вида [2,7]. Возможность фагоидентификации вытекает из специфичности действия фагов, которая может быть настолько выражена, что позволяет дифференцировать не только отдельные виды, но и серологически неотличимые штаммы в пределах одного вида [4]. Поэтому все большее число исследователей предпочитают обращаться к фаговым тестам, как единственному средству, способному дифференцировать близкородственные штаммы [2,8,9].

Материалы и методы. В исследованиях использовали фаги *Bacillus subtilis* Bs-13, Bs-16, фаги *Bacillus cereus* Bc-4, Bc-8 серии УГСХА; водопроводную воду, комбикорм, мясо, пряности, которые контаминировали штаммами бактерий *Bacillus subtilis* (*Bacillus subtilis* 6633, *Bacillus subtilis* 2) и *Bacillus cereus* (*Bacillus cereus* 2527, *Bacillus cereus* 8035) в концентрации 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 м.к./мл., полученными из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А.Столыпина».

Используя строгую родовую и видовую специфичность селекционированных бактериофагов, нами была разработана схема выделения и ускоренной идентификации бактерий видов *Bacillus subtilis* и *Bacillus cereus*. Подготовку и посев проб кормов и пищевых продуктов, подлежащих исследованию, проводили в соответствии ГОСТ Р 51592-2000 «Вода. Общие требования к отбору проб» [10] и ГОСТ 26669-85 «Продукты пищевые и вкусовые. Подготовка проб для микробиологических анализов» [11].

Результаты исследований и их обсуждение. Для искусственной контаминации пробы воды (мяса, комбикорма и пряностей) объемом (весом) 10 мл (г) вносили в стерильные колбы объемом 100 мл, заливали стерильным МПБ из расчета 10 мл бульона на 1 мл (г) исследуемой пробы. В колбы вносили индикаторные культуры в концентрации 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 м.к./мл (г). Полученные смеси встряхивали в шуттель-аппарате в течение 15 минут и ставили в термостат на 24 часа при 37°C . Затем надосадочную жидкость исследовали в соответствии со схемой, представленной на рис.2. Первоначально производили посев по МПА по методу Дригальского для выделения чистой культуры *Bacillus subtilis* и *Bacillus cereus*, а затем производили посева на среду Гаузе № 2 и среду Громько. Инкубировали посева в условиях термостата в течение 24 часов в условиях термостата при 37°C . Затем выросшие колонии пересеивали на МПБ и инкубировали в условиях термостата в течение 18 часов в условиях термостата при 37°C . Следующим этапом наших исследований было изучение биологических свойств выделенных культур по тестам, отраженным на рис.1. Результаты исследований представлены в таблицах 1 и 2.

В основу приведенной ниже схемы оценки диагностических признаков выделенных бацилл положены принципы, изложенные в работах R. Gordon [13] автора систематики рода *Bacillus* в последних изданиях определителя бактерий Bergey [12].

Бульонные культуры, полученные после пересева колоний с вышеперечисленных сред на МПБ, микроскопии (окраска по Граму) и при наличии в мазках грамположительных палочек с закругленными концами, располагающихся одиночно и попарно, подвергали фагоидентификации.

На поверхность МПА в чашках Петри пастеровской пипеткой наносили 3-4 капли бульонной 18-часовой культуры исследуемых микроорганизмов. Нанесённую культуру равномерно распределяли по поверхности среды стерильным шпателем. Чашки ставили в термостат для подсушивания на 15-20 минут.

Чашку делили бактериологическим карандашом на три сектора. На поверхность засеянной среды, в зоне первого сектора, пастеровской пипеткой легким прикосновением капли наносили фаг Bs-13 УГСХА, на второй сектор аналогично наносили

фаг Bs-16 УГСХА, на третий сектор в качестве контроля наносили стерильный МПБ. Наклоняли чашку, чтобы капли стекли в виде дорожки. Чашки оставляли для подсушивания в боксе на 15-20 минут и помещали в термостат на 18 часов при 37°C. По аналогичной методике изучали работу цереусных бактериофагов Вс -4 и Вс-8 серии УГСХА.

Результат исследований считали положительным, если на месте нанесения фагов на газоне сплошного роста культуры образовывалась прозрачная зона лизиса с вторичным ростом фагорезистентных микроорганизмов или без него, а также рост негативных колоний фага. Отрицательным считали результат - отсутствие лизиса на газоне роста исследуемой культуры микроорганизмов и отсутствие лизиса в контроле. При положительном результате культуру относили к виду *Bacillus subtilis* или *Bacillus cereus*. Результаты опытов представлены в таблице 3.

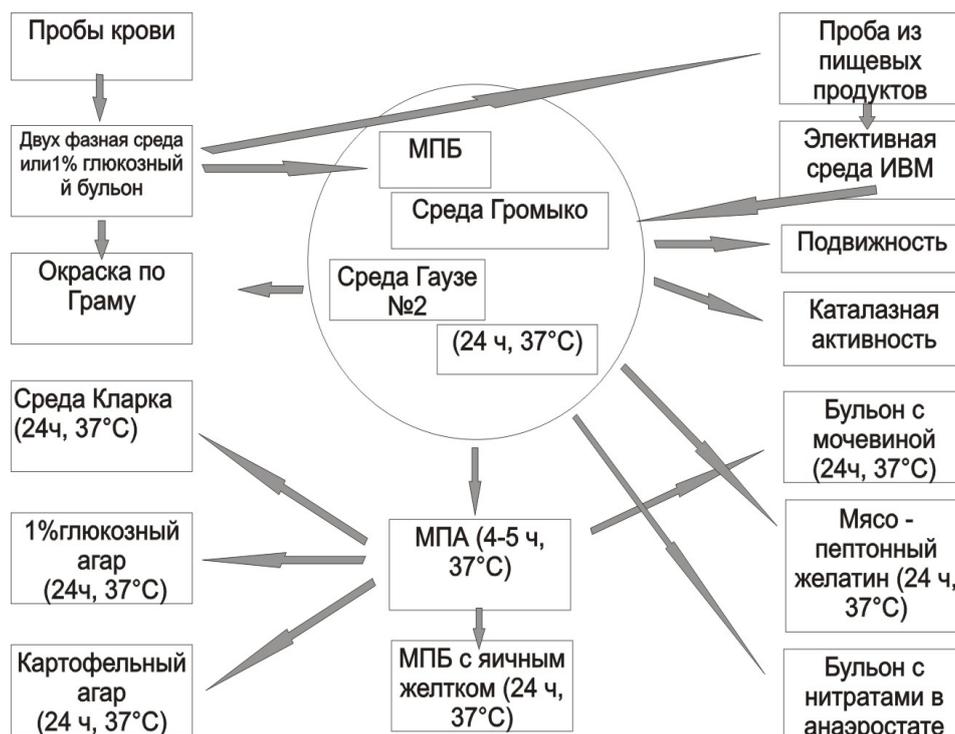


Рис.1 - Схема выделения и дифференциации бактерий *Bacillus subtilis* и *Bacillus cereus*

Таблица 1 - Результаты исследований объектов санитарного надзора на наличие бактерий *Bacillus subtilis* и *Bacillus cereus* на среде Гаузе № 2

Объекты	Количество микробных клеток в 1 гр (мл), проба №1				Количество микробных клеток в 1 гр (мл), проба №2				Количество микробных клеток в 1 гр (мл), проба №3			
	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴
1 вода	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+
2 пряности	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+
3 мясо	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+
4 комби корм	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+

Примечание:

«+» - положительный результат, «-» - отрицательный результат.

Таблица 2 - Результаты исследований объектов санитарного надзора на наличие бактерий *Bacillus subtilis* и *Bacillus cereus* на среде Громыко

Объекты		Количество микробных клеток в 1 гр (мл), проба №1				Количество микробных клеток в 1 гр (мл), проба №2				Количество микробных клеток в 1 гр (мл), проба №3			
		10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴
1	вода	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+
2	пряности	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+
3	мясо	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+
4	комбикорм	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+

Примечание:

«+» - положительный результат, «-» - отрицательный результат.

Таблица 3 - Фагоидентификация бактерий *Bacillus subtilis* бактериофагами Bs-13 и Bs-16 серии УГСХА и бактерий *Bacillus cereus* бактериофагами Bc-4 и Bc-8 серии УГСХА

	Объекты	Результат воздействия фагов Bs-13 и Bs-16 серии УГСХА			Результат воздействия фагов Bc-4 и Bc-8 серии УГСХА		
		Проба 1	Проба 2	Проба 3	Проба 1	Проба 2	Проба 3
1	вода	+	+	+	+	+	+
2	мясо	+	+	+	+	+	+
3	пряности	+	+	+	+	+	+
4	комбикорм	+	+	+	+	+	+

Примечание:

«+» - положительный результат, «-» - отрицательный результат.

Заключение. Фагоидентификация бактерий *Bacillus subtilis* бактериофагами Bs-13 и Bs-16 серии УГСХА и бактерий *Bacillus cereus* бактериофагами Bc-4 и Bc-8 серии УГСХА дала положительные результаты: из всех искусственно контаминированных бактериями *Bacillus subtilis* и *Bacillus cereus* проб пряностей, комбикорма, водопроводной воды и мяса были выделены культуры, которые при взаимодействии с вышеуказанными фагами были лизированы ими. При получении отрицательных результатов фагоидентификации необходимо проведение детального изучения ферментативных, серологических и патогенных свойств выделенных микроорганизмов. На рисунке 2 изображена схема фагоидентификации бактерий вида *Bacillus subtilis* и *Bacillus cereus*. Она представлена в сравнении с традиционной схемой выделения и дифференциации бацилл первой морфологической группы [13], изложенной в «Определителе бактерий Берджи» [12]. Доказано, что время исследований в соответствии с разработанной нами схемой короче на 71 час с меньшими затратами посуды и реактивов

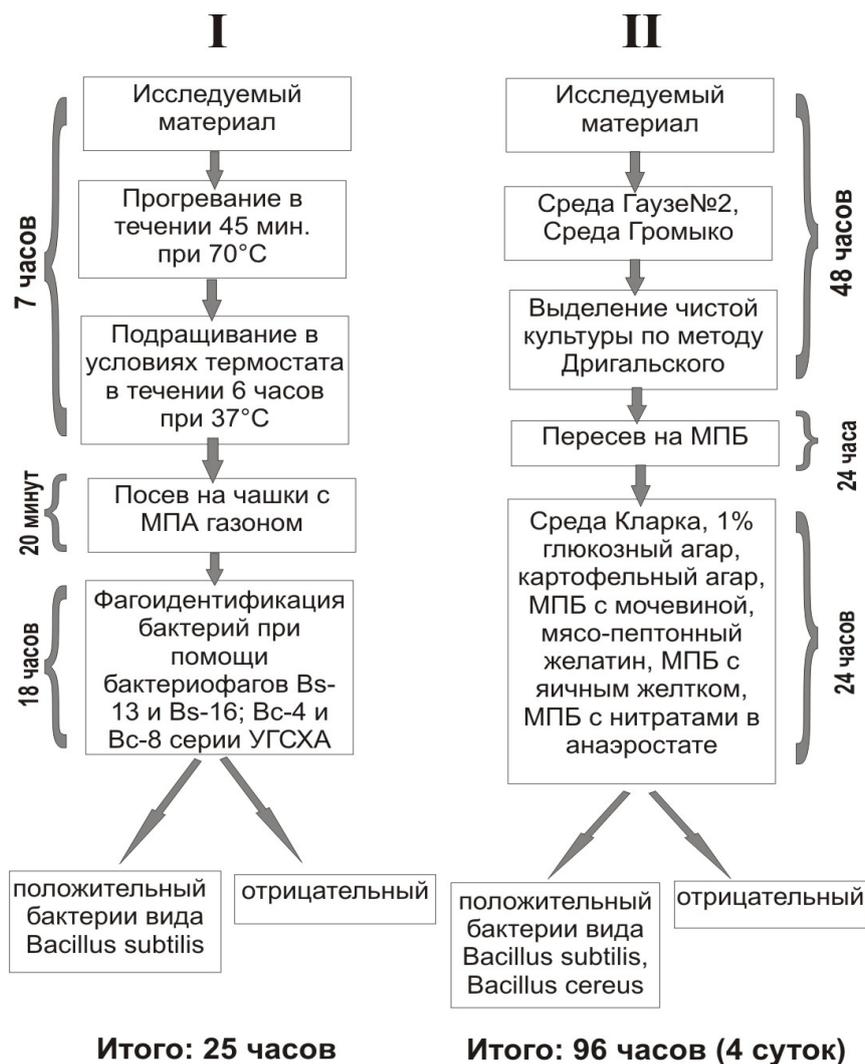


Рис. 2 - Схема ускоренной идентификации бактерий вида *Bacillus subtilis* и *Bacillus cereus* с помощью селекционированных нами бактериофагов (I) в сравнении со схемой выделения и дифференциации бацилл первой морфологической группы, изложенной в «Определителе бактерий Берджи».

Библиографический список

1. Адамс, М. Бактериофаги / М. Адамс. – М., Медгиз, 1961. – С. 26-121.
2. Адельсон, Л.И. Бактериофаги, активные по отношению к энтеропатогенным кишечным палочкам / Л.И. Адельсон // Вопросы микробиологической диагностики и бактериофагии. – М., 1962. – С. 184-194.
3. Габрилович, И.М. Общая характеристика бактериофагов / И.М. Габрилович // Основы бактериофагии. – Минск, 1973. – С.5 – 24.
4. Габрилович, И.М. Биологические свойства бактериофагов *Serratia marcescens* / И.М. Габрилович // ЖМЭИ. – 1992. – №6. – С.10-12.
5. Ганюшкин, В.Я. Бактериофаги сальмонелл и их применение в ветеринарии/ В.Я. Ганюшкин // – Ульяновск. – 1988. – С.45
6. Гольдфарб, Д.М. Бактериофагия / Д.М. Гольдфарб. – М.: Медгиз, 1961. – С. 6-18.
7. Егоров В.В. Практикум по микробиологии / В.В. Егоров. – М.: Изд-во МГУ, 1986. – С. 35-42.

8. Клевакин, В. М. Санитарная микробиология пищевых продуктов / В.М. Клевакин, В.В. Карцев. – Л.: Медицина, 1986. – С. 164.
9. Смирнов, В.В. Спорообразующие аэробные бактерии - продуценты биологически активных веществ / В.В. Смирнов, С.Р. Резник, И.А. Василевская. - Киев: Наукова Думка, 1982. - С. 117-120.
10. ГОСТ Р 51592-2000 «Вода. Общие требования к отбору проб».
11. ГОСТ 26669-85 «Продукты пищевые и вкусовые. Подготовка проб для микробиологических анализов».
12. Bergey's manual of determinative bacteriology, Williams and Wilkins Co, Baltimore, Md., 8th ed., 1974. - 1246 p. 191.
13. Gordon, R. The genus *Bacillus* / R. Gordon // In: Handb. Microbiol. Cleveland (Ohio). - 1973. - V.1. - P.71-88.

FAGOIDENTIFIKATSII BACILLUS SUBTILIS BACTERIA AND BACILLUS CEREUS

Feoktistova N.A., Kaldirkaev A.I., Vasilyev D.A. Aleshkin A.V.

Key words: *bacteriophages, Bacillus subtilis, Bacillus cereus, lysis, feed, food, fagoidentifikatsiya*

The scheme of study samples of food products and food raw materials for the isolation and rapid identification of bacteria Bacillus subtilis and Bacillus cereus with dedicated and select for a strictly specific bacteriophages of Bacillus subtilis and Bacillus cereus in comparison with the classical scheme of isolation and identification of bacteria of the genus Bacillus by Gordon (1973) .