

SELECTION OF BACTERIOPHAGES OF *BACILLUS CEREUS* AND INCREASE OF THEIR LYTIC ACTIVITY

Golyakevich O., Grankina N., Simurzina O., Palatkina N., Panina N.

Keywords: *Bacillus cereus*, bacteriophages, selection, лизис, lytic activity, passage, фаголизат.

In article the technique of selection of specific bacteriophages of Bacillus cereus is described. After carrying out repeated series of passages on indicator cultures and finishing a caption of each of 57 bakteriobag not less than 1×10^9 corpuscles in 1 ml. we corked them in sterile bottles and stored at a low temperature (4 - 6 °C) without introduction of preservatives.

УДК 602.3:579.8

ПРИМЕНЕНИЕ ФАГОВ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ БАКТЕРИЙ *BACILLUS CEREUS*

Голякевич О., Гранкина Н., Симурзина О., Палаткина Н.,
Панина Н. - студентки 2 курса факультета ветеринарной
медицины

Научные руководители – Феоктистова Н.А., к.б.н., доцент,
Лыдина М.А., к.б.н., старший преподаватель
ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина»

Ключевые слова: *Bacillus cereus*, контаминация, пищевые продукты, среда, фаги, колонии, лизис, качество.

Контаминация пищевых продуктов Bacillus cereus - это серьёзная проблема для пищевого производства. Используя строгую родовую и видовую специфичность селекционированных бактериофагов, была отработана схема выделения и ускоренной идентификации бактерий вида Bacillus cereus.

Одна из тем научно-исследовательских работ кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ связана с бактериями вида *Bacillus cereus*. Контаминация пищевых продуктов *Bacillus cereus* - это серьезная проблема для пищевого производства. Спорообразующие бактерии, относящиеся к роду *Bacillus*, широко распространены в окружающей среде. Некоторые виды являются патогенными для человека. К ним, в первую очередь, относится возбудитель сибирской язвы - *Bacillus anthracis* и бактерии вида *Bacillus cereus*, способные вызывать развитие пищевых токсикоинфекций у людей. Весьма важным аспектом в изучении данной группы бактерий является высокий уровень фенотипической изменчивости, проявляющийся в изменении культуральных, биохимических и других свойств при воздействии условий обитания бактерий в природе или в условиях лаборатории. Это в значительной степени усложняет дифференциацию видов рода *Bacillus* [1,7-9].

Цель исследований – разработка ветеринарно-санитарных требований к тест-системе для обнаружения бактерий вида *Bacillus cereus* из пищевых продуктов, приобретенных на продовольственных рынках г. Ульяновска и Ульяновской области.

Первоначально мы отработали методику выделения бактерий *Bacillus cereus* на референс-штаммах бактерий вида *Bacillus cereus* № 8035и № 2527, полученных из музея Научно - исследовательского инновационного центра микробиологии и биотехнологии Ульяновской ГСХА.

Мы произвели посев на питательные среды: мясо-пептонный бульон, мясо-пептонный агар, среду Мосселя, полимиксиновый агар с ТТХ, кровяной агар, сибирезвенную среду, среду Пивоварова.

Результаты исследований:

- на МПА вырастают крупные, распластанные, серовато-беловатые колонии с изрезанными краями, некоторые штаммы образуют розовато-коричневый пигмент;
- на МПБ - образует нежную пленку, пристеночное кольцо, равномерное помутнение и хлопьевидный осадок на дне пробирки. На средах с желтком колонии бактерий *Bacillus cereus* окружены широкой зоной глубокого белого равномерного матового коагулята (положительная реакция на лецитиназу);
- на среде Мосселя сероватой окраски, зернистые в отраженном свете и с перламутровым отливом - в проходящем свете, окружены зоной гемолиза разной интенсивности;

- на полимиксиновых средах с ТТХ (2,3,5-трифенилтетразолия хлорид) колонии зернистые, матовые, ярко-рубинового цвета на фоне зоны белого коагулята;
- на кровяном агаре - колонии сероватой окраски, зернистые в отраженном свете и с перламутровым отливом - в проходящем свете, окружены зоной гемолиза разной интенсивности
- на сибиреязвенной среде – колонии матовые с неровными краями, после добавление 10% водного раствора аммиака идет образование малиновой окраски, что свидетельствует о выработки щелочной фосфатазы;
- на среде Пивоварова - колонии розовые (могут быть красные) за счёт редукции ТТХ, окружённые зоной лецитиназной активности.

Далее мы готовили мазки, окрашивали по Грамму. В наших исследованиях бактерии вида *Bacillus cereus* были окрашены в фиолетовый цвет.

Далее мы использовали идентификационную таблицу для изучения биохимических свойств бактерий вида *Bacillus cereus* [2,3,4]. Результаты представлены в таблице.

В результате проведенных исследований нами было установлено, что музейные штаммы *Bacillus cereus* 8035 и *Bacillus cereus* 2527 обладают специфическими свойствами.

Все большее число исследователей предпочитают обращаться к фаговым тестам, как единственному средству, способному дифференцировать близкородственные штаммы. Фагодиагностика основана на специфической способности фагов взаимодействовать с определенными видами (идентификация) или типами (фаготипирование) бактерий, в результате чего происходит их лизис. Феномен лизиса является основой для использования фага в диагностических целях. Метод фагодиагностики широко используется в лабораторной практике для идентификации различных видов микроорганизмов [5,6].

Используя строгую родовую и видовую специфичность селекционированных бактериофагов, ранее была разработана схема выделения и ускоренной идентификации бактерий вида *Bacillus cereus*. Подготовку и посев проб продуктов, подлежащих исследованию, проводили в соответствии ГОСТ Р «Вода. Общие требования к отбору проб» и ГОСТ «Продукты пищевые и вкусовые. Подготовка проб для микробиологических анализов».

В исследованиях использовали водопроводную воду, муку, мясо, пряности, которые контаминировали бактериями вида *Bacillus cereus* в концентрации 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 м.к. в 1 мл.

Результаты исследований. Для искусственной контаминации пробы воды (мяса, муки и пряностей) весом 10 г вносили в стерильные колбы объемом 100 мл, заливали стерильным МПБ из расчета 10 мл бульона на 1 г исследуемой пробы. В колбы вносили индикаторные культуры в концентрации 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 м.к./мл. Полученные смеси встряхивали в шуттель-аппарате в течение 15 минут и ставили в термостат на 9 часов при 37°C. Затем надосадочную жидкость высевали на МПА по методу Дригальского для выделения чистой культуры *Bacillus cereus*. Инкубировали посевы в условиях термостата в течение 9 часов в условиях термостата при 37°C. Затем выросшие колонии пересевали на МПБ и инкубировали в условиях термостата в течение 6 часов в условиях термостата при 37°C.

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 8-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 Вс-2 УГСХА, на второй сектор аналогично наносили фаг Вс-6 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 10 часов при 37°C.

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 cereus*. Результаты опытов представлены в таблице.

Таким образом, фагоидентификация бактерий вида *Bacillus cereus* бактериофагами Вс-2 и Вс-6 серии УГСХА дала положительные результаты: из всех искусственно контаминированных бактериями вида

Bacillus cereus проб пряностей, муки, водопроводной воды и мяса были выделены культуры, которые при взаимодействии с вышеуказанными фагами были лизированы ими.

Время исследования по данной методике 44 часа, традиционная схема идентификации бактерий вида *Bacillus cereus* занимает 96 часов при значительных затратах посуды, реактивов и времени на проведение исследований.

Библиографический список:

1. Васильев, Д.А. Распространение *Bacillus cereus* и *Bacillus mycoides* в объектах санитарного надзора / Феоктистова Н.А., Калдыркаев А.И., Васильев Д.А. [и др.] // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2014. - № 1 (25). - С. 68-76.

2. Васильев, Д.А. Фагоидентификация бактерий *Bacillus subtilis* и *Bacillus cereus* / Феоктистова Н.А., Калдыркаев А.И., Васильев Д.А. [и др.] // Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности Материалы Международной научно-практической конференции. – Ульяновск, 2013. - С. 126-131.

3. Калдыркаев, А.И. Разработка системы фаговаров *Bacillus cereus* / Калдыркаев А.И., Феоктистова Н.А., Васильев Д.А. [и др.] // Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения Материалы V Международной научно-практической конференции. – Ульяновск, 2013. - С. 178-185.

4. Калдыркаев, А.И. Биохимические свойства бактерий *Bacillus cereus* / Калдыркаев А.И., Алешкин А.В., Феоктистова Н.А. [и др.] // Биотехнология: реальность и перспективы в сельском хозяйстве/ - Саратов, 2013. - С. 186-188.

5. Калдыркаев, А.И. Разработка системы фаговаров бактерий *Bacillus cereus* для идентификации и мониторинга данного микроорганизма / Калдыркаев А.И., Феоктистова Н.А., Алешкин А.В. // Бактериофаги микроорганизмов значимых для животных, растений и человека. Коллектив авторов под ред. Васильев Д.А., Золотухин С.Н. - Ульяновск, 2013. - С. 211-225.

6. Феоктистова, Н.А. Выделение фагов бактерий вида *Bacillus cereus* / Меркулова Е.В., Феоктистова Н.А., Юдина М.А. [и др.] // Актуальные проблемы инфекционной патологии и биотехнологии Материалы V-й Всероссийской (с международным участием) студенческой науч-

ной конференции. Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия. – Ульяновск, 2012. - С. 14-17.

7. Феоктистова, Н.А. Заболевания, вызываемые бактериями вида *Bacillus cereus* / Садева Н.Т., Меркулова Е.В., Феоктистова Н.А. [и др.] // Актуальные проблемы инфекционной патологии и биотехнологии Материалы V-й Всероссийской (с международным участием) студенческой научной конференции. Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия. – Ульяновск, 2012. С. 25-30.

8. Феоктистова, Н.А. Перспективы применения бактериофагов рода *Bacillus* / Феоктистова Н.А., Васильев Д.А., Меркулов А.В. [и др.] // Настоящее и будущее биотехнологии в решении проблем экологии, медицины, сельского, лесного хозяйства и промышленности Научно-практический семинар с международным участием. – Ульяновск, 2011. - С. 136-139.

9. Феоктистова, Н.А. Перспективы применения бактериофагов для индикации и идентификации бактерий вида *Bacillus cereus* в речной воде и рыбе / Васильев Д.А., Феоктистова Н.А., Юдина М.А. [и др.] // Задачи ветеринарной науки в реализации доктрины продовольственной безопасности Российской Федерации. – Ульяновск, 2011. - С. 175-180.

APPLICATION OF PHAGES FOR IDENTIFICATION OF BACTERIA OF *BACILLUS CEREUS*

Golyakevich O., Grankina N., Simurzina O., Palatkina N., Panina N.

Keywords: *Bacillus cereus*, kontamination, foodstuff, Wednesday, phage, colony, лизис, quality.

Kontamination of Bacillus cereus foodstuff is a serious problem for food production. Using strict patrimonial and specific specificity of the selected bacteriophages, the scheme of allocation and the accelerated identification of bacteria of a type of Bacillus cereus was fulfilled.