

ИЗУЧЕНИЕ ВИДОВОГО РАЗНООБРАЗИЯ БАКТЕРИЙ РОДА *BACILLUS*, КОНТАМИНИРУЮЩИХ КОРНЕ- И КЛУБНЕПЛОДЫ

К.В. Кудряшова, аспирант

тел. 8(8422)55-95-47, kudryashova_91@list.ru

Н.А. Феокистова, кандидат биологических наук, доцент

тел. 8(8422)55-95-47, feokna@yandex.ru

М.А. Лыдина, кандидат биологических наук, ст. преподаватель

тел. 8(8422)55-95-47, feokna@yandex.ru

Д.А. Васильев, доктор биологических наук, профессор

тел. 8(8422)55-95-47, dav_ul@mail.ru

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

Б.И. Шморгун, кандидат ветеринарных наук

ФГБУ «ВГНКИ»,

тел. 7 (499) 253-14-68, dav_ul@mail.ru

Ключевые слова: *бациллы, Bacillus mesentericus (pumilus) Bacillus subtilis, Bacillus cereus, Bacillus mycoides, Bacillus megaterium, бактерии, штаммы, пробы, биохимические свойства, методика, тест, корнеплоды, клубнеплоды, порча.*

Работа посвящена выделению и идентификации бактерий рода *Bacillus*, контаминирующих корне- и клубнеплоды. На наличие бактерий рода *Bacillus* было проведено 37 проб корне- и клубнеплодов. Выделено и идентифицировано 26 культур бактерий, которые были классифицированы по ферментативным свойствам (на основании тестов, описанных в литературных источниках и по результатам изучения биохимических свойств штаммов бактерий рода *Bacillus*, полученных из музея кафедры МВЭ и ВСЭ УГСХА им. П.А. Столыпина) и отнесли к видам *Bacillus mesentericus (pumilus) Bacillus subtilis, Bacillus cereus, Bacillus mycoides, Bacillus megaterium*.

Спорообразующие бактерии рода *Bacillus* представляют собой основной фактор биологического разрушения пищевых продуктов и различных других материалов. Борьба с ними является одной из основных практических задач на этапах процесса хранения и переработки сельскохозяйственной продукции [1].

Известно, что способность образовывать споры, обладающие большой устойчивостью к внешним воздействиям, позволяет спорообразующим бактериям рода *Bacillus* оставаться жизнеспособными при самых неблагоприятных условиях. Представители рода *Bacillus* - это почвенные сапрофиты, они выдерживают резкие колебания температуры, отсутствие влаги и воздуха, действие различных химических соединений, обычно губительно влияющих на живые организмы. Таким образом, вышеназванные спороносные бактерии имеют, по сравнению с другими формами микроорганизмов, большие возможности приспосабливаться к тем или другим условиям среды [1].

Поиск эффективного и безвредного способа обработки корне- и клубнеплодов с целью уничтоже-

ния фитопатогенных бацилл – актуальная тема для исследований, результаты которых позволят повысить эффективность применения контрольных мер при хранении в овощехранилищах и в торговых залах магазинов, а также сделать данную технологическую операцию значительно дешевле [1].

Цель исследования: выделить и идентифицировать фитопатогенные бациллы, контаминирующие корне- и клубнеплоды.

Материалы и методы. *Материалы.* Картофель, морковь, репа, редька, свекла красная, полученные в хозяйствах Ульяновской, Самарской областей и Краснодарского края.

Методы. В работе использовали методики, изложенные в следующих нормативно-технических документах и научных трудах:

- ГОСТ 26669-85 «Продукты пищевые и вкусовые. Подготовка проб для микробиологических анализов» [13];

- ГОСТ Р 51426-99 «Общее руководство по приготовлению разведений для микробиологических исследований» [13];

- ГОСТ 26669-85 «Подготовка проб для микробиологического анализа»[15];

- для выделения бактерий *Bacillus* использовали схему дифференциации бактерий рода *Bacillus* [13].

Было исследовано 36 проб корне- и клубнеплодов.

Результаты исследований и их обсуждение.

Подготовка проб осуществлялась по методикам, изложенным в нормативно-технической документации [13]. Исследования каждой из 36 проб проводилось нами по классическому четырехдневному алгоритму, предложенному Gordon (1973). Методология исследований многократно была апробирована сотрудниками кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза» ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина» [3-4, 10].

По результатам ранее проведенных исследований по изучению биохимических свойств референс – штаммов бактерий рода *Bacillus*, можно сделать вывод, что представители данного рода отличаются многообразием и сходством фенотипического признаков [10]. Поэтому мы применили классическую пошаговую инструкцию для первичной дифференциации бактерий рода *Bacillus* по Gordon (1973): подвижность выделенных представителей рода *Bacillus* мы изучали в препаратах «висячая капля» и «раздавленная капля», а также при посеве культуры в полужидкий агар (0,45-0,75% агара) уколом. Образование аммиака, индола и сероводорода выделенными культурами мы определяли с помощью индикаторных бумажек, помещенных под пробку пробирок с мясо-пептонным бульоном. При образовании индола бумажка приобретала сиреневый или малиновый цвет различной интенсивности. Об образовании сероводорода судили по почернению индикаторной бумажки. При образовании аммиака индикаторная бумажка краснеет.

Для определения гидролиза мочевины (это исследований позволяет определить наличие фермента уреазы) производили посев на среду с мочевиной. Покраснение среды через 20-24 ч. свидетельствовало о наличии у данного штамма фермента уреазы.

Редукцию нитратов определяли после роста выделенной культуры на бульоне с нитратами в течение 24-72ч. В каждую пробирку с засеянным нитратным бульоном добавляли по 1 мл реактива. Если нитрат восстановлен в нитрит, то получалось темносинее окрашивание. Продукция газов из нитратов в анаэробных условиях изучали на нитратном бульоне с поплавком или под слоем стерильного вазелинового масла. При продукции газа он скапливался в поплавке.

Определение гидролиза казеина выделенными штаммами изучали на молочном агаре. Культуру засеивали на среду штрихом, инкубировали в термостате при 37 °С. Наблюдали за появлением прозрачных зон гидролиза. Продукцию летициназы изуча-

ли на бульоне с яичным желтком. О летициназной активности судили по появлению беловатой мути и всплывающим хлопьям.

Для изучения разложения тирозина культуру инкубировали на агаре с тирозином. О разложении тирозина судили по исчезновению кристаллов тирозина в среде вокруг посевов.

Гидролиз крахмала наблюдали на картофельном агаре. Чашки Петри с засеянным картофельным агаром через 24-48 ч. заливали раствором Люголя. Светлые зоны вокруг посевов свидетельствовали о гидролизе крахмала. Для изучения продукции каталазы чашечную культуру заливали 10% H_2O_2 . Образовавшиеся пузырьки газа свидетельствовали о наличии каталазы.

С помощью реакции Фогес-Проскауэра устанавливали в среде ацетон, промежуточный продукт, образующийся при распаде глюкозы. Для постановки реакции Фогес-Проскауэра (в модификации Барита) культуры выращивали на среде Кларка 1-3 суток при 37 °С. Затем 1 мл культуральной жидкости переносили в пробирку и прибавляли 0,6 мл α – нафтола (5% раствор в абсолютном спирте) и 0,2 мл 40% КОН, взбалтывали. При положительной реакции через 2-5 мин наблюдали розовое окрашивание. У штаммов, дающих сильную реакцию, окраска становится интенсивной и через 30 мин, а через 1 час переходит в малиновую. В случае отрицательной реакции розового окрашивания не наблюдается, и раствор принимает цвет меди.

Для определения утилизации углеводов культуры засеивали на полужидкую среду Омелянского с углеводами. При образовании кислоты из углеводов цвет среды изменяется с зеленого на желтый. О кислотообразовании культур при росте на лакмусовом молоке судили по изменению цвета молока до розового (красного).

Продукцию аргининдигидролазы изучали на среде Шеррио. Пробирку со средой Шеррис и контрольную (без аргенина) засеивали 18 часовой культурой и заливали стерильным вазелиновым маслом. Посевы инкубировали при 37 °С в течение 5 дней. Если бактерии не способны анаэробному расщеплению глюкозы, то среда в контрольной пробирке (без аргенина) остается серой или слабо розовой. О разложении аргенина свидетельствует появление фиолетовой окраски в опытной пробирке.

Для быстрого спорообразования культуры выращивали на кукурузно-пептонном агаре. Рост в анаэробных условиях изучали на анаэробном агаре. Петлю суточной бульонной культуры засеивали уколом в столбик среды. Рост культуры по всей длине укола свидетельствовали об анаэробном росте.

Об утилизации цитрата и пропионата судили по наличию роста культур на среде Козера. О разжижении желатина судили по разжижению мясо-пептонной желатине. Рассматривали наличие роста бактерий на соевом агаре.

Таблица 1 - Сводные данные о биохимических свойствах выделенных бактерий рода *Bacillus*

Вид	<i>B. cereus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. megaterium</i>	<i>B. mycoides</i>	<i>B. mesentericus</i>
Признаки					
Рост в присутствии лизоцима	+	х	-	+	х
Анаэробный рост	+	-	-	+	-
Каталаза	+	+	+	+	+
Тест Фогес-Проскауера	+	+	-	+	+
Утилизация цитрата	+	+	-	х	+
Расщепление тирозина	+	-	+	х	-
Фенилаланин дезаминаза	-	-	+	-	-
Летитиназа	+	-	х	х	-
Редукция нитратов до нитритов	+	+	х	+	-
Гидролиз					
Казеина	+	+	-	+	+
Желатина	+	+	х	+	+
Крахмала	+	+	+	+	-
Образование кислоты из					
D-глюкозы	+	+	+	+	+
L-арабинозы	-	+	х	-	+
D-ксилозы	-	+	х	-	+
D-маннита	-	+	х	-	+
Газ из глюкозы	-	-	-	-	-

Примечание – « + » - более 85% штаммов, исследованных Сидоровым (1975) положительны,
 « - » - более 85% штаммов отрицательны,
 « х » - варибельный признак.

Полученные нами результаты позволили нам сгруппировать выделенные бактерии по результатам их биохимических свойств. Результаты представлены в таблице 1.

Дополнительными тестами для дифференциации выделенных бактерий были биохимические тесты, предложенные Сидоровым (1995): утилизация цитрата, взаимодействие с фенилаланиндезаминазой, D-маннитом (рисунок 1), D-ксилозой, D-глюкозой и L-арабинозой.

Полученные нами результаты изучения биохимических свойств выделенных нами бацилл были сравнены с данными по изучению биохимических свойств штаммов бактерий рода *Bacillus*, полученных из музея кафедры МВЭ и ВСЭ УГСХА им. П.А. Столыпина [4, 6, 8].

Таким образом, в результате проведенных исследований нами было выделено из 37 проб корне- и клубнеплодов 26 культур бактерий, которые мы классифицировали по ферментативным свойствам (на основании тестов, описанных в литературных источниках и результатах изучения биохимических свойств штаммов бактерий рода *Bacillus*, получен-

ных из музея кафедры МВЭ и ВСЭ УГСХА им. П.А. Столыпина) и отнесли к видам *Bacillus mesentericus* (*pumilus*) *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus megaterium*.

Закключение. Нами было исследовано на наличие бактерий *Bacillus mesentericus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus mycoides* 37 проб корне- и клубнеплодов (гартофель, морковь, репа, редька, свекла красная, полученные в хозяйствах Ульяновской, Самарской областей и Краснодарского края). Нами установлено, что уровень контаминации исследованных проб бактериями рода *Bacillus* составил более 70 %. Для эффективного и безвредного способа обработки сельскохозяйственной продукции с целью снижения контаминации бактериями рода *Bacillus*, их фагоиндикации и фагоидентификации, для лечения и профилактики болезней молодняка сельскохозяйственных животных, на протяжении многих лет ведется активная работа сотрудниками кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ ФГБОУ ВПО «Ульяновской ГСХА им. П.А. Столыпина» [1-2,5,7-8,11].

Библиографический список:

1. Васильев, Д.А. Разработка параметров постановки реакции нарастания титра фага для индикации бактерий *Bacillus mesentericus* в объектах санитарного надзора / Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин, Н.А. Феоктистова [и др.] // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2012. - № 3. - С. 69-73.

2. Васильев, Д.А. Характеристика биологических свойств бактериофагов вида *Bacillus subtilis* / Д.А. Васильев, Д.А., Н.А. Феоктистова М.А. Юдина [и др.] // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2011. - № 1. - С. 79-83.
3. Васильев, Д.А. Биосенсорная детекция бактерий рода *Bacillus* в молоке и молочных продуктах для предупреждения их порчи / Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин, Н.А. Феоктистова [и др.] // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2013. - № 4 (24). - С. 36-43.
4. Калдыркаев, А.И. Разработка системы фаговаров бактерий *Bacillus cereus* для идентификации и мониторинга данного микроорганизма / А.И. Калдыркаев, Н.А. Феоктистова, А.В. Алешкин // В книге: «Бактериофаги микроорганизмов значимых для животных, растений и человека». - Ульяновск, 2013. - С. 211-225.
5. Садеева, Н.Т. Выделение фагов бактерий вида *Bacillus cereus* / Н.Т. Садеева, Н.А. Феоктистова, М.А. Юдина [и др.] // В сборнике: Актуальные проблемы инфекционной патологии и биотехнологии: материалы V-й Всероссийской (с международным участием) студенческой научной конференции. – Ульяновск: ГСХА, 2012. - С. 14-17.
6. Райчинец, Ю.А. Методика выделения *Paenibacillus larvae* / Ю.А. Райчинец, Н.А. Феоктистова, М.А. Лыдина [и др.] // Современные проблемы науки и образования. - 2014. - № 5. - С. 599.
7. Феоктистова, Н.А. Перспективы применения бактериофагов рода *Bacillus* / Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев, М.А. Юдина [и др.] // В сборнике: Настоящее и будущее биотехнологии в решении проблем экологии, медицины, сельского, лесного хозяйства и промышленности Научно-практический семинар с международным участием. – Ульяновск: УлГУ, 2011. - С. 136-139.
8. Феоктистова, Н.А. Разработка схемы исследования материала с целью выделения и ускоренной идентификации бактерий видов *Bacillus subtilis* и *Bacillus cereus* / Н.А. Феоктистова, А.И. Калдыркаев, А.Х. Мустафин // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. - 2011. - Т. 4. - № 32-1. - С. 288-290.
9. Феоктистова, Н.А. Выделение и изучение биологических свойств бактериофагов рода *Proteus*, конструирование на их основе биопрепарата и разработка параметров практического применения / автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова. Саратов, 2006. – С. 6.
10. Феоктистова, Н.А. Распространение *Bacillus cereus* и *Bacillus mycoides* в объектах санитарного надзора / Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин [и др.] // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2014. - № 1 (25). - С. 68-76.
11. Феоктистова, Н.А. Методы выделения бактериофагов рода *Bacillus* / Н.А. Феоктистова, В.А. Макеев, М.А. Юдина [и др.] // Вестник ветеринарии. - 2011. - Т. 59. - № 4. - С. 88-89.
12. Юдина, М.А. Разработка фагового препарата *Bacillus mesentericus* и область его практического применения/ автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова. Саратов, 2012. – С. 5.
13. Электронный фонд правовой и научно-технической документации - URL: <http://docs.cntd.ru/document/gost-r-51808-2001> - (дата обращения 09.09.2014).

STUDYING OF A SPECIFIC VARIETY OF BACTERIA OF THE SORT BACILLUS, KONTAMINIRUYUSHCHIKH THE ROOT - AND TUBER CROPS

K.V. Kudryashova, N. A. Feoktistova, M. A. Lydina, D. A. Vasilyev, B. I. Shmorgun

Key words: *bacilli, Bacillus mesentericus (pumilus) of Bacillus subtilis, Bacillus cereus, Bacillus mycoides, Bacillus megaterium, bacterium, strains, tests, biochemical properties, technique, test, root crops, tuber crops, damage.*

Work is devoted to allocation and identification of bacteria of the sort *Bacillus*, the kontaminiruyushchikh a root - and tuber crops. On existence of bacteria of the sort *Bacillus* there were proissledovano 37 tests a root - and tuber crops. 26 cultures of bacteria which were classified by fermentativny properties (on the basis of the tests described in references and by results of studying of biochemical properties of strains of the bacteria of the sort *Bacillus* received from the museum of MVE and VSE UGSH chair of P. A. Stolypin) are allocated and identified and carried to types of *Bacillus mesentericus (pumilus) of Bacillus subtilis, Bacillus cereus, Bacillus mycoides, Bacillus megaterium.*