

БИОИНДИКАЦИЯ БАКТЕРИЙ *BACILLUS MYCOIDES* В ОБЪЕКТАХ САНИТАРНОГО НАДЗОРА

Васильев Дмитрий Аркадьевич, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

Золотухин Сергей Николаевич, доктор биологических наук, профессор кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

Феоктистова Наталья Александровна, кандидат биологических наук, доцент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

Лыдина Мария Александровна, кандидат биологических наук, ассистент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

Калдыркаев Андрей Иванович, кандидат биологических наук, ассистент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

Макеев Владимир Александрович, аспирант кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

Швиденко Инна Григорьевна, доктор медицинских наук, профессор*

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

432017, Ульяновск, бульвар Новый Венец, 1; тел.: 8(422)559547; e-mail: feokna@yandex.ru

*ФГБОУ ВПО Саратовский ГМУ имени В.И.Разумовского Минздравсоцразвития России

410012, Саратов, ул. Большая Казачья, 112

Научные исследования проводятся при финансовой поддержке государства в лице Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках реализации федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы (соглашение от №8267 от 10.08.2012).

Ключевые слова: *Bacillus mycoides*, фаги, реакция нарастания титра фага, параметры, объекты санитарного надзора.

В статье представлены результаты исследований по разработке схемы ускоренной биоиндикации бактерий *Bacillus mycoides* в объектах санитарного надзора методом постановки реакции нарастания титра фага. Время исследования составляет 25 часов. Определяемая при постановке реакции нарастания титра фага концентрация микроорганизмов – 10^2 м.к. бактерий *B. mycoides* в 1 мл водопроводной воды и 10^3 м.к. бактерий *B. mycoides* – в 1 г мяса и пряностей.

Введение. В настоящее время установлено, что бактерии рода *Bacillus*: *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus weihenstephanensis* составляют таксономическую группу «*Bacillus cereus*». Известно, что эту группу объединяют сходные морфологические свойства, высокая гомология и сходная организация геномов, отличающаяся относительно низким содержанием ГЦ-пар и наличием больших плазмид, способных в эксперименте к внутри- и межвидовой передаче [1]. По литературным данным, вышеперечисленные виды бактерий рода *Bacillus* довольно сложно поддаются идентификации на основе фенотипических

и генетических особенностей [2,3]. Поэтому создание биопрепарата для идентификации бактерий *Bacillus mycoides* на основе бактериофагов – это актуальная задача, решение которой позволит частично снять вопрос об однозначной идентификации вышеперечисленного контаминанта пищевого сырья и продуктов питания. Успешному решению проблем идентификации группы «*Bacillus cereus*» будет способствовать комплексный анализ штаммов группы, чье систематическое положение вызывает сомнения, на основе определения наиболее специфических фенотипических свойств в сочетании с ПЦР с праймерами к нескольким плазмидным и хромосомным локусам, MLVA и MLST [4].

Цель и задачи исследований

Разработать схему биоиндикации бактерий *Bacillus mycoides* в пищевом сырье и продуктах питания.

Для достижения поставленной цели необходимо определить параметры постановки реакции нарастания титра фага с биопрепаратом на основе фага *B. mycoides* и разработать схему постановки реакции нарастания титра фага с образцами объектов санитарного надзора.

Материалы и методы исследований.

Штамм бактерий *B. mycoides* 537, полученный из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина». Штамм бактериофага *B.мус* – 5 серии УГСХА, выделенный из пробы почвы п. Тушна Ульяновского района Ульяновской области в 2011 году.

В качестве объектов исследования использовали пробы водопроводной воды, красного молотого перца, корицы, говядины и баранины.

Обнаружение бактерий *B. mycoides* в водопроводной воде и пищевых продуктах

проводили с помощью реакции нарастания титра фага. Реакцию нарастания титра фага ставили по методикам, описанным Э. Каттер и А. Сулаквелидзе [5], С.Н. Золотухиным [6] и М.А. Юдиной [7].

Результаты исследований. Первоначально нами были выделены и изучены биологические свойства бактериофагов *Bacillus* [8,9]. Проведены эксперименты с использованием мясо-пептонного бульона (МПБ), контаминированного 18-часовой индикаторной культурой (*B. mycoides* 537) в концентрации от 10^1 до 10^5 м.к./мл. В качестве контроля был использован интактный МПБ. Учет результатов проводили через 18 часов инкубирования, согласно оценке, предложенной В.Я. Ганюшкиным (1988) (табл. 1).

Экспериментальным путем нами установлено, что количество фаговых частиц в опытной пробирке более чем в 5 раз превышает количество фаговых частиц в контрольной пробе, при контаминации бактериями *B. mycoides* МПБ в концентрации 10^2 м.к./мл (табл. 2).

Далее, для определения оптимального времени, обеспечивающего наиболее полное взаимодействие исследуемого фага

Таблица 1

Оценка реакции нарастания титра фага (РНФ)

Увеличение количества корпускул индикаторного фага в опытной пробе (пробирка №1) в отношении к количеству корпускул в контроле (пробирка №3)	Оценка
Увеличение в 2,5 раза Увеличение от 3 до 5 раз Увеличение свыше 5 раз Увеличение более 10 раз	Сомнительная Слабо положительная Положительная Резко положительная

Таблица 2

Результаты исследований по подбору оптимальной концентрации бактерий

Объект исследования - контаминированный бактериями <i>B. mycoides</i> МПБ в дозе: (м.к. в 1 г)	Контроль индикаторного фага	Контроль свободного фага	Опыт	Увеличение (раз)
	Количество негативных колоний фага			
10 ⁴	56 ± 3,7	-	Полный лизис	Более 10
10 ³	56 ± 3,7	-	392±4	7
10 ²	56 ± 3,7	-	280±7	5
10 ¹	56 ± 3,7	-	112±2	2

Таблица 3

Результаты исследований по подбору времени контакта исследуемого материала с фагом

Время контакта исследуемого материала с фагом (часы)	Количество <i>Bacillus mycoides</i> , обнаруживаемое с помощью	Время исследований (в часах)
6	10^2	25
10	10^2	29
16	10^2	35
24	10^1	43

с бактериями, нам необходимо было провести эксперименты на тест-объекте (в данном случае МПБ, контаминированный *B. mycoides* 537). Это было необходимо для выявления временного показателя, характеризующего наиболее полное взаимодействие фага и индикаторной культуры, при сохранении остальных параметров постановки реакции нарастания титра фага (РНФ) (установлена оптимальная концентрация бактерий, температура культивирования – 37 °C).

Схема постановки эксперимента (рис. 1): контаминированный бактериями *B. mycoides* 537 в концентрации 10^2 , не подращивали в условиях термостата, а сразу же после встряхивания колб в шуттель-аппарате вносили в пробирки. Для каждого опыта использовали по три комплекта из 3 пробирок. В пробирки № 1 и № 2 вносили исследуемый материал из колб в количестве 9 мл. В пробирку № 3 вносили 9 мл стерильного МПБ. Затем в пробирки № 1 и № 3 добавляли по 1 мл индикаторного фага в концентрации 10^4 фаговых корпускул в миллилитре, в пробирку № 2 вносили 1 мл стерильного МПБ и помещали в термостат при температуре 37 °C: первый комплект на 6 часов, второй – на 10 часов, третий – на 16 часов, четвертый – на 24 часа. Время для экспозиции подбирали эмпирическим путем. По окончании инкубации из каждой пробирки брали по 0,25 мл материала и вносили в пробирку с 4,5 мл МПБ (для получения в контроле на индикаторный фаг сосчитываемого количества негативных колоний). Содержимое всех пробирок фильтровали через мембранные фильтры фирмы Millipore (filter type: 0,22 μ m GV) и подвергали дальнейшему исследованию

методом агаровых слоев по Грациа. Накануне опыта по чашкам разливали 1,5-процентный мясопептонный агар. Перед использованием чашки подсушивали в термостате 15-20 минут. Индикаторные выращивались в условиях термостата в течение 18 часов при 37°C на мясо-пептонном бульоне. Стерильно подготовленный 0,7%-ный мясопептонный агар, разлитый в пробирки по 2,5 мл, расплавляли и остужали до 46-48 °C. Исследуемый на наличие бактериофага субстрат в количестве 1,0 мл помещали в 2,5 мл 0,7%-ного мясопептонного агара, туда же вносили 0,2 мл индикаторной культуры. Все быстро и тщательно перемешивали вращением пробирки в ладонях и выливали на поверхность 1,5%-ного МПА. Смесь осторожными вращательными движениями распределяли по поверхности мясо-пептонного агара. Чашки оставляли на горизонтальной поверхности с приоткрытыми крышками на 30 минут, до полного застывания агара, затем инкубировали в термостате при 37°C в течение 18 часов.

Результаты исследований позволяют считать наиболее оптимальным временной режим реакции нарастания титра фага (РНФ) при 6-часовой экспозиции исследуемого материала с фагом без дополнительного подращивания микроорганизмов, находящихся в исследуемом субстрате. В данном опыте время исследования - 25 часов (0,5 часа – подготовка реакции + 6 часов – время экспозиции субстрата с фагом + 0,5 часа – постановка реакции (метод агаровых слоев по Грациа) + 18 часов – время термостатирования), нам удалось провести индикацию бактерий *B. mycoides* в концен-

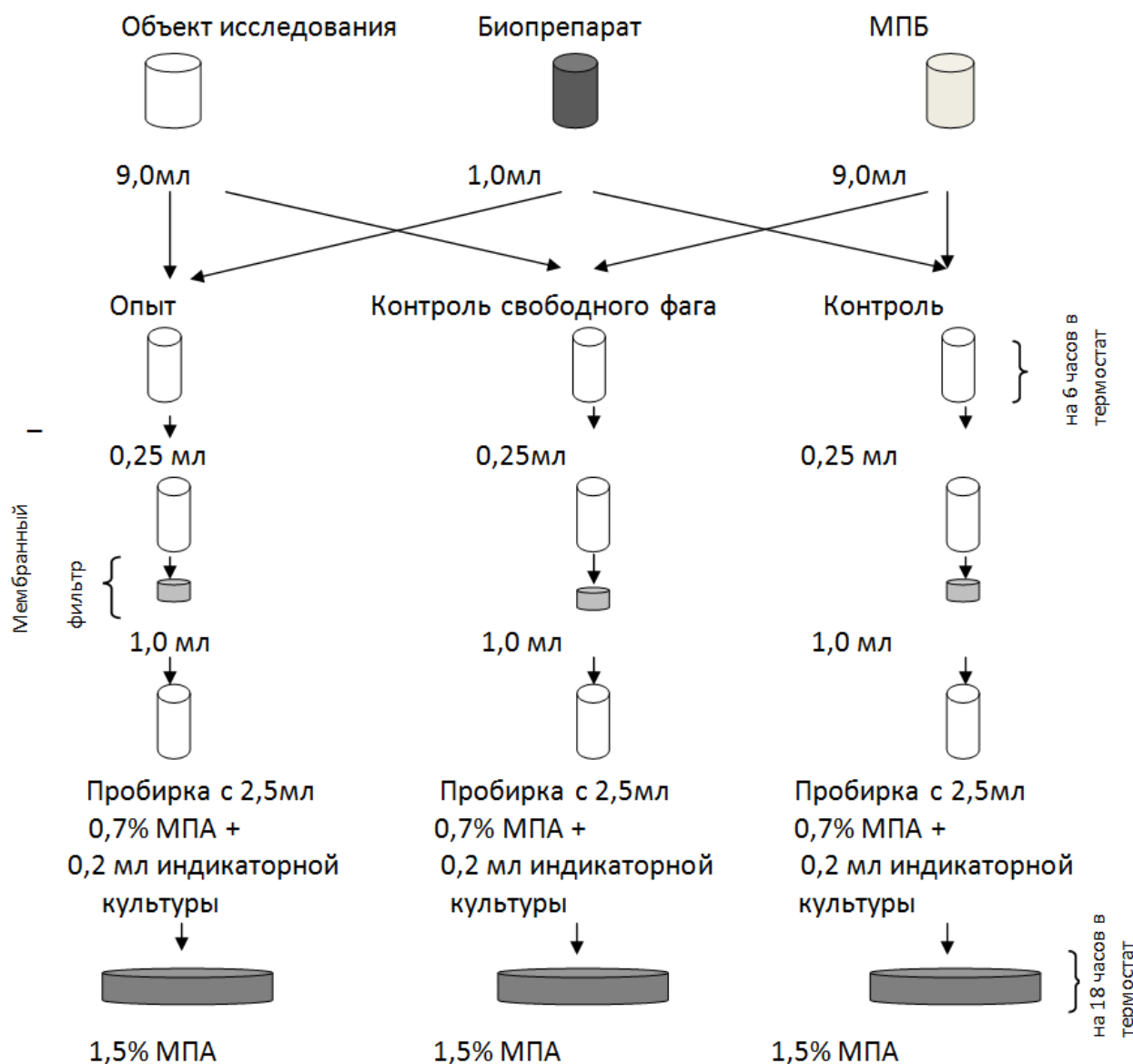


Рис. 1 - Схема постановки реакции нарастания титра фага с использованием биопрепарата на основе бактериофага *B. mycoides*

трации 10^2 м.к. в миллилитре исследуемого субстрата (физическое состояние субстрата - жидкость). Увеличение времени инкубирования исследуемого материала с фагом до 10-24 часов не повышает чувствительность метода (табл. 3).

Следующим этапом наших исследований была отработка схемы постановки реакции нарастания титра при помощи селекционированного бактериофага на объектах санитарного надзора, из которых наиболее часто выделяют бактерий *B. mycoides*.

Для того чтобы оценить эффективность использования РНФ для обнаружения бактерий *B. mycoides* в объектах санитарного надзора, исследовали образцы водопро-

водной питьевой воды, красного молотого перца, корицы молотой, говядины и баранины.

Пробы образцов объектов санитарного надзора (водопроводная вода, красный молотый перец, корица молотая, говядина и баранина) в объеме 10 г (мл) вносили в колбы и искусственно контаминировали 18-часовым штаммом *Bacillus mycoides* 537 в концентрации $10^1 - 10^5$ м.к./мл. Пробы мяса (кусочки говядины и баранины) растирали в фарфоровой ступке.

По результатам проведенной серии опытов установлено, что увеличение титра фага *B. мус.* 5 серии УГСХА в 5 раз произошло при концентрации 10^2 м.к. бактерий *B.*

mycoides 537 в 1 мл водопроводной воды и 10^3 м.к. бактерий *B. mycoides* 537 – в 1 г красного молотого перца, корицы молотой, говядины и баранины.

Современная микробиология не рассматривает бактерии *B. mycoides*, как опасный для здоровья человека контаминант пищевых продуктов. Анализ литературных данных показывает, что в настоящее время активно изучаются плазмиды, содержащие гены, ответственные за синтез основных факторов патогенности – токсинов и капсулы, бактерий *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis* [1,2,3,4]. На другие бактерии группы «*Bacillus cereus*» не обращают должного внимания. Однако нет гарантии, что микроорганизм, являющийся почвенным сапрофитом, часто выделяемый из продуктов питания при признаках их порчи [10,11], не будет в скором времени носителем плазмид, характерных *B. anthracis* и *B. cereus*.

Выводы. В результате проведенных исследований были выполнены поставленные задачи. Доказана возможность применения РНФ с целью обнаружения бактерий *B. mycoides* в объектах санитарного надзора, позволяющая сократить время исследования, уменьшить расход питательных сред и лабораторной посуды, повысить эффективность обнаружения картофельной палочки.

Библиографический список

1. Еременко, Е.И. Группа бактерий «*Bacillus cereus*» - проблемы идентификации и таксономии / Е.И. Еременко // Медицинский вестник Северного Кавказа. – 2008. - №3. – С. 57-60.
2. Cerif, A. *Bacillus anthracis* Diverges from Related Clades of the *Bacillus cereus* Group in 16S-23S Ribosomal DNA Intergenic Transcribed Spacers Containing tRNA Genes / A. Cerif, S. Borin, A.A. Pizzi [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 2003. – vol.69. - №1. – P. 33-40.
3. Феоктистова, Н.А. Разработка схемы исследования материала с целью выделения и ускоренной идентификации бактерий видов *Bacillus cereus* и *Bacillus subtilis* / Н.А. Феоктистова, А.Х. Мустафин, А.И. Калдыркаев // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. – 2011. - №

4(32). - С. 288-291.

4. Klevan, A. Evolution of pXO1 Backbone in the *Bacillus cereus* Group of Bacteria / A. Klevan, E. Helgason, N.J. Trounstein, A.-B. Kolsto. / Abstract book // *Bacillus – ACT 2007 – International Conference on Bacillus anthracis, B. cereus and B. thuringiensis*. – Oslo, Norway. - 2007. - P.93.

5. Золотухин, С.Н. Создание и разработка схем применения диагностических биопрепаратов на основе выделенных и изученных бактериофагов энтеробактерий: автореф. дис. ...докт. биол. наук: 03.00.07, 03.00.23 / Золотухин Сергей Николаевич. – Ульяновск, 2007. – 17с.

6. Каттер, Э. Бактериофаги. Биология и практическое применение / Э. Каттер, А. Сулаквелидзе. – М.: Научный мир, 2012. – С. 588-593.

7. Юдина, М.А. Разработка параметров постановки реакции нарастания титра фага для индикации бактерий *Bacillus mesentericus* в объектах санитарного надзора / М.А. Юдина, Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев [и др.] // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2012. – № 3 (19). – С.69–73.

8. Феоктистова, Н.А. Методы выделения бактериофагов бактерий *Bacillus*/ В.А. Макеев, М.А. Юдина, А.И. Калдыркаев // Вестник Ветеринарии. – 2011. - № 4(59). – С.88-89.

9. Васильев, Д.А. Характеристика биологических свойств бактериофагов вида *Bacillus subtilis* / Золотухин С.Н., Хайруллин И.Н., Калдыркаев А.И. [и др.] // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2011. - № 1 (13). – С.79-84

10. Очирова, Л.А. Микробиологическая оценка безопасности пищевых продуктов: автореф. дис. ...канд. техн. наук: 16.00.03 / Очирова Луиза Андреевна. – Барнаул, 2008. – 12с.

11. Суслова, М.Ю. Распространение и разнообразие спорообразующих бактерий рода *Bacillus* в водных экосистемах: автореф. дис. ...канд. биол. наук: 03.00.16, 03.00.07 / Суслова Мария Юрьевна. – Иркутск, 2007. – С.3-4.