

# Разработка и оценка качества отечественной питательной среды для идентификации *Bacillus cereus* и *Bacillus subtilis*

А.Ю.Иванова, О.В.Полосенко, А.П.Шепелин

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Московская область, Российская Федерация

Бактериологический метод, позволяющий выделить патоген из любого исследуемого объекта, характеризуется высокой специфичностью за счет внесения селективных добавок. Наиболее распространенный метод идентификации бактерий *Bacillus cereus* и *Bacillus subtilis* основан на выделении чистой культуры на желточном агаре. Разработанная отечественная питательная среда – «Желточный агар с маннитом и феноловым красным, основа» (МYP-агар) – обладает хорошими селективными и дифференцирующими свойствами, может использоваться для выделения и подсчета *B. cereus* из пищевых продуктов, кормов для животных и объектов окружающей среды. Проведена специфическая оценка биологических свойств МYP-агара на тест-штаммах, показаны дифференцирующие свойства среды, позволяющие идентифицировать микроорганизмы *B. cereus*, *B. subtilis* уже на этапе первичного посева. МYP-агар дополнительно может использоваться для выявления и идентификации патогенных стафилококков.

**Ключевые слова:** *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, стафилококки, бактериологический метод, МYP-агар, среда КМАФАнМ, среда TSA

**Для цитирования:** Иванова А.Ю., Полосенко О.В., Шепелин А.П. Разработка и оценка качества отечественной питательной среды для идентификации *Bacillus cereus* и *Bacillus subtilis*. Бактериология. 2022; 7(1): 18–24. DOI: 10.20953/2500-1027-2022-1-18-24

## Development and evaluation of the quality of the domestic nutrient medium for the identification of *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis*

A.Yu.Ivanova, O.V.Polosenko, A.P.Shepelin

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation

A bacteriological method making it possible to isolate a pathogen from any object under study has been characterized by high specificity due to selective additives introduced. The most common method of *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* identification relies upon the isolation of pure culture on egg yolk agar. The domestic egg yolk agar supplemented with mannitol and phenolic red (MYP Agar Base) possesses good selective and differentiating properties to be used for isolating and counting *B. cereus* bacilli in food, animal feed and environmental specimens. Biological properties of MYP agar against test strains were specifically assessed. Differentiating properties of the medium allowing the identification of *B. cereus* and *B. subtilis* microorganisms as early as at the initial plating have been demonstrated. MYP agar can be also used to detect and identify pathogenic staphylococci.

**Key words:** *B. cereus*, *B. subtilis*, staphylococci, bacteriological method, MYP-agar, NMAFAnM medium, TSA medium

**For citation:** Ivanova A.Yu., Polosenko O.V., Shepelin A.P. Development and evaluation of the quality of the domestic nutrient medium for the identification of *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis*. Bacteriology. 2022; 7(1): 18–24. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2022-1-18-24

### Для корреспонденции:

Полосенко Ольга Вадимовна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник сектора микробиологических исследований ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», 26  
Телефон (4967) 31-2170  
E-mail: polosenko@obolensk.org

Статья поступила 17.02.2022 г., принята к печати 30.03.2022 г.

### For correspondence:

Olga V. Polosenko, PhD (Biological Sciences), Leading Researcher, Microbiological Research Unit, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Address: 26 "Quarter A" territory, 142279, Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation  
Phone: (4967) 31-2170  
E-mail: polosenko@obolensk.org

The article was received 17.02.2022, accepted for publication 30.03.2022

**М**икроорганизмы рода *Bacillus* могут быть возбудителями серьезных инфекционных заболеваний. В роду *Bacillus*, насчитывающем 263 вида, выделяют группу *Bacillus cereus sensu lato*, представленную тремя основными видами: *B. cereus*, *B. thuringiensis* и *B. anthracis*. Это деление было признано к началу 1990-х гг., потому что каждый из видов проявлял различные фенотипические черты [1].

Бактерии *B. cereus* способны при определенных условиях вызывать у человека широкий спектр заболеваний, включающий пищевые токсикоинфекции, системные и местные гнойные инфекции. Впервые этиологическая роль *B. cereus* при пищевых отравлениях была изучена и описана Naugle в 1950 г. [2]. Начиная с 1951 г. накопились сообщения об острых желудочно-кишечных заболеваниях у человека, вызываемых *B. cereus* [3]. По данным Центра по контролю и профилактике заболеваний (CDC), в США ежегодно регистрируется более 60 тыс. случаев заболеваний, вызванных *B. cereus*. Изучение роли *B. cereus* при пищевых отравлениях в нашей стране начато лишь в последние годы [4].

Основной причиной инфицирования человека является употребление в пищу недостаточно термически обработанных мясных и рыбных блюд, невымытых овощей, непастеризованного молока и некоторых других продуктов. Особенно быстро *B. cereus* размножается в измельченных продуктах (фарш, котлеты, колбаса, кремы). В сырье допускается не более 100 клеток в 1 г, в стерилизованных консервах присутствие *B. cereus* не допускается. Споры *B. cereus* термостойчивы и могут сохраняться в продукте не только при обычной кулинарной обработке, но даже и при стерилизации консервов. В связи с этим контроль *B. cereus* в ряде продуктов является обязательным санитарно-эпидемиологическим показателем, утвержденным в СанПиН 2.3.2.1078-01 [5].

Кроме инфекций, связанных с пищевым отравлением, *B. cereus* была выявлена при множестве других клинических состояний. Сообщалось о молниеносном сепсисе, менингите и абсцессах головного мозга, эндофтальмите, эндокардите, остеомиелите, кожной инфекции по типу газовой гангрены и т.д. В последние годы появились сведения о пневмониях, вызываемых *B. cereus*. Так, Hoffmaster A.R. et al. [6] сообщают о выделении из слюны и крови больного пневмонией человека штамма *B. cereus* G9241, имеющего плазмиду pBCX01, гомология которой с плазмидой pX01 *B. anthracis* составила 99,6%. При проведении диагностических тестов у полученного изолята было обнаружено сходство с сибиреязвенным микробом. Наблюдалась пневмония с летальными исходами, при которых выделяли штаммы *B. cereus*, продуцирующие токсин, подобный сибиреязвенному [1, 7, 8].

На поверхности плотных питательных сред, таких как мясопептонный агар (МПА), триптон-соевый агар (ТСА) и ряд других неселективных сред, колонии *B. cereus* крупные, плоские, распластанные, белого цвета. Рост этого микроорганизма на жидких питательных средах сопровождается помутнением бульона, образованием хлопьевидного осадка белого цвета (у 25–30% штаммов) и нежной пленки белого цвета на поверхности среды.

Первоначально, когда этот микроорганизм изучался главным образом как почвенный, для его выделения использовался обычный желточный или кровяной агар. В настоящее

время для его выделения рекомендуют использовать селективные среды: триптон-соевый полимиксиновый бульон (TSPB), среду Донован, среду Никодемуса, среду Моссея, желточный агар с полимиксином, пируватом, яичным желтком, маннитом и бромтимоловым синим (РЕМВА), солевой полимиксиновый агар с ТТХ (2,3,5-трифенилтетразолий хлористый) и др. [4, 9].

Проведение широких исследований по изучению этиологической роли данного микроорганизма при пищевых отравлениях у человека потребовало разработки новых питательных сред, позволяющих выделять данный микроорганизм из сильно загрязненных микрофлорой объектов.

*B. subtilis* (сенная палочка) также является возбудителем порчи многих пищевых продуктов [8]. Широко распространена в окружающей среде. *B. subtilis* относится к транзитным (проходящим с кормовыми массами) просветным микроорганизмам, присутствует в фекалиях всех животных в больших количествах, так как в обычных условиях поступает с кормами.

Согласно СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней» *B. subtilis* не относится к патогенным для человека микроорганизмам, но может быть санитарно-гигиеническим показателем загрязнения микроорганизмами пищевых продуктов и может приводить к отравлениям при их употреблении [10].

В соответствии с требованиями промышленной стерильности консервированных пищевых продуктов, по микробиологическим показателям безопасности допускается содержание спорообразующих мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов группы *B. subtilis* не более 11 клеток в 1 г (см<sup>3</sup>) продукта [11].

Штаммы в составе пробиотических препаратов отбираются по выраженности антагонистических свойств к патогенной микрофлоре. Они продуцируют большое количество антибиотических и других веществ, подавляющих многие микроорганизмы. *B. subtilis* используют в промышленности при производстве антибиотиков класса полимиксины (с бактерицидным действием в отношении грамтрицательных бактерий). Имеют выраженные ферментативные свойства, улучшают переваримость корма. Являются представителями гнилостной микрофлоры за счет ярко выраженных протеолитических свойств [12].

Описаны случаи эндокардитов, энцефаломиелитов, пневмоний и даже летальных исходов, обусловленных *B. subtilis*. Исходя из этого следует, что близкородственные спорообразующие сапрофиты могут быть потенциально опасными для человека [13, 14].

Бактерии неприхотливы и хорошо растут на простом агаре, в бульоне, на средах с растительными остатками и синтетических питательных средах для гетеротрофов. На плотных питательных средах образуются сухие, мелкие, морщинистые, бархатистые колонии с волнистым краем розового, серого цвета или полностью прозрачные. На поверхности жидких сред после инкубации появляется тонкая пленка с беловатым налетом, а на дно пробирки выпадает осадок. Помимо разложения белков эти бактерии способны разлагать пектиновые вещества, полисахариды растительных тканей, сбраживать углеводы.

С учетом этиологической роли *B. cereus* и *B. subtilis* при пищевых отравлениях у человека возникает научный и практический интерес к бактериям этого вида. Кроме того, представители родов *Bacillus*, в том числе *B. cereus* и *B. subtilis*, относятся к микроорганизмам, способным вызывать заболевания или способным осуществлять либо опосредовать передачу генов антибиотикорезистентности [11].

Все вышеизложенное привлекает к данным микроорганизмам внимание все большего и большего числа исследователей. А выделение и идентификация *B. cereus* и *B. subtilis* при санитарно-микробиологическом анализе различных объектов является актуальной задачей для обеспечения максимально возможной их безопасности.

Наиболее распространенный (классический) метод идентификации этого вида бацилл основан на выделении чистой культуры, но внутривидовое разграничение бацилл *B. cereus* и *B. subtilis* на традиционных неселективных питательных средах затруднено. В связи с этим вопрос о разработке достоверного культурального метода выделения и идентификации бактерий *B. cereus* от *B. subtilis* остается актуальным. Достоверно типировать *B. subtilis* от *B. cereus* можно, руководствуясь описанием морфологии колоний и отсутствием лецитиназной активности, с использованием желточных питательных сред [4].

Желточные селективные питательные среды выпускаются ведущими зарубежными производителями: MYP agar Mossel – Агар желточный с маннитом, полимиксином и феноловым красным (Merck) – для определения, учета и выделения *B. cereus*; MYP Agar Base – Основа желточного агара с полимиксином (HiMedia) – для выделения и идентификации клинически значимых бацилл и стафилококков; *Bacillus Cereus Selective Agar Base* – основа селективного агара для *B. cereus* (Pronadisa) – для выделения и подсчета *B. cereus* из продуктов питания.

Для выявления и подсчета наиболее вероятного числа жизнеспособных презумптивных *B. cereus* по стандартам ГОСТ ISO 21871-2013 российские методики предполагают использование селективной среды – агара с маннитом, яичным желтком и полимиксином (MYP) лабораторного приготовления [9].

В отечественной практике питательная среда в сухом виде не производится, поэтому существует необходимость ее разработки в рамках программы импортозамещения, одной из главных задач которой является придание отечественной экономике хороших конкурентоспособных свойств.

**Цель исследования:** провести качественную оценку питательной среды (MYP-агар) для выделения и дифференциации *B. cereus*, *B. subtilis*, разработанной на основе отечественных белковых компонентов в сравнении с неселективными питательными средами.

## Материалы и методы

**Питательные среды.** В исследовании использовали среды производства ФБУН ГНЦ ПМБ: питательную среду для определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (среда КМАФАнМ) ТУ 20.59.52-260-78095326-2017, МПА ТУ 20.59.52-286-78095326-2018, ТСА ТУ 9385-254-78095326-

2016. Испытуемой средой служил желточный агар с маннитом и феноловым красным, основа (MYP-агар) ТУ 20.59.52-351-78095326-2021. В качестве контроля использовали агар с маннитом, яичным желтком и полимиксином (MYP-агар) лабораторного приготовления согласно ГОСТ ISO 21871-2013 [9]. В питательные среды (MYP-агар) вносили селективную добавку (полимиксин В) производства BioFroxx.

Эмульсию яичного желтка готовили по общепринятой методике, включающей приготовление желточной взвеси, полученной из желтка, асептически выделенного из яйца и внесенного в изотонический раствор хлорида натрия [9].

**Тест-штаммы.** Для биологического контроля питательных сред были использованы тест-штаммы микроорганизмов из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболонск»: *B. cereus* ATCC 10702 NCTC 8035, *B. subtilis* ATCC 6633 NCTC 10400, *Staphylococcus aureus* FDA 209-P ATCC 6538-P, *Escherichia coli* 168/59 (O111:K58), *Pseudomonas aeruginosa* 27/99. Все использованные штаммы микроорганизмов типичны по своим культуральным, морфологическим и биохимическим свойствам.

Рост микроорганизмов на питательных средах оценивали количественным методом в соответствии с МУК 4.2.2316–08 «Методы контроля бактериологических питательных сред» [15]. Для этого исходные суспензии микроорганизмов для посева готовили в 0,9%-м растворе натрия хлорида по отраслевому стандартному образцу мутности СОС 42-28-85 (10 единиц мутности). Использовали рабочие разведения  $10^{-5}$  – для целевых культур тест-штаммов *B. cereus* ATCC 10702 NCTC 8035 и *B. subtilis* ATCC 6633 NCTC 10400; для тест-штамма *S. aureus* FDA 209-P ATCC 6538-P – разведение  $10^{-6}$ . Для оценки результатов при интерпретации ингибирующих свойств испытуемой среды нецелевых тест-штаммов *E. coli* 168/59 (O111:K58) и *P. aeruginosa* 27/99 использовали разведения  $10^{-4}$ .

## Результаты и обсуждение

Спорообразующие бациллы неприхотливы к питательным средам. Тем не менее отсутствуют единые критерии типизации патогенных бацилл и возникают трудности при их дифференциации с использованием неселективных питательных сред. На рис. 1, 2 наглядно продемонстрирован рост тест-штаммов *B. cereus* ATCC 10702 NCTC 8035 и *B. subtilis* ATCC 6633 NCTC 10400 на классических неселективных агаризованных питательных средах.

При росте на питательной среде КМАФАнМ через 24 ч инкубации при температуре 33°C рост тест-штамма *B. cereus* ATCC 10702 NCTC 8035 наблюдался в виде плоских, мелкобугристых, слегка вогнутых, матовых с волнистыми краями колоний диаметром 3,0–6,0 мм (рис. 1а). На МПА рост тест-штамма *B. cereus* ATCC 10702 NCTC 8035 – в виде крупных, расплывчатых, серовато-беловатых колоний с неровными краями, диаметром 3,0–6,0 мм (рис. 1б). Колонии *B. cereus* на ТСА через 24 ч представляли собой плоские, расплывчатые, с волнистыми краями колонии диаметром 3,0–5,0 мм (рис. 1в).

Тест-штамм *B. subtilis* ATCC 6633 NCTC 10400 при росте на питательной среде КМАФАнМ в течение 24 ч при температуре 33°C образовывал сухие колонии кремового цвета, па-



Рис. 1. Рост тест-штамма *B. cereus* ATCC 10702 NCTC 8035 на питательных средах: а – среда КМАФАНМ, б – МПА, в – TSA.

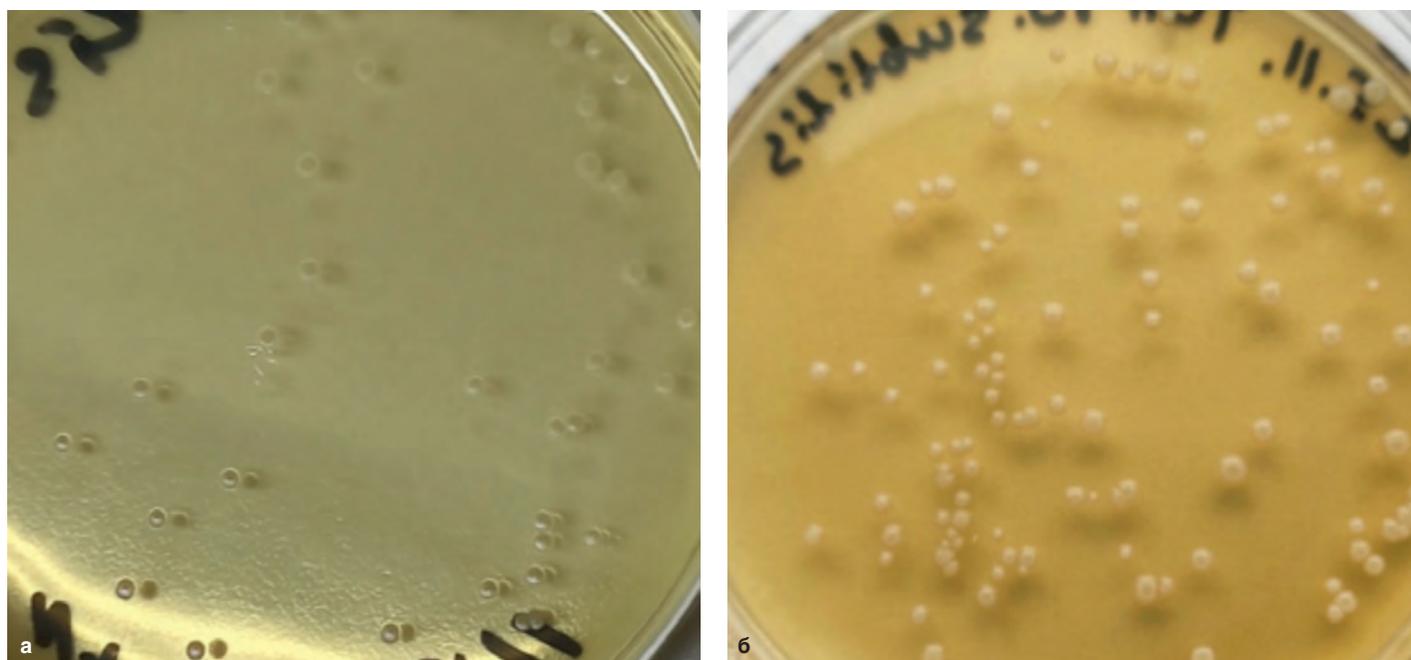


Рис. 2. Рост тест-штамма *B. subtilis* ATCC 6633 NCTC 10400 на питательных средах: а – среда КМАФАНМ, б – TSA.

стообразной консистенции с неровными краями, диаметром 2,0 мм (рис. 2а), на TSA – кремового цвета колонии с неровными изрезанными краями, диаметром 2,0–3,0 мм (рис. 2б).

Такие питательные среды не обладают селективными свойствами, в связи с чем дифференциация бактерий рода *Bacillus* затруднена и необходимо использовать питательные среды, имеющие в составе индикаторные красители, сахара и селективные добавки.

Поэтому МУР-агар явился средой, позволяющей определить фенотипические свойства выросших культур микроорганизмов и правильно их идентифицировать.

Бактериологическими лабораториями широко применяются питательные среды, в качестве белковых компонентов которых используются ферментативные гидролизаты мяса, рыбы, рыбной муки, мясокостной муки, казеина, желатина и т.д. При разработке МУР-агара проводились исследования по определению возможности использования качественных белковых основ. Наиболее доступным отечественным белковым компонентом при разработке МУР-агара в настоящее время является панкреатический гидролизат рыбной муки (ПГРМ) и панкреатический гидролизат казеина (ПГК) [16].

ПГК и ПГРМ имеют сопоставимую степень расщепления белка и полный набор незаменимых аминокислот, поэтому обеспечивают в питательных средах биологическую потребность достаточно широкого круга микроорганизмов в азотистом питании.

Оптимизация состава МУР-агара была проведена по основным факторам: содержанию белковой основы и витаминной добавки (дрожжевой экстракт). Концентрации остальных компонентов оставались на одном уровне с контрольной питательной средой лабораторного изготовления – средой сравнения, так как считались оптимальными. Изменение соотношения этих компонентов приводило к неспецифической опознавательной реакции.

Таким образом, состав МУР-агара, г/л: ПГРМ/ПГК – 10,0; дрожжевой экстракт – 1,00; маннит – 10,0; натрия хлорид – 10,0; феноловый красный – 0,025; агар бактериологический – 14,0. Состав селективной добавки (СД): полимиксина В сульфат – 0,012.

pH 7,0–7,4. Величина pH, определенная по МУК 4.2.2316-08, является условной величиной, которая соответствует значению pH готовой среды и может незначительно менять-

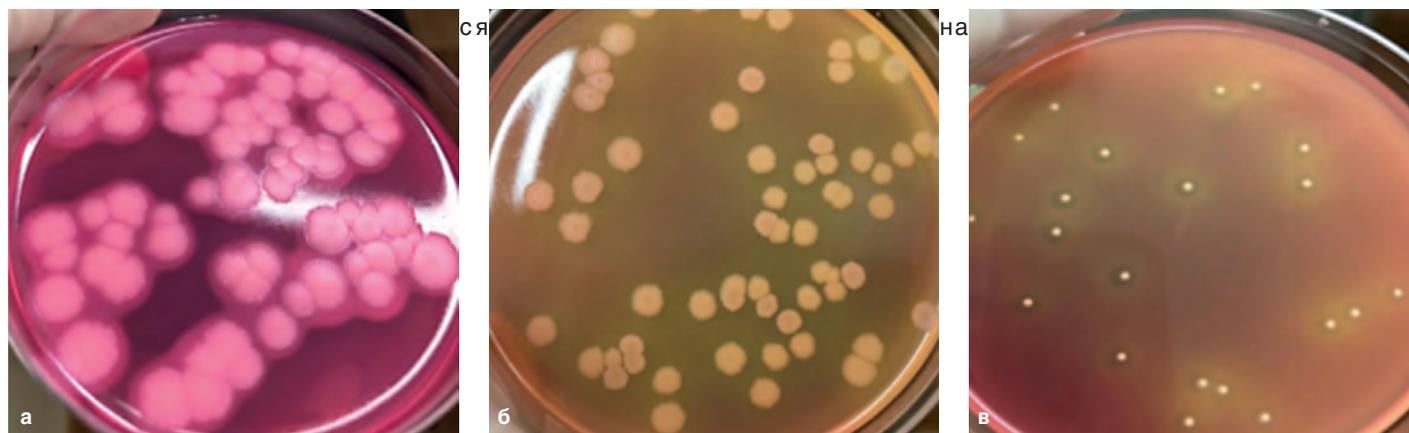


Рис. 3. Рост тест-штаммов на МYP-агаре ФБУН ГНЦ ПМБ: а – *B. cereus* ATCC 10702 NCTC 8035, б – *B. subtilis* ATCC 6633 NCTC 10400, в – *S. aureus* FDA 209-P ATCC 6538-P.

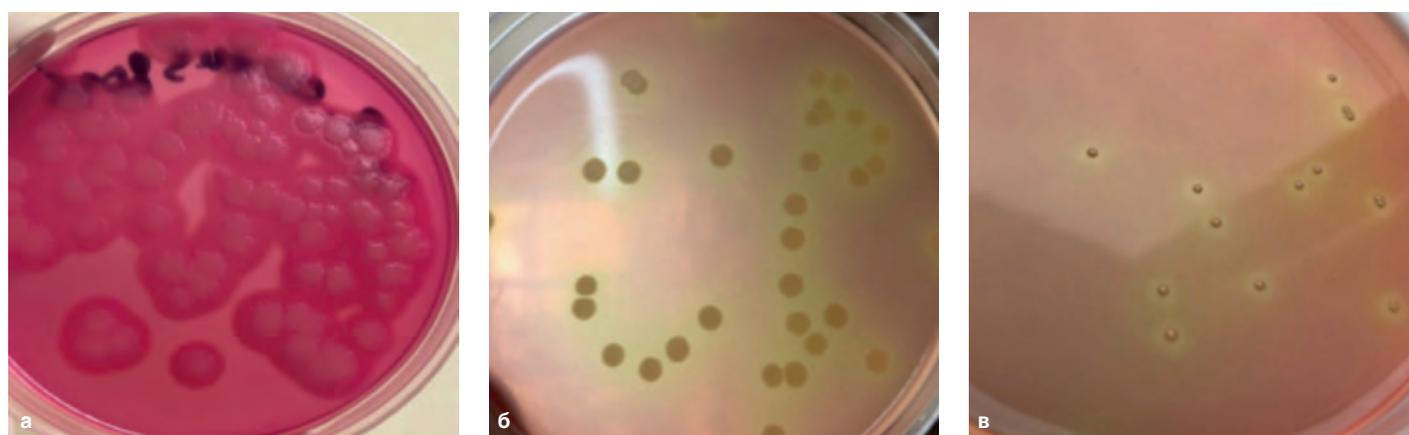


Рис. 4. Рост тест-штаммов на контрольной среде МYP-агар: а – *B. cereus* ATCC 10702 NCTC 8035, б – *B. subtilis* ATCC 6633 NCTC 10400, в – *S. aureus* FDA 209-P ATCC 6538-P.

после стерилизации. Пределы значения pH, указанные выше, учитывают отклонения pH после стерилизации среды.

Биологические показатели МYP-агара определяли после внесения в основу желточной эмульсии и селективной добавки.

Питательная среда разработана с учетом биохимических особенностей *B. cereus*. *B. cereus* – маннит-отрицательны. Присутствие маннита в среде позволяет дифференцировать сопутствующую маннит-положительную микробную флору, идентифицируемую по изменению цвета индикатора фенолового красного на желтый.

Для определения лецитиназной активности *B. cereus* в состав питательной среды МYP-агар включена желточная эмульсия. Нерастворимые продукты распада яичного желтка аккумулируются вокруг колоний *B. cereus*, образуя белый преципитат. Лецитиназная активность проявляется очень быстро, поэтому колонии *B. cereus* могут быть обнаружены раньше других видов, устойчивых к полимиксину.

На рис. 3а, 4а представлен рост тест-штамма *B. cereus* ATCC 10702 NCTC 8035 на питательной среде МYP-агар и контрольной в виде шершавых, плоских, матовых колоний розового цвета, окруженных кольцом плотного преципитата, диаметром 3,0–6,0 мм.

Бактерии *B. subtilis* в отличие от *B. cereus* ферментируют маннит и не проявляют лецитиназную активность, поэтому

среде образуют матовые желтоватого цвета колонии диаметром 2,0–3,0 мм с диффузным пожелтением среды (рис. 3б, 4б).

Рост тест-штаммов *B. cereus* ATCC 10702 NCTC 8035, *B. subtilis* ATCC 6633 NCTC 10400 из разведений  $10^{-5}$  и *S. aureus* FDA 209-P ATCC 6538-P из разведения  $10^{-6}$  регистрировался при температуре 33°C через 24 ч.

Некоторые ведущие производители используют МYP Agar Base для выделения и идентификации не только клинически значимых бацилл, но и стафилококков. Стафилококки хотя и относятся к легко распознаваемым и обнаруживаемым микроорганизмам и не требуют сложных диагностических приемов в микробиологической практике клинических лабораторий, однако часто возникают определенные трудности установления их потенциальной патогенности. Присутствие желтка в таких питательных средах дает возможность визуально наблюдать лецитовителлазную реакцию. Стафилококки, продуцирующие лецитиназу, разлагают яичный желток, в результате чего вокруг выросших колоний формируются характерные прозрачные и матовые зоны. Проявление лецитиназной активности является одним из важных показателей патогенности стафилококков [17].

На МYP-агаре маннит-положительный и продуцирующий лецитиназу *S. aureus* FDA 209-P ATCC 6538-P образует круглые блестящие колонии желтого цвета с зоной лецитиназной активности диаметром 1,0–2,0 мм (рис. 3в, 4в).

*B. cereus* устойчивы к концентрациям полимиксина, который подавляет рост таких грамотрицательных бактерий, как *E. coli* и *P. aeruginosa*. Внесение полимиксина необходимо, если предполагается высокое содержание сопутствующих микроорганизмов в материале проб.

При посеве тест-штаммов *E. coli* 168/59 (O111:K58), *P. aeruginosa* 27/99 из разведения  $10^{-4}$  при температуре 32°C через 24 ч на МYP-агарах рост полностью отсутствовал.

Таким образом, достоверным методом идентификации *B. cereus* и *B. subtilis* является бактериологический метод с использованием питательных сред. МYP-агар используется для выделения и изучения культурально-морфологических признаков бактерий *B. cereus* и *B. subtilis* и характеризуется высокой специфичностью за счет внесения селективной добавки. Среда обеспечивает внутривидовую дифференциацию *B. cereus* и *B. subtilis* по способности ферментировать маннит и проявлять лецитиназную активность.

### Заключение

Сухая отечественная питательная среда МYP-агар может быть использована для выделения и визуальной идентификации бактерий рода *Bacillus* из пищевых продуктов, кормов для животных, фармацевтических и косметических продуктов, воды, объектов окружающей и производственной среды. Полимиксин в составе среды ингибирует рост большинства энтеробактерий, тем самым облегчая выделение *B. cereus*, делает среду селективной и позволяет выделить патоген на этапе первичного посева.

Внедрение в практику современной отечественной питательной среды МYP-агар для санитарных исследований позволит отказаться от закупки дорогостоящих импортных препаратов. А создание и внедрение в бактериологическую практику питательной среды нового поколения, обладающей информативностью, производительностью и низкой стоимостью повысит надежность бактериологических исследований.

### Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

### Financial support

The work was carried out within the framework of the sectorial program of Rosпотребнадзор.

### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

### Conflict of interest

Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

### Литература

1. Микробиологический контроль качества пищевой продукции. Коллективная монография. Под ред. профессора Поповой АЮ и академика РАН Дятлова ИА. М.: Династия; 2020, 448 с.
2. Hauge S. Food poisoning caused by aerobic spore-forming bacilli. Journal of Applied Bacteriology. 1955;18:591-5.

3. Ахундова КА. Значение *B. cereus* в патологии человека. Журнал микробиологии. 1967;10:129-32.
4. Васильев ДА, Калдыркаев АИ, Феоктистова НА, Алёшкин АВ. Идентификация бактерий *Bacillus cereus* на основе их фенотипической характеристики. Научное издание. Ульяновск: НИИЦМиБ УлГСХА им. П.А.Столыпина; 2013, 98 с.
5. СанПин 2.3.2.1078-01 «Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов». Утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 06-06-2001.
6. Hoffmaster AR, Ravel J, Rasko DA, Chapman GD, Chute MD, Marston CK, et al. Identification of anthrax toxin genes in a *Bacillus cereus* associated with an illness resembling inhalation anthrax. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Jun 1;101(22):8449-54. DOI: 10.1073/pnas.0402414101
7. Rasko DA, Altherr MR, Han CS, Ravel J. Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms. FEMS Microbiol Rev. 2005 Apr;29(2):303-29. DOI: 10.1016/j.femsre.2004.12.005
8. Мудрецова-Висс КА, Масленникова ЕВ, Дедюхина ВП. Основы микробиологии. Учебник. М.: Издательство ИНФРА-М; 2014, 354 с.
9. ГОСТ ISO 21871-2013 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Метод обнаружения и подсчета наиболее вероятного числа *Bacillus cereus*. Введ.01-07-2014. М.: Стандартинформ; 2013, 15 с.
10. СанПиН 3.3686-21. Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней. Утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 28-01-2021.
11. Технический регламент Таможенного союза. О безопасности пищевой продукции: ТР ТС 021/2011. Введ. 2013-07-01. М.: РосТест; 2013. 242 с.
12. Данилевская НВ. Фармакологические аспекты применения пробиотиков. Ветеринария. 2005;11:6-10.
13. Bottone EJ. *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. Clin Microbiol Rev. 2010 Apr;23(2):382-98. DOI: 10.1128/CMR.00073-09
14. Ефимочкина НР. Новые бактериальные патогены в пищевых продуктах: экспериментальное обоснование и разработка системы контроля с применением методов микробиологического и молекулярно-генетического анализа. Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. М., 2010, 28 с.
15. МУК 4.2.2316-08 Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы. Методы контроля бактериологических питательных сред. Методические указания. Введ. 2008-01-18. М.: Федеральный центр гигиены и эпиднадзора Роспотребнадзора; 2008, 67 с.
16. Шепелин АП. Современное состояние и тенденции в разработке, производстве и применении питательных сред. Бактериология. 2016;1(1):42-7. DOI: 10.20953/2500-1027-2016-1-42-47
17. Полосенко ОВ, Шепелин АП, Ажержмачева НИ, Абаев ИВ. Клинические испытания новых питательных сред для выделения стафилококков. Клиническая лабораторная диагностика. 2021;66(2):115-21. DOI: 10.51620/0869-2084-2021-66-2-115-121

### References

1. Microbiological quality control of food products. Edited by Popova AYU, Dyatlov IA. Moscow: "Dinastiya" Publ.; 2020, 448 p. (In Russian).
2. Hauge S. Food poisoning caused by aerobic spore-forming bacilli. Journal of Applied Bacteriology. 1955;18:591-5.
3. Akhundova KA. The significance of *B. cereus* in human pathology. Zhurnal mikrobiologii. 1967;10:129-32. (In Russian).
4. Vasil'ev DA, Kaldyrkaev AI, Feoktistova NA, Aleshkin AV. Identification of *Bacillus cereus* bacteria based on their phenotypic characteristics. Ulyanovsk, 2013, 98 p. (In Russian).
5. SanPIN 2.3.2.1078-01 "Hygienic requirements for the safety and nutritional value of food products". Approved. Chief State Sanitary Doctor of the Russian Federation 06-06-2001. (In Russian).

6. Hoffmaster AR, Ravel J, Rasko DA, Chapman GD, Chute MD, Marston CK, et al. Identification of anthrax toxin genes in a *Bacillus cereus* associated with an illness resembling inhalation anthrax. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Jun 1;101(22):8449-54. DOI: 10.1073/pnas.0402414101
7. Rasko DA, Altherr MR, Han CS, Ravel J. Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms. *FEMS Microbiol Rev*. 2005 Apr;29(2):303-29. DOI: 10.1016/j.femsre.2004.12.005
8. Mudretsova-Viss KA, Maslennikova EV, Dedyukhina VP. Fundamentals of microbiology. Moscow: "INFRA-M" Publ.; 2014, 354 p. (In Russian).
9. GOST ISO 21871-2013 Microbiology of food and animal feed. Method of detecting and counting the most probable number of *Bacillus cereus*. Introduction. 01-07-2014. Moscow: "Standartinform" Publ.; 2013, 15 p. (In Russian).
10. SanPiN 3.3686-21. Sanitary and epidemiological requirements for the prevention of infectious diseases. Approved. Chief State Sanitary Doctor of the Russian Federation 28-01-2021. (In Russian).
11. Technical Regulations of the Customs Union. About food safety: TR CU 021/2011. Introduction. 2013-07-01. Moscow: "RosTest" Publ.; 2013.242 p. (In Russian).
12. Danilevskaya NV. Farmakologicheskie aspekty primeneniya probiotikov. *Veterinariya*. 2005;11:6-10. (In Russian).
13. Bottone EJ. *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. *Clin Microbiol Rev*. 2010 Apr;23(2):382-98. DOI: 10.1128/CMR.00073-09
14. Efimochkina NR. New bacterial pathogens in food products: experimental substantiation and development of a control system using methods of microbiological and molecular genetic analysis. Diss. Moscow, 2010, 28 p. (In Russian).
15. MUK 4.2.2316-08 Methods of control. Biological and microbiological factors. Methods of control of bacteriological nutrient media. Methodical instructions. Intr. 2008-01-18. Moscow: Federal Center for Hygiene and Surveillance, Rospotrebnadzor; 2008, 67 p. (In Russian).
16. Shepelin AP. Nutrient media: current status & trends in design, production and application. *Bacteriology*. 2016;1(1):42-7. DOI: 10.20953/2500-1027-2016-1-42-47 (In Russian).
17. Polosenko OV, Shepelin AP, Azhermacheva NI, Abaev IV. Clinical trials of new culture media for staphylococcus isolation. *Russian Clinical Laboratory Diagnostics*. 2021;66(2):115-21. DOI: 10.51620/0869-2084-2021-66-2-115-121 (In Russian).

#### Информация об авторах:

Иванова Анастасия Юрьевна, стажер-исследователь сектора микробиологических исследований ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Шепелин Анатолий Прокопьевич, доктор биологических наук, заместитель директора ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

#### Information about authors:

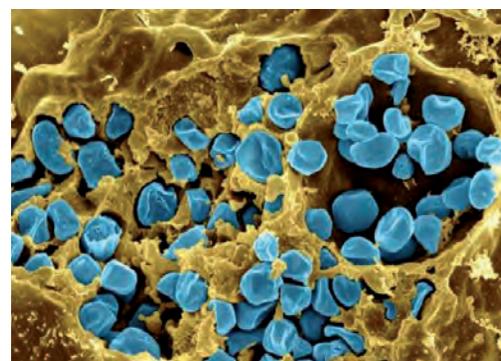
Anastasia Yu. Ivanova, Intern Researcher, Microbiological Research Unit, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor

Anatoly P. Shepelin, PhD, DSc (Biological Sciences), Deputy Director, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor

## НОВОСТИ НАУКИ

### Возбудитель туляремии остается вирулентным в течение нескольких месяцев в холодной воде

*Francisella tularensis*, возбудитель туляремии, может вызывать сезонные вспышки острого лихорадочного заболевания у людей, пик которого приходится на конец лета – осень. Механизмы его устойчивости в окружающей среде между вспышками плохо изучены. Одна из гипотез состоит в том, что *F. tularensis* образует биопленки в водной среде. В исследовании использовали два вирулентных штамма дикого типа: FSC200 (*F. tularensis* subsp. *Holarctica*) и Schu S4 (*F. tularensis* subsp. *Tularensis*) и три контрольных штамма: аттенуированный штамм живой вакцины (LVS; *F. tularensis* subsp. *Holarctica*), Schu S4 мутант DwbtI, который, как документально подтверждено, образует биопленки, и штамм с низкой вирулентностью U112 близкородственного вида *Francisella novicida*. Штаммы инкубировали в микрокосмах с соевым раствором (0,9% NaCl) в течение 24 нед. при 4°C и при 20°C, после чего измеряли жизнеспособность и образование биопленок. Эти температуры были выбраны для приблизительных зимних и летних температур пресной воды в Скандинавии соответственно. U112 и Schu S4 DwbtI образовывали биопленки, а штаммы *F. tularensis* FSC200 и Schu S4 и LVS – нет. Все штаммы показали более длительную жизнеспособность при 4°C по сравнению с 20°C. Штаммы U112 и FSC200 продемонстрировали замечательную долгосрочную устойчивость при 4°C, с только 1- и 2-кратным логарифмическим сокращением, соответственно, жизнеспособных клеток через 24 нед. Штамм Schu S4 показал более низкую выживаемость, не давая никаких жизнеспособных клеток к 20-й неделе. Через 24 нед. клетки штамма FSC200, но не Schu S4, все еще были полностью вирулентными у мышей. Эти результаты демонстрируют независимое от биопленки долгосрочное выживание патогенных *F. tularensis* subsp. *holarctica* в условиях, имитирующих перезимовку в водной среде.



Golovliov I, Bäckman S, Granberg M, et al.

Long-Term Survival of Virulent Tularemia Pathogens outside a Host in Conditions That Mimic Natural Aquatic Environments. *Appl Environ Microbiol*. 2021 Feb 26;87(6):e02713-20. DOI: 10.1128/AEM.02713-20