

В.А.Говорунова, Л.И.Маринин, Р.И.Миронова, М.В.Храмов, А.Н.Мокриевич, А.М.Баранов

## ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЯ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», Оболensk

Разработана дифференциально-диагностическая плотная питательная среда для выделения и идентификации возбудителя сибирской язвы. В состав среды входят: питательная основа (ферментативный гидролизат рыбьей костной муки), агар-агар, D (+)-сорбит, индикатор pH бромтимоловый синий и антибиотик широкого спектра действия (полимиксин). Среда позволяет дифференцировать по цвету и морфологии колоний вирулентные (капсулообразующие) и авирулентные (бескапсульные) штаммы *Bacillus anthracis*, а также близкородственные сапрофитные микроорганизмы.

*Ключевые слова:* питательная среда, возбудитель сибирской язвы, D(+)-сорбит, бромтимоловый синий, микроорганизмы.

V.A.Govorunova, L.I.Marinin, R.I.Mironova, M.V.Khramov, A.N.Mokrievich, A.M.Baranov

## Diagnostic Nutrient Media for Isolation and Identification of Anthrax Agent

State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk

Designed is a differential-diagnostic solid nutrient media for isolation and identification of anthrax agent. This media contains: nutrient base (enzymic hydrolysate of fishbone powder), agar-agar, D (+)-sorbit, pH indicator bromthymol blue, and broad-spectrum antibiotic (polymyxin). The media makes it possible to differentiate virulent (capsular) and avirulent (non-capsular) *Bacillus anthracis* strains, as well as closely related saprophyte microorganisms, depending upon the color and colony morphology.

*Key words:* nutrient media, anthrax agent, D(+)-sorbit, bromthymol blue, microorganisms.

Анализ большинства разработанных к настоящему времени питательных сред для выделения и дифференциации штаммов возбудителя сибирской язвы [2, 4] показал, что всем им свойственны те или иные недостатки. В некоторых случаях это нестабильность проявления дифференцирующих признаков, например, фосфатазообразования, продукции лецитиназы и других биохимических особенностей *B. anthracis* и близкородственных бацилл. В других – невозможность проведения внутривидовой дифференциации штаммов *B. anthracis* (вирулентных и аттенуированных). Это положение отражено в Постановлении Главного государственного санитарного врача Российской Федерации № 41 от 27.06.2008 г. «О мерах совершенствования мероприятий по профилактике сибирской язвы в Российской Федерации» в котором указано, что в настоящее время у нас в стране отсутствуют селективные питательные среды для выделения возбудителя сибирской язвы.

Целью настоящей работы являлась разработка плотной питательной среды для выделения и идентификации возбудителя сибирской язвы.

### Материалы и методы

*Штаммы микроорганизмов.* В работе использовали штаммы возбудителя сибирской язвы и других микроорганизмов из коллекции Государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии (ФБУН ГНЦ ПМБ).

*Питательные среды.* В качестве основы пита-

тельной среды использовали ферментативный гидролизат рыбьей костной муки производства ФБУН ГНЦ ПМБ (Оболensk).

*Химические реактивы и добавки.* D(+)-сорбит по ТУ 6-09-1588-87; бромтимоловый синий по ТУ 6-09-2086-77; полимиксин М-сульфат (Агрофарм, Россия); натрия гидроокись (NaOH) по ГОСТ 4328-77; спирт этиловый ректификованный по ГОСТ 18300-87; агар-агар микробиологический (Becton Dickinson Difco, США); перекись водорода по ГОСТ 177-88.

### Результаты и обсуждение

Одним из перспективных направлений развития экспресс-индикации возбудителей инфекционных заболеваний считается энзимоиндикационное, связанное с наличием у микроорганизма определенных биохимических свойств, отличающих его от других представителей данного рода. Это направление может быть реализовано посредством использования дифференциально-диагностических питательных сред. В состав таких сред входят: питательная основа, обеспечивающая размножение бактерий; химический субстрат, отношение к которому является диагностическим признаком для данного микроорганизма; цветной индикатор, изменение окраски которого свидетельствует о наличии у исследуемого микроорганизма ферментной системы к использованному субстрату.

При сравнительной оценке ферментативной активности штаммов *B. anthracis* и близкородственных

**Морфология и окраска колоний микроорганизмов рода *Bacillus*, выращенных на дифференциально-диагностической питательной среде**

Вид микроорганизма	Окраска колоний	Морфология колоний
Вирулентные штаммы <i>B. anthracis</i>	Желтая (желто-зеленая)	Колонии мелкие (1,5–2 мм), круглой формы с фестончатым краем, выпуклым центром, с нежной зернистой структурой, с ярким желтоватым ореолом вокруг колонии.
Аттенуированные штаммы <i>B. anthracis</i>	Зеленая (светло-зеленая)	Колонии среднего размера (3–6 мм), круглой формы, без выраженного центра, с однородной структурой, матовые.
<i>B. subtilis</i>	Желтая или сине-зеленая	Колонии крупные (4–8 мм), с выраженным фестончатым краем, поверхность плоская, бугристая, с выраженным центром.
<i>B. cereus</i>	Желтая или сине-зеленая	Колонии очень крупные (4–10 мм), с выраженным фестончатым краем, поверхность плоская, бугристая, без выраженного центра.
<i>B. thuringiensis</i>	Сине-зеленая	Колонии среднего размера (3–7 мм), круглой формы с фестончатым краем, с ярко окрашенным синим центром.

бацилл нами была установлена разница в их способности к утилизации сорбита. Эта особенность и позволила провести исследования по разработке плотной диагностической питательной среды для одновременного выделения и дифференциации сибиреязвенных культур и спорообразующих сапрофитов.

В ходе работ экспериментальным путем был подобран состав питательной среды, обеспечивающий оптимальные условия для роста и проявления биохимической активности тестируемых микроорганизмов, определены рабочие концентрации ферментируемого субстрата и регистрирующего его утилизацию индикатора. Установлено, что наилучшие результаты могут быть получены при использовании в качестве основы для питательной среды ферментативного гидролизата рыбкоостной муки. Оптимальная концентрация в среде D (+)-сорбита составила 2 %. В качестве индикатора утилизации сорбита был выбран бромтимоловый синий в конечной концентрации 0,003 %. Подавление роста неспецифической микрофлоры обеспечивалось за счет введения в состав среды антибиотика широкого спектра действия (полимиксина).

В результате была разработана дифференциально-диагностическая питательная среда следующего состава:

- панкреатический гидролизат рыбкоостной муки (ГРМ) – 20,0 г,
- агар-агар микробиологический – 15,0 г,
- раствор D(+)-сорбита 20 % – 100,0 мл,
- спиртовой раствор бромтимолового синего 1,6 % – 1,9 мл,
- полимиксин М сульфат – 25 мг,
- вода дистиллированная – до 1 литра.

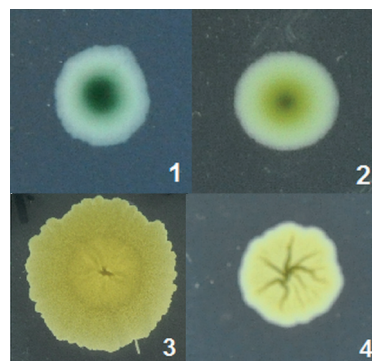
Для приготовления среды в дистиллированную воду добавляли гидролизат рыбкоостной муки, агар-агар, перемешивали и прогревали смесь при температуре 50–60 °С до полного растворения компонентов. Доводили pH среды до 7,2–7,4 добавлением NaOH. Стерилизовали среду автоклавированием при температуре (120±1) °С в течение 20 мин. Отдельно готовили: 20 % раствор D(+)-сорбита и стерилизовали кипячением; 1,6 % спиртовой раствор бромтимолового синего; навеску полимиксина М-сульфата.

В расплавленную питательную среду при температуре 45–50 °С стерильно добавляли раствор

D(+)-сорбита, спиртовой раствор бромтимолового синего и навеску полимиксина М-сульфата. После тщательного перемешивания среду разливали в чашки Петри слоем 2,0–2,5 мм; застывшая питательная среда должна иметь сине-зеленый цвет (цвет морской волны). Чашки с разлитой средой можно хранить до 1 месяца в плотно укуренных пакетах при температуре 2–4 °С.

Для проведения анализа исследуемый материал наносили на поверхность питательной среды в чашке Петри в объеме 0,1–0,2 см<sup>3</sup> и тщательно растирали стеклянным шпателем. Этим же шпателем последовательно растирали остатки культуры еще на 4–5 чашках для получения изолированных колоний. Посевы инкубировали в термостате при температуре (36±1) °С в течение 28–36 ч, после чего проводили визуальную идентификацию выросших колоний микроорганизмов на основании их морфологии и окраски (таблица).

В ходе проведенных работ [3] нами были апробированы 16 штаммов *B. anthracis* и 13 штаммов близкородственных сапрофитов. Сапрофиты на диагностической среде образовывали колонии сине-зеленого цвета. В дополнительных исследованиях других родственных сапрофитов были обнаружены штаммы, которые давали колонии желтого цвета, но по своей морфологии они четко дифференцировались от колоний *B. anthracis* (рисунок). Состав среды защищен патентом Российской Федерации [1].



Колонии микроорганизмов рода *Bacillus* на дифференциально-диагностической питательной среде (32 ч культивирования при (36±1) °С):

- 1 – колония *B. thuringiensis*; 2 – колония аттенуированного штамма *B. anthracis*; 3 – колония *B. cereus*; 4 – колония *B. subtilis*

Эксперименты по выделению штаммов *B. anthracis* из свежих и длительно хранившихся трупов животных, а также из образцов почвы потребовали введения в среду полимиксина для подавления роста посторонней микрофлоры.

Таким образом, разработанная дифференциально-диагностическая плотная питательная среда с дополнительным внесением антибиотика для выделения и идентификации возбудителя сибирской язвы позволяет дифференцировать по цвету и морфологии колонии вирулентных (капсулообразующих) и авирулентных (бескапсульных) штаммов *B. anthracis*, а также близкородственных сапрофитных микроорганизмов.

Авторы выражают благодарность В.М.Храмову за фотографии, представленные в статье.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Говорунова В.А., Мацаренко Г.В., Маринин Л.И., Степанов А.В. Плотная питательная среда для выявления возбудителя сибирской язвы. Патент РФ 2125610, опубл. 24.01.1999 г.
2. Егорова И.Ю., Селянинов Ю.О., Вологина И.В. Сравнительная оценка методов индикации *B. anthracis* в почве. Ветеринария. 2006; 6:26–30.
3. Маринин Л.И., Дятлов И.А., Мокриевич А.Н., Бахтеева И.В., Белова Е.В., Борзилов А.И. и др. Методы изучения биоло-

гических свойств возбудителя сибирской язвы. (Уч.-метод. пособие). М.: Гигиена; 2009. 304 с.

4. Методические указания. Лабораторная диагностика и обнаружение возбудителя сибирской язвы. МУК 4.2.2413-08. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2009. 67 с.

#### References (Presented are the Russian sources in the order of citation in the original article)

1. Govorunova V.A., Matsarenko G.V., Marinin L.I., Stepanov A.V. [Solid nutrient media for identification of anthrax agent]. RF Patent 2125610.
2. Egorova I.Yu., Selyaninov Yu.O., Vologina I.V. [Comparative evaluation of methods of *B. anthracis* indication in soils]. Veterinariya. 2006; 6:26–30.
3. Marinin L.I., Dyatlov I.A., Mokrievich A.N., Bakhteeva I.V., Belova E.V., Borzilov A.I. et al. [Methods of Study of Anthrax Agent Biological Properties. Study Guide]. M.: Gigiena; 2009. 304 p.
4. Methodic Regulations [Laboratory diagnostics and detection of anthrax agent]. MR 4.2.2413-08. M.: Rospotrebnadzor Federal Center of Hygiene and Epidemiology; 2009. 67 p.

#### Authors:

Govorunova V.A., Marinin L.I., Mironova R.I., Khramov M.V., Mokrievich, A.N. Baranov A.M. State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology. Obolensk, Moscow Region, 142279, Russia. E-mail: info@obolensk.org

#### Об авторах:

Говорунова В.А., Маринин Л.И., Миронова Р.И., Храмов М.В., Мокриевич А.Н., Баранов А.М. Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии. 142279, Московская обл., п. Оболensk. E-mail: info@obolensk.org

Поступила 30.03.12.