

УДК 602.3:579.6

## ВЫДЕЛЕНИЕ БАКТЕРИЙ *VACILLUS CEREOUS* ИЗ МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ

*Н.А. Феоктистова, кандидат биологических наук, доцент,  
8(8422) 55-95-47, feokna@yandex.ru,  
К.Г. Трифонова, студент, 8(8422) 55-95-47, usxa@yandex.ru,  
Э.Т. Гафурова, студент, 8(8422) 55-95-47, usxa@yandex.ru,  
А.Н. Антонова, студент, 8(8422) 55-95-47, usxa@yandex.ru,  
Д.А. Васильев, доктор биологических наук, профессор,  
8(8422)55-95-47, dav\_ul@mail.ru  
ФГБОУ ВО УльяновскаяГСХА*

**Ключевые слова:** *Bacillus cereus*, молочные продукты, контаминация, метод выделения, пробы

В статье описаны результаты исследований по выявлению бактерий рода *Bacillus* в молочных продуктах. Выделено из проб сметаны и плавленого сыра 3 культуры бактерий, которые были отнесены к видам *Bacillus cereus* и *Bacillus megaterium* на основании изучения биологических свойств.

Известно множество литературных данных, что молоко и молочные продукты могут быть контаминированы бактериями рода *Bacillus*. Так, Н. Станчева (1997), изучая состав липолитических микроорганизмов, выделенных из свежего овечьего молока машинной дойки, установила, что процент контаминации молока бациллами (*Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*) составляет 24, 24 %, за которыми следуют представители рода *Micrococcus*. В. Snezana et al., (1998) исследовали 114 образцов сырого молока на наличие бацилл и установили, что бациллы (*Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*) можно выделить даже после прогрева в течение 10 минут при 80 °С. S.Gaillard, I.Lequerinel, P. Mafart (1998), определяя содержание спорообразующих бактерий в пробах молока, установили, что после термической обработки молока чаще обнаруживались *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus coagulans* [1-4].

Плавленые сыры с добавками специй и ветчины также становятся потенциально контаминированными спорообразующими термофильными бактериями рода *Bacillus*. В сообщении С.Klug, К.Fehlhaber, U.Muller, Р. Braun (1998) приводятся данные о наличии спорообразующих аэробных бактерий в некоторых партиях колбас различных сортов, высказывается мнение, что причиной контаминации колбас являются добавляемые специи. Бактериологическое исследование более 100

проб различных специй (лавровый лист, перец, корица, сухой чеснок, сухая горчица) показало, что спорообразующие аэробные бактерии, более чем в половине случаев обнаруживаются в количестве до 8500 бактерий на 1 г пробы [5-8].

Цель работы – изучить молочные продукты (сметану, плавленный сыр, молоко питьевое коровье, сливочное масло) на наличие в них бактерий рода *Bacillus*.

В исследованиях применяли методики, опробированные сотрудниками кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ ФГБОУ ВО Ульяновская ГСХА [6-13].

Первоначально каждая навеска продукта (1 грамм) была подвергнута термостатированию при 37°C в течение 10-18 часов для перехода споровой формы искомым бактериям в вегетативную (соотношение 1:10 в среде обогащения ((Claus, 1955)). В 100 см<sup>3</sup> дистиллированной воды растворяли 10 г KNO<sub>3</sub>, 5 г пептона, 3 г мясного экстракта. Устанавливали pH 7,0, разливали в пробирки по 9 мл. стерилизовали при 120°C 15 минут.

Далее из предварительно «подрощенного» материала делали ряд последовательных десятикратных разведений: 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup>. 1 мл разведения высевался на чашку Петри при добавлении 9 мл мясо-пептонного агара с глюкозой и дрожжевым экстрактом температурой 38-42°C и производили посев штрихом на среду Донована, которую готовили без добавления полимиксина. Посевы культивировали в условиях термостата в течение 18 часов.

Результаты исследований представлены в таблице 1.

С чашек Петри было взято для дальнейших исследований по 1-2 типичных для изучаемых бактерий колонии. Выделение «чистой культуры» проводили по методу Дригальского.

У выделенных культур были изучены тинкториальные свойства. Установлено, что все выделенные бактерии – это крупные грамположительные палочки, расположенные цепочками или попарно, кислотоустойчивые. Затем изучаемые культуры были сгруппированы по культуральным свойствам (рост на жидкой и плотной питательных средах) в условные группы, описанные в таблице 2.

Следующий этап исследований был посвящен изучению биохимических свойств выделенных культур. Для типирования мы применяли ключ R.A. Slepecky, H.T. Hemphill [8], разработанный для первичной дифференциации бактерий родов *Bacillus* и *Paenibacillus* (табл.3).

Алгоритм применения ключа: при положительном или результа-

Таблица 1 – Количество бактерий, выделенных из проб молочных продуктов

Номер пробы	Количество БВППП, КОЕ/г
Сметана 1	$(1,2 \pm 0,3) \times 10^4$
Сметана 2	$(2,3 \pm 0,2) \times 10^3$
Сыр плавленый 1	$(0,6 \pm 0,1) \times 10^3$

Таблица 2 – Культуральные свойства выделенных бактерий рода *Bacillus*

Номер пробы	тип колоний	Характерные культуральные свойства	
		особенности роста на мясо-пептонном агаре с глюкозой и дрожжевым экстрактом	особенности роста на мясо-пептонном бульоне
Сметана 2	тип 1 (условная группа <i>B. cereus</i> )	Колонии плотной консистенции, белые, восковидные, круглые	Среда мутная, осадок трудно-разбиваемый, крошковатый, прочные пленка и пристеночное кольцо. При образовании пленки среда просветляется/
Сыр плавленый 1	тип 2 (условная группа <i>B. megaterium</i> )	Колонии слизистые, желтоватобелые	Растет в виде осадка на дне пробирки с помутнением среды
Сметана 1	тип 1 (условная группа <i>B. cereus</i> )	Колонии плотной консистенции, белые, восковидные, круглые	Среда мутная, осадок трудно-разбиваемый, крошковатый, прочные пленка и пристеночное кольцо. При образовании пленки среда просветляется/

те определения какого-либо биохимического свойства следующий этап, рекомендованный авторами, обозначен арабской цифрой по горизонтали и отражен буквенным обозначением по вертикали. Заключительным этапом дифференциации по ключу служит название вида микроорганизма.

Параллельно мы проводили исследования по дифференциации выделенных бактерий по схеме выделения и дифференциации бацилл первой морфологической группы по классической методике, составляющей основу идентификационных тестов для бактерий рода *Bacillus* в «Определителе бактерий Берджи». На основе изученных нами биологических свойств выделенные культуры отнесли к видам *Bacillus cereus*

Таблица 3 – Ключ для первичной дифференциации бактерий родов *Bacillus* и *Paenibacillus*

1. Катализа: положительный	2
отрицательный	17
2. Voges-Proskauer: положительный	3
отрицательный	10
3. Рост в анаэробном агаре: положительный	4
отрицательный	9
4. Рост при 50°C: положительный	5
отрицательный	6
5. Рост в 7% NaCl: положительный	<i>B. licheniformis</i>
отрицательный	<i>B. coagulans</i>
6. Кислота и газ из глюкозы (неорганический N): положительный	<i>B. pasteurii</i>
отрицательный	7
7. Редукция NO <sub>2</sub> до NO <sub>3</sub> : положительный	8
отрицательный	<i>Paenibacillus alvei</i>
8. Параспоральное тело в спорангии: положительный	<i>B. thuringiensis</i>
отрицательный	<i>B. cereus</i>
9. Гидролиз крахмала: положительный	<i>B. subtilis</i>
отрицательный	<i>B. pumilus</i>
10. Рост при 65°C: положительный	<i>B. stearothermophilus</i>
отрицательный	11
11. Гидролиз крахмала: положительный	12
отрицательный	15
12. Кислота и газ из глюкозы (неорганический N): положительный	<i>B. macevensis</i>
отрицательный	13
13. Ширина палочки 1.0µm или больше: положительный	<i>B. megaterium</i>
отрицательный	14
14. Рост при pH < 6.0: положительный	<i>B. circulans</i>
отрицательный	<i>B. firmus</i>
15. Рост в анаэробных условиях: положительный	<i>B. laterosporus</i>
отрицательный	16
16. Образование кислоты из глюкозы (неорганический азот):	<i>B. brevis</i>
отрицательный	<i>B. sphaericus</i>
17. Рост при 65°C: положительный	<i>B. stearothermophilus</i>
отрицательный	18
18. Разложение казеина: положительный	<i>P. larvae</i>
отрицательный	19
19. Параспоральное тело в спорангии: положительный	<i>P. popilliae</i>
отрицательный	<i>B. lentimorbus</i>

и *Bacillus megaterium*. Время исследования с применением «Ключа для первичной дифференциации бактерий рода *Bacillus*» составило 77 часов.

#### Библиографический список

1. Васильев, Д.А. Идентификация бактерий *Bacillus cereus* на основе их фенотипической характеристики / Д.А. Васильев, А.И. Калдыркаев, Н.А. Феоктистова, А.В. Алешкин. - Ульяновск, 2013. – С. 21-22.

2. Юдина, М.А. Диагностика картофельной болезни хлеба, вызываемой бактериями видов *Bacillus subtilis* и *Bacillus mesentericus* / М.А. Юдина, Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2011. - № 3. - С. 61-67.
3. Феоктистова, Н.А. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов бактерий *Bacillus subtilis* / Н.А. Феоктистова // В книге: «Бактериофаги микроорганизмов значимых для животных, растений и человека». – Ульяновск, 2013. – С. 186-197.
4. Феоктистова, Н.А. Выделение бактерий вида *Bacillus mesentericus* из объектов санитарного надзора / Н.А. Феоктистова Н.А., М.А. Юдина, Д.А. Васильев [и др.] // В Молодежь и наука XXI века: материалы III-й Международной научно-практической конференции молодых ученых. - Ульяновск, 2010. - С. 82-84.
5. Юдина, М.А. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов бактерий вида *Bacillus mesentericus* / М.А. Юдина, Н.А. Феоктистова // В книге: «Бактериофаги микроорганизмов значимых для животных, растений и человека». - Ульяновск, 2013. - С. 197-211. (315 с.).
6. Макеев, В.А. Изучение чувствительности бактерий рода *Bacillus* к различным концентрациям хлорида натрия / В.А. Макеев, М.А. Юдина, Н.А. Феоктистова [и др.] // Ветеринарная медицина XXI века: инновации, опыт, проблемы и пути их решения: международная научно-практическая конференция, посвященная Всемирному году ветеринарии в ознаменование 250-летия профессии ветеринарного врача. 2011. С. 185-187.
7. Феоктистова, Н.А. Выделение бактерий вида *Bacillus mesentericus* из объектов санитарного надзора / Н.А. Феоктистова Н.А., М.А. Юдина, Д.А. Васильев [и др.] // В Молодежь и наука XXI века: материалы III-й Международной научно-практической конференции молодых ученых. - Ульяновск, 2010. - С. 82-84.
8. Феоктистова, Н.А. Результаты сравнительного анализа бактериологических методов исследований какао-порошка на наличие бацилл, вызывающих порчу продуктов питания / Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2015. - № 1 (29). - С. 69-76.
9. Феоктистова, Н.А. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов бактерий *Bacillus subtilis* / Н.А. Феоктистова // В книге: «Бактериофаги микроорганизмов значимых для животных, растений и человека». – Ульяновск, 2013. – С. 186-197.
10. Феоктистова, Н.А. Методы идентификации *Bacillus coagulans*, включая фагоидентификацию / Феоктистова Н.А., Васильев Д.А., Золотухин С.Н. [и др.]

// Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности: материалы Третьей научно-практической конференции с международным участием. – Москва: Медицинское маркетинговое агентство. - С. 89-90.

11. Садртдинова, Г.Р. Биохимические тесты для ускоренной внутриродовой детекции бактерий *Klebsiella* / Г.Р. Садртдинова, Д.А. Васильев // Sci-article. - 2015. - №17. – С.11-15.
12. Садртдинова, Г.Р. Изучение культуральных свойств бактерий вида *Klebsiella oxytoca* / Г.Р. Садртдинова, Е.А. Ляшенко, Д.А. Васильев // Материалы Международной научно-практической конференции «Биотехнология: реальность и перспективы».- Саратов: Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И.Вавилова, 2014.-С.193-196.
13. Садртдинова, Г.Р. Повышение селективных и дифференциально-диагностических свойств плотной агаровой среды, предназначенной для выделения бактерий рода *Klebsiella* // Материалы IV Международной научно-практической конференции молодых ученых «Молодежь и наука XXI века». – Ульяновск: Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина, 2014, т.1 – С. 122-127.

## ALLOCATION OF BACTERIA OF *BACILLUS CEREUS* FROM DAIRY PRODUCTS

*Feoktistova N. A., Trifonova K. G., Gafurova E. T., Antonova A.N. , Vasilyev D.A.*

**Keywords:** *Bacillus cereus*, dairy products, contamination, method of allocation, test

*In article results of researches on identification of bacteria of the sort Bacillus in dairy products are described. 3 cultures of bacteria which were referred to types of Bacillus cereus and Bacillus megaterium based on studying of biological properties are marked out from tests of sour cream and processed cheese.*