

**Библиографический список:**

1. Бургасов П.Н., Рожков Г.И. Сибиреязвенная инфекция. – М.: Медицина. – 1984. – С.206.
2. Ганюшкин В.Я. Бактериофаги сальмонелл и их применение в ветеринарии. – Ульяновск. – 1988. – С.45.
3. Гольдфарб Д.М. Бактериофагия. – М.: Медгиз, 1961. – С. 6-184.
4. Ревенко И.П. Бактериофаги и их использование в ветеринарной практике. – Киев: Урожай, 1978. – С. 41-88.
5. Смирнов В.В., Резник С.Р., Василевская И.А. Спорообразующие аэробные бактерии – продуценты биологически активных веществ – Киев: Наукова Думка, 1982. – С.117-120.
6. Ahmed R., Sankar-mistry P., Jackson S., Ackermann H.W. and Kasatiya S.S. *Bacillus cereus* Phage Typing as an Epidemiological Tool in Outbreaks of Food Poisoning // Journal of clinical microbiology, Mar. 1995. - P. 636-640.

УДК 619:578

**ДИАГНОСТИКА КАРТОФЕЛЬНОЙ БОЛЕЗНИ ХЛЕБА, ВЫЗЫВАЕМОЙ БАКТЕРИЯМИ ВИДОВ  
BACILLUS SUBTILIS И BACILLUS MESENTERICUS**

*М.А. Юдина, аспирант кафедры МВЭиВСЭ УГСХА*

*А.Х. Мустафин, аспирант кафедры МВЭиВСЭ УГСХА*

*Н.А. Феоктистова, к б н, доцент кафедры МВЭиВСЭ УГСХА*

*Меркулов А.В., к б н, ст преподаватель кафедры МВЭиВСЭ УГСХА*

*Бахаровская Е.О., студент УГСХА*

*Васильев Д.А. д б н, профессор кафедры МВЭиВСЭ УГСХА*

*В статье описаны способы диагностики картофельной болезни хлеба, вызываемой бактериями видов *Bacillus subtilis* и *Bacillus mesentericus*. Описан способ индикации возбудителя картофельной болезни хлеба – бактерий вида *Bacillus subtilis* с помощью специфических бактериофагов методом «стекающая капля».*

*Ключевые слова: Бактерии: *Bacillus subtilis*, *Bacillus mesentericus*, картофельная болезнь хлеба, фаги, индикация, диагностика.*

В большинстве стран мира зерно и продукты его переработки являются основным источником питания для человека и кормом для сельскохозяйственных животных. Поэтому проблема микробиологического загрязнения зерна является одним из главенствующих факторов, определяющих здоровье населения и сохранения его генофонда. В связи с этим одной из важных проблем в хлебопекарной промышленности является оценка микробиологической зараженности зернового сырья, а также предупреждение картофельной болезни пшеничного хлеба [1].

В зерне сконцентрированы различные питательные вещества, и потому оно является благоприятным субстратом для развития микроорганизмов. Только один грамм зерновой массы содержит от нескольких сотен до нескольких тысяч микроорганизмов [5]. Развитие этих микроорганизмов является одной из возможных причин снижения качества зерна пшеницы и других зерновых культур при хранении. В зависимости от условий хранения зерновой массы изменения в численном и видовом составе ее микрофлоры могут носить различный характер [9].

При нарушении санитарно-технического режима хранения зерна, муки, выпечки и реализации хлеба создаются условия для размножения картофельной палочки. Болезнь вызывают штаммы бакте-

рий видов *Bacillus subtilis* и *Bacillus mesentericus*, обладающие высокой протеолитической и амилазной активностью. Их основная масса начинает накапливаться в зерне еще во время уборки, попадая в него с пылью, частицами почвы и из других источников, развивается в процессе приготовления хлеба и вызывает его порчу. Под действием высокоактивных ферментов – амилаз в хлебе увеличивается количество декстринов, придающих мякишу хлеба излишнюю липкость. Продукты распада белков, образующиеся в результате действия протеолитических ферментов, обладают резким специфическим запахом. Внешне картофельная болезнь хлеба характеризуется очаговым, влажным ослизнением мякиша с желтовато-коричневым цветом и гнилостным запахом. При разламывании хлеба видны тонкие тягучие нити. Употребление такого хлеба может привести к пищевому отравлению. Болезнь обнаруживается обыкновенно не раньше, чем через двое суток после выпечки хлеба. Бактерии видов *Bacillus subtilis* и *Bacillus mesentericus* являющиеся причиной этого заболевания хлеба, в огромном большинстве контаминируют тесто через зараженную муку; в других, более редких, случаях они могут попадать в тесто из загрязненной и зараженной ею хлебопекарной посуды [2, 18].

Для развития бактерий необходимы следующие условия:

- достаточная влажность хлеба,
- длительность его хранения не менее 2 суток;
- достаточно высокая  $t^{\circ}$  при хранении (не ниже  $15^{\circ}$ ) [3].

Споровые бактерии, попадая в организм человека, способны вызывать очень серьезные нарушения функционирования иммунной системы, желудочно-кишечного тракта, печени, органов дыхания, нервной системы. Поэтому даже если споровые бактерии не вызывают картофельной болезни хлеба, все же их наличие в готовых изделиях нежелательно [10].

До настоящего времени для зерна и муки не разработаны критерии качества по микробиологическим показателям. Однако из литературных источников известно, что качество муки можно считать хорошим, если в ней содержание спорообразующих аэробных бактерий (САБ) *B. subtilis* – возбудителя картофельной болезни хлеба не более 200 КОЕ/г (КОЕ – колониобразующих единиц). Известно также, что мука, содержащая до 10 КОЕ/г САБ, считается слабо, до 100 КОЕ/г умеренно, более 1000 КОЕ/г сильно зараженной [17].

В настоящее время известные методы определения контаминированности зерна видов *Bacillus subtilis* и *Bacillus mesentericus* имеют известные недостатки. Метод пробной лабораторной выпечки трудоемок и в случае заражения штаммами, имеющими низкую амилазную активность, даже при значительных концентрациях не дает положительных результатов [8, 13, 19].

Известен экспресс-метод диагностики картофельной болезни по активности спорных бактерий в хлебопекарном сырье и готовой продукции, результаты которого свидетельствуют о качественных показателях бактерий в протеолитическом отношении, не являются информативными в плане количественной оценки зараженности и также часто представляют искаженную картину о реальной степени зараженности сырья [6].

Для количественной оценки степени зараженности зерна пшеницы использовался хорошо зарекомендовавший себя метод мембранной фильтрации микроорганизмов на оборудовании фирмы Sartorius. Микробиологический контроль методом мембранной фильтрации в настоящее время широко применяется в пищевой промышленности, для мониторинга микробиологической обсемененности безалкогольных напитков и пива. Данный метод позволяет избегать предварительной сложной и трудоемкой подготовки, связанной с варкой питательных сред, сложной обработкой образцов, длительным культивированием, что позволяет сократить длительность анализа, проводить селективный анализ микроорганизмов, применять для широкого спектра хлебобулочных изделий. Метод стандартизирован в соответствии с международными требованиями, на его использование имеется разрешение Минздрава РФ (№2000/373 от 04.08.2000 г.) [7].

Подготовка сырья для исследования на наличие бактерий вида *B. subtilis* и *B. mesentericus* проводилась по ГОСТ 26669-85 «Подготовка проб для микробиологического анализа» [17]. Количество спорообразующих бактерий учитывают из смывов, прогретых на водяной бане в течение 10 минут при

80 °С для исключения роста неспоровой микрофлоры. При приготовлении смывов руководствуются ГОСТ Р 51426-99 «Общее руководство по приготовлению разведений для микробиологических исследований» [16]. Смывы из исследуемых образцов зерна пшеницы высеваются на питательные картонные подложки (ПКП) фирмы Sartorius со средой Standard-TCC, эту среду используют как селективно-дифференциальную для бактерий видов *B. subtilis* и *B. mesentericus*, позволяя получать их высококонтрастные колонии. ПКП являются готовыми к использованию питательными средами, разработанными специально для использования совместно с системой мембранной фильтрации. Посевы культивируют при 37 °С в течение 48 часов. Для документирования результатов мембранные фильтры высушивают при комнатной температуре, после чего их облучают бактерицидной лампой в течение 10 минут, с целью уничтожения вегетативных форм микроорганизмов [8].

В настоящее время индикация и идентификация бактерий вида *B. subtilis* и *B. mesentericus* на предприятиях, занимающихся производством хлеба и хлебобулочных изделий проводятся бактериологическими методами. Задача изыскания простого и доступного метода индикации и идентификации названных микроорганизмов – актуальная тема для исследований, результаты которых позволят повысить эффективность применения микробиологического контролера и контрольных мер по системе ХАССП на перерабатывающих предприятиях, а также сделать данный этап исследований значительно дешевле.

Применение тест-системы для индикация и идентификация бактерий вида *B. subtilis* и *B. mesentericus* на основе бактериофагов позволит контролировать чистоту зерна и муки при приемке на пекарнях и хлебокомбинатах [2].

Бактериофаг - вирус способный инфицировать бактериальную клетку, репродуцировать в ней, образуя многочисленное потомство, и вызывать ее лизис, сопровождающийся выходом фаговых части в среду обитания бактерий [4]. Используя строгую родовую и видовую специфичность селекционированных бактериофагов, нами была разработана схема выделения и ускоренной идентификации вышеуказанных микроорганизмов. Подготовку и посев проб кормов и пищевых продуктов, подлежащих исследованию, проводили в соответствии ГОСТ Р 51592-2000 «Вода. Общие требования к отбору проб» [14] и ГОСТ 26669-85 «Продукты пищевые и вкусовые. Подготовка проб для микробиологических анализов» [15]. В исследованиях использовали муку пшеничную высшего и первого сортов, зерно пшеницы 3-х производителей (Ульяновская область) которые контаминировали бактериями вида *Bacillus subtilis* в концентрации  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ ,  $10^1$  м.к. в 1 мл.

Для этого пробы муки и зерна весом 10 г вносили в стерильные колбы объемом 100 мл, заливали стерильным МПБ из расчета 10 мл бульона на 1 г исследуемой пробы. В колбы вносили индикаторные культуры в концентрации  $10^5$ ;  $10^4$ ;  $10^3$ ;  $10^2$ ;  $10^1$  м.к./мл (г). Полученные смеси встряхивали в шуттель-аппарате в течение 15 минут и ставили в термостат на 24 часа при 37 °С. Затем надосадочную жидкость исследовали в соответствии со схемой, представленной на рис. 2. Первоначально производили посев на МПА по методу Дригальского для выделения чистой культуры *Bacillus subtilis*, а затем производили посева элективную среду ИВМ, затем на среду Гаузе

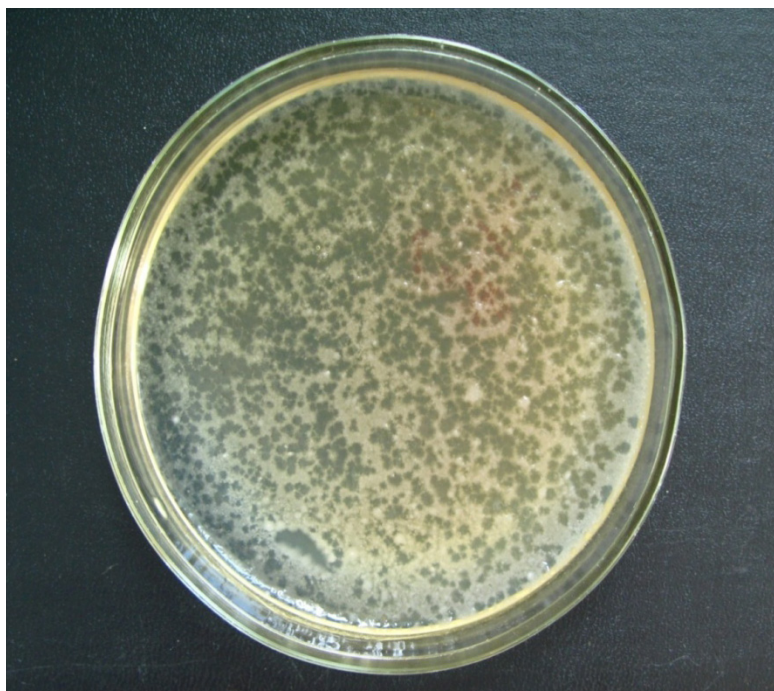


Рис. 1 - Негативные колонии фага Bs-13 УГСХА

№ 2 и среду Громыко. Инкубировали посевы в условиях термостата в течение 24 часов в условиях термостата при 37 °С. Затем выросшие колонии пересева на МПБ и инкубировали в условиях термостата в течение 18 часов в условиях термостата при 37 °С. Следующим этапом наших исследований было изучение биологических свойств выделенных культур по тестам, отраженным на рис. 1. Результаты исследований представлены в таблицах 1-2.

В основу приведенной ниже схемы оценки диагностических признаков выделенных бацилл положены принципы, изложенные в работах R. Gordon - автора систематики рода *Bacillus* в последних изданиях определителя бактерий Bergey [11, 12]. Бульонные культуры, полученные после пересева колоний с вышеперечисленных сред на МПБ, микроскопии (окраска по Граму) и при наличии в мазках грамположительных палочек с закругленными концами, располагающихся одиночно и попарно, подвергали фагоидентификации.

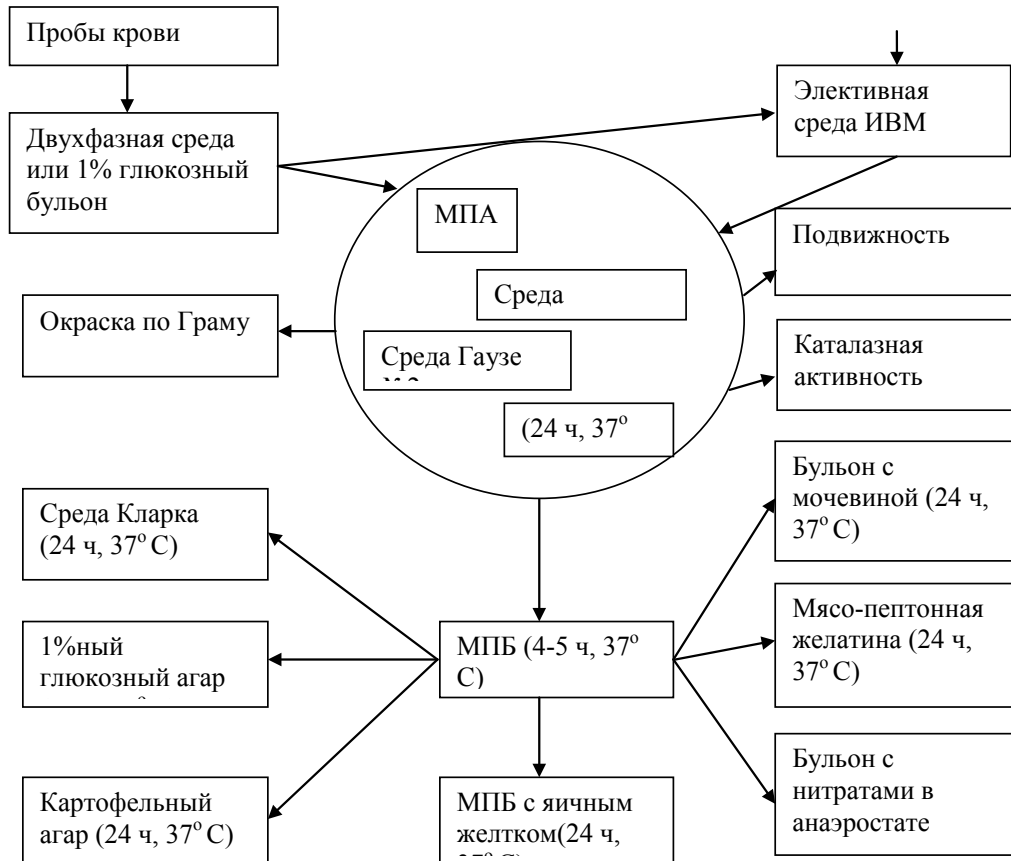


Рис. 1. Схема выделения и дифференциации бактерий вида *Bacillus subtilis*

Таблица 1. - Результаты исследований объектов санитарного надзора на наличие бактерий вида *Bacillus subtilis* на среде Гаузе № 2

Объекты	Количество микробных клеток в 1гр (мл), проба №1				Количество микробных клеток в 1гр (мл), проба №2				Количество микробных клеток в 1гр (мл), проба №3			
	10 <sup>1</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>1</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>1</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>
Мука высшего сорта	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+
Мука первого сорта	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+
Зерно	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+

Примечание:

“+” - положительный результат,

“-” - отрицательный результат.

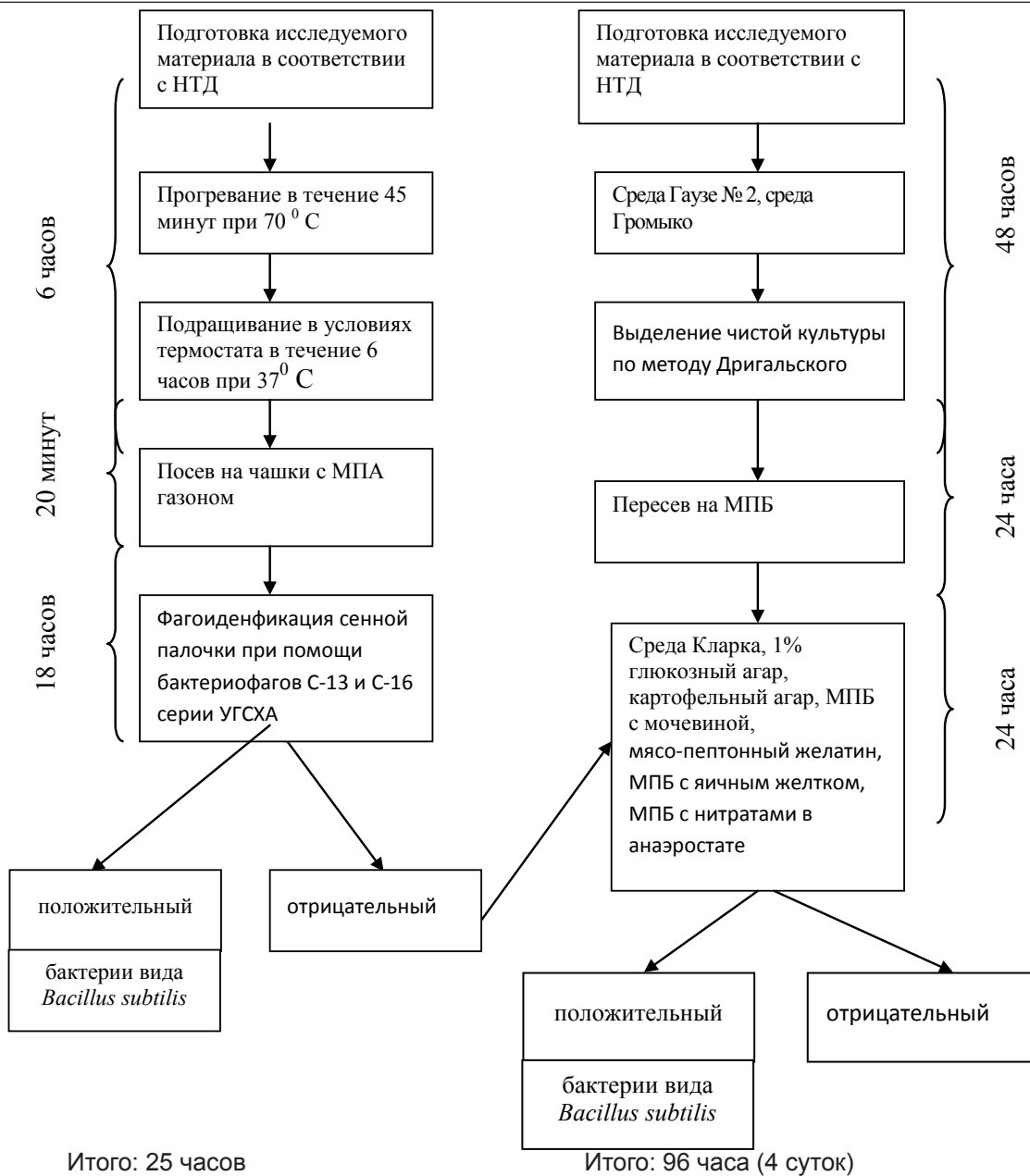


Рис. 2. Схема ускоренной идентификации бактерий вида *Bacillus subtilis* с помощью селекционированных нами бактериофагов (I) в сравнении со схемой выделения и дифференциации бацилл первой морфологической группы [11], изложенной в «Определителе бактерий» [12]

Таблица 2. - Результаты исследований объектов санитарного надзора на наличие бактерий вида *Bacillus subtilis* на среде Громько

Объекты	Количество микробных клеток в 1гр (мл), проба №1				Количество микробных клеток в 1гр (мл), проба №2				Количество микробных клеток в 1гр (мл), проба №3			
	10 <sup>1</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>1</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>1</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>
Мука высшего сорта	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+
Мука первого сорта	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+
Зерно	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+

Примечание:

“+” - положительный результат,

“-” - отрицательный результат.

Фагоидентификации бактерий вида *Bacillus subtilis* методом «стекающая капля»

На поверхность МПА в чашках Петри пастеровской пипеткой наносили 3-4 капли бульонной 18-часовой культуры исследуемых микроорганизмов. Нанесённую культуру равномерно распределяли по поверхности среды стерильным шпателем. Чашки ставили в термостат для подсушивания на 15-20 минут.

Чашку делили бактериологическим карандашом на три сектора. На поверхность засеянной среды, в зоне первого сектора, пастеровской пипеткой легким прикосновением капли наносили фаг Bs-13 УГСХА, на второй сектор аналогично наносили фаг Bs-16 УГСХА, на третий сектор в качестве контроля наносили стерильный МПБ. Наклоняли чашку, чтобы капли стекли в виде дорожки. Чашки оставляли для подсушивания в боксе на 15-20 минут и помещали в термостат на 18 часов при 37 °С.

Результат исследований считали положительным, если на месте нанесения фагов на газоне сплошного роста культуры образовывалась прозрачная зона лизиса с вторичным ростом фагорезистентных микроорганизмов или без него, а также рост негативных колоний фага. Отрицательным считали результат - отсутствие лизиса на газоне роста исследуемой культуры микроорганизмов и отсутствие лизиса в контроле. При положительном результате культуру относили к виду *Bacillus subtilis*. Результаты опытов представлены в таблице 3.

**Таблица 3. - Фагоидентификация бактерий вида *Bacillus subtilis* бактериофагами Bs-13 и Bs-16 серии УГСХА**

№	Объекты	Результат воздействия фага Bs-13 серии УГСХА			Результат воздействия фага Bs-16 серии УГСХА		
		Проба 1	Проба 2	Проба 3	Проба 1	Проба 2	Проба 3
1	Мука высшего сорта	+	+	+	+	+	+
2	Мука первого сорта	+	+	+	+	+	+

Примечание:

“+” - положительный результат,

“-” - отрицательный результат.

Таким образом, фагоидентификация бактерий вида *Bacillus subtilis* бактериофагами Bs-13 и Bs-16 серии УГСХА дала положительные результаты: из всех искусственно контаминированных бактериями вида *Bacillus subtilis* проб муки пшеничной высшего и первого сортов (по 3 пробы каждого сорта) и зерна пшеницы были выделены культуры, которые при взаимодействии с вышеуказанными фагами были лизированы ими.

При получении отрицательных результатов фагоидентификации необходимо было бы проведение детального изучения ферментативных, серологических и патогенных свойств выделенных микроорганизмов

На рисунке 2 изображена схема фагоидентификации бактерий вида *Bacillus subtilis*. Она представлена в сравнении с традиционной схемой выделения и дифференциации бацилл первой морфологической группы (Gordon, 1973), изложенной в «Определителе бактерий» [12].

Доказано, что время исследований в соответствии с разработанной нами схемой короче на 71 час с меньшими затратами посуды и реактивов.

Применяя фаговые биопрепараты в различных методиках (реакция нарастания титра фага, реакция адсорбции фагов, фаготетразоловый метод, пробирочный метод, метод «стекающей капли») можно осуществлять контроль параметров технологического процесса хлебопечения, анализировать качественный и количественный состав выделенных из сырья бацилл, являющихся причиной картофельной болезни хлеба и разрабатывать контрольные меры. Вышеуказанные методики, в отличие от бактериологических занимают значительно меньше времени, (до 25 часов) что чрезвычайно важно для

исключения рисков возникновения картофельной болезни хлеба на предприятии или уменьшения их возможности до приемлемого уровня.

#### Список использованной литературы:

1. Афанасьева О.А. Микробиологический контроль хлебопекарного производства / О.А. Афанасьева. - М.: Пищевая промышленность, 1976. - С. 113.
2. Бахаровская Е.О., Феоктистова Н.А., Юдина М.А., Васильев Д.А. Роль бактерий вида *Bacillus mesentericus* в контаминации объектов санитарного надзора // Аграрная наука – сельскому хозяйству / Материалы VI Международной научно-практической конференции. – Барнаул, 2011. – С. 353-355.
3. Витавская А.В. Биологическая защита хлеба от картофельной болезни хлеба / А.В. Витавская, Г.Н. Дудикова, К.А. Тулемисова. – Алматы, 1998. – С. 432.
4. Гольдфарб Д.М. Бактериофагия. – М.: Медгиз, 1961. – С. 6-184.
5. Егоров В.В. Практикум по микробиологии / В.В. Егоров. – М.: Изд-во МГУ, 1986. - С. 35-42.
6. Клевакин В. М. Санитарная микробиология пищевых продуктов / В.М. Клевакин, В.В. Карцев – Л.: Медицина - 1986. – С. 164.
7. Крючков А.Г. Основные принципы и методология агроэкологического районирования зерновых культур в степи Южного Урала / А.Г. Крючков. // Вестник Российской академии сельскохозяйственных наук – 2006. – С. 704.
8. Медведев П.В., Степанов А.С., Федотов В.А. Оценка уровня зараженности зерна пшеницы различных природно-географических зон Оренбургской области возбудителями картофельной болезни хлеба // Вестник ОГУ, № 2 (108) – Оренбург, 2010. – С. 114-118.
9. Омельченко В.Д. Зерна, поврежденные и испорченные микроорганизмами и самосогреванием как критерий санитарно-гигиенического состояния пшеницы и кукурузы / В.Д. Омельченко - Автореф. дисс. канд. техн. наук. - М., 1991. – С. 19.
10. Пучкова Л.И. Технология хлеба / Л.И. Пучкова, Р.Д. Поландова, И.В. Матвеева – СПб.: ГИОРД, – 2005.
11. Gordon R. The genus *Bacillus*. // In: Handb. Microbiol. Cleveland (Ohio), 1973. – V.1. – P.71-88.
12. Bergey's manual of determinative bacteriology. – 8<sup>th</sup> ed. – Baltimore: Williams and Wilkins Co. 1974. – 1258 p.
13. ГОСТ 27699-88 Мука пшеничная. Методы пробной лабораторной выпечки хлеба.
14. ГОСТ Р 51592-2000 Вода. Общие требования к отбору проб.
15. ГОСТ 26669-85 Продукты пищевые и вкусовые. Подготовка проб для микробиологических анализов.
16. ГОСТ Р 51426-99 «Общее руководство по приготовлению разведений для микробиологических исследований».
17. ГОСТ 26669-85 «Подготовка проб для микробиологического анализа».
18. Инструкция по предупреждению картофельной болезни хлеба / ГосНИИХП. – М, 1998.
19. Инструкции по микробиологическому контролю хлебопекарного производства / ГосНИИХП. – М, 1975.