

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° при хранении (не ниже 15°) [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 стандартизован 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

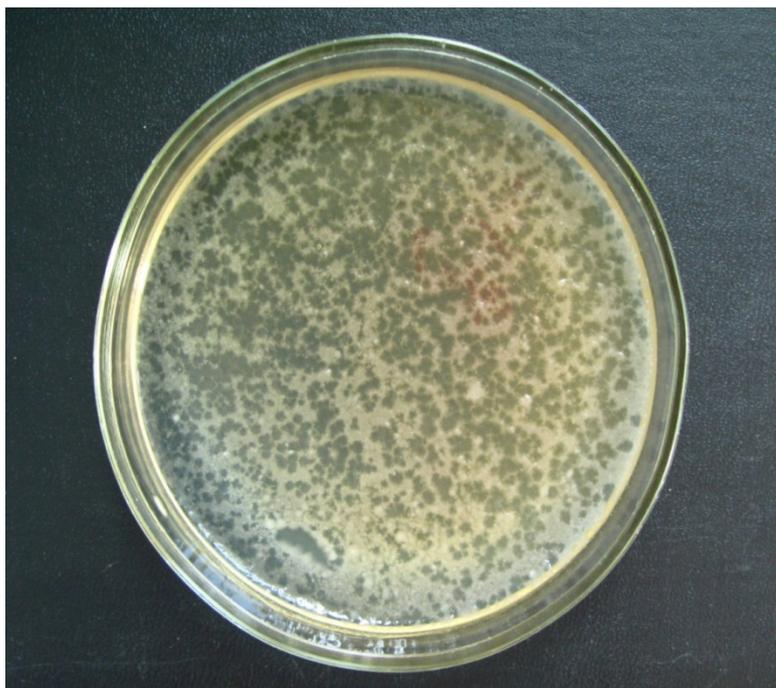


Рис. 1 - Негативные колонии фага Bs-13 УГСХА

№ 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.

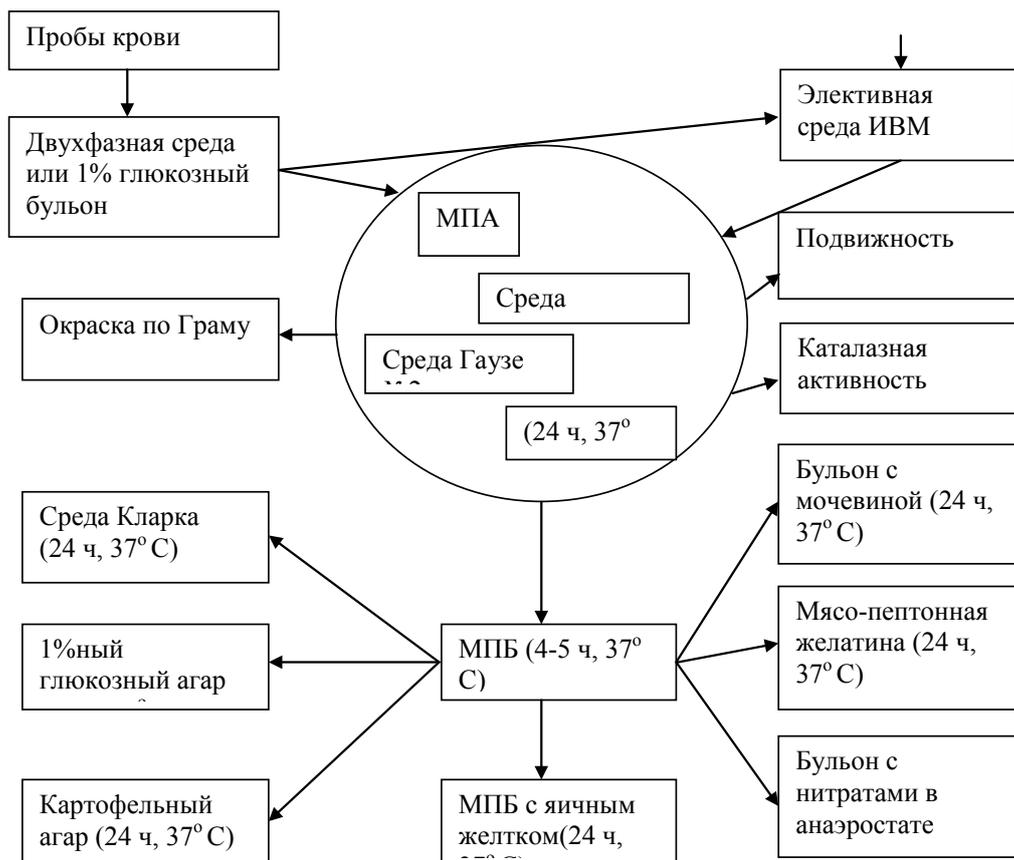


Рис. 1. Схема выделения и дифференциации бактерий вида *Bacillus subtilis*

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 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴
Мука высшего сорта	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+
Мука первого сорта	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+
Зерно	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+

Примечание:

“+” - положительный результат,

“-” - отрицательный результат.

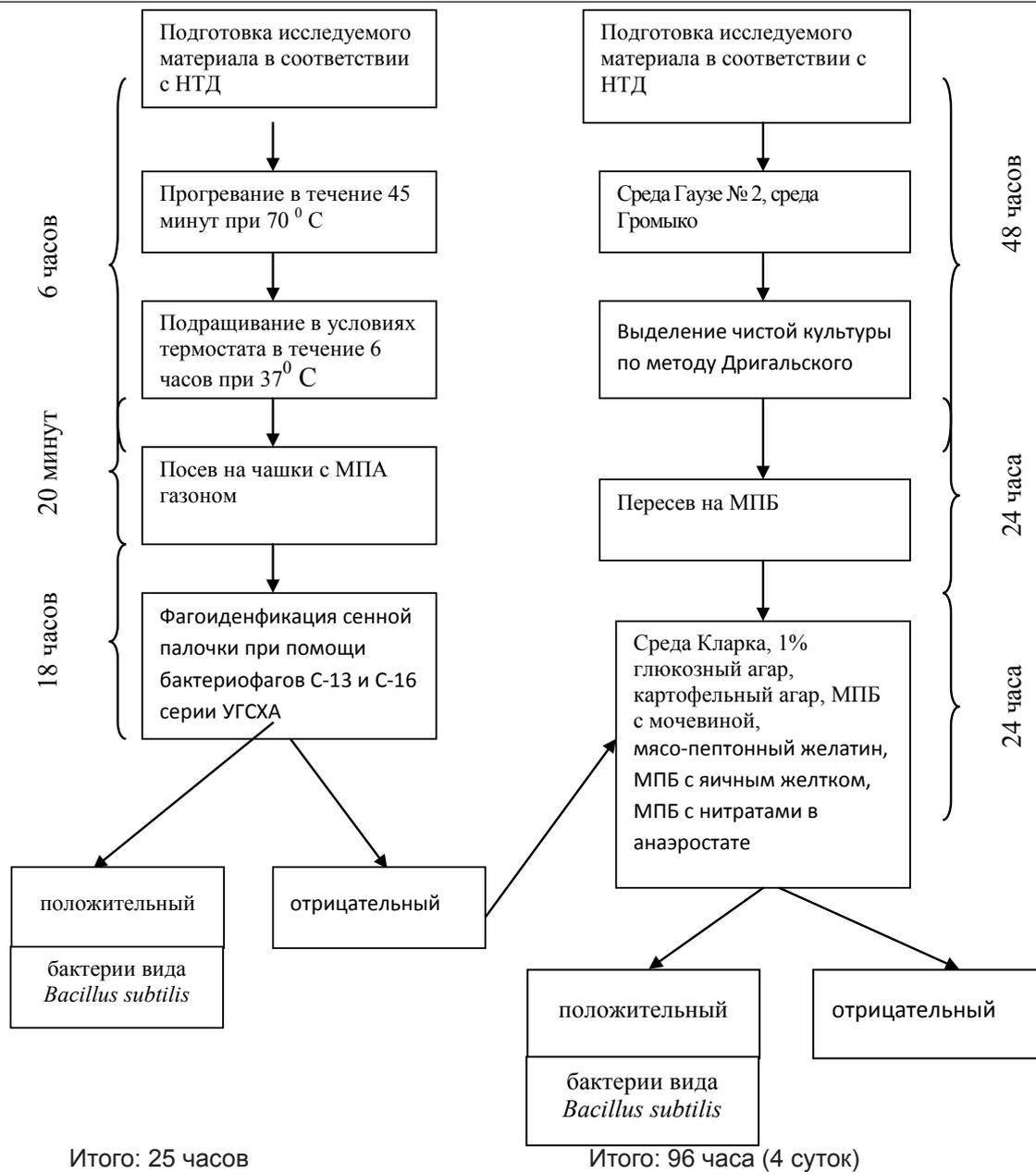


Рис. 2. Схема ускоренной идентификации бактерий вида *Bacillus subtilis* с помощью селектированных нами бактериофагов (I) в сравнении со схемой выделения и дифференциации бацилл первой морфологической группы [11], изложенной в «Определителе бактерий» [12]

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 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴
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. – 8th 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.