

УДК 602.3:579.8

БИОСЕНСОРНАЯ ДЕТЕКЦИЯ БАКТЕРИЙ РОДА *BACILLUS* В МОЛОКЕ И МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТАХ ДЛЯ ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ ИХ ПОРЧИ

Васильев Дмитрий Аркадьевич, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ВСЭ»*

Золотухин Сергей Николаевич, доктор биологических наук, профессор кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ВСЭ»*

Феоктистова Наталья Александровна, кандидат биологических наук, доцент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ВСЭ»*

Алешкин Андрей Владимирович, доктор биологических наук**

ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина»*

ФГУН МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора**

ava@gabri.ru

432017, г. Ульяновск, бульвар Новый Венец, 1; тел.: 8(422)559547¹

e-mail: feokna@yandex.ru

Ключевые слова: *Bacillus cereus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus mesentericus* (*rimilus*), *Bacillus megaterium*, *Bacillus coagulans* бактериофаги, детекция, биосенсоры, индикация, идентификация, молоко, молочные продукты, порча.

Научные исследования проводятся при финансовой поддержке государства в лице Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках реализации федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы (соглашение от №8267 от 10.08.2012).

В статье представлены результаты исследований проб молока, искусственно контаминированных штаммами бактерий *Bacillus mycoides*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus mesentericus* (*rimilus*), *Bacillus megaterium* в концентрации 10^3 КОЕ/мл, бактериологическим методом и методом РНФ с помощью сконструированных экспериментальных биопрепаратов на основе бациллярных бактериофагов. Установлено, что постановка РНФ при обнаружении данных бактерий показала значительную экономию времени (26 часов) в сравнении с бактериологическим методом исследования (96 часов), чувствительность которого не позволила обнаружить указанные бактерии в вышеназванной концентрации.

Введение

Одним из основных требований, предъявляемых к пищевым продуктам, является их безопасность для потребителя и стабильность состава. Основной причиной порчи продуктов и развития пищевых от-

равлений людей являются микроорганизмы. Особенно остро эта проблема касается портящихся продуктов – свежих фруктов, овощей, мясных и хлебобулочных изделий, соков, молочных продуктов [1,2].

Спорообразующие бактерии рода *Bacillus* (*Bacillus cereus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus mesentericus (pumilus)*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus coagulans*) являются одним из этиологических факторов биологического разрушения продуктов питания, в том числе молока. Наличие у бацилл спор препятствует инактивации этих микроорганизмов после кратковременного термического воздействия, а выраженная их протеолитическая активность приводит к различным порокам.

Результаты исследований, полученные ВНИИМС, показали, что бактерии рода *Bacillus* активно развиваются при различных температурах хранения, изменяя органолептические характеристики продукта. При размножении в диапазоне температур 28-37°C бациллярные факультативные анаэробы придают молоку и молочным продуктам специфический вяжущий вкус, запах порченных фруктов, дрожжевой привкус, полынную и хинную горечь и изменяют цвет. Установлено, что в условиях холодильного хранения процессы порчи идут аналогично, но значительно медленнее [3,4]

Анализ нормативно-технической документации (ГОСТов и СанПиНов) свидетельствует о том, что в настоящее время для молочных продуктов споровые факультативно-анаэробные микроорганизмы, которыми являются бациллы, не являются санитарно-показательными, поэтому их наличие не нормируется и не подлежит обязательному контролю в условиях производственных лабораторий. Однако при появлении ряда характерных пороков вкуса и внешнего вида у молочных продуктов для бактериологического контроля рекомендуется делать посеvy 2–4-кратно разведенного продукта на наличие указанной неспецифической микрофлоры [5,6].

Основным источником контаминации молока являются объекты окружающей среды, корма и воздуха. Доказано, что пастеризация не снижает уровень контаминации, а анаэробные условия и низкие температуры хранения задерживают, но не предотвращают развитие бактерий рода *Bacillus* [7].

При производстве ряда продуктов, в

технологическом процессе которых заложено концентрирование сухих веществ молока (сыры, сгущенные и сухие молочные продукты), происходит увеличение количества бактериальных клеток изучаемых споровых микроорганизмов за счет их концентрации. Для плавящихся сыров и молоко-содержащих продуктов, в рецептуре которых используются разнообразные молочные и немолочные компоненты и высокотемпературная обработка сырья (пастеризация или плавление), споровая микрофлора становится подавляющей. Так, в плавящихся сырах ее количество может превышать 70% от общего количества микроорганизмов в продукте [8].

Своевременное качественное и количественное обнаружение этих микроорганизмов поможет предотвратить негативные процессы. Поэтому разработка методов детекции бактерий рода *Bacillus* в молоке и молочных продуктах является той практической задачей, которую необходимо решать в пищевой и перерабатывающей промышленности.

Использование для этих целей тест-систем ПЦР ограничено по нескольким причинам: отсутствие коммерческих праймеров на многие виды рода *Bacillus*, дорогостоящее оборудование и расходные материалы, отсутствие квалифицированных специалистов [9]. Применение бактериологического метода исследований для этих целей затруднено в связи с отсутствием соответствующей современной нормативно-технической документации, позволяющей проводить идентификацию бацилл [10].

Цель и задачи исследования

Разработать метод биосенсорной детекции бактерий *Bacillus mycoides*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus mesentericus (pumilus)*, *Bacillus megaterium* с использованием фаговых биопрепаратов, который позволит в течение 25-26 часов определить бракеражную концентрацию вышеназванных бактерий (10^3 КОЕ/мл) в молоке-сырье [3].

Для достижения поставленной цели необходимо

- сконструировать экспериментальные биопрепараты на основе выделенных и се-

лекционированных специфических бактериофагов *Bacillus mycoides*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus mesentericus (pumilus)*, *Bacillus megaterium*;

- определить оптимальные параметры постановки реакции нарастания титра фага с экспериментальными биопрепаратами;

- разработать схему по постановки реакции нарастания титра фага с пробами молока с целью обнаружения разных видов бацилл.

Объекты и методы исследования

Штаммы бактерий *Bacillus megaterium* 182 и *Bacillus megaterium* 4, *Bacillus mesentericus* 66 и *Bacillus mesentericus* 2; *Bacillus subtilis* 26 и *Bacillus subtilis* 4, *Bacillus mycoides* 537 и *Bacillus mycoides* H были полученные из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина». Штаммы бактериофагов: Phagum *Bacillus megaterium* Bm – 10 УГСХА-Деп и Phagum *Bacillus megaterium* Bm – 1 УГСХА-Деп; Phagum *Bacillus subtilis* Bs – 13 УГСХА-Деп и Phagum *Bacillus subtilis* Bs – 16 УГСХА-Деп; Phagum *Bacillus mycoides* B. myc – 3 УГСХА-Деп и Phagum *Bacillus mycoides* B. myc–5 УГСХА-Деп; Phagum *Bacillus mesentericus (pumilus)* Bm – 3 УГСХА-Деп и Phagum *Bacillus mesentericus (pumilus)* Bm – 8 УГСХА-Деп, выделены и изучены нами.

Объекты исследования – пробы молока.

Метод биосенсорной детекции бактерий *Bacillus mycoides*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus mesentericus (pumilus)*, *Bacillus megaterium* с использованием фагового биопрепарата разрабатывали на основе методики реакции нарастания титра фага [11, 12]. Выделение и идентификацию бактерий *Bacillus mycoides*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus mesentericus (pumilus)*, *Bacillus megaterium* проводили по методике Gordon [13, 14]. Статистическую обработку результатов исследований проводили с применением пакета прикладных программ Statistica 6.0. (for Windows; «Stat Soft Ins.», США), Microsoft Excel 2003 (for Windows XP).

Результаты исследований

Первым этапом конструирования био-

препаратов для биосенсорной детекции бактерий рода *Bacillus* нами был осуществлен подбор фагов, специфичных в пределах каждого вида (для *Bacillus mycoides* - Phagum *Bacillus mycoides* B. myc. серии УГСХА; для *Bacillus subtilis* - Phagum *Bacillus subtilis* B.s. серии УГСХА; для *Bacillus mesentericus (pumilus)* - Phagum *Bacillus mesentericus (pumilus)* Bm. серии УГСХА); для *Bacillus megaterium* - Phagum *Bacillus megaterium* B. meg. серии УГСХА. Отобранные фаги характеризовались высокими показателями литической активности и максимально широким совместным спектром литического действия в пределах гомологичного вида [15, 16, 17, 18].

Экспериментальные биопрепараты готовили на основе коммерческого питательного бульона при температуре 37°C.

В результате проведенных исследований нами было определено оптимальное соотношение бактериофага и индикаторной культуры – 1:1, т.е. 0,2 мл фага и 0,2 мл индикаторной культуры (для фагов *Bacillus subtilis*, *Bacillus mesentericus (pumilus)*, *Bacillus megaterium*), 1:5 (для фагов *Bacillus mycoides*), время пассажа составило 6-7 часов.

Очистку готовых фаговых препаратов от бактериальных клеток производили методом фильтрации с использованием мембранных фильтров фирмы Millipore (filter type: 0,22 µm GV). Разлитый во флаконы фаг подвергали контролю на чистоту, стерильность и литическую активность. Биопрепараты на основе фагов *Bacillus* представляют собой флаконы с прозрачной жидкостью желтого цвета (цвет засеянной среды) без посторонних примесей и наличия осадка. Литическая активность на плотных питательных средах составила 10⁹ БОЕ/мл. Дата изготовления серии бактериофагов исчисляется со дня закупки флаконов. Экспериментальным путем установлено, что срок годности биопрепаратов на основе бациллярных фагов при температуре 2-4 °C составляет 12 месяцев (срок наблюдения).

На втором этапе были проведены исследования по постановке реакции нарастания титра фага с МПБ, искусственно кон-

Таблица 1

Концентрация бактерий, определяемая в пробе молока при постановке РНФ на бактериофагах рода *Bacillus* серии УГСХА

Объект исследования - контаминированное бактериями рода <i>Bacillus</i> молоко в дозе (КОЕ, мл)	Контроль индикаторного фага	Контроль свободного фага	Опыт	Увеличение (раз)
	Количество негативных колоний фага			
<i>Bacillus megaterium</i>				
10 ³	39 ± 2	-	273 ± 14	7
10 ²	39 ± 2	-	195 ± 8	5
10 ¹	39 ± 2	-	41 ± 6	1
<i>Bacillus subtilis</i>				
10 ³	24 ± 3,2	-	144 ± 12	6
10 ²	24 ± 3,2	-	72 ± 5	3
10 ¹	24 ± 3,2	-	24 ± 9	1
<i>Bacillus mycoides</i>				
10 ³	56 ± 3,7	-	280 ± 11	5
10 ²	56 ± 3,7	-	168 ± 6	3
10 ¹	56 ± 3,7	-	56 ± 7	1
<i>Bacillus mesentericus (pumilus)</i>				
10 ³	38 ± 4,4	-	228 ± 5	6
10 ²	38 ± 4,4	-	152 ± 6	4
10 ¹	38 ± 4,4	-	76 ± 3	2

таминированными 18 часовыми индикаторными культурами бацилл каждого вида в концентрации 10³ КОЕ/мл. В качестве контроля применяли стерильный МПБ. Для каждого бациллярного бактериофага в эксперименте использовали по три комплекта из 3 пробирок. В пробирки № 1 и № 2 вносили исследуемый материал (в данном случае это МПБ, контаминированный 18-часовой индикаторной культурой) объемом 9 мл. В пробирку № 3 вносили 9 мл стерильного МПБ. Затем в пробирки № 1 и № 3 добавляли по 1 мл бактериофага в концентрации 10⁴ БОЕ/мл, в пробирку № 2 вносили 1 мл стерильного МПБ и помещали в термостат (37 °С) на 7 часов. После подрачивания исследуемого материала вместе с бактериофагом из каждой пробирки брали по 0,25 мл и вносили в пробирки с 4,5 мл МПБ. Содержимое всех пробирок фильтровали и подвергали дальнейшему исследованию методом агаровых слоев по Грациа.

В результате опытов нами установлено, что при положительной реакции количество бляшкообразующих единиц в опыте превышало более чем в 5 раз количество

бляшкообразующих единиц в контроле [19].

Время, затраченное на детекцию бацилл с помощью изготовленных фаговых препаратов, составило 26 часов (0,5 часа – подготовка реакции + 7 часов – время экспозиции субстрата с фагом + 0,5 часа – время, затрачиваемое на постановку эксперимента + 18 часов – время термостатирования посева).

Третьим этапом наших исследований стала разработка схемы постановки РНФ для биосенсорной детекции выше перечисленных бацилл с использованием фаговых биопрепаратов в молоке-сырье. Для постановки эксперимента было исследовано 3 пробы молока.

Первая проба молока была использована для определения концентрации бактерий рода *Bacillus*, которую возможно определить в молоке, используя РНФ с применением гомологичных бактериофагов. Пробу молока в объеме 10 мл вносили в колбу со МПБ (соотношение 1:10) и искусственно контаминировали 18-часовым штаммом *Bacillus* каждого вида в концентрации 10³ КОЕ/мл. Схема проведения эксперимента

Таблица 2

Результаты использования РНФ для детекции бацилл в пробах молока, искусственно контаминированного бактериями *Bacillus* разных видов в концентрации 10^3 КОЕ/мл

№ пробы	№ фага	Количество негативных колоний в контроле	Количество негативных колоний в опыте	Увеличение титра фага, раз	Результат РНФ (время исследования 26 часов)	Результат бактериологических исследований (время исследования 96 часов)
<i>Bacillus megaterium</i>						
1	V.meg – 10	39 ± 2	280 ± 13	7,2	Положительный	Отрицательный при выявлении концентрации 10^3 КОЕ/мл молока при использовании схемы Gordon (1973)
	V.meg – 1	43 ± 4	296 ± 9	6,9	Положительный	
2	V.meg – 10	39 ± 2	273 ± 11	7,0	Положительный	
	V.meg – 1	43 ± 4	233 ± 8	7,3	Положительный	
3	V.meg – 10	39 ± 2	288 ± 12	7,4	Положительный	
	V.meg – 1	43 ± 4	305 ± 6	7,1	Положительный	
<i>Bacillus subtilis</i>						
1	Bs-13	24 ± 3,2	166 ± 14	6,9	Положительный	Отрицательный при выявлении концентрации 10^3 КОЕ/мл молока при использовании схемы Gordon (1973)
	Bs-16	38 ± 4,4	266 ± 9	7,0		
2	Bs-13	24 ± 3,2	151 ± 8	6,3	Положительный	
	Bs-16	38 ± 4,4	274 ± 11	7,2		
3	Bs-13	24 ± 3,2	158 ± 6	6,6	Положительный	
	Bs-16	38 ± 4,4	277 ± 12	7,3		
<i>Bacillus mycoides</i>						
1	V.myc-3	56 ± 3,7	364 ± 12	6,5	Положительный	Отрицательный при выявлении концентрации 10^3 КОЕ/мл молока при использовании схемы Gordon (1973)
	V.myc-5	39 ± 4,6	199 ± 5	5,1		
2	V.myc-3	56 ± 3,7	347 ± 11	6,2	Положительный	
	V.myc-5	39 ± 4,6	218 ± 9	5,6		
3	V.myc-3	56 ± 3,7	367 ± 6	6,6	Положительный	
	V.myc-5	39 ± 4,6	230 ± 10	5,9		
<i>Bacillus mesentericus (pumilus)</i>						
1	Vm-3	36 ± 1,4	245 ± 13	6,8	Положительный	Отрицательный при выявлении концентрации 10^3 КОЕ/мл молока при использовании схемы Gordon (1973)
	Vm-8	22 ± 2,3	156 ± 6	7,1		
2	Vm-3	36 ± 1,4	209 ± 11	5,8	Положительный	
	Vm-8	22 ± 2,3	150 ± 9	6,8		
3	Vm-3	36 ± 1,4	241 ± 14	6,7	Положительный	
	Vm-8	22 ± 2,3	141 ± 6	6,4		

отражена на рис. 1. Результаты исследований представлены в табл. 1.

В табл. 2 приведены сравнительные результаты индикации бактерий рода *Bacillus* с применением специфических бактериофагов при применении бактериологического метода и метода РНФ.

На рис. 2 отражена схема ускоренной идентификации на примере бактерий *Bacillus subtilis* и *Bacillus cereus* с помощью селекционированных нами бактериофа-

гов (I) в сравнении со схемой выделения и дифференциации бацилл первой морфологической группы, изложенной в «Определителе бактерий Берджи» (1993) (II) [20].

Результаты проведенных исследований по детекции бактерий рода *Bacillus* в искусственно контаминированных пробах молока свидетельствуют о том, что постановка РНФ для обнаружения данных бактерий показала значительную экономию времени (26 часов)

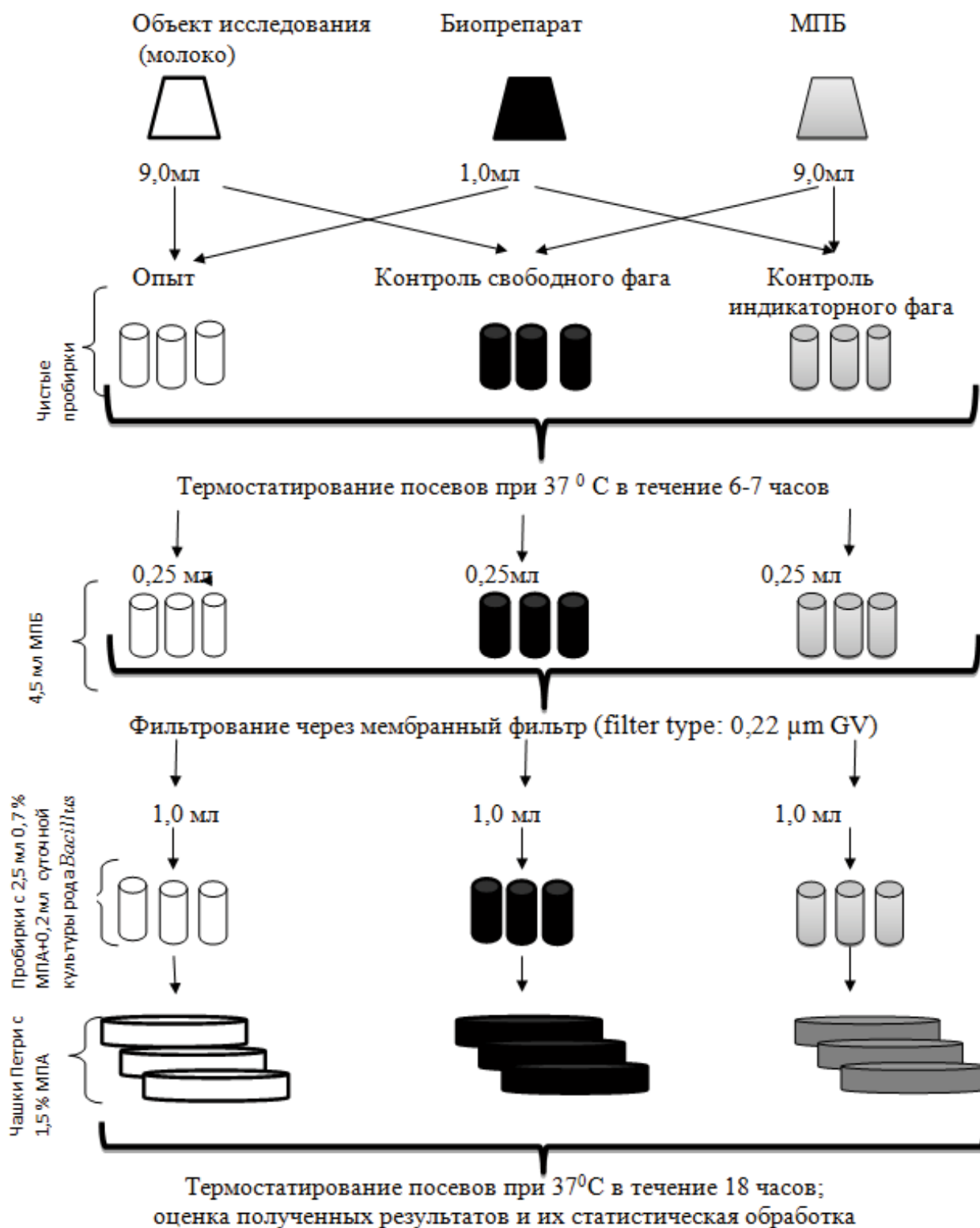


Рис. 1 - Схема постановки реакции нарастания титра фага с использованием экспериментального биопрепарата на основе бактериофагов изучаемых видов бактерий рода *Bacillus*

в сравнении с бактериологическим методом исследования (96 часов), чувствительность которого не позволяет обнаружить бациллы всех

вышеперечисленных видов.

Выводы

Исходя из выше изложенного и учиты-

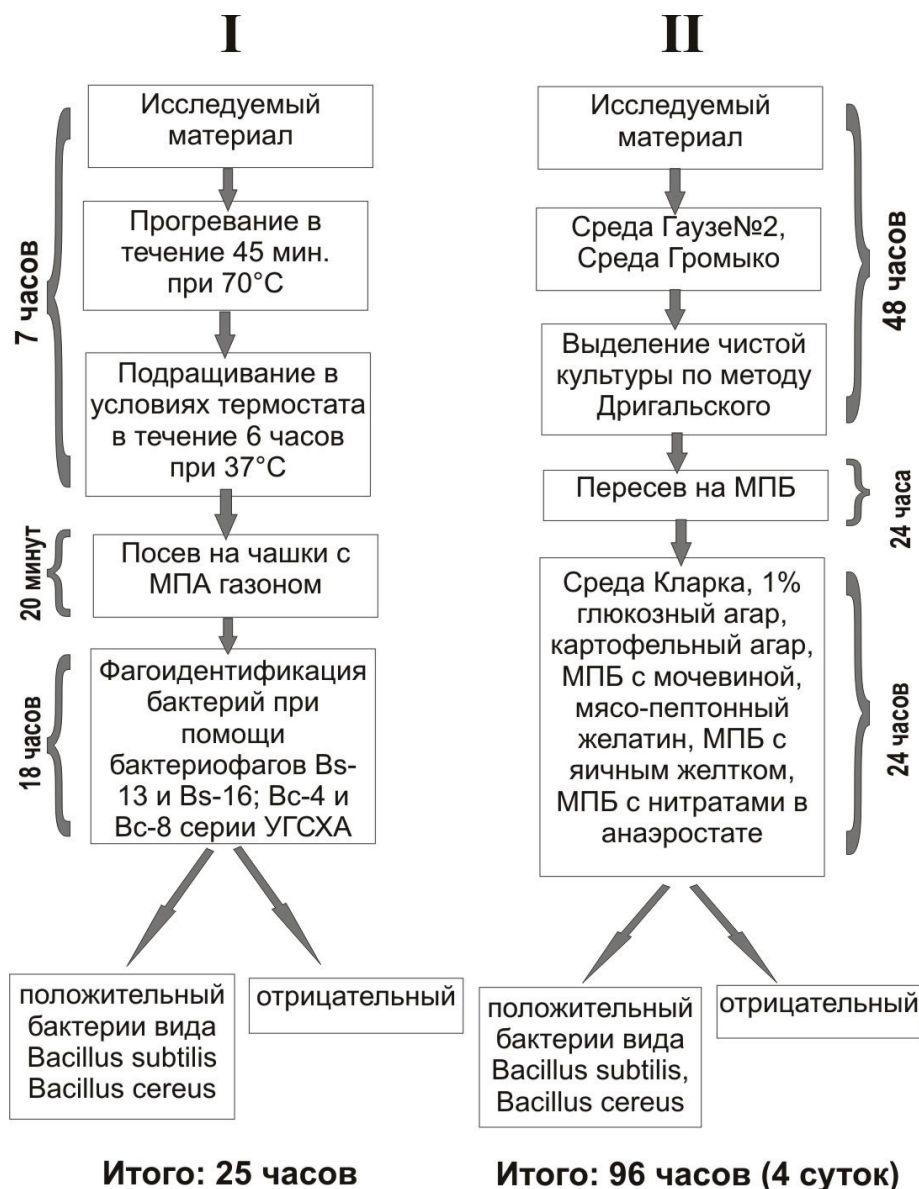


Рис. 2 - Схема ускоренной идентификации бактерий *Bacillus subtilis* и *Bacillus cereus* с помощью селекционированных нами бактериофагов (I) в сравнении со схемой выделения и дифференциации бацилл первой морфологической группы, изложенной в «Определителе бактерий Берджи» (II)

вая результаты исследований, полученных нами ранее, разработанный метод биосенсорной детекции *Bacillus megaterium*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus mesentericus* (*pumilus*) с применением выделенных и селекционированных специфических в пределах вида бактериофагов, может быть с успехом использован на этапе приемочного контроля качества молока-сырья.

Библиографический список

1. Джей, Дж.М. Современная пищевая

микробиология / Дж. М. Джей, М. Дж. Лесснер, Д.А. Гольден. – М.: БИНОМ Лаборатория знаний, 2011. – 887 с.

2. Васильев, Д.А. Бактериофаги микроорганизмов, значимых для животных, растений и человека / Д.А. Васильев, Н.А. Феоктистова, А.И. Калдыркаев. - Ульяновск: УГСХА ООО «Колор-Принт», 2013. –226 с.

3. Свириденко, Г., Комарова Т. Споровые аэробы рода *Bacillus* - значимые микроорганизмы порчи для молочных продуктов // Продовольственный торговый промышленный портал - режим доступа - URL: <http://www.produkt.by/Journal>.

4. Rasko, DA. Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms / D.A. Rasko, M.R. Altherr, C.S. Han, J. Ravel // FEMS Microbiol Rev. – 2005. – № 29. – P.303–329.

5. Техэксперт (электронный фонд правовой и нормативно-технической документации) – режим доступа - URL: <http://docs.cntd.ru/document>.

6. Законы России: справочник по законодательству – режим доступа - URL: <http://zakonrus.ru/gost>.

7. Васильев, Д.А. Бактериофаги рода *Bacillus* / Д.А. Васильев, Н.А. Феоктистова, С.Н. Золотухин, А.В. Алешкин. - Ульяновск: УГСХА, 2013. – 78 с.

8. Портал Foodinnovation.ru – режим доступа - URL: http://foodinnovation.ru/news/prom_news/3621.html.

9. Феоктистова, Н.А. Роль *Bacillus subtilis* в обсеменении пищевых продуктов

/ Н.А. Феоктистова, А.И. Мустафин, Д.А. Васильев // Материалы Всероссийской научно-практической конференции «Вклад молодых ученых в отраслевую науку с учетом современных тенденций развития АПК». – Москва, 2009. – Т.2. – С. 70-72.

10. Калдыркаев, А.И. Разработка системы фагов бактерий *Bacillus cereus* для идентификации и мониторинга данного микроорганизма: автореф. дис. ...канд. биол. наук / Калдыркаев Андрей Иванович. – Саратов, 2013. – С. 17.

11. Каттер, Э. Бактериофаги. Биология и практическое применение / Э. Каттер, А. Сулаквелидзе. – М.: Научный мир, 2012. – 636 с.

12. Юдина, М.А. Разработка параметров постановки реакции нарастания титра фага для индикации бактерий *Bacillus mesentericus* в объектах санитарного надзора / М.А. Юдина, Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2012. – № 3 (19). – С.69–73.

13. Васильев, Д.А. Идентификация бактерий *Bacillus cereus* на основе их фенотипической характеристики / Д.А. Васильев, Н.А. Феоктистова, А.И. Калдыркаев. - Ульяновск, ООО «Колор-Принт», 2013. – 48 с.

14. Васильев, Д.А. Методы частной бактериологии / Д.А. Васильев, А.А. Щербаков, С.Н. Золотухин. – Ульяновск: УГСХА, 2004. – 234 с.

15. Феоктистова, Н.А. Диагностика картофельной болезни хлеба, вызываемой бактериями видов *Bacillus subtilis* и *Bacillus*

mesentericus / Н.А. Феоктистова, А.И. Мустафин, Д.А. Васильев // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2011. – № 3 (15). – С.61-68.

16. Феоктистова, Н.А. Биоиндикация бактерий *Bacillus mycooides* в объектах санитарного надзора / Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2013. – № 3 (23). – С.43–49.

17. Феоктистова, Н.А. Методика выделения фагов бактерий видов *Bacillus cereus* и *Bacillus subtilis*, перспективы их применения / Н.А. Феоктистова, А.И. Мустафин, Д.А. Васильев // Естественные и технические науки. – 2011. - №2 (52). – С. 83-86.

18. Феоктистова, Н.А. Разработка схемы исследования материала с целью выделения и ускоренной идентификации бактерий видов *Bacillus cereus* и *Bacillus subtilis* / Н.А. Феоктистова, А.И. Мустафин, А.И. Калдыркаев // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. – 2011. - № 4(32). - С. 288-291.

19. Золотухин, С.Н. Создание и разработка схем применения диагностических биопрепаратов на основе выделенных и изученных бактериофагов энтеробактерий: автореф. дис. ...докт. биол. наук: / Золотухин Сергей Николаевич. – Ульяновск, 2007. – С.32.

20. Bergey's manual of determinative bacteriology. – Baltimore: Williams and Wilkins Co, – 1993. – 9th ed. – P.1258.