

и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути решения. Материалы V Международной научно-практической конференции.-Ульяновск: Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия им. П.А. Столыпина, 2013.- С. 146-154.

5. Симанова, Н.Г. К методике преподавания курса анатомии домашних животных / Н.Г. Симанова // Юбилейный сборник к 75-летию профессора Н.А. Жеребцова.- Ульяновск, 2005.- С. 38-40

6. Скрипник, Т.Г. Закономерности постнатальных изменений миелоархитектоники блуждающего нерва животных / Т.Г. Скрипник, Н.Г. Симанова // Актуальные вопросы аграрной науки и образования. Материалы Международной научно-практической конференции, посвященной 65-летию Ульяновской ГСХА.- Ульяновск, 2008.- С. 27-31.

7. Сравнительный морфогенез нейронитов краниального шейного и звездчатого ганглиев собаки / С.Н.Хохлова, Н.Г. Симанова, А.А. Степочкин, А.Н.Фасахутдинова // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии.- 2013.- № 1 (21).- С. 64-69.

8. Структурно-функциональные изме-

нения некоторых симпатических ганглиев у плотоядных в разные возрастные периоды / С.Н. Хохлова, Н.Г. Симанова, А.Н. Фасахутдинова, Е.М. Марьин, О.Н. Марьина // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии.-2010.- № 1.- С. 96-100.

9. Фасахутдинова, А.Н.Возрастные особенности скелетотопии спинного мозга собаки и кролика / А.Н. Фасахутдинова, С.Г. Писалева // Роль биологии и ветеринарной медицины в реализации государственной программы развития сельского хозяйства на 2008-2012гг. Материалы международной научно-практической конференции. – Оренбург. - 2008. - С 117-118.

10. Фасахутдинова, А.Н. Скелетотопия спинного мозга собаки и кролика/А.Н. Фасахутдинова, С.Г. Писалева // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии.– 2010. - С 39-41.

11. Фасахутдинова, А.Н. Материалы по возрастной морфологии спинного мозга кролика / А.Н. Фасахутдинова //Юбилейный сборник (к 75-летию профессора Н.А. Жеребцова). – Ульяновск: Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия, 2005. – С 29-31.

УДК 602.3:579.8

РЕЗУЛЬТАТЫ СРАВНИТЕЛЬНОГО АНАЛИЗА БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЙ КАКАО-ПОРОШКА НА НАЛИЧИЕ БАЦИЛЛ, ВЫЗЫВАЮЩИХ ПОРЧУ ПРОДУКТОВ ПИТАНИЯ (БВППП)

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

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»

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

432017, г. Ульяновск, бульвар Новый Венец, 1; тел.: 8(422)559547,

e-mail: feokna@yandex.ru

Ключевые слова: какао-порошок, порча продуктов питания, бациллы, *Bacillus cereus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus mesentericus (pumilus)*, *Bacillus megaterium*, бактериофаги, методика, культура.

В статье представлены результаты исследований по подбору оптимальной методики для изучения качественного и количественного состава бацилл, вызывающих порчу продуктов питания на основе какао-порошка, как одного из основных компонентов рецептуры кондитерских изделий. Микробиологическая оценка качества какао-порошка, проведенная нами по 11 партиям, показала, что количество бактерий рода *Bacillus* исследованных пробах какао-порошка изменяется в пределах от $5,1 \times 10^2$ КОЕ/г до $6,2 \times 10^5$ КОЕ/г. Изученные биологические свойства выделенных культур позволили отнести их к видам *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus (mesentericus)*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus megaterium*. Показано, что срок бактериологического исследования по традиционной схеме выделения и дифференциации бацилл первой морфологической группы (Gordon, 1973) составляет 107 часов при значительных экономических затратах. Применение «Ключа для первичной дифференциации бактерий рода *Bacillus*» занимает 77 часов. Схема фагоидентификации составляет 29 часов. Эффективность применения трех методик аналогичная.

Введение

Считалось, что кондитерские изделия из-за большой концентрации сахара (осмотического давления), применяемого при производстве, могут не вызывать опасений на предмет бактериологической опасности. Однако в последнее десятилетие экспертами Всемирной организации здравоохранения в рамках Комиссии Кодекс Алиментариус создана классификация пищевых продуктов – причин пищевых отравлений бактериальной этиологии, которая отнесла какао-порошок, шоколад, шоколадные изделия, какао-продукты и шоколадные конфеты ко второй категории, т.е. они являются оптимальной средой для культивирования возбудителей токсикоинфекций и токсикозов [1,2].

Безопасность пищевых продуктов, в частности кондитерских изделий и полуфабрикатов, в настоящее время оценивается по 4 группам микроорганизмов, куда входят санитарно-показательные (КМАФАнМ (количество мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов) и БГКП (бактерий группы кишечной палочки)), патогенные (в том числе *Salmonella*), плесени и дрожжи и условно-патогенные (*Staph. aureus*, *Bacillus cereus* и др.) [3].

Из литературных данных известно, что спорообразующие аэробные бактерии, к которым относятся бактерии *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus (mesentericus)*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus megaterium*, являются активными продуцентами разнообразных гидролитических ферментов и используют в качестве питательных вещества

белки, жиры, углеводы, глюкозиды, спирты и органические кислоты [4-7]. Повышенное содержание бацилл, вызывающих порчу продуктов питания (БВППП), является причиной изменения органолептических свойств сырья, полуфабрикатов и готовых кондитерских изделий, основным рецептурным компонентом которых является какао-порошок, что сказывается на сроках годности и доброкачественности готовой продукции.

Цель наших исследований - изучение качественного (видовой состав бактерий) и количественного состава БВППП какао-порошка различных партий.

Задачи:

- подобрать оптимальную методику (по временным и экономическим показателям) для изучения качественного и количественного состава БВППП какао-порошка;
- определить количество БВППП какао-порошка;
- изучить видовое разнообразие БВППП какао-порошка, включая патогенный для человека вид *Bacillus cereus*.

Объекты и методы исследований

В соответствии с рекомендациями Международной комиссии по микробиологическим спецификациям пищевых продуктов ICMSF оценка качества какао-порошка проводилась по 11 партиям, из средней пробы каждой партии брались 3 навески, которые высевались в двух повторностях. 1-7 партия – какао-порошок производства Россия; 8-11 – импортного производства.

Для выделения БВППП использовали две схемы дифференциации бактерий рода *Bacillus* (по методикам GordonR. [8]

и R.A.Slepecky, H.T. Hemphill [9]), которые включали обширный список биохимических свойств (табл. 3 и рис. 1).

Фагоидентификацию бактерий рода *Bacillus* осуществляли по методикам, модифицированным Васильевым Д.А., Золотухиным С.Н. с соавт. [10-11]. Статистическую обработку результатов опытов проводили с применением пакета прикладных программ Statistica 6.0. (for Windows; «Stat Soft Ins.», США), Microsoft Excel 2003 (for Windows XP).

В исследовании применяли разработанные нами фаговые биопрепараты на основе Phagum *Bacillus megaterium* Bm – 10 УГСХА-Депи Phagum *Bacillus megaterium* Bm – 1 УГСХА-Деп для идентификации *Bacillus megaterium*; Phagum *Bacillus subtilis* Bs – 13 УГСХА-Депи Phagum *Bacillus subtilis* Bs – 16 УГСХА-Деп для идентификации *Bacillus subtilis*; Phagum *Bacillus mycoides* B. мус – 3 УГСХА-Депи Phagum *Bacillus mycoides* B. мус – 5 УГСХА-Деп *Bacillus mycoides* для идентификации *Bacillus mycoides*; Phagum *Bacillus mesentericus (pumilus)* Bm – 3 УГСХА-Депи Phagum *Bacillus mesentericus (pumilus)* Bm – 8 УГСХА-Деп для идентификации *Bacillus mesentericus (pumilus)*, выделены и изучены нами.

Результаты исследований

Известно, что технология производства какао-порошка требует охлаждения жмыха до 20°C и отделения крупных частиц в воздушно-инерционных классификаторах, что «заставляет» бактериальную клетку образовывать споры, с последующей длительной лаг-фазой для прорастания. Поэтому первоначально каждая навеска была подвергнута термостатированию при 37°C в течение 10-18 часов для перехода спор-

вой формы искомым бактерий в вегетативную (соотношение 1:10 в среде обогащения (Claus, 1955)). В 100 см³ дистиллированной воды растворяли 10 г KNO₃, 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: 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴. 1 мл разведения высевался на чашку Петри при добавлении 9 мл мясопептонного 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 табл. 1 и показывают, что количество БВППП в исследованных пробах какао-порошка изменяется в пределах от 5,1x10² КОЕ/г до 6,2x10⁵ КОЕ/г.

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 табл. 2.

Следующий этап исследований был посвящен изучению биохимических свойств

Таблица 1

Количество бактерий, выделенных из проб какао-порошка

Номер пробы	Количество БВППП, КОЕ/г	Номер пробы	Количество БВППП, КОЕ/г
1	3,6x10 ⁴ ±0,6x10 ⁴	7	1,6x10 ⁴ ±0,4x10 ⁴
2	6,2x10 ⁵ ±1,1x10 ⁵	8	7,4x10 ² ±1,6x10 ²
3	0,8x10 ⁵ ±0,1x10 ⁵	9	4,0x10 ³ ±0,8x10 ³
4	1,9x10 ⁴ ±0,5x10 ⁴	10	5,1x10 ² ±1,3x10 ²
5	4,9x10 ³ ±1,2x10 ³	11	6,4x10 ² ±1,5x10 ²
6	6,7x10 ³ ±0,9x10 ³		

Таблица 2

Культуральные свойства выделенных бактерий рода *Bacillus*

Тип колоний	Характерные культуральные свойства		Количество выделенных культур одного типа
	особенности роста на мясо-пептонном агаре с глюкозой и дрожжевым экстрактом	особенности роста на мясо-пептонном бульоне	
тип 1 (условная группа <i>B. cereus</i>)	Колонии плотной консистенции, белые, восковидные, круглые	Среда мутная, осадок трудноразбиваемый, крошковатый, прочные пленка и пристеночное кольцо. При образовании пленки среда просветляется/	2
тип 2 (условная группа <i>B. megaterium</i>)	Колонии слизистые, желтовато-белые	Растет в виде осадка на дне пробирки с помутнением среды	2
тип 3 (условная группа <i>B. pumilus</i>)	Толстые матово-белые морщинистые колонии	Бульон остается почти прозрачным, на поверхности среды морщинистая пленка	1
тип 4 (условная группа <i>B. mycooides</i>)	Войлоковидные наложения, ползущие по поверхности среды	Помутнения среды нет, на дне ватообразный осадок, пленки не образует	2
тип 5 (условная группа <i>B. subtilis</i>)	Колонии белые или сероватые, морщинистые	Бульон мутный, при образовании пленки среда просветляется	1

выделенных культур. Для типирования мы применяли ключ R.A. Slepecky, H.T. Hemphill [9], разработанный для первичной дифференциации бактерий родов *Bacillus* и *Paenibacillus* (табл.3).

Алгоритм применения ключа: при положительном результате 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 (рис. 1) по классической методике, составляющей основу идентификационных тестов для бактерий рода *Bacillus* в «Определителе бактерий Берджи».

На основе изученных нами биологиче-

ских свойств выделенные культуры отнесли к видам *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus (mesentericus)*, *Bacillus mycooides*, *Bacillus megaterium*. Время исследования с применением «Ключа для первичной дифференциации бактерий рода *Bacillus*» составило 77 часов. Исследования по схеме выделения и дифференциации бацилл первой морфологической группы [8] составляет 107 часов. Значительные временные и материальные затраты не позволяют применять данные методики в производственных лабораториях, в виду невозможности останавливать технологический процесс производства кондитерских изделий до получения результата бактериологического исследования с ККТ (критической контрольной точки) системы обеспечения безопасности пищевой продукции НАССР.

С целью оптимизации процесса идентификации бацилл, вызывающих порчу продуктов питания, мы использовали специфические бактериофаги, выделенные и селекционированные нами ранее по отработанным

Ключ для первичной дифференциации бактерий родов *Vacillus* и *Paenibacillus*

1. Каталаза: 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. polymyxa</i>
отрицательный.....	7
7. Редукция NO ₃ до NO ₂ : 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. stearothersophilus</i>
отрицательный	11
11. Гидролиз крахмала: положительный.....	12
отрицательный.....	15
12. Кислота и газ из глюкозы (неорганический N): положительный.....	<i>B. macerans</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. stearothersophilus</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>

ной методике фагоидентификации [12-13].

На поверхность подсушенного мясопептонного агара в чашках Петри пастеровской пипеткой наносили 3-4 капли бульонной 10-часовой культуры исследуемых микроорганизмов. Нанесённую культуру равномерно распределяли по поверхности среды стерильным шпателем. Чашки ста-

вили в термостат для подсушивания газона культуры на 20-30 минут при 37 °C.

Чашку делили бактериологическим карандашом на шесть секторов. На поверхность засеянной среды, в зоне первого-пятого секторов, пастеровской пипеткой легким прикосновением капли наносили фаги, на шестой сектор в качестве контроля наноси-

Эффективность методов идентификации бактерий рода *Bacillus*

Метод идентификации бактерий	Время исследования, час	Вид бактерий				
		<i>B. cereus</i>	<i>B. megaterium</i>	<i>B. pumilus</i>	<i>B. mycooides</i>	<i>B. subtilis</i>
Фагоидентификация	29	2	2	1	2	1
«Ключ для первичной дифференциации бактерий рода <i>Bacillus</i> »	77	2	2	1	2	1
Схема выделения и дифференциации бацилл первой морфологической группы	107	2	2	1	2	1

ли стерильный мясопептонный. Наклоняли чашку, чтобы капли стекли в виде дорожки. Чашки оставляли для подсушивания в боксе на 20-30 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 возможно 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 тому виду бактерий, для которого специфичен «сработавший» бактериофаг.

В табл. 4 представлены результаты фагоидентификации выделенных нами бактерий в сравнении с двумя ранее применяемыми нами методиками. Полученные результаты свидетельствуют об эффективности применения специфических бактериофаговых препаратов с целью типирования бактерий рода *Bacillus*, так как сокращение времени исследования и снижение затрат на фоне экономии дорогостоящих питательных сред и реактивов, не снижает качества исследования, что было продемонстрировано нами в данном эксперименте.

Выводы

Оценка микробиологических показателей качества какао-порошка, проведенная нами по образцам 11 партий, показала, что количество БВПП в исследованных пробах какао-порошка изменяется в пределах

от $5,1 \times 10^2$ КОЕ/г до $6,2 \times 10^5$ КОЕ/г. Повышенная контаминация отечественного какао-порошка в сравнении с импортным может, на наш взгляд, объясняться рядом причин: во-первых, такие технологические операции, как обжарка и последующее отделение какаовеллы – это неотъемлемая часть производства какао-порошка вне зависимости от географического положения, температурные параметры которых недостаточны для инактивации выделенных нами бактерий видов *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus (mesentericus)*, *Bacillus mycooides*, *Bacillus megaterium*, как следствие, речь может идти о наличии в объектах исследований дебактеризаторов.

Во-вторых, контаминация оборудования при дроблении и размоле и сложность санитарной обработки технологической линии приводит к экзогенному загрязнению сырья, полуфабриката и готового продукта БВПП.

Нами доказано, что срок бактериологического исследования по традиционной схеме выделения и дифференциации бацилл первой морфологической группы (Gordon, 1973), составляет 107 часов при значительных экономических затратах. Модифицированная схема ускоренной идентификации БВПП с применением «Ключа для первичной дифференциации бактерий рода *Bacillus*» составляет 77 часов. Схема предлагаемой нами фагоидентификации составляет 29 часов.

На рис. 1 показана сравнительная характеристика трех методов исследований по идентификации бацилл, вызывающих порчу продуктов питания (БВПП), к которым от-

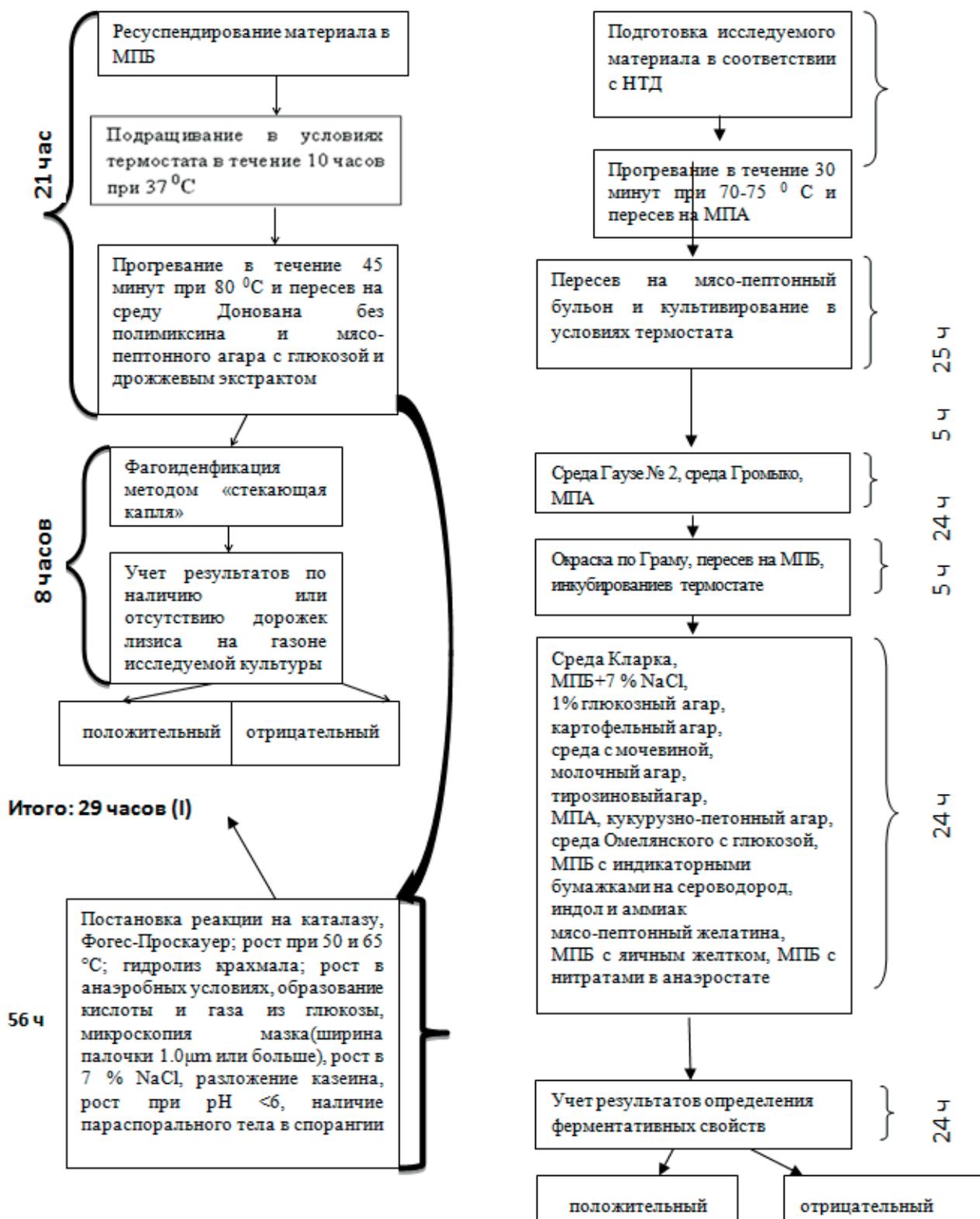


Рис.1 - Схема ускоренной идентификации БВП с помощью селекционированных нами бактериофагов (I) в сравнении со схемой выделения и дифференциации бацилл первой морфологической группы (III) и «Ключом для первичной дифференциации бактерий рода *Bacillus*»(II)

носятся виды *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus (mesentericus)*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus megaterium*. Также мы предлагаем использовать «Ключ...» в симбиозе с методом фагоидентификации при отрицательном результате фаготипирования выделенной культуры без приостановления исследований.

Библиографический список

1. Codex alimentarius. Мед, сахара, какао-продукты и шоколад. – М.: «Весь мир», 2007. – с. 31-37.

2. Леонова, И.Б. Характеристика качества шоколада и какао-порошка по микробиологическим критериям / автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата технических наук / Российская экономическая академия им. Г. В. Плеханова. - Москва, 1993. – С. 3-5.

3. Скокан, Л.Г. Технологические аспекты обеспечения качества кондитерских изделий / автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора технических наук / Московский государственный институт пищевых производств. - Москва, 2004. – С. 4-8.

4. Васильев, Д.А. Разработка параметров постановки реакции нарастания титра фага для индикации бактерий *Bacillus mesentericus* в объектах санитарного надзора / Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин, Н.А. Феоктистова [и др.] // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2012. - № 3. - С. 69-73.

5. Васильев, Д.А. Биосенсорная детекция бактерий рода *Bacillus* в молоке и молочных продуктах для предупреждения их порчи / Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин, Н.А. Феоктистова [и др.] // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2013. - № 4 (24). - С. 36-43.

6. Калдыркаев, А.И. Разработка системы фаговаров бактерий *Bacillus cereus* для идентификации и мониторинга данного ми-

кроорганизма / А.И. Калдыркаев, Н.А. Феоктистова, А.В. Алешкин // В книге: «Бактериофаги микроорганизмов значимых для животных, растений и человека». - Ульяновск, 2013. - С. 211-225.

7. Петрукова, Н.А. Биоиндикация содержания бактерий *Bacillus megaterium* в молоке и молочных продуктах / Н.А. Петрукова, Н.А. Феоктистова, Д.А. Васильев [и др.] // «Экология родного края: проблемы и пути их решения»: материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. – Киров, 2014. - С. 375-377.

8. Gordon, R. The genus *Bacillus* / R. Gordon // In: Handb. Microbiol. Cleveland (Ohio), 1973. V.1. P.71–88.

9. Slepecky, R.A. The Genus *Bacillus*-Non-medical / R.A. Slepecky, H.T. Hemphill // Prokaryotes. – 2006. - № 4. – P. 530–562.

10. Романова, Н.А. Сравнительная эффективность методов выделения фагов бактерий *Bacillus megaterium* / Н.А. Романова, Н.А. Феоктистова, С.Н. Золотухин [и др.] // Вестник ветеринарии. - 2013. - № 1 (64). - С. 26-27.

11. Васильев, Д.А. Характеристика биологических свойств бактериофагов вида *Bacillus subtilis* / Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин, Н.А. Феоктистова [и др.] // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2011. - № 1. - С. 79-83.

12. Феоктистова, Н.А. Методы выделения бактериофагов рода *Bacillus* / Н.А. Феоктистова, В.А. Макеев, М.А. Юдина [и др.] // Вестник ветеринарии. - 2011. - Т. 59. - № 4. - С. 88-89.

13. Феоктистова, Н.А. Разработка схемы исследования материала с целью выделения и ускоренной идентификации бактерий видов *Bacillus subtilis* и *Bacillus cereus* / Н.А. Феоктистова, А.И. Калдыркаев, А.Х. Муштафин // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. - 2011. - Т. 4. - № 32-1. - С. 288-290.