



УДК 637.3.07

## Виявлення мікроорганізмів роду *BACILLUS* у сирах

М. ШУГАЙ, канд. біол. наук

Інститут продовольчих ресурсів НААН України

**Анотація.** Досліджено рівень забруднення напівтвердих сирів вітчизняних виробників спороутворювальними бактеріями роду *Bacillus*. Усі проби сирів були контаміновані бацилами, більшість з яких (64 %) перебували у формі вегетативних клітин. Серед бацил виявлено психротрофні, мезо- та термофільні штами, представлені як споровою, так і вегетативною формами, співвідношення між якими залежно від температури культивування, було різне. Найчисельнішу групу становили мезофільні бацили, здатні розвиватись за температури 30 °С: кількість вегетативних клітин сягала  $10^3$  КУО/г, а спор –  $10^2$  КУО/г. Цей факт свідчить про те, що умови виробництва сиру є сприятливими для розвитку/збереження цих мікроорганізмів та їх спор.

**Ключові слова:** *Bacillus*, безпечність, мікробіологічне забруднення, напівтверді сири, якість

**Detection of microorganisms of genus *Bacillus* in cheeses.** M.SCHUGAY.  
Institute of food resources of НААН of Ukraine.

**Abstract.** The analysis focused on the level of pollution of domestic hemisolid cheeses by bacteria of the genus *Bacillus*. All samples of cheese were contaminated by bacillus, most of which (64 %) had vegetative form. Psychrotrophic, mesophilic and thermophilic bacterias in spores as well as vegetative forms, which had different correlation that depends on temperature of cultivation, was revealed between the bacillus. Mesophilic bacillus, capable to vegetate at 30C formed the majority group: quantity of vegetative cells measured up to  $10^3$  KFU/g, and  $10^2$  KFU/g of spors. It indicates the proper conditions of cheese production during the development and storage of these microorganisms and theirs spores.

**Key words:** *Bacillus*, microbiological contamination, hemisolid cheeses, quality, safety

Спороутворювальні бактерії роду *Bacillus* представляють дуже розповсюджену в природі групу мікроорганізмів, які завдяки широким адаптаційним можливостям освоїли практично всі біотопи Земної кулі – від тропічних ґрунтів до малоприсаєднатих для життя арктичних вод і екстремальних середовищ [1]. Ці бактерії та їх спори можна виявити у повітрі, на рослинах і тваринах, їхніх рештках та інших субстратах. Описано велику кількість видів бацил, проте у літературі час від часу з'являються дані про виявлення нових [1]. Більшість бацил активно продукують ферменти, що спричиняють гідроліз білків, крохмалю та інших субстратів. Завдяки чому ці мікроорганізми здатні розщеплювати рештки рослин та сполуки, які повільно розкладаються. Беручи активну участь у процесах ґрунтоутворення, спороутворювальні бактерії є важливою складовою біоценозів.

З використанням бацил освоєно промислове виробництво цінних ферментів, органічних кислот, антибіотиків та інших сполук. Варто зазначити, що значну частку антибіотиків бактеріального походження було виділено саме зі спороутворювальних бактерій. Високий рівень антагоністичної активності деяких штамів бацил сприяв розробці на їх основі лікувальних препаратів, так званих пробіотиків [2, 3].

Проте серед бацил є і патогенні для тварин, комах і навіть людини форми. Найбільш досліджений *Bacillus anthracis* – збудник сибірської виразки, спалахи захворювань якої відомі людству ще з античних часів. До умовно-патогенних мікроорганізмів належить *B. cereus*, що може спричинити харчові отруєння. Є дані [4] про причетність окремих штамів *B. subtilis*, *B. pumilis*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. circulans* та ін. до розвитку патологічних процесів у людей. На щастя, такі випадки реєструються порівняно рідко.

Здатність бацил утворювати ендоспори – осо-

бливу форму спокою, яка відзначається високою стійкістю до несприятливих факторів (високої температури, тиску, різноманітних хімічних сполук, іонізуючого випромінювання тощо) тривалий час привертає увагу дослідників з точки зору з'ясування природи анабіотичного та парабіотичного стану живої матерії. У цьому напрямі вже зроблено чимало відкриттів, проте, таємницю механізму надзвичайної стійкості спор ще не розгадано. Водночас здатність утворювати спори, що мають найвищу стійкість серед відомих нині живих організмів до несприятливих факторів довкілля, призводить до того, що бактерії роду *Bacillus* є важливим чинником біологічного руйнування харчових продуктів.

**Упродовж 2013 у відділі біотехнології Інституту продовольчих ресурсів НААН України проведено дослідження сирів вітчизняного виробництва з низькою температурою другого нагрівання (загалом 5 проб) щодо рівня забруднення бацилами. Представляло інтерес визначити ступінь контамінації сирів бацилами у споровій та вегетативній формах.**

**Матеріали та методи досліджень.** Для виявлення кількості спор бацил відповідні розведення проб сирів прогрівали за температури  $88 \pm 2$  °C упродовж 12 хв, після чого їх висівали на м'ясопептонному агарі (МПА) та МУР-агарі (МУР agar Mossel, (Merck, Німеччина). Чашки культивували за температур 30 °C і 55 °C упродовж 3 діб та за 7 °C упродовж 15 діб. Число вегетативних клітин бацил встановлювали на МУР-агарі. Дане середовище містить антибіотик поліміксин В, що допомагає позбутися мікрофлори, яка може пригнічувати ріст бацил. Наявність у середовищі жовткової емульсії дає змогу виявити бацили групи *B. cereus* за ознакою наявності лецитиназної активності. Умови культивування посівів були такі ж як і для спор.

За **результатами досліджень** бацили виявлено в пробах усіх сирів. При цьому встанов-

лено, що психротрофні, мезо- та термофільні штами цих мікроорганізмів представлені як спорами, так і вегетативними клітинами (рис. 1). Найчисельнішими виявились бацили, здатні розвиватись за температури 30 °C. Так, кількість спор у чотирьох пробах становила  $10^2$  КУО/г, в одній –  $10^1$  КУО/г, тоді як вегетативну форму виявлено скрізь у третьому розведенні. Менше було термофільних бацил, культивованих за температури 55°C. Їх спори виявлялись переважно у першому та в одній пробі – у другому розведенні, а вегетативні клітини – у другому розведенні. Слід зауважити, що завдяки наявності на поверхні клітин джгутиків, більшість бацил за сприятливих умов здатні дуже швидко колонізувати поверхню поживного середовища. Зокрема, це було характерно для тих, що перебували у сирі у формі вегетативних клітин, проби з якими культивували за температур 30°C і 55°C. Про їх інтенсивний ріст свідчила зміна забарвлення МУР-агару з малинового на жовте (зумовлена ферментацією маніту бацилами), що відбувалась по всій чашці менше ніж за добу. Високою енергією росту також характеризувались деякі штами бацил, проросли з активованих спор.

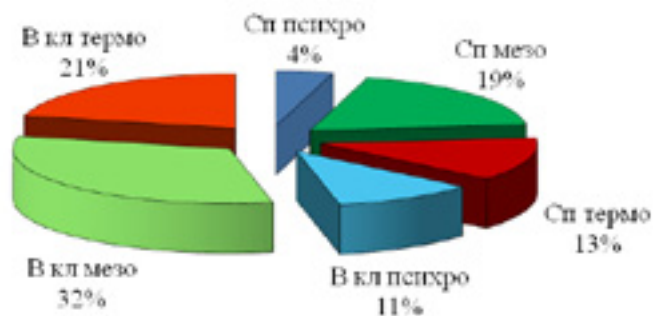
Найнижчою була чисельність психротрофних штамів бацил, які розвинулись за температури 7 °C. Для вегетативних клітин вона становила  $10^1$  КУО/г, тоді як спори, здатні проростати за такої температури, було виявлено лише у двох пробах.

Наявність бацил у сирах не є несподіванкою, оскільки ці мікроорганізми завжди виявляються у середовищі ферми, звідки вони легко потрапляють до молочної сировини. Під час пастеризації молока, яку у сироварінні прийнято проводити за температури  $72 \pm 2$  °C упродовж 15–20 с, вегетативні клітини бацил гинуть. Однак такий режим обробки молочної сировини неефективний щодо спор. Більше того, під дією температури може відбутись їх активація, що призведе до проростання спор та розвитку за сприятливих умов вегетативної форми.

За даними літератури [5] процес активації спор бацил залежить від багатьох фізичних та хімічних чинників, серед яких чи не найважливішим є температура. Зазвичай теплова обробка прискорює проростання спор. З підвищенням температури відсоток активованих спор зростає. Проте не всі активовані спори проростають одразу. Деякі з них упродовж тривалого часу залишаються непророслими, не втрачаючи життєздатності. Причину цього явища та природу таких «дрімаючих» спор ще не з'ясовано.

Крім сировини джерелом забруднення сирів бацилами та їх спорами може бути обладнання, на поверхні якого вони здатні утворювати стійкі до впливу різноманітних чинників біоплівки. Після потрапляння в сирне молоко чи зерно ці мікроорганізми практично безперешкодно можуть репродукуватись під час виробки та дозрівання сиру, особливо на його початку, що іноді може при-





**Рис. 1. Співвідношення між психротрофними, мезофільними та термофільними штамми бацил, виявленими в сирах у вигляді спор та вегетативних клітин. Скорочення: Сп – спори, В кл – вегетативні клітини**



**Рис. 2. Ріст на МПА, вилучених із сирів бацил, здатних утворювати пігментовані ендоспори**

звести до розвитку тих чи інших вад. Так, було повідомлено [6] про здуття сирних головок, спричинене розвитком *Bacillus polymixa*, при цьому кислотність сиру через 24 години після виробки знаходилась у межах норми і становила 5,6 одиниць рН. Описано випадки виникнення невластивого темного забарвлення сирного тіста, пов'язаного з розвитком бацил, здатних до пігментування [7]. Крім цього інтенсивний розвиток бацил може негативно позначитись на смакових характеристиках сиру, надаючи йому неприємного нечистого присмаку. Проте, найбільші проблеми пов'язані з наявністю *B. cereus*, патогенні штамми якого здатні продукувати діарейний і блювотний екзотоксини. У виникненні харчових токсикоінфекцій велике значення має кількісний вміст цих мікроорганізмів.

За даними літератури розвиток отруєння відбувається після споживання їжі, контамінованої *B. cereus* чисельністю  $10^4$ – $10^9$  КУО/г. Величина інфекційної дози залежить від частки клітин, що перебувають у стані спори, і тому можуть подолати кислотний бар'єр шлунка [4].

Серед вилучених із сирів бацил виявлено штамми, ендоспори яких утворювали коричневий та рожевий пігменти (рис. 2), а також умовно-патогенні *B. cereus*. Останні ідентифікували за розвитком

на МУР-агарі характерних колоній рожевого кольору, оточених зоною білого преципітату, зумовленого лецитиназною активністю. Важливо зазначити, що мікроорганізми групи *B. cereus* виявлено лише в одній пробі – вони розвинулись з активованих прогріванням спор. Наявність цих мікроорганізмів у такій незначній кількості не могла істотно вплинути на безпечність досліджуваного сиру.

#### **Висновки.**

1. Бактерії роду *Bacillus* є поширеною групою контамінантів напівтвердих сирів – ці мікроорганізми та їх спори виявлено в усіх без винятку пробах.

2. Серед вилучених із сирів бацил наявні психротрофні, мезо- та термофільні штамми, представлені вегетативною і споровою формами, співвідношення між якими залежно від температури культивування було різним.

3. Наявність у пробах спор і вегетативних клітин бацил, максимальні титри яких становили відповідно  $10^2$  КУО/г і  $10^3$  КУО/г, свідчить, що умови виробництва сиру загалом є сприятливими для їх збереження та/чи розвитку.

4. Рівень забруднення сирів бацилами, зокрема *B. cereus*, не є критичним і незначно позначився на показниках безпечності та якості продукту.

#### **ЛІТЕРАТУРА**

1. **Amoozegar M.A., SanchezPorro C., Rohban R., Hajighasemi M., Ventosa A.** *Bacillus persepolensis* sp. nov., a moderately halophilic bacterium from a hypersaline lake // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2009. – Vol. 59. – P. 2352–2358.
2. **Чудновская Н.В., Рыбалко С.Л., Сорокулова И.Б., Белявская В.А., Резник С.Р., Смирнов В.В.** Антивирусная активность пробиотиков из бацилл // *Доповіді Національної академії наук України*. – 1995. – № 2. – С. 124–126.
3. **Скрыпник И.Н., Маслова А.С.** Современные спорообразующие пробиотики в клинической практике // *Сучасна гастроентерологія*. – 2009. – № 3(47). – С. 81–90.
4. **Logan N.A.** *Bacillus* and relatives in foodborne illness // *Journal of Applied Microbiology*. – 2011. – Vol. 112. – P. 417–429.
5. **Lvdal I.S., Granum P.E., Rosnes J.T., Lvdal T.** Activation of *Bacillus* spores at moderately elevated temperatures (3033°C) // *Antonie Van Leeuwenhoek*. – 2013. – Vol. 103. – № 3. – P. 693–700.
6. **Tjepkema R., Price W.V. Foster E. M.** An early gas defect in Swiss cheese caused by *Bacillus polymyxa* // *Journal of Dairy Science*. – 1953. – Vol. 36. – №12. – P. 1272–1278.
7. **Kramer J.M., Gilber R.J.** *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species, in *Foodborne bacterial pathogens*. Ed Doyer M.P. New York, Marcel Dekker. – 1989. – P. 21–70.