

Н. В. Гончарова, аспирант; З. Е. Егорова, доцент

## ИЗУЧЕНИЕ ФАКТОРОВ ПАТОГЕННОСТИ МИКРОБНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ РАСТИТЕЛЬНЫХ ПРОДУКТОВ

The article is devoted to research pathogenic factors of non-pathogenic *Bacillus* species isolated from vegetable products and raw materials. The results of investigation on haemolytic and coagulative activity and ability to produce lecithinase of 62 strains genus *Bacillus* are presented.

Проблема пищевых отравлений, среди которых наибольшую опасность представляют отравления микробного происхождения, до сих пор чрезвычайно остро стоит во всех странах мира. Общее количество пищевых отравлений оценить сложно, но, по официальным данным, в 2000 г. они являлись причиной смерти около 2,1 млн. человек. В США пищевые отравления являются причиной примерно 76 млн. заболеваний, 325 тыс. госпитализаций и 5 тыс. смертей ежегодно, а затраты на медицинское обслуживание и потерю трудоспособности вследствие заболеваний, вызванных основными патогенами, каждый год составляют 35 млн. долларов [1].

В то же время, во всем мире довольно велика доля инфекций с неустановленным этиологическим агентом. Так, в Республике Беларусь из 9573 официально зарегистрированных за 2003 г. случаев острых кишечных инфекций более 38% вызвано неустановленным возбудителем [2]. Среди причин подобной ситуации отмечается поиск общепризнанных возбудителей заболеваний в лабораторной диагностике и игнорирование представителей обычной микрофлоры окружающей среды, относимых к лабораторным контаминантам [3].

Одними из широко распространенных в природе микроорганизмов являются споровые аэробы рода *Bacillus*. Являясь постоянными обитателями почвы, они практически всегда присутствуют в растительном сырье для производства пищи. Благодаря способности образовывать споры эти микробы могут переносить разного рода неблагоприятные воздействия и выживать даже в продуктах, подвергнутых стерилизации.

С пищей, водой, вдыхаемым воздухом микроорганизмы рода *Bacillus* неизменно попадают в организм человека. Известно, что под воздействием различных неблагоприятных факторов может увеличиваться проницаемость стенок кишечника, вследствие чего возможно проникновение в кровь токсинов бактерий – обитателей желудочно-кишечного тракта и возникновение либо усиление патологического состояния организма [4].

Доказана роль представителей рода *Bacillus* в возникновении и развитии широкого спектра заболеваний, среди которых бактериемии и

септицемии, бактериальный эндокардит, пневмонии, энцефалиты, менингиты, осложнения у хирургических больных, инфекционные поражения глаз и др.

С точки зрения пищевых отравлений опасными для человека признаны *B. anthracis* и *B. cereus*. Однако в литературе имеются сведения о том, что некоторые микроорганизмы рода *Bacillus*, в частности *B. subtilis*, считавшиеся ранее сапрофитами, также могут являться причинами отравлений [3].

Сказанное свидетельствует об актуальности проблемы исследования патогенных свойств споровой микрофлоры пищевых продуктов.

Патогенность – видовой признак возбудителя, обозначающий его способность вызывать инфекционный процесс у хозяина. Материальные носители патогенности (эндотоксины, экзотоксины, ферменты-токсины и др.) получили название факторов патогенности.

Целью данной работы являлось изучение некоторых факторов патогенности спорообразующей микрофлоры новых видов консервированных продуктов из растительного сырья.

Выбор подвергавшихся исследованию факторов патогенности был обусловлен как ролью данного фактора в иницировании патологии, так и доступностью методов его определения.

Считается, что патогенность отдельных видов микроорганизмов связана с их способностью продуцировать гемотоксины. Гемотоксины (гемолизины) – белки, вызывающие повреждение и лизис эритроцитов животных, включая человека.

По мнению некоторых авторов, токсигенная активность микроорганизмов может зависеть от их лецитиназной активности, т. е. способности образовывать лецитиназу. Лецитиназа – внеклеточные ферменты из группы липаз, расщепляющие лецитины на фосфохолины и нерастворимые в воде диглицериды.

Многие патогенные микроорганизмы (коклюшнные палочки, чумные бактерии, стафилококки) обладают коагулазной активностью. Коагулаза бактерий (плазмокоагулаза) – группа бактериальных протеиназ, свертывающих плазму крови животных.

Роль рассмотренных факторов как патогенных очевидна, их обнаружение не требует использования сложных методов и дорогих мате-

риалов, поэтому именно данные факторы и были выбраны для исследования.

Объектами исследований в работе являлись чистые культуры микроорганизмов, выделенные из растительного сырья и полуфабрикатов, используемых для консервного производства, а также из плодово-ягодных и плодовоовощных консервов (пюре для детского питания на основе моркови, тыквы, яблок; пастеризованного яблочно-клубничного сока; консервированных горячим розливом яблочного, клубничного и смородинового соков).

Всего было исследовано 62 культуры микроорганизмов, выделенных из 12 видов сырья, полуфабрикатов и готовых продуктов.

Отбор проб для микробиологических исследований производился на консервных предприятиях Республики Беларусь в соответствии с требованиями нормативной или технической документации на продукцию.

Сырье и полуфабрикаты в соответствующих разведениях высевали в чашки Петри на питательный агар и Сабуро-агар (СА) в соответствии с [5, 6]. Посевы с питательным агаром термостатировали при 15, 30 и 55°C, с Сабуро-агаром – при 24°C.

При посеве консервов до стерилизации дополнительно к вышеуказанному осуществляли посев в две пробирки со средой Китт-Тароцци для определения присутствия анаэробов.

При исследовании консервов после стерилизации пюре термостатировали в течение 5 суток. Из подвергнутых тщательному осмотру банок по две пробирки высевали на питательный бульон и на среду Китт-Тароцци с глюкозой, дрожжевым экстрактом, аскорбиновой кислотой, залитые маслом [7].

Кроме того, производился посев по 30 мл продукта в три флакона со 100 мл питательного бульона для определения стерильности консервов.

Для получения изолированных колоний использовали глубинный метод посева в плотные среды. Жидкий продукт или разведение навески вносили параллельно в две чашки Петри и заливали не позднее чем через 15 мин расплавленным и охлажденным до температуры (45±1)°C питательным агаром [8]. Посевы инкубировали 72 ч при (30±0,5)°C.

Колонии микроорганизмов, выросших на чашках Петри, снимали петлей и переносили в пробирки на скошенный СА и питательный агар.

Были изучены культуральные, морфологические, биохимические свойства выделенных микроорганизмов.

Микроорганизмы, отнесенные нами к роду *Bacillus*, были исследованы на наличие таких факторов патогенности, как лецитиназная ак-

тивность, способность свертывать плазму крови кролика и вызывать гемолиз эритроцитов крови человека.

Морфологические признаки микроорганизмов определяли путем микроскопирования мазков, окрашенных по Граму. Каталазную активность определяли по появлению пузырьков при воздействии на культуру 3%-ной  $H_2O_2$  [7].

Для установления способности к образованию лецитиназы использовали мясо-пептонный бульон, содержащий желток куриного яйца (к 400 см<sup>3</sup> стерильного мясо-пептонного бульона добавляли асептически 1 яичный желток) [9]. Среду тщательно перемешивали, разливали по пробиркам, инокулировали и инкубировали при (30±0,5)°C в течение двух недель. О лецитиназной активности культуры судили по появлению в среде беловатой мути и всплывающим белым хлопьям.

Гемолитическую активность культур исследовали по появлению зоны просветления на кровяном агаре, содержащем 5% человеческой крови [3].

Для постановки реакции плазмокоагуляции использовали сухую цитратную плазму кролика в разведении 1 : 5 с учетом результатов через 2, 18 и 24 ч в соответствии с рекомендациями производителя.

Исследование морфологических свойств выделенных из сырья и полуфабрикатов культур показало, что подавляющее большинство из них являются факультативно-аэробными, каталазоположительными, грамположительными, спорообразующими палочками, по совокупности признаков отнесенными нами к роду *Bacillus*. При этом ни один из выделенных микроорганизмов не был идентифицирован нами как патогенный *B. anthracis* или близкородственный к нему *B. cereus*.

Проведенные исследования патогенных свойств выделенных микроорганизмов показали, что в процессе производства консервированных продуктов на растительной основе присутствуют микроорганизмы, обладающие различными факторами патогенности.

Результаты исследования факторов патогенности микроорганизмов, выделенных из овощных продуктов и сырья и плодово-ягодных продуктов представлены в табл. 1 и 2 соответственно.

Как видно из табл. 1, половина исследованных микроорганизмов обладала гемолитической активностью; лецитиназная активность проявлялась лишь у микроорганизмов, выделенных из сырья, не подвергавшегося термообработке; реакция плазмокоагуляции была выражена очень слабо и проявлялась в образовании нитей или нестойкого сгустка.



Таблица 1

**Факторы патогенности микроорганизмов,  
выделенных из овощных продуктов, сырья и полуфабрикатов**

Наименование источника выделения	рН	Исследовано культур	Из них проявили					
			гемолитическую активность		лецитиназную активность		коагулазную активность	
			шт.	%	шт.	%	шт.	%
Тыква после мойки	—	6	2	33	2	33	3	50
Тыква после протирки	5.68	7	6	86	0	0	4	57
Пюре тыквенное перед стерилизацией	3.75	4	3	75	0	0	0	0
Пюре на основе тыквы стерилизованное	4.02	3	1	33	0	0	1	33
Пюре на основе моркови стерилизованное	—	4	0	0	0	0	4	100
<i>Всего</i>	—	24	12	50	2	8	12	50

\* Реакция проявлялась в образовании нитей и слабого сгустка.

Таблица 2

**Факторы патогенности микроорганизмов, выделенных из плодово-ягодных продуктов**

Наименование источника выделения	рН	Исследовано культур	Из них проявили					
			гемолитическую активность		лецитиназную активность		коагулазную активность	
			шт.	%	шт.	%	шт.	%
<i>Соки плодово-ягодные горячего розлива</i>								
Клубничный	3.37	8	8	100	0	0	6	75
Смородиновый	2.87	12	11	92	0	0	6	50
Яблочный	3.0	7	7	100	1	140	6	86
<i>Соки плодово-ягодные пастеризованные</i>								
Яблочно-клубничный	3.6	8	8	100	0	0	5	62
<i>Стерилизованные фруктовые пюре</i>								
Пюре на основе яблок	3.4	3	3	100	1	33	3	100
<i>Всего</i>	—	38	37	97	2	5	26	68

\* Реакция проявлялась в образовании нитей и слабого сгустка.

Данные табл. 2 показывают, что микроорганизмы, выделенные из плодово-ягодных консервированных продуктов, обладают исследуемыми факторами патогенности.

Практически все подвергнутые исследованию микроорганизмы обладали гемолитической активностью, больше 65% из них проявили коагулазную активность в слабовыраженной форме, две выделенные культуры обнаружили лецитиназную активность на жидкой среде с желтком. При этом одна из лецитиназно-активных культур была выделена из готового к употреблению стерилизованного пюре из яблок.

Рисунок отражает соотношение долей (%) выделенных из овощных и плодово-ягодных продуктов и сырья микроорганизмов, обладающих факторами патогенности.

Как видно из рисунка, в плодово-ягодных продуктах доли микроорганизмов, обладающих такими факторами патогенности, как гемолитическая и коагулазная активность, выше, чем в овощных продуктах и сырье.

Незначительно различаются доли лецитиназо-положительных микроорганизмов, однако в случае с овощными объектами эти микроорганизмы были выделены лишь из сырого сырья, тогда как плодово-ягодные продукты – источники выделения микроорганизмов прошли термическую обработку.

Таким образом, проведенные исследования показали, что в процессе производства консервированных продуктов на растительной основе присутствуют микроорганизмы, обладающие различными факторами патогенности.

Большая часть исследованных микроорганизмов обладала гемолитической активностью; лецитиназная активность проявлялась лишь у 5–8% микроорганизмов, выделенных из овощного сырья, не подвергавшегося термообработке, и из плодово-ягодных продуктов; реакция плазмокоагуляции была выражена очень слабо и проявлялась в образовании нитей или нестойкого сгустка.



Рисунок. Доли обладающих факторами патогенности микроорганизмов из плодово-ягодных и овощных продуктов и сырь

Полученные результаты позволяют предположить, что обладающие факторами патогенности, в частности гемолитической и коагулазной активностью, штаммы рода *Bacillus* лучше переносят такие неблагоприятные внешние воздействия, как повышенная температура, низкие значения рН среды.

Полученные результаты свидетельствуют о целесообразности исследования наличия факторов патогенности и возможного негативного воздействия на человека спорообразующих аэробов рода *Bacillus*, обитающих в растительных продуктах и сырье, а также изменения токсинообразующей способности этих микроорганизмов в процессе технологической обработки.

## Литература

1. Food safety and foodborne illness / World Health Organizations official site. General WHO information. Media centre. Fact sheets. Fact sheet № 237, revised January 2002 // [www.who.int/entity/mediacentre/factsheets/en](http://www.who.int/entity/mediacentre/factsheets/en).

2. Основные показатели здоровья населения, деятельности санэпидслужбы и состояния окружающей среды. – Мн.: МЗ РБ, ГУ Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья, 2004. – 80 с.

3. Смирнов В. В., Резник С. Р., Василевская И. А. Спорообразующие аэробные бактерии – продуценты биологически активных веществ. – Киев.: Наук. думка, 1982. – 280 с.

4. Резник С. Р., Затула Д. Г. Токсические свойства некоторых бактерий группы *subtilis-senesentericus* // Микробиологический журнал, 1971. – № 6. – С. 748–750.

5. ГОСТ 10444.15-94. Продукты пищевые. Методы определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов. – Введ. 01.07.1996 г. – 12 с.

6. ГОСТ 10444.12-88. Продукты пищевые. Метод определения дрожжей и плесневых грибов. – Введ. 01.01.90 г. – 12 с.

7. ГОСТ 30425-97. Консервы. Метод определения промышленной стерильности. – Введ. 01.07.98 г. – 28 с.

8. ГОСТ 26670-91. Продукты пищевые. Методы культивирования микроорганизмов. – Введ. 01.01.93 г. – 16 с.

9. Мазохина-Поршнякова Н. Н., Найденова Л. П., Николаева С. А., Розанова Л. И. Анализ и оценка качества консервов по микробиологическим показателям. – М.: Пищевая пром-сть, 1977. – 472 с.