УДК 637.1
DOI: 10.31515/1019-8946-2023-01-26-29

Споровые аэробные микроорганизмы *Bacillus cereus* в молоке и молочных продуктах

Наталья Рамазановна Ефимочкина, д-р биол. наук,
ведущий научный сотрудник
ФИЦ питания и биотехнологии
E-mail: karlikanova@ion.ru

Нарушение режимов производства и хранения может стать причиной контаминации молока и молочных продуктов споровыми микроорганизмами, продуцирующими токсины и вызывающими пищевые заболевания. Особое значение среди таких микроорганизмов имеет Bacillus cereus, являющийся этиологическим агентом двух различающихся типов пищевых отравлений. В различных видах пищевой продукции довольно часто регистрируется совместное вегетирование B. cereus с другими условно-патогенными и патогенными микроорганизмами. Изучены особенности культивирования потенциально токсигенных штаммов B. cereus, выделенных из молока и молочных продуктов, определены тенденции и закономерности их совместного вегетирования с другими микробными контаминантами (S. aureus, Proteus spp. и E. coli), повышающие риск возникновения токсикоинфекций смешанной этиологии. Установлено, что при одновременном культивировании S. aureus и B. cereus отмечается определенное взаимное синергетическое воздействие, сопровождающееся активизацией процесса токсинообразования энтеротоксигенными штаммами S. aureus. Синергетический эффект наблюдался как в среде культивирования, так и модельных продуктах. Степень этого взаимовлияния в значительной мере определяется условиями культивирования, составом питательных сред и соотношением исходных уровней контаминантов.

Ключевые слова: *спорообразующие микроорганизмы, пищевые отравления, Bacillus cereus, совместное вегетирование, токсинообразование.*

Efimochkina N.R. Spore aerobic microorganisms Bacillus cereus in milk and dairy products
Federal Research Center for Nutrition and Biotechnology

Violation of production and storage regimes can cause contamination of milk and dairy products with spore microorganisms that produce toxins and cause foodborne illness. Of particular importance among such microorganisms is Bacillus cereus, which is the etiological agent of various types of food poisoning. In various types of food products, the joint vegetation of B. cereus with other opportunistic and pathogenic microorganisms is quite often recorded. The features of cultivation of potentially toxigenic strains of B. cereus isolated from milk and dairy products were studied, the tendencies and patterns of their joint vegetation with other microbial contaminants (S. aureus, Proteus spp. and E. coli), which increase the risk of toxic infections of mixed etiology, were determined. It has been established that with the simultaneous cultivation of S. aureus and B. cereus, a certain mutual synergistic effect is observed, accompanied by activation of the process of toxin formation by enterotoxigenic strains of S. aureus. A synergistic effect was observed both in the cultivation medium and in model products. The degree of this mutual influence is largely determined by the cultivation conditions, the composition of nutrient media, and the ratio of the initial levels of contaminants.

Key words: *spore-forming microorganisms, food poisoning, Bacillus cereus, co-vegetation, toxin formation.*

Микрофлора молока и молочных продуктов представлена широким бактериальным спектром контаминантов, в числе которых встречаются токсигенные варианты. Среди них наибольшее значение имеют споровые аэробы *Bacillus*, обладающие способностью продуцировать ряд экстрацеллюлярных токсинов. Накоплению токсинов могут способствовать некоторые технологические параметры производства и хранения продукции, создающие благоприятные условия для прорастания спор, особенно при отсутствии конкурирующей вегетативной микрофлоры: пастеризация при щадящих температурных режимах, хранение при нерегулируемой температуре, высокой влажности и др.

Наиболее высок риск обнаружения споровых аэробных микроорганизмов в некоторых видах цельномолочной продукции, сухом молоке, молочных и растительных компонентах, предназначенных для изготовления продуктов детского питания — сухих молочных смесей, молочных каш и др. [1].

Род *Bacillus* включает грамположительные палочковидные бактерии, которые различаются по физиологическим свойствам и особенностям занимаемой экологической ниши. Все виды *Bacillus* формируют эндоспоры, устойчивые к нагреванию, могут размножаться в пищевых продуктах в процессе хранения, продуцируя при определенных условиях токсины.

Несколько видов рода *Bacillus* ассоциируются с пищевыми заболеваниями или имеют генетические детерминанты токсигенности, в том числе: *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. mesentericus*, *B. weihenstephanensis*, *B. thuringiensis*, *B. licheniformis* [2]. Наибольшее значение имеют представители вида *B. cereus*. До недавнего времени, пока не были разработаны критерии идентификации бактерий рода *Bacillus*, применялись и другие названия *B. cereus*: *B. pseudoanthracis*, *B. anthracoides, B. subtilis*. Поскольку по ряду морфологических свойств *B. cereus* близки к основным характеристикам *B. anthracis* (возбудителя сибирской язвы), считалось даже, что *B. anthracis* является патогенной разновидностью *B. cereus*.

В свете современных данных о характеристиках и таксономии рода *Bacillus* [3] шесть морфологически близких видов (толстые — более 0,9 мкм, короткие палочки, формирующие центральные или терминальные эллипсоидные и цилиндрические споры) выделены в группу *B. cereus* (табл. 1).

В настоящее время общепризнано, что *B. cereus* является этиологическим агентом двух различающихся по клиническому течению типов пищевых отравлений (табл. 2). Для одной из форм заболевания характерным является синдром диарейного типа, включающий диарею, спазмы и боли в абдоминальной области спустя 8–16 ч после употребления инкриминированной пищи, включая молоко и молочные продукты, кулинарные и кондитерские изделия. Второй тип пищевого отравления *B. cereus*, названный синдромом рвотного типа (эметический синдром), характеризуется коротким инкубационным периодом (1–6 ч), клиническая картина напоминает стафилококковые отравления: острое начало с тошнотой и рвотой, продолжительность заболевания менее 24 ч, диарея отсутствует.

Интерес к *B. cereus* как этиологическому агенту других заболеваний с локализацией патологического процесса

Таблица 1

Критерии дифференциации видов микроорганизмов в составе группы *B. cereus*

Вид	Характеристика колоний	Гемолиз	Подвижность	Чувствительность к пенициллину	Зернистость клеток
B. cereus	Белые	+	+	–	–
B. anthracis	Белые	–	–	+	–
B. thuringiensis	Серовато-белые	+	+	–	+
B. mycoides	Шероховатые	(+)	–	–	–
B. weihenstephanensis	Отличается от *B. cereus* наличием роста при температуре менее 7 °С и отсутствием при 43 °С, идентифицируется по rДНК или cspA				
B. pseudomycoides	Не отличается от *B. mycoides* по морфологическим и физиологическим характеристикам, основное различие в составе жирных кислот и последовательности 16S rДНК				

Таблица 2

Заболевания, вызываемые *B. cereus* [4, 5]

Характеристика	Эметический синдром	Диарейный синдром
Тип токсина	Циклический пептид	Протеин
Инфицирующая доза	10^5–10^8 клеток/г контаминированного продукта	10^5–10^7 (общее количество)
Токсинообразование	В контаминированном продукте	В тонком кишечнике
Инкубационный период	0–5 ч	8–16 ч (иногда более 24 ч)
Длительность заболевания	6–24 ч	12–24 ч (иногда несколько дней)
Устойчивость к нагреванию	Слабая	Термостабилен (до 121 °С в течение 90 мин)
Симптомы	Тошнота, рвота, озноб	Абдоминальные боли, водная диарея, иногда тошнота
Продукты – факторы передачи	Вареный рис, пасты и макаронные изделия	Мясные продукты, супы, гарниры, пудинги, соусы и молочные продукты

Таблица 3

Распространенность и уровни контаминации *B. cereus* в молоке и молочных продуктах

Продукт	Число исследованных проб	Частота обнаружения, %	Уровень, КОЕ/г	Страна
Молоко-сырье	53	3,7	$6{,}3\cdot10^2$–$2{,}4\cdot10^3$	Египет
	106	10,3	$4{,}1\cdot10^1$–$3{,}8\cdot10^5$	Турция
Пастеризованное молоко	157	33	10^0–10^4	Нидерланды
	458	56	10^1–$3\cdot10^5$	Дания
	200	0,5	$2{,}8\cdot10^2$	Тайвань
	55	55	10^1–10^4	Индия
	50	26	10^1–$1{,}1\cdot10^3$	Турция
	254	41	До 10^5	Канада
	258	27	11 (средний)	Китай
	60	30	н/д	Польша
Концентрированное молоко	10	33,3	10^2–$4\cdot10^2$	Египет
Кисломолочные напитки	200	17	$5{,}0\cdot10^0$–$1{,}2\cdot10^2$	Тайвань
Мороженое	200	52	$5{,}0\cdot10^0$–$2{,}5\cdot10^2$	Тайвань
	809	62,8	$0{,}1$–$2\cdot10^1$	Германия
	40	25	$5{,}2\cdot10^2$–$1{,}5\cdot10^3$	Египет
	25	40	10^2–10^8	Индия
Сухое молоко	200	27	$5{,}0\cdot10^0$–$4{,}5\cdot10^2$	Тайвань
	381	46	$3\cdot10^0$–10^4	Чили
	35	52	10^2–10^3	Индия
	18	11,1	10^2–$3\cdot10^2$	Россия
Сухие молочные смеси для детей	20	10	$4\cdot10^1$–$2\cdot10^2$	Египет
	587	6,8	10^3–10^4	Китай
	6656	7,53	10^1–$5\cdot10^3$	Китай
	465	4,3	120±45	Россия
Масло сливочное	25	20	10^3–10^4	Индия
Мягкие сыры	184	30,9	$<10^3$–10^6	Италия
	35	8,6	10^1–$1{,}6\cdot10^2$	Польша
	30	50	н/д	Аргентина
Сычужные сыры	175	43,4	10^1–$6{,}5\cdot10^3$	Польша

вне ЖКТ возник относительно недавно. Распознаванию патогенного потенциала *B. cereus* мешала тенденция рассматривать аэробные спорообразующие бактерии, найденные в клинических материалах, как лабораторные контаминанты. Среди наиболее тяжелых клинических проявлений инфекций, вызываемых *B. cereus*, в первую очередь отмечают пневмонию [6]. Характерной особенностью этого заболевания является некротическое повреждение легочной паренхимы, половина всех описанных случаев заканчивается летальным исходом. Отмечена способность *B. cereus* вызывать развитие остро протекающих деструктивных офтальмитов [7]. Наибольший удельный вес среди заболеваний с локализацией патологии вне ЖКТ приходится на инфекции послеоперационных или травматических ран [8].

Токсические свойства *B. cereus* обусловлены способностью микроорганизмов продуцировать ряд экстрацеллюлярных токсинов, из них в настоящее время наибольшее значение придается эметическому токсину — цереулиду [3].

Поскольку *B. cereus* — убиквитарные микроорганизмы, они могут обнаруживаться на разных этапах переработки молока-сырья и в готовых продуктах (табл. 3) [1, 10, 11].

Статистические данные о вспышках пищевых отравлений, вызываемых споровыми аэробами группы *B. cereus*, обычно представлены достаточно фрагментарно вследствие трудностей, связанных с коротким сроком течения заболеваний (менее 24 ч) и региональными особенностями их регистрации.

Доминирующий тип заболеваний, вызываемых *B. cereus*, в различных странах существенно варьирует: например, в Японии эметический тип встречается в 10 раз чаще, нежели диарейный [12]. В то же время в Европе и Северной Америке наиболее часто фиксируется диарейный тип [13]. Такое различие в значительной степени связано с особенностями питания населения, хотя известна большая вспышка отравления эметического типа при употреблении молока, контаминированного *B. cereus*, в Японии [12].

С 2007 по 2014 г. в странах Европы зарегистрировано 413 вспышек, вызванных *B. cereus* с общим числом пострадавших 6657 человек [14]. В 2006 г. 57 человек из 149 участников свадебного банкета в Салерно (Италия) отравились сыром «Рикотта», содержащим *B. cereus* [15].

При расследовании вспышек пищевых отравлений и контроле продуктов на наличие микроорганизмов

группы *B. cereus* традиционно применяются бактериологические методы посева на селективные агаровые среды и кровяной агар. Ведущими дифференциально-диагностическими признаками являются лецитиназная активность, ферментация маннита и способность формировать окрашенные колонии, характерные для используемого красителя в составе питательного субстрата. Токсины *B. cereus* в продуктах и клиническом материале выявляют серологическими методами или цитотоксическими тестами на культурах клеток. Иммунологические методы недостаточно специфичны, поскольку не позволяют определять все основные виды энтеротоксинов *B. cereus* и не обеспечивают их идентификацию. Наиболее приемлемым для выявления токсинов является сочетание иммунологических коммерческих наборов с использованием культур эпителиальных клеток (Hep-2).

Традиционный ПЦР-анализ также считается неэффективным вследствие того, что гены, кодирующие экспрессию токсинов, стабильно присутствуют в хромосоме *B. cereus* независимо от токсигенности штаммов. В последние годы разработаны методики, основанные на количественной дуплексной real-time ПЦР с флюоресцентными красителями SYBR-green (MPN-RT-PCR). Эти методы позволяют не только выявить присутствие *B. cereus*, но и провести дифференциацию между эметическим и диарейным токсинами [16].

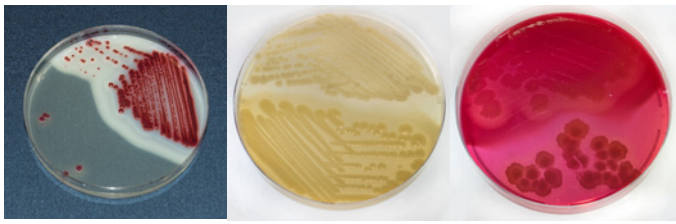
В соответствии с законодательством РФ и стран ЕАЭС бактерии *B. cereus* нормируются в продуктах для питания детей раннего возраста. Контролируются детские сухие молочные смеси и каши, для которых допустимое количество *B. cereus* составляет 100–200 КОЕ в 1 г сухого продукта, что соответствует уровню в готовой к употреблению смеси (каше) после восстановления или термообработки не более 10–20 КОЕ/г. Действующими документами также предусмотрены требования отсутствия *B. cereus* в 0,1 г концентратов пищевых. Для смесей крупяных экструзионной технологии эти микроорганизмы нормируются на уровне не более 10 КОЕ/г.

На этапе методической проработки проблемы были предложены рецептуры сухих питательных сред для обнаружения *B. cereus* в соответствии с требованиями национальных и межгосударственных стандартов. Для промышленного изготовления рекомендован оптимизированный способ производства питательной основы сухих сред и подобран сбалансированный состав ростовых и селективных компонентов, красителей и буферных смесей [17]. В результате проведенных исследований апробированы и валидированы для практического внедрения сухие питательные среды:

- солевой полимиксиновый агар с 2,3,5-трифенилтетразолиум хлоридом;
- среда Донована с хлоридом лития и полимиксином;
- MYP-агар (агар с маннитом, яичным желтком и полимиксином).

На поверхности этих сред *B. cereus* формируют характерные колонии, легко дифференцируемые от других сапрофитных представителей *Bacillus* spp. (рис. 1).

Состав MYP-агара регламентируется требованиями ГОСТ 10444.8–2013 и ГОСТ ISO 21871–2013, которые включены в Перечни стандартов, содержащие правила и методы исследований, необходимые для применения ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции» и



а б в

Рис. 1. Рост B. cereus на селективных питательных средах: а – солевой полимиксиновый агар с 2,3 5-ТТХ; б – среда Донована; в – MYP-агар

ТР ТС 033/2013 «О безопасности молока и молочной продукции». Основным преимуществом MYP-агара является возможность четкой дифференциации *B. cereus*, не ферментирующих маннит, от других сапрофитных споровых аэробов с одновременным выявлением лецитиназной активности презумптивных вариантов *B. cereus*.

Совместное вегетирование *B. cereus* с другими условно-патогенными и патогенными микроорганизмами в различных видах пищевой продукции регистрируется довольно часто, в том числе и при вспышках отравлений. Эта проблема заслуживает особого внимания, поскольку закономерности формирования смешанных микробных ассоциаций в продуктах изучены недостаточно и требуют более детальной проработки в плане исследования взаимовлияния токсигенных штаммов *B. cereus*, *S. aureus*, *E. coli* и др., а также возможности их развития в различных пищевых продуктах.

Изучение особенностей культивирования потенциально токсигенных штаммов *B. cereus*, выделенных из молока и молочных продуктов, позволило определить тенденции и закономерности их совместного вегетирования с другими микробными контаминантами (*S. aureus*, *Proteus spp*. и *E. coli*), повышающие риск возникновения токсикоинфекций смешанной этиологии. Установлено, что при одновременном культивировании *S. aureus* и *B. cereus* отмечается определенное взаимное синергетическое воздействие, сопровождающееся активизацией процесса токсинообразования энтеротоксигенными штаммами *S. aureus*. Степень этого взаимовлияния в значительной мере определяется условиями культивирования, составом питательных сред и соотношением исходных уровней контаминантов.

Для сравнительной оценки условий роста культуры и накопления стафилококковых энтеротоксинов исследовали три варианта питательных сред (бульон Хоттингера с содержанием аминного азота 180 мг% (БХ), жидкую синтетическую среду Байрд-Паркера (БП) и сердечно-мозговой бульон с 1 % глюкозы (СМБ)) при трех исходных уровнях контаминации штаммами *S. aureus* (10^4, 10^6 и 10^8 клеток/см^3) и фиксированной дозе *B. cereus* (10^6 клеток/см^3). Культивировали в течение 24 ч при 37 °С при перемешивании в постоянном режиме 100 об/мин. Содержание энтеротоксинов определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА).

Показано, что при малых посевных дозах *S. aureus* во всех вариантах испытанных сред (рис. 2) стафилококковые энтеротоксины накапливались более интенсивно в смешанных культурах в присутствии *B. cereus*, посевная доза которого (10^6 клеток/см^3) даже превышала исходное количество *S. aureus* (10^4 клеток/см^3).

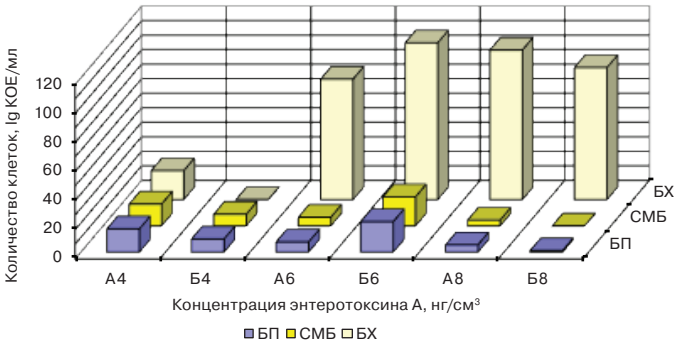


Рис. 2. Концентрация энтеротоксина А при культивировании S. aureus и B. cereus в средах БП, СМБ и БХ: А – смешанная культура; Б – монокультура

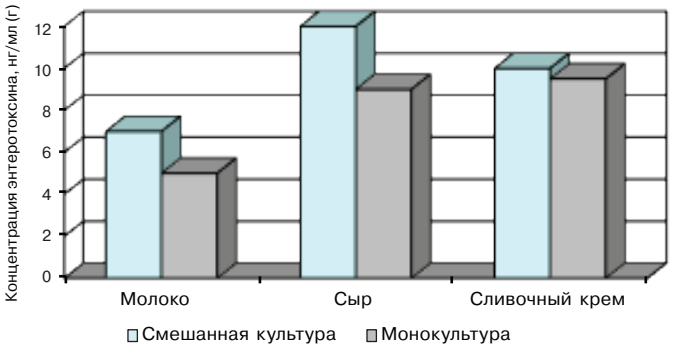


Рис. 3. Накопление энтеротоксинов в продуктах при их заражении S. aureus в смеси с B. cereus

Наиболее интенсивный рост клеток стафилококков и синтез энтеротоксинов отмечены при выращивании культур на СМБ. Количество клеток *S. aureus* на этой среде достигало 1,6–2,0·10^{10} КОЕ/$см^3$ при посевной дозе 10^6 клеток/$см^3$, тогда как при тех же условиях на среде Байрд-Паркера оно составило лишь 5,0·10^7 КОЕ/$см^3$, а на бульоне Хоттингера — 1,9·10^9 КОЕ/$см^3$. Соответственно энтеротоксин накапливался более интенсивно на СМБ практически при всех испытанных посевных дозах, достигая 100 нг/$см^3$, что в 4–5 раз выше по сравнению с другими средами.

В модельных опытах по искусственной контаминации пищевых продуктов штаммами стафилококков в сочетании с другими условно-патогенными микроорганизмами изучены условия токсинообразования при накоплении культуры *S. aureus*. Заражение трех видов продуктов (пастеризованного молока, сыра, сливочного крема) смешанной культурой *S. aureus* и *B. cereus*, а также *S. aureus* и *E. coli* в дозах 10^6–10^8 клеток/$см^3$ приводило к синтезу и накоплению энтеротоксинов в течение 48 ч до концентрации 7,5–12 нг/$см^3$ (рис. 3). При введении в продукты смешанных культур *S. aureus* и *B. cereus* энтеротоксин накапливался более интенсивно, чем при использовании чистого штамма стафилококков. Присутствие *E. coli* в продуктах не оказывало стимулирующего действия на рост и токсинообразование *S. aureus*.

Появление новых токсигенных штаммов микроорганизмов и усиление вирулентных свойств продуцируемых ими метаболитов обусловливают необходимость проведения микробиологических и токсикологических исследований в этой области применительно ко всем аспектам безопасности питания.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. ***Tirloni, E.*** *Bacillus cereus in Dairy Products and Production Plants/ E.Tirloni [et al.]// Foods. 2022. V. 11. P. 2572. https://doi.org/10.3390/foods11172572*
2. ***Ehling-Schulz, M.*** *The Bacillus cereus Group: Bacillus Species with Pathogenic Potential/ M.Ehling-Schulz [et al.]// Microbiol. Spectr. 2019. V. 7. P. 1–35. DOI:/https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0032-2018*
3. ***Ehling-Schulz, M.*** *Food–bacteria interplay: pathometabolism of emetic Bacillus cereus/ M.Ehling-Schulz, E.Frenzel, M.Gohar// Front. Microbiol. 2015. V. 6. P. 704. doi: 10.3389/fmicb.2015.00704.*
4. ***Jessberger, N.*** *The Bacillus cereus food infection as multifactorial process/ N.Jessberger [et al.]// Toxins. 2020. V. 12. P. 701.*
5. ***Tuipulotu, D.E.*** *Bacillus cereus: Epidemiology, virulence factors, and host-pathogen interactions/ D.E.Tuipulotu [et al.]// Trends Microbiol. 2021. V. 29. P. 458–471.*
6. ***Bekemeyer, W.B.*** *Life-threating complications associated with Bacillus cereus pneumonia/ W.B.Bekemeyer, G.A.Zimmerman// The American review of respiratory disease. 1985. V. 131. № 3. P. 466–469.*
7. ***Feng, M.*** *Posttraumatic Bacillus cereus Endophthalmitis: Clinical Characteristics and Antibiotic Susceptibilities/ M.Feng [et al.]// Journal of Ophthalmology Volume. 2021. Article ID 6634179. P. 1–6. https://doi.org/10.1155/2021/663417*
8. ***Turnbull, P.C.B.*** *Non-gastroentestinal Bacillus cereus infections: an analysis of exotoxin production by strains isolated over a two-year period/ P.C.B.Turnbull, S.M.Kramer// Journal of Clinical Pathology. 1983. V. 36. № 10. P. 1091–1096.*
9. ***Флуер, Ф.С.*** *Энтеротоксины Bacillus cereus/ Ф.С.Флуер// Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2006. № 2. С. 105–110.*
10. ***Pei, X.*** *Prevalence of Bacillus cereus in powdered infant and powdered follow-up formula in China/ X.Pei [et al.]// Food Control. 2018. V. 93. P. 101–105.*
11. ***Ефимочкина, Н.Р.*** *Микробиология пищевых продуктов и современные методы детекции патогенов/ Н.Р.Ефимочкина. – М.: Издательство РАМН, 2013. – 517 с.*
12. ***Shinagawa, K.*** *Serology and characterization of Bacillus cereus in relation to toxin production/ K.Shinagawa// Bulletin of the International Dairy Federation. 1993. V. 287. P. 42–49.*
13. ***Schmidt, K.*** *WHO Surveillance Programme for control of foodborne infections and intoxications in Europe. Sixth Report – FAO/WHO Collaborating Centre for Research and Training in Food Hygiene and Zoonosis, Berlin, 1995.*
14. ***EFSA BIOHAZ Panel*** *(EFSA Panel on Biological Hazards), 2016. Scientific opinion on the risks for public health related to the presence of Bacillus cereus and other Bacillus spp. including Bacillus thuringiensis in foodstuffs// EFSA Journal. 2016. V. 14(7). P. 4524. doi:10.2903/j.efsa.2016.4524.*
15. ***Spanu, C.*** *Occurrence and behavior of Bacillus cereus in naturally contaminated ricotta salata cheese during refrigerated storage/ C.Spanu [et al.]// Food Microbiology. 2016. V. 58. P. 135–138.*
16. ***Wang, P.*** *Insight into Bacillus cereus Associated with Infant Foods in Beijing/ P.Wang [et al.]// Foods. 2022. V. 11. P. 719. https://doi.org/10.3390/ foods11050719.*
17. ***Ефимочкина, Н.Р.*** *Совершенствование методических подходов к конструированию и оценке качества сухих питательных сред/ Н.Р.Ефимочкина [и др.]// Молочная промышленность. 2006. № 3. С. 36–38.*