

УДК 579.088; 577.158.54

## БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ МИКРОБНОЙ ЗАГРЯЗНЕННОСТИ СЫРОГО РУБЛЕННОГО МЯСА

В.Г. Фрунджян, В.С. Бабунова\*, Н.Н. Угарова

(Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, кафедра химической энзимологии; e-mail: vgf@enz.chem.msu.ru)

Разработан биолюминесцентный метод определения микробной загрязненности (количества мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов или КМАФАнМ) сырого рубленого мяса, основанный на измерении концентрации внутриклеточного микробного АТФ. Для удаления немикробного АТФ образцы обрабатывали смесью детергента и протеазы, после чего фильтровали через бактериальные мембранные фильтры. Для упрощения анализа использовали специальные люминометрические микрокюветы фильтравет<sup>TM</sup> (дно выполнено из бактериального мембранного фильтра), позволяющие концентрировать микробные клетки, экстрагировать микробный АТФ и измерять биолюминесцентный сигнал в одной и той же кювете. Применение высокочувствительного АТФ-реагента на основе рекомбинантной люциферазы светляков, разработанного в нашей лаборатории, и фильтравет<sup>TM</sup> позволило определять микробную загрязненность в сыром рубленом мясе с пределом обнаружения  $10^3$  КОЕ/г при длительности анализа ~100 мин вместо 48 ч согласно методу ГОСТ. Коэффициент корреляции (*R*) предложенного метода с методом посева предельных разведений составил 0,99.

Микробная загрязненность (количество мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов или сокращенно КМАФАнМ) является одним из основных показателей санитарного качества сырого рубленого мяса. Согласно СанПиН [1] пригодным для употребления является сырое рубленое мясо с микробной загрязненностью не более  $10^3$  колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1 г мяса, которую определяют стандартным методом посева предельных разведений при продолжительности анализа 48 ч [2]. В настоящее время для определения микробной загрязненности пищевого сырья и продуктов его переработки все шире используют методы “быстрой микробиологии”, основанные на определении какого-либо физико-химического параметра образца, абсолютная величина которого или ее изменение пропорциональны концентрации КОЕ.

Наиболее перспективным является биолюминесцентный метод, основанный на измерении концентрации микробного аденозин-5'-трифосфата (АТФ) в анализируемом образце при помощи люциферин-люциферазной системы светляков [3]. Данный метод при продолжительности анализа от нескольких минут до нескольких часов позволяет определять только жизнеспособные микробные клетки [4], наличие которых в продуктах питания может быть опасным для

здоровья человека. В литературе описано применение биолюминесцентного метода для определения микробной загрязненности сырого рубленого мяса [5–7]. Из-за высокого остаточного содержания немикробного АТФ (суммы свободного АТФ и АТФ соматических клеток) в анализируемых образцах предел обнаружения микробной загрязненности был выше  $5 \times 10^4$  КОЕ/г. Для правильного определения микробной загрязненности биолюминесцентным методом необходимо проводить предварительную подготовку образцов, в ходе которой немикробный АТФ существенно разрушается или удаляется из образца.

Цель нашей работы состояла в оптимизации биолюминесцентного метода для определения микробной загрязненности сырого рубленого мяса с пределом обнаружения  $10^3$  КОЕ/г.

### Материалы и методы

**Использованные вещества и растворы.** Использовали лиофилизированный АТФ-реагент (предел обнаружения АТФ составлял  $2 \times 10^{-16}$  моль/кювета люминометра), содержащий люциферазу светляков, D-люциферин, соль магния, компоненты буферной системы и стабилизаторы (химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова) [8, 9], АТФ (“Pharmacia”, США), ВРН-реагент (химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова) [9], неол-10 (НПО “Нижнекамск”, Россия),  $\text{NaIO}_4$  (“Sigma”,

\*Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной санитарии, гигиены и экологии; Звенигородское ш. 5, Москва 123022, Россия)

США), диметилсульфоксид (ДМСО) свежеперегранный (“*Реахим*”, Россия), модифицированную агаровую среду для определения ОБО молока и молочных продуктов (“*Ставропольский ЭБТЗ*”, Россия), среду LB (“*ICN*”, США), деионизованную воду, полученную на установке “*Milli-Q*” (“*Millipore*”, Франция).

Бульонную культуру *Escherichia coli* (штамм LE392) выращивали на среде LB (37°, 120<sup>-1</sup>, 3 ч). Титр клеток *E. coli* в исходной культуре определяли по светорассеянию при 590 нм, принимая, что 1 ед. опт. пл. соответствует 5×10<sup>8</sup> кл/мл.

**Приборы и оборудование** Измерения концентрации АТР проводили на люминометре 3550i (*New Horizons Diagnostic Corp.*, USA). Для фильтрования образцов использовали микрокюветы фильтравет<sup>TM</sup> (*New Horizons Diagnostic Corp.*, USA) и модифицированные фильтрационные ячейки *Swinnex*, 13 мм (“*Millipore*”, Франция).

**Подготовка образцов рубленого мяса для измерения концентрации микробного АТР.** К 10 г рубленого мяса, искусственно контаминированного клетками *E. coli* (10<sup>3</sup>–10<sup>5</sup> КОЕ/г), добавляли 20 мл среды 0,5×LB и гомогенизировали. Полученный гомогенат фильтровали через 4 слоя стерильной марли; 5 мл профильтрованного гомогената вносили во флакон с BPN-реагентом и инкубировали в водяной бане при 45° в течение 60 мин. Фильтравет<sup>TM</sup> помещали в фильтрационную ячейку и при помощи шприца последовательно прокачивали 1 мл инкубированного гомогената и 5 мл промыточного раствора – физиологического раствора, содержащего 1% неонала-10 и 1–5 мМ NaIO<sub>4</sub>, который готовили непосредственно перед использованием. Фильтравет<sup>TM</sup> вынимали из фильтрационной ячейки, вносили 0,02 мл ДМСО и через 1–45 мин инкубирования при комнатной температуре проводили измерение концентрации АТР, как описано ниже.

**Измерение концентрации микробного АТР (пмоль/мл)** Для каждой партии АТР-реагента предварительно получали градуировочную зависимость (1) между концентрацией стандартных растворов АТР в ДМСО и максимумом интенсивности биолюминесцентного сигнала ( $I_{\text{макс}}$ ). Для этого раствор АТР 10<sup>-6</sup> М в деионизованной воде разбавляли ДМСО, получая растворы АТР с концентрацией 0,1, 1 и 10 пмоль/мл. Фильтравет<sup>TM</sup> помещали в кюветное отделение люминометра, вносили 0,18 мл АТР-реагента и 0,02 мл стандартного раствора АТР, быстро перемешивали, прокачивая содержимое фильтравет<sup>TM</sup> через наконечник дозатора, и регистрировали биолюминесцентный сигнал ( $I_{\text{макс}}$ ). Полученные результаты представляли в виде градуировочной зависимости (1), которую далее использовали для определения концентрации микробного АТР в анализируемых образцах:

$$\lg([\text{АТР, пмоль/мл}]) = a + \epsilon \times \lg(I_{\text{макс}}). \quad (1)$$

Для измерения концентрации АТР в анализируемых образцах в фильтравет<sup>TM</sup>, содержащую микробный АТР в 0,02 мл ДМСО, вносили 0,18 мл АТР-реагента, перемешивали ее содержимое и регистрировали величину  $I_{\text{макс}}$ . Чтобы получить концентрацию микробного АТР в исходном образце (пмоль/г мяса), концентрацию микробного АТР, рассчитанную по зависимости (1), умножали на 0,04 для поправки на разбавление / концентрирование образца в ходе анализа. Каждый образец анализировали по 3 раза.

**Определение микробной загрязненности сырого рубленого мяса методом посева предельных разведений (КОЕ/г)** проводили по методу [2], посеvy инкубировали 48 ч при 30°.

По экспериментальным данным, полученным биолюминесцентным методом и методом посева предельных разведений, рассчитывали коэффициенты  $A$ ,  $B$  уравнения линейной регрессии (2) и коэффициент корреляции ( $R$ ):

$$\lg([\text{АТР, пмоль/г мяса}]) = A + B \times \lg([\text{КОЕ/г мяса}]). \quad (2)$$

## Результаты и их обсуждение

Микробные клетки в рубленом мясе, в отличие от крупнокускового, находятся не только на поверхности образца, но и в толще мышечных волокон, поэтому микробную загрязненность определяли в мясном гомогенате. Нами показано, что в мясном гомогенате концентрация немикробного АТР находится на уровне ~10<sup>-11</sup> моль/мл. Поскольку для определения микробной загрязненности на уровне 10<sup>3</sup> КОЕ/г концентрация немикробного АТР в мясном гомогенате не должна превышать 10<sup>-15</sup> моль/мл, ее необходимо было уменьшить в ~10<sup>4</sup> раз. Для разрушения соматических клеток, высвобождения соматического АТР и его гидролиза мясной гомогенат инкубировали с BPN-реагентом при 45°, как описано в [9]. Время инкубирования, необходимое для разрушения соматических клеток и снижения концентрации немикробного до ~10<sup>-15</sup> моль/мл, составило 60 мин. Нами показано, что микробные клетки в ходе такого инкубирования не разрушаются, но и не делятся. Далее инкубированный гомогенат фильтровали через специальные люминометрические микрокюветы фильтравет<sup>TM</sup>, дно которых выполнено из бактериального мембранного фильтра с порами 0,45 мкм (рис. 1). Такая конструкция микрокювет позволяет не только удалять немикробный АТР из образца и концентрировать микробные клетки, но и проводить экстракцию микробного АТР, а также измерять биолюминесцентный сигнал в одной и той же кювете, что упрощает процедуру подготовки образца, повышает точность и чувствительность биолюминесцентного метода. Ранее нами было показано, что использование фильтравет<sup>TM</sup> при биолюминесцентном

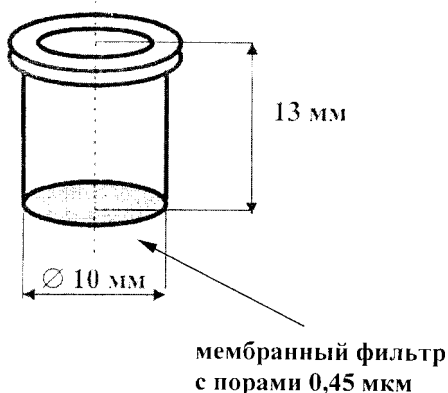


Рис. 1. Люминометрическая микрокувета фильтравет™

определении общей бактериальной обсемененности (ОБО) сырого сборного молока позволяет снизить предел обнаружения ОБО с  $5 \times 10^4$  [10] до  $10^3$  КОЕ/мл [9] и упростить проведение анализа. Через фильтравет™ удавалось воспроизводимо фильтровать не более 1 мл инкубированного мясного гомогената. При этом остаточная концентрация немикробного АТР на мембранном фильтре существенно возрастала, что не позволяло определять микробную загрязненность рубленого мяса с требуемой чувствительностью. Микрокопирование мембранных фильтров показало, что некоторые мышечные волокна в ходе инкубирования с BPN-реагентом недостаточно полно разрушались и задерживались на них. Для разрушения остаточного немикробного АТР мембранный фильтр промывали промывочным раствором, содержащим  $\text{NaIO}_4$ , который быстро разрушает АТР [11]. При использовании промывочного раствора с 1 мМ  $\text{NaIO}_4$  остаточная концентрация немикробного АТР уменьшалась в 2–3 раза, при этом микробные клетки не повреждались. Более высокие концентрации  $\text{NaIO}_4$  разрушали и микробные клетки (рис. 2). Полная экстракция АТР при помощи

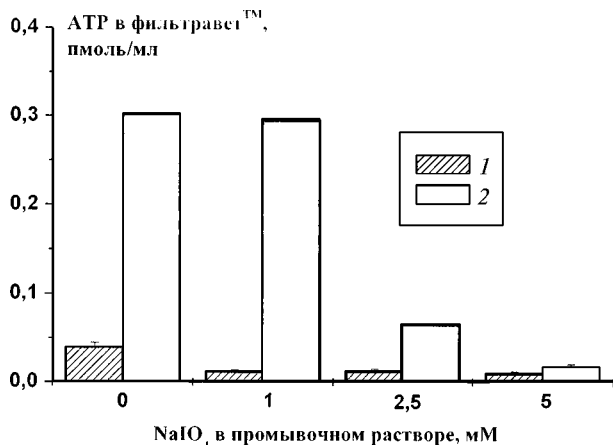


Рис. 2. Разрушение остаточного соматического и микробного АТР на мембранном фильтре при помощи  $\text{NaIO}_4$ : 1 – остаточный соматический АТР; 2 – микробный АТР,  $10^4$  клеток *E. coli* на мембранном фильтре

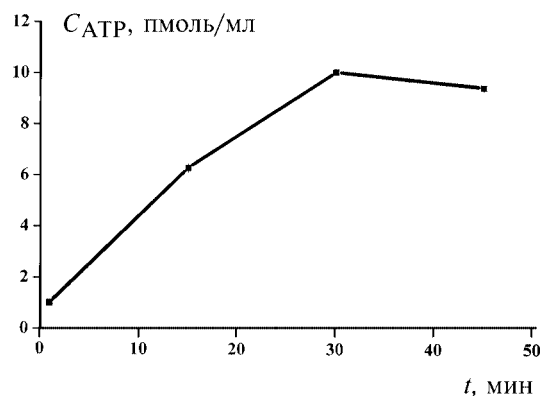


Рис. 3. Зависимость от времени концентрации АТР, экстрагируемого ДМСО из осажденных на мембранном фильтре  $10^5$  клеток *E. coli*

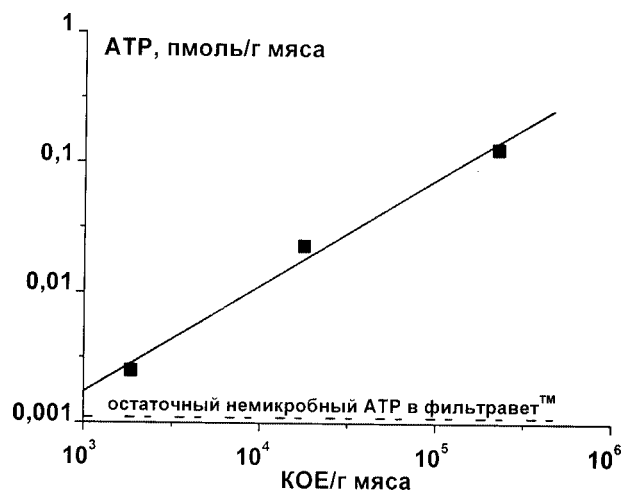


Рис. 4. Соотношение между содержанием микробного АТР (пмоль/мл) и микробным загрязнением (КОЕ/г) сырого рубленого мяса:  $R = 0,99$ ,  $A = -5,21$ ,  $B = 0,81$

ДМСО в суспензиях микробных клеток занимает несколько секунд [11]. При экстракции АТР из микробных клеток, осажденных на мембранном фильтре, концентрация АТР в полученном экстракте увеличивалась со временем и достигала максимальной величины через 30 мин инкубирования при комнатной температуре (рис. 3).

Таким образом, для билюминесцентного определения микробной загрязненности сырого рубленого мяса была предложена следующая методика. 10 г рубленого мяса гомогенизируют в 20 мл среды  $0,5 \times \text{LB}$ , и полученный гомогенат фильтруют через 4 слоя стерильной марли. 5 мл фильтрата инкубируют с BPN-реагентом (60 мин,  $45^\circ$ ). Через мембранный фильтр фильтравет™ фильтруют, как описано выше, 1 мл инкубированного мясного гомогената и 5 мл промывочного раствора, содержащего 1 мМ  $\text{NaIO}_4$ , добавляют 0,02 мл ДМСО и инкубируют в течение 30 мин при комнатной температуре. Добавляют 0,18 мл АТР-реа-

гента и измеряют биолюминесцентный сигнал ( $I_{\text{макс}}$ ). Рассчитывают концентрацию микробного АТР по градуировочной зависимости (1), а затем по зависимости (2) определяют микробную загрязненность мяса.

С помощью данной методики нами были проанализированы образцы сырого рубленого мяса, искусственно контаминированного клетками *E. coli* в диапазоне  $10^3$ – $10^5$  КОЕ/г. Результаты, представленные на

рис. 4, показывают высокую степень корреляции ( $R = 0,99$ ) между величинами [АТР, пмоль/г мяса] и [КОЕ/г мяса], определенными биолюминесцентным методом и методом посева предельных разведений соответственно. Предел обнаружения микробных клеток составил  $10^3$  КОЕ/г мяса при продолжительности анализа ~100 мин/образец, вместо 48 ч по методу посева предельных разведений.

Данная работа выполнена при финансовой поддержке Международного контракта PNNL-325785-A-G2 и Госконтракта МН по проекту “Биокаталитические технологии”.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. СанПиН 2.3.2.560-96 “Гигиенические нормативы качества и безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов (микробиологические показатели)”.
2. ГОСТ 10444.15.94 “Продукты пищевые. Методы определения КМАФАнМ”.
3. Угарова Н.Н., Бровко Л.Ю., Лебедева О.В., Березин И.В. // Вестн. Акад. мед. наук СССР. 1985. N 7. С. 88.
4. Угарова Н.Н., Бровко Л.Ю., Трдатян И.А., Райнина Е.И // Прикл. биохим. микробиол. 1987. 23. N.1. С.14.
5. Stannard C.J., Wood J.M. // J. Appl. Bacteriol. 1983. 55. № 3. P. 429.
6. Kennedy J.E., Oblinger J.I. // J. Food Prot. 1985. 48. P. 334.
7. Littel K.J., Pikelis S., Spurgash A. // J. Food Prot. 1986. 49. P. 18.
8. Патент на изобретение № 2164241 Реагент для определения аденозин-5'-трифосфата. г. Москва, 20 марта 2001 г.
9. Фрунджян В.Г., Угарова Н.Н. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2000. 41. 6. С. 407.
10. Фрунджян В.Г., Бабунова В.С., Бровко Л.Ю. и др. // Прикл. биохим. микробиол. 1999. 35. 3. С. 1.
11. Бровко Л.Ю., Трдатян И.А., Угарова Н.Н. // Прикл. биохим. микробиол. 1991. 27. С. 134.

Поступила в редакцию 25.10.02