

УДК 579.088; 577.158.54

БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЩЕЙ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ОБСЕМЕНЕННОСТИ СЫРОГО МОЛОКА

В. Г. Фрунджян, Н. Н. Угарова*

(кафедра энзимологии химического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова; Воробьевы горы, Москва 119899, Россия;
факс: (095) 939-54-17; e-mail: UNN@enz.chem.msu.ru)

Модифицирована методика биолюминесцентного определения общей бактериальной обсемененности сырого молока, включающая: 1) разрушение казеиновых мицелл молока и соматических клеток при инкубировании образца со смесью панкреатина и неонала-10; 2) удаление небактериального АТР фильтрованием через мембранный фильтр; 3) разрушение бактериальных клеток диметилсульфоксидом; 4) измерение концентрации АТР биолюминесцентным методом. Стадии (2)–(4) выполняют в кювете *Filtravette*, дном которой является бактериальный мембранный фильтр (поры 0,45 мкм), что позволяет сократить длительность анализа 1 образца до 15 мин. Предел обнаружения ОБО составляет 10^3 КОЕ на 1 мл молока. Коэффициенты корреляции (R) и остаточные стандартные отклонения (S_{xy}) предложенного метода с методом посева разведений составили 0,98 и 0,28 для образцов стерилизованного молока, искусственно контаминированного чистой культурой *Escherichia coli*, 0,92 и 0,30 – для сырого молока ($n = 20$).

Общая бактериальная обсемененность (ОБО) молока – один из основных показателей санитарного качества продукта. Длительность анализа ОБО молока прямым методом (посева разведений) составляет 72 ч, поэтому для оценки ОБО в масштабе реального времени используют различные косвенные методы [1–3], среди которых наиболее

перспективным является биолюминесцентная АТР-метрия [4].

Ранее нами была разработана методика биолюминесцентного определения ОБО сырого молока с пределом обнаружения бактериальных клеток $0,5 \cdot 10^5$ КОЕ/мл и продолжительностью анализа 1 образца 25–30 мин [5]. Однако

*Адресат для переписки.

она была довольно трудоемкой и включала большое количество операций. Целью настоящей работы была разработка модифицированной методики определения ОБО сырого молока, которая позволила бы сократить продолжительность анализа до 15 мин и повысить чувствительность определения ОБО молока в 50 раз.

Материалы и методы

Использованные вещества и растворы. Панкреатин медицинский (ОАО «Самсон», Россия) (акт. 178 казеиновых ед/г) суспендировали в воде или в 5%-м растворе неонла-10 (НПО «Нижнекамск», Россия) в 0,1 М Натфосфат-цитратном буфере (рН 7,2) или в вышеуказанном буфере, получая 20%-е суспензии, которые центрифугировали (16 000 g, 20 мин) для удаления нерастворимых примесей, а затем фильтровали через стерильные мембранные фильтры (поры 0,22 мкм). Фильтраты разливали по 0,2 мл в пенициллиновые флаконы, замораживали в жидком азоте и лиофилизовали в течение 24 ч. Протеолитическую активность полученных ферментных препаратов определяли по скорости гидролиза этилового эфира N-ацетил- α -тирозина (АТЭЭ) («Reanal», Венгрия) потенциометрическим титрованием на рН-стате («Radiometer», Дания).

Лиофилизованный АТФ-реагент Микролюм (химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова), содержащий растворимую люциферазу светлячков, D-люциферин, соль магния и компоненты буфера [6], реконструировали деионизованной водой, полученной на установке «Milli-Q» («Millipore», Франция). Стандартный 1 мМ раствор АТФ («Sigma», США) в деионизованной воде готовили по навеске, замораживали порциями по 0,5 мл, хранили при 20°. Перед использованием отдельную порцию размораживали и разбавляли до концентрации 0,1–10 нМ свежеперегнанным диметилсульфоксидом (ДМСО) («Реахим», Россия).

Использовали стерилизованное молоко «Пармалат» (Лианозовский молочный комбинат, Москва) и сырое молоко, отобранное из танков и хранившееся до проведения анализа на холоде. Стерилизованное молоко комнатной температуры контаминировали трехчасовой бульонной культурой *E. coli* (штамм LE392), получая образцы молока с обсемененностью в интервале 10^3 – 10^6 кл/мл. Титр клеток *E. coli* в исходной культуре определяли по светорассеянию при 590 нм (1 ед. опт. пл. соответствует $5 \cdot 10^8$ кл/мл). Аликвоты сырого молока непосредственно перед анализом разбавляли в 10–1000 раз стерилизованным молоком, получая образцы молока с различной ОБО.

Определение ОБО молока методом посева разведенный (КОЕ/мл). Использовали модифицированную агаровую среду для определения ОБО молока и молочных продуктов (Ставропольский ЭБТЗ, Россия). Количество колониобразующих единиц (КОЕ) в молоке определяли согласно [7].

Определение концентрации бактериального АТФ в молоке биолюминесцентным методом. Анализировали по три аликвоты каждого образца молока, проводя все эксперименты в ламинаре GS («Babcock», Германия). Алик-

воту (1 мл) тщательно перемешанного молока вносили во флакон с лиофилизованным панкреатином и инкубировали в водяной бане (45°, 10 мин). Через фильтр кюветы *Filtravette* («New Horizons Diagnostics Corp.», США) [8], помещенной на стерильную фильтровальную бумагу, последовательно фильтровали 100 мкл прогретого (45°) физиологического раствора, содержащего 1% неонла-10 (промывочный раствор), 100 мкл инкубированного молока и вновь 200 мкл промывочного раствора. После каждого фильтрования кювету при помощи пинцета перемещали на сухой участок фильтровальной бумаги. Избыточное давление над кюветой создавали при помощи шприца. Кювету помещали в кюветное отделение люминометра «3550i» («New Horizons Diagnostics Corp.», США) и дозатором последовательно вносили 10 мкл ДМСО и 90 мкл АТФ-реагента Микролюм, быстро перемешивали, дважды прокачивая содержимое кюветы через наконечник дозатора, и измеряли интенсивность биолюминесценции ($I_{\text{макс}}$).

Для каждой партии АТФ-реагента Микролюм получали градуировочную зависимость между концентрацией АТФ и интенсивностью биолюминесценции (1), которую использовали для определения концентрации бактериального АТФ в молоке. Для этого к 10 мкл стандартного раствора АТФ (0,1, 1 и 10 нМ) в ДМСО добавляли 90 мкл АТФ-реагента Микролюм, быстро перемешивали и фиксировали интенсивность биолюминесценции ($I_{\text{макс}}$):

$$\lg([ATP]) = a + b \cdot \lg(I_{\text{макс}}). \quad (1)$$

Результаты измерений обрабатывали по методу [7] и [9], затем рассчитывали коэффициенты A , B уравнения линейной регрессии (2), коэффициент корреляции (R) между содержанием в молоке АТФ и КОЕ и остаточное стандартное отклонение (S_{xy}) [10]:

$$\begin{aligned} \lg(\text{КОЕ/мл молока}) &= \\ &= A + B \cdot \lg([ATP]_{\text{бакт.}}, \text{пмоль/мл молока}). \end{aligned} \quad (2)$$

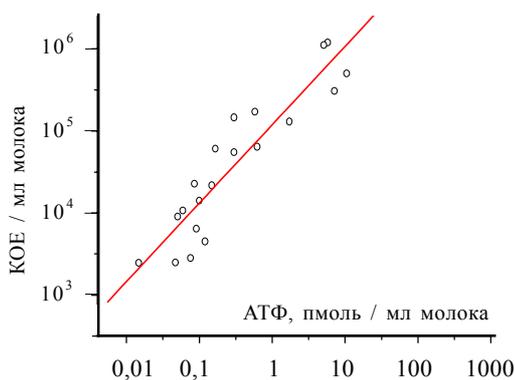
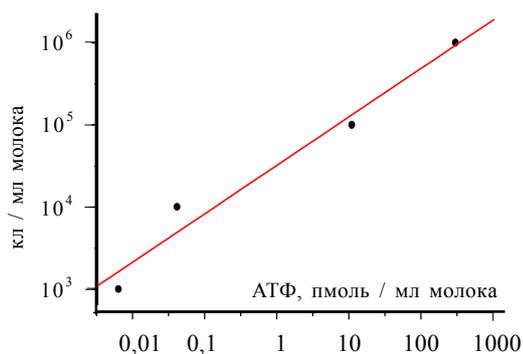
Результаты и их обсуждение

В описанной ранее методике [5] проводили многократное пипетирование и перенос анализируемого образца и реагентов из одной емкости в другую в ходе анализа, что повышало его трудоемкость и служило источником случайных погрешностей. Реагент на основе панкреатина медицинского готовили непосредственно перед анализом. Концентрацию бактериального АТФ измеряли с помощью АТФ-реагента Иммолюм [6] с пределом обнаружения АТФ в присутствии ДМСО на уровне 10 нМ.

В модифицированной методике для упрощения и сокращения продолжительности анализа использовали лиофилизованный стандартизированный реагент на основе панкреатина и неонла-10, а также специальные люминометрические кюветы *Filtravette*.

Для повышения чувствительности определения ОБО молока измерение концентрации АТФ проводили при помощи АТФ-реагента Микролюм с пределом обнаружения АТФ в присутствии ДМСО на уровне 0,1 нМ.

Стандартизация реагента на основе панкреатина и неонла-10. Сравнивали протеолитическую активность



Зависимость между содержанием бактериального АТФ и количеством клеток в молоке: а – стерилизованном, искусственно загрязненном клетками *E. coli*, б – сыром

различных лиофилизированных препаратов панкреатина по скорости гидролиза АТЭЭ. Наиболее высокая протеолитическая активность была у препарата, полученного после лиофилизации раствора панкреатина в 5%-м неоноле-10 с 0,1 М Na-фосфат-цитратным буфером. У такого препарата панкреатина протеолитическая активность до и после лиофилизации практически не менялась. Реконструирование лиофилизованного панкреатина целесообразно проводить молоком, так как в этом случае концентрации детергента и протеолитических ферментов панкреатина в анализируемом образце наиболее высокие. Лиофилизированный панкреатин стабилен при хранении на холоде в течение нескольких месяцев.

Фильтрация образцов молока. Дно люминометрической кюветы *Filtravette* выполнено из мембранного

фильтра (диаметр диска 5 мм, поры 0,45 мкм). В такой кювете можно проводить выделение и разрушение бактериальных клеток образца, а также измерять концентрацию бактериального АТФ. Через кювету *Filtravette* удавалось фильтровать до 300 мкл молока после инкубирования в смеси с панкреатином и неонолом-10, но воспроизводимо фильтровалось лишь 100 мкл. Фильтрация таких малых объемов не оказывает сильного стрессового воздействия на бактериальные клетки молока, при котором уровень внутриклеточного АТФ резко снижается. Поэтому отпадает необходимость инкубирования с глюкозой выделенных на мембранном фильтре бактериальных клеток [5].

Измерение концентрации бактериального АТФ в молоке. Люцифераза светлячков в составе АТФ-реагента Микролюм в большой степени подвержена ингибирующему действию ДМСО, который используют для разрушения бактериальных клеток. Поэтому варьировали объемное соотношение образца (раствор АТФ в ДМСО) и АТФ-реагента Микролюм в реакционной смеси (1:9, 1:14 и 1:19), а также полный объем реакционной смеси (от 100 до 200 мкл). Предел обнаружения АТФ во всех вариантах был на уровне 0,1 нМ, но для измерений наиболее удобными оказались соотношение 1:9 и величина полного объема реакционной смеси 100 мкл.

Использование вышеописанных условий позволило получить зависимости между содержанием бактерий и концентрацией бактериального АТФ для двух типов образцов молока: I (стерилизованное, загрязненное бульонной культурой *E. coli*), II (сырое, разбавленное стерилизованным молоком для получения образцов в широком диапазоне обсемененности).

Для образцов молока типа I такая зависимость хорошо описывается уравнением (2). Предел обнаружения бактериальных клеток составляет 10^3 ккл/мл, а величины R и S_{xy} – 0,98 и 0,28 соответственно (таблица и рисунок, а).

При анализе образцов молока типа II была также получена зависимость (2) с высокой степенью корреляции между содержанием КОЕ и концентрацией бактериального АТФ. Предел обнаружения бактериальных клеток составил 10^3 КОЕ/мл, а величины R и S_{xy} – 0,92 и 0,30 соответственно (таблица и рисунок, б). Однако у таких образцов молока был отмечен существенный разброс экспериментальных данных, вызванный неравномерным распределением бактериальных клеток в сыром молоке [5], которое невозможно полностью устранить даже при интенсивном

Коэффициенты A и B уравнения (2), коэффициенты корреляции (R) между биолюминесцентным методом и методом посева разведений, остаточные стандартные отклонения (S_{xy})

Образец	A	B	R	S_{xy}
Стерилизованное молоко, загрязненное клетками <i>E. coli</i>	4,52±0,14	0,59±0,07	0,98	0,28
Сырое молоко (расчет A и B по массивам средних арифметических)	5,17±0,10	0,96±0,10	0,92	0,30
Сырое молоко (расчет A и B по массивам медиан)	5,26±0,09	0,97±0,09	0,93	0,31

перемешивании образца. Поэтому при статистической обработке результатов эксперимента по методу [7], рассчитывая среднее арифметическое, отбрасывали отдельные «сорные» данные. В случае величин биолуминесцентных сигналов это можно было сделать достаточно просто. Однако определить, какие из величин КОЕ являются истинными, а какие «сорными», в некоторых случаях было достаточно сложно, так как согласно [7] можно учитывать все чашки с посевами последовательных десятикратных разведений, на которых выросло от 30 до 300 КОЕ. В работе [9] предложен метод расчета, позволяющий получать относительно правильные результаты, не прибегая к отбрасыванию отдельных «сорных» данных, тем более когда

отсутствует критерий, позволяющий выделять их среди результатов измерений. Согласно данному методу вместо среднего арифметического рассчитывается медиана, а вместо стандартного отклонения – медиана абсолютных отклонений от медианы.

По всем результатам измерений образцов сырого молока, в том числе «сорным», рассчитывали медианы концентрации бактериального АТФ и медианы КОЕ и использовали полученные величины для расчета коэффициентов A и B уравнения (2). Как видно из таблицы, коэффициенты A и B практически не изменились, сходимость двух методов осталась высокой, но при этом отпала необходимость сортировки экспериментальных данных.

Работа частично финансировалась Министерством науки по подпрограмме «Новейшие методы биоинженерии» по проекту «Биокаталитические технологии».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Purnendu C.V. // J. Dairy Sci. 1993. **76**. P. 3101.
2. Rowlands A., Barkworth H., Hosking Z., Kemphorne O. // J. Dairy Res. 1950. **17**. P. 161.
3. Petty R.D., Sutherland L.A., Hunter E.M., Cree I.A. // J. Biolum. Chemilum. 1995. **10**. P. 29.
4. Угарова Н.Н., Бровко Л.Ю., Трдатян И.А., Райнина Е.И. // Прикл. биохим. микробиол. 1987. **23**. С. 14.
5. Фрунджян В.Г., Бровко Л.Ю., Бабунова В.С., Карташова В.М., Угарова Н.Н. // Прикл. биохим. микробиол. 1999. **35**. С. 321.
6. Brovko L.Yu., Ugarova N.N., Duhovich A.F. // Proceedings of the 6th International Symposium on Biolum. and Chemilum. «Bioluminescence and Chemiluminescence». 1990. Cambridge, 1991. P. 433.
7. ГОСТ 9225-84 с изменением № 2 от 28.09.89. Молоко и молочные продукты (Методы микробиологического анализа).
8. Cutter C.N., Dorsa W.J., Siragusa G.R. // Dairy, Food and Environmental Sanitation. 1996. **16**. P. 726.
9. Юфа Б.Я. // ЖАХ. 1989. **XLIV**. С. 2148.
10. International IDF Standard 128:1985. Milk. Determination and evaluation of the overall accuracy of indirect methods of milk analysis – application to calibration procedure and quality control in dairy laboratory. IDF General Secretariat. Belgium. 1985.

Поступила в редакцию 20.06.00