

Наталья Евгеньевна Посокина<sup>1✉</sup>, Анна Ивановна Захарова<sup>2</sup>,  
Мадинат Насрудиновна Курбанова<sup>3</sup>

<sup>1,2,3</sup>Всероссийский научно-исследовательский институт технологии консервирования – филиал Федерального научного центра пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН, Видное, Московская область, Россия

<sup>1</sup>technol@vniitek.ru

<sup>2</sup>zakharova@vniitek.ru

<sup>3</sup>m.kurbanova@fncps.ru

## ПОИСК ПОДХОДА К КОЛИЧЕСТВЕННОМУ ОПРЕДЕЛЕНИЮ СПОР МИКРООРГАНИЗМОВ В ПИЩЕВЫХ СИСТЕМАХ

*Цель исследований – поиск подхода к контролю количественного прорастания спор микроорганизмов в пищевых системах. Задачи: определить наличие ионов кальция в суспензии проросших спор; установить зависимость концентрации ионов кальция от количества проросших спор. В качестве объекта исследования использовали штамм *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Определение биологической концентрации *Bacillus subtilis* в споровой суспензии выполняли методом посева последовательных десятикратных разведений суспензии *Bacillus subtilis* в стерильной дистиллированной воде с последующим высевом суспензии и ее последовательных разведений в чашки Петри с плотной питательной средой. Прогрев суспензии проводили при температуре  $95\pm 1$  °C в течение 20 минут. После прогрева определяли титр суспензии и концентрацию  $Ca^{2+}$ . Определение концентрации  $Ca^{2+}$  проводили методом капиллярного электрофореза по методике М 04-52-2008 на приборе «Капель-105М» (Люмэкс, Россия). Полученная зависимость концентрации  $Ca^{2+}$  от титра микроорганизмов позволяет определять количество проросших спор даже при минимальном их содержании, что дает возможность проводить количественное определение проросших спор в пищевых системах аналитическим методом. Такой подход к контролю количественного прорастания спор показал свою применимость для данного вида исследования, поскольку используемый в исследовании метод капиллярного электрофореза позволяет определять массовую концентрацию катионов кальция от 1,0 до 500 мг/дм<sup>3</sup>.*

**Ключевые слова:** споры микроорганизмов, отложенное прорастание, безопасность пищевой продукции, ионы кальция, капиллярный электрофорез

**Для цитирования:** Посокина Н.Е., Захарова А.И., Курбанова М.Н. Поиск подхода к количественному определению спор микроорганизмов в пищевых системах // Вестник КрасГАУ. 2023. № 6. С. 179–185. DOI: 10.36718/1819-4036-2023-6-179-185.

Natalya Evgenievna Posokina<sup>1✉</sup>, Anna Ivanovna Zakharova<sup>2</sup>, Madinat Nasrudinovna Kurbanova<sup>3</sup>

<sup>1,2,3</sup>All-Russian Research Institute of Canning Technology – a branch of the Federal Scientific Center for Food Systems named after V.M. Gorbатов RAS, Vidnoe, Moscow Region, Russia

<sup>1</sup>technol@vniitek.ru

<sup>2</sup>zakharova@vniitek.ru

<sup>3</sup>m.kurbanova@fncps.ru

## SEARCHING FOR AN APPROACH TO THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF SPORES IN FOOD SYSTEMS

The aim of research is to find an approach to control the quantitative germination of microbial spores in food systems. Tasks: to determine the presence of calcium ions in the suspension of germinated spores; to establish the dependence of the concentration of calcium ions on the number of germinated spores. The *Bacillus subtilis* ATCC 6633 strain was used as the object of the study. The determination of the biological concentration of *Bacillus subtilis* in the spore suspension was performed by seeding successive tenfold dilutions of the *Bacillus subtilis* suspension in sterile distilled water, followed by seeding the suspension and its successive dilutions in Petri dishes with a solid nutrient medium. The suspension was heated at a temperature of  $95 \pm 1^\circ\text{C}$  for 20 minutes. After heating, the suspension titer and  $\text{Ca}^{2+}$  concentration were determined. Determination of the  $\text{Ca}^{2+}$  concentration was carried out by capillary electrophoresis according to the method M 04-52-2008 on the device Kapel-105M (Lumex, Russia). The obtained dependence of the  $\text{Ca}^{2+}$  concentration on the titer of microorganisms makes it possible to determine the number of germinated spores even at their minimum content, which makes it possible to quantify germinated spores in food systems by an analytical method. This approach to controlling the quantitative germination of spores showed its applicability for this type of study, since the method of capillary electrophoresis used in the study makes it possible to determine the mass concentration of calcium cations from 1.0 to 500 mg/dm<sup>3</sup>.

**Keywords:** spores of microorganisms, delayed germination, food safety, calcium ions, capillary electrophoresis

**For citation:** Posokina N.E., Zakharova A.I., Kurbanova M.N. Searching for an approach to the quantitative determination of spores in food systems // Bulliten KrasSAU. 2023;(6): 179–185. (In Russ.). DOI: 10.36718/1819-4036-2023-6-179-185.

**Введение.** С точки зрения безопасности пищевой продукции одной из самых сложных проблем при обработке пищевых продуктов физическими методами является борьба с микроорганизмами, в том числе спорами [1]. Споры, благодаря защитным механизмам, способны выдерживать радикальные изменения условий внешней среды [2–5]. Обеспечение стерилизующего эффекта часто осуществляется за счет увеличения режимов обработки, однако при этом, помимо инактивации микроорганизмов, происходит деградация необходимых для организма человека питательных веществ [6, 7]. Направление по оптимизации режимов стерилизации, обеспечивающих сохранность и безопасность готовой продукции, также актуально в связи с тем, что полное ингибирование спорной формы микроорганизмов не всегда достижимо [8, 9]. Это связано с таким явлением, как отложенное прорастание спор, или лаг-период.

Бактериальная спора является уникальной биологической системой, обладающей устойчивостью к неблагоприятным условиям, и является объектом, позволяющим изучить механизмы ее образования и прорастания [10–12]. В качестве распространенной модели используют раз-

личные штаммы *Bacillus subtilis*, признанные в качестве объекта изучения генетической и биохимической регуляции структуры клетки.

У большинства видов спорообразование вызывается неблагоприятными для роста условиями, например истощением питательных веществ. Как внутренние, так и внешние рецепторы могут сигнализировать вегетативной клетке о прекращении роста и формировании менее метаболически требовательного и более устойчивого состояния, которое способствует ее выживанию в условиях дефицита питательных веществ [13].

Достаточность или недостаточность обработки пищевых систем физическими методами оценивают в том числе и по наличию либо отсутствию спор микроорганизмов. Споры достаточно термоустойчивы благодаря внешней оболочке и кортексу. Попадая в благоприятные условия, покоящаяся спора начинает прорастание, теряя свою термоустойчивость [14].

На рисунке 1 представлено схематичное строение споры. Ядро споры содержит комплекс дипиколиновой кислоты и хелата кальция, содержание которых колеблется от 5 до 15 % от общей сухой массы спор [15].



Рис. 1. Строение споры (адаптировано из [15])

При попадании в благоприятную среду активируется прорастание спор, которое условно делится на несколько этапов: активация спор (может происходить при нагревании); инициация прорастания; собственно прорастание спор (выделение дипиколиновой кислоты, ионов кальция и разрушение пептидогликана кортекса) [16].

Несмотря на то что уже многое известно о прорастании спор, остается неясным, что происходит в течение весьма изменчивого и часто длительного периода задержки между воздействием на споры питательных веществ и моментом их прорастания, в так называемый лаг-период. Например, продолжительность лаг-периода прорастания спор *C. perfringens* в питательных средах определяется многими факторами и уменьшается за счет термической активации и повышенного количества рецепторов прорастания. Однако, что именно происходит во время лаг-периода, кроме медленного высвобождения комплекса дипиколиновой кислоты с ионами кальция в некоторых случаях, неясно [17].

**Цель исследования** – поиск подхода к контролю количественного прорастания спор.

**Задачи:** определить наличие ионов кальция в суспензии проросших спор; установить зависимость концентрации ионов кальция от количества проросших спор.

**Объекты и методы.** В качестве объекта исследования использовали штамм *Bacillus subtilis* ATCC 6633, полученный в ФБУН ГНЦ ПМБ «ГКПМ-Оболенск». Культуру активировали посредством трех-, четырехкратного пересева че-

рез каждые 24 ч в жидкую питательную среду МПБ (мясо-пептонный бульон). После этого культуру высевали на плотную агаровую среду МПА (мясо-пептонный агар) и термостатировали при температуре  $37 \pm 1$  °С. После термостатирования в течение 3–7 дней (при относительной влажности воздуха не менее 60 %) культуру выдерживали при комнатной температуре до 14 суток в зависимости от скорости спорообразования и устойчивости спор к прорастанию. Интенсивность спорообразования бактериальной культуры контролировали под микроскопом с применением фазового контраста. Споры, выращенные на твердой среде, смывали с поверхности среды раствором фосфатного буфера из расчета 10–15 см<sup>3</sup> раствора на 75 см<sup>2</sup> поверхности при помощи стерильного шпателя из проволоки и сливали в пробирки. Образовавшиеся споры отделяли от питательной среды центрифугированием при 2500–3000 об/мин (модель центрифуги MPW-223e) в течение 30 мин. Осадок промывали стерильной дистиллированной водой или раствором фосфатного буфера, после чего вновь центрифугировали. Промывание с последующим центрифугированием повторяли несколько раз. Отмытые от культуральной среды споры суспензировали в растворе фосфатного буфера с pH 6,98.

Определение биологической концентрации *Bacillus subtilis* в споровой суспензии выполняли методом посева последовательных десятикратных разведений суспензии *Bacillus subtilis* в стерильной дистиллированной воде с последую-

щим высевом суспензии и ее последовательных разведений в чашки Петри с плотной питательной средой МПА.

Проводили опыт с прогреванием и количественным определением  $Ca^{2+}$ .

1. Определяли титр суспензии перед прогревом (методом разведений и посевов в МПА).

2. Проводили прогрев суспензии при температуре  $95 \pm 1$  °С в течение 20 мин в высокотемпературном циркуляционном термостате WiseCircu WCH12. Прогрев осуществлялся в пробирке с постановкой контроля с термометром для фиксации достижения заданной температуры.

3. Определяли титр суспензии и концентрации  $Ca^{2+}$  после прогрева.

Определение концентрации  $Ca^{2+}$  проводили методом капиллярного электрофореза по методике М 04-52-2008 на приборе «Капель-105М» (Люмэкс, Россия). Диапазон измеряемых значений массовой концентрации катионов кальция от 1,0 до 500 мг/дм<sup>3</sup>.

Эксперименты проводили в трехкратной повторности с отсеиванием статистически недос-

товерных данных. Математическую обработку проводили с использованием специализированного программного обеспечения TableCurve 2D v.5.01 (SYSTAT Software Inc.).

**Результаты и их обсуждение.** С целью изучения влияния обработки физическими методами на прорастание спор было выдвинуто предположение, что количественную оценку проросших спор возможно провести по количеству  $Ca^{2+}$ , выделившегося из спор при прорастании, так как микробиологические методы определения количества спор занимают много времени, при этом остается риск вторичного роста вегетативных клеток, возникла необходимость поиска решения данной проблемы. Поскольку ядро спор содержит комплекс дипиколиновой кислоты и хелата кальция, было выдвинуто предположение о корреляции концентрации ионов кальция и титра микроорганизмов. С целью построения калибровочной кривой и нахождения функциональной зависимости концентрации  $Ca^{2+}$  от количества проросших спор был проведен ряд экспериментов. Данные исследований представлены в таблице.

#### Количество выделенного кальция и титр микроорганизмов при прорастании спор

Номер эксперимента	Концентрация микроорганизмов, КОЕ/г	Кальций, мг/л
1	$6,5 \cdot 10^8$	11,36
	$6,5 \cdot 10^7$	4,358
	$6,5 \cdot 10^6$	3,384
2	$9,1 \cdot 10^8$	21,86
	$9,1 \cdot 10^7$	9,987
	$9,1 \cdot 10^6$	5,827
3	$3,0 \cdot 10^8$	22,67
	$3,0 \cdot 10^7$	8,107
	$3,0 \cdot 10^6$	5,156
4	$2,5 \cdot 10^8$	16,95
	$2,5 \cdot 10^7$	6,214
	$2,5 \cdot 10^6$	4,021

При концентрации спор микроорганизмов в количестве  $(2,5-9,1) \cdot 10^6$  КОЕ/г количество выделенного кальция составляет от 3,384 до 5,827 мг/л.

При концентрации спор микроорганизмов в количестве  $(2,5-9,1) \cdot 10^7$  КОЕ/г количество выделенного кальция составляет от 4,358 до 9,987 мг/л.

При концентрации спор микроорганизмов в количестве  $(2,5-9,1) \cdot 10^8$  КОЕ/г количество выделенного кальция составляет от 11,36 до 22,67 мг/л.

На основании полученных данных была найдена зависимость концентрации выделившегося  $Ca^{2+}$  от концентрации микроорганизмов (рис. 2).

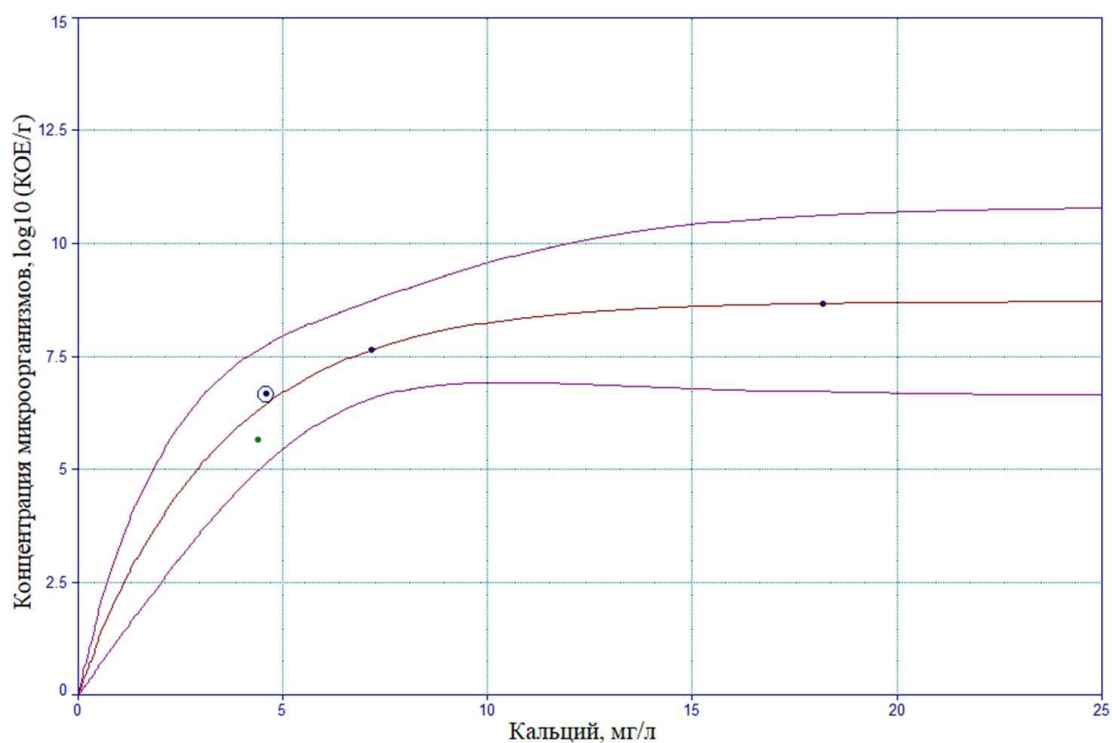


Рис. 2. Калибровочная кривая зависимости концентрации  $Ca^{2+}$  от концентрации микроорганизмов

Данная зависимость описывается функцией

$$\text{Lg } N = a(1 - \exp(-bm)),$$

где  $N$  – концентрация микроорганизмов, КОЕ/г;  $m$  – количество кальция, мг/л;  $a$  – константа;  $b$  – коэффициент.

**Заключение.** На основании проведенного исследования можно сделать вывод, что при прорастании спор выделяется значимое количество ионов кальция, которое коррелирует с титром проросших спор микроорганизмов. На основании полученных данных была найдена зависимость концентрации выделившегося кальция от концентрации микроорганизмов, что дает возможность проводить количественное определение проросших спор в пищевых системах аналитическим методом. Такой подход к контролю количественного прорастания спор показал свою применимость для данного вида исследований, поскольку используемый в исследовании метод капиллярного электрофореза позволяет определять массовую концентрацию катионов кальция от 1,0 до 500 мг/дм<sup>3</sup>.

#### Список источников

1. Посокина Н.Е., Захарова А.И. Термические способы обработки растительного сырья для увеличения его хранимоспособности // Вестник КрасГАУ. 2022. № 11. С. 192–201. DOI: 10.36718/1819-4036-2022-11-192-201.
2. Role of novel polysaccharide layers in assembly of the exosporium, the outermost protein layer of the *Bacillus anthracis* spore / D. Lehmann [et al.] // Molecular Microbiology. 2022. № 118(3). С. 258–277. DOI: 10.1111/mmi.14966.
3. Tan I.S., Ramamurthi K.S. Spore formation in *Bacillus subtilis* // Environmental Microbiology Report. 2014. № 6 (3). С. 212–225. DOI: 10.1111/1758-2229.12130.
4. Stewart G.C. The exosporium layer of bacterial spores: a connection to the environment and the infected host // Microbiology and Molecular Biology Reviews. 2015. № 79 (4). P. 437–457. DOI: 10.1128/MMBR.00050-15.
5. Coordinated Assembly of the *Bacillus anthracis* Coat and Exosporium during Bacterial Spore Outer Layer Formation / T.J. Boone

- [et al.] // *mBio*. 2018. № 9(6). P. e01166–18. DOI:10.1128/mBio.01166-18.
6. Modelling the effect of sub(lethal) heat treatment of *Bacillus subtilis* spores on germination rate and outgrowth to exponentially growing vegetative cells / *J.P.P.M. Smelt* [et al.] // *International Journal of Food Microbiology*. 2008. № 128 (1). С. 34–40. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.08.023.
  7. Посокина Н.Е., Захарова А.И. Современные нетермические способы обработки растительного сырья, применяемые для увеличения его хранимоспособности // *Пищевые системы*. 2023. № 1 (6). С. 4–10. DOI: 10.21323/2618-9771-2023-6-1-4-10.
  8. *Schubert W.W., Beaudet R.A.* Determination of lethality rate constants and D-values for heat-resistant *Bacillus* spores ATCC 29669 exposed to dry heat from 125 °C to 200 °C // *Astrobiology*. 2011. № 11(3). P. 213–223. DOI: 10.1089/ast.2010.0502.
  9. *Rodrigo D., Tejedor W., Martínez A.* Heat Treatment: Effect on Microbiological Changes and Shelf Life // *Encyclopedia of Food and Health*. 2016. P. 311–315. DOI: 10.1016/B978-0-12-384947-2.00372-X.
  10. Dipicolinic acid as a novel spore-inspired excipient for antibody formulation / *I.L. Batalha* [et al.] // *International Journal of Pharmaceutics*. 2017. № 526 (1–2). P. 332–338. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2017.05.012.
  11. Targeting the Impossible: A Review of New Strategies against Endospores / *A. Romero-Rodríguez* [et al.] // *Antibiotics*. 2023. № 12 (2). P. 248. DOI: 10.3390/antibiotics12020248.
  12. A monostyryl boradiazaindacene (BODIPY)-based lanthanidefree colorimetric and fluorogenic probe for sequential sensing of copper (II) ions and dipicolinic acid as a biomarker of bacterial endospores / *Y. Cetinkaya* [et al.] // *Journal of Hazardous Materials*. 2019. № 377. P. 299–304. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2019.05.108.
  13. Mechanisms and Applications of Bacterial Sporulation and Germination in the Intestine / *N. Koopman* [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. 2022. № 23(6). P. 3405. DOI: 10.3390/ijms23063405.
  14. *Setlow P.* Germination of Spores of *Bacillus* Species: What We Know and Do Not Know // *Journal of Bacteriology*. 2014. № 196(7). P. 1297–1305. DOI: 10.1128/JB.01455-13.
  15. *Rekadwad B. N., Gonzalez J. M., Khobragade C.N.* One Plate-double Nutrient Endospore Activation Method // *Bio-101*. 2020. P. e3474. DOI: 10.21769/BioProtoc.3474.
  16. Bacterial Spores: Mechanisms of Stability and Targets for Modern Biotechnologies / *B.G. Andryukov* [et al.] // *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research*. 2019. № 20 (5). С. 15329–15344. DOI: 10.26717/BJSTR.2019.20.003500.
  17. Kinetics of Germination of Individual Spores of *Geobacillus stearothermophilus* as Measured by Raman Spectroscopy and Differential Interference Contrast Microscopy / *T. Zhou* [et al.] // *PLoS ONE*. 2013. № 8 (9). P. e74987. DOI: 10.1371/journal.pone.0074987.

### References

1. *Posokina N.E., Zaharova A.I.* Termicheskie sposoby obrabotki rastitel'nogo syr'ya dlya uvelicheniya ego hranimosposobnosti // *Vestnik KrasGAU*. 2022. № 11. S. 192–201. DOI: 10.36718/1819-4036-2022-11-192-201.
2. Role of novel polysaccharide layers in assembly of the exosporium, the outermost protein layer of the *Bacillus anthracis* spore / *D. Lehmann* [et al.] // *Molecular Microbiology*. 2022. № 118(3). С. 258–277. DOI: 10.1111/mmi.14966.
3. *Tan I.S., Ramamurthi K.S.* Spore formation in *Bacillus subtilis* // *Environmental Microbiology Report*. 2014. № 6 (3). С. 212–225. DOI: 10.1111/1758-2229.12130.
4. *Stewart G.C.* The exosporium layer of bacterial spores: a connection to the environment and the infected host // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2015. № 79 (4). P. 437–457. DOI: 10.1128/MMBR.00050-15.
5. Coordinated Assembly of the *Bacillus anthracis* Coat and Exosporium during Bacterial Spore Outer Layer Formation / *T.J. Boone* [et al.] // *mBio*. 2018. № 9(6). P. e01166–18. DOI:10.1128/mBio.01166-18.
6. Modelling the effect of sub(lethal) heat treatment of *Bacillus subtilis* spores on germination rate and outgrowth to exponentially growing vegetative cells / *J.P.P.M. Smelt* [et al.] // *In-*

- ternational Journal of Food Microbiology. 2008. № 128 (1). С. 34–40. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.08.023.
7. *Posokina N.E., Zaharova A.I.* Sovremennye netermicheskie sposoby obrabotki rastitel'nogo syr'ya, primenyaemye dlya uvelicheniya ego hranimosposobnosti // *Pischevye sistemy*. 2023. № 1 (6). С. 4–10. DOI: 10.21323/2618-9771-2023-6-1-4-10.
  8. *Schubert W.W., Beaudet R.A.* Determination of lethality rate constants and D-values for heat-resistant *Bacillus* spores ATCC 29669 exposed to dry heat from 125 °C to 200 °C // *Astrobiology*. 2011. № 11(3). P. 213–223. DOI: 10.1089/ast.2010.0502.
  9. *Rodrigo D., Tejedor W., Martínez A.* Heat Treatment: Effect on Microbiological Changes and Shelf Life // *Encyclopedia of Food and Health*. 2016. P. 311–315. DOI: 10.1016/B978-0-12-384947-2.00372-X.
  10. Dipicolinic acid as a novel spore-inspired excipient for antibody formulation / *I.L. Batalha* [et al.] // *International Journal of Pharmaceutics*. 2017. № 526 (1–2). P. 332–338. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2017.05.012.
  11. Targeting the Impossible: A Review of New Strategies against Endospores / *A. Romero-Rodríguez* [et al.] // *Antibiotics*. 2023. № 12 (2). P. 248. DOI: 10.3390/antibiotics12020248.
  12. A monostyryl boradiazaindacene (BODIPY)-based lanthanidefree colorimetric and fluorogenic probe for sequential sensing of copper (II) ions and dipicolinic acid as a biomarker of bacterial endospores / *Y. Cetinkaya* [et al.] // *Journal of Hazardous Materials*. 2019. № 377. P. 299–304. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2019.05.108.
  13. Mechanisms and Applications of Bacterial Sporulation and Germination in the Intestine / *N. Koopman* [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. 2022. № 23(6). P. 3405. DOI: 10.3390/ijms23063405.
  14. *Setlow P.* Germination of Spores of *Bacillus* Species: What We Know and Do Not Know // *Journal of Bacteriology*. 2014. № 196(7). P. 1297–1305. DOI: 10.1128/JB.01455-13.
  15. *Rekadwad B. N., Gonzalez J. M., Khobragade C.N.* One Plate-double Nutrient Endospore Activation Method // *Bio-101*. 2020. P. e3474. DOI: 10.21769/BioProtoc.3474.
  16. Bacterial Spores: Mechanisms of Stability and Targets for Modern Biotechnologies / *B.G. Andryukov* [et al.] // *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research*. 2019. № 20 (5). С. 15329–15344. DOI: 10.26717/BJSTR.2019.20.003500.
  17. Kinetics of Germination of Individual Spores of *Geobacillus stearothermophilus* as Measured by Raman Spectroscopy and Differential Interference Contrast Microscopy / *T. Zhou* [et al.] // *PLoS ONE*. 2013. № 8 (9). P. e74987. DOI: 10.1371/journal.pone.0074987.

Статья принята к публикации 12.04.2023 / The article accepted for publication 12.04.2023.

Информация об авторах:

**Наталья Евгеньевна Посокина**<sup>1</sup>, заведующая лабораторией технологии консервирования, кандидат технических наук

**Анна Ивановна Захарова**<sup>2</sup>, научный сотрудник лаборатории технологии консервирования

**Мадинат Насрудиновна Курбанова**<sup>3</sup>, ведущий научный сотрудник, кандидат биологических наук

Information about the authors:

**Natalya Evgenievna Posokina**<sup>1</sup>, Head of the Laboratory of Canning Technology, Candidate of Technical Sciences

**Anna Ivanovna Zakharova**<sup>2</sup>, Researcher, Laboratory of Canning Technology

**Madinat Nasrudinovna Kurbanova**<sup>3</sup>, Leading Researcher, Candidate of Biological Sciences

