

## RESEARCH OF QUALITATIVE AND QUANTITATIVE COMPOSITION OF MICROFLORA BRINE

S. Danylenko, L. Kovalenko, L. Nedorizanyuk

*Institute of Food Resources NAAS*

I. Panasyuk

*National University of Food Technologies*

---

**Key words:**

Brine microflora  
Staphylococci  
Lactic acid bacteria  
Fermented meat products

**Article history:**

Received 22.01.2013  
Received in revised form  
18.02.2013  
Accepted 03.04.2013

**Corresponding author:**

S. Danylenko  
L. Kovalenko  
E-mail:  
svet1973@gmail.com  
lyuduska00@mail.ru

---

**ABSTRACT**

The qualitative and quantitative composition of microflora brine was studied. Six samples of industrial brine microflora have been explored. It was determined that the number of bacteria in 1 cm<sup>3</sup> reaches 10<sup>6</sup> CFU, the main part is a genera Lactobacillus, Micrococcus, Staphylococcus. The most common genera in brine, used for preserving fruits and vegetables, is Lactobacillus, and in brain for meat, Lactobacillus, Micrococcus and Staphylococcus. Two highly productive staphylococci and five strains of lactic acid bacteria were selected by both biological and technological characteristics. The presence of nitrate reducing, catalase and aroma forming activities were discovered in selected strains of bacteria, so they are promising for the manufacture of fermented meat products.

## ДОСЛІДЖЕННЯ ЯКІСНОГО ТА КІЛЬКІСНОГО СКЛАДУ МІКРОФЛОРИ РОЗСОЛІВ

С.Г. Даниленко, Л.М. Коваленко, Л. П. Недорізанюк

*Інститут продовольчих ресурсів НААН*

І.В. Панасюк

*Національний університет харчових технологій*

*Вивчено якісний та кількісний склад мікрофлори розсолів. Досліджено мікрофлору 6 зразків промислових розсолів. Встановлено, що чисельність бактерій досягає 10<sup>7</sup> КУО/см<sup>3</sup>, основну частку складають роди Lactobacillus, Micrococcus, Staphylococcus. За сукупністю біологічних та технологічних ознак було відібрано 2 високопродуктивних штами стафілококів та 5 штамів молочнокислих бактерій.*

**Ключові слова:** мікрофлора, розсоли, стафілококи, молочнокислі бактерії, ферментовані м'ясні продукти.

Посол — це спосіб консервації і технологічна операція в ковбасному виробництві, в результаті якої м'ясопродукти набувають характерних запах, смак і забарвлення.

При посолі під впливом високої концентрації хлориду натрію, зниженої температури і антагоністичних взаємин мікроорганізмів різних видів різко змінюється кількісний і груповий склад мікрофлори м'яса. Найбільш істотні зміни зумовлені дією хлориду натрію.

Оскільки значна частина мікроорганізмів, що містяться в розсолі, здатна розмножуватися за високих концентрацій хлориду натрію, посол слід проводити за зниженої температури (не вище 3 – 5 °С). В цьому разі стримується розвиток мікроорганізмів.

У розсолах і солонині виявляють різні галофільні і солестійкі мікрококи, солестійкі штами бактерій з родів *Pseudomonas* і *Achromobacter*, солестійкі молочнокислі бактерії, колиформні бактерії, *Enterococcus* і аеробні види роду *Bacillus*. Усі ці мікроорганізми складають основну мікрофлору розсолів і солоних м'ясопродуктів. Окрім того, в розсолах інколи виявляють представників родів *Leuconostoc*, *Vibrio*, *Spirillum* і *Proteus*; анаеробні клостридії, дріжджі та плісеньові гриби. У доброякісних розсолах і солонині, зазвичай, переважають мікрококи, молочнокислі бактерії і деякі види неспоруютьовальних грамнегативних паличок.

Склад мікрофлори розсолів залежить від багатьох факторів, в тому числі від сировини, умов і режимів посолу. З часом у розсолі зростає частка молочнокислої мікрофлори, яка пригнічує гнильну мікрофлору [1].

Пошук технологічно перспективних штамів для бактеріальних препаратів, особливо для посолу м'яса, є складним і тривалим процесом, який вимагає новітніх підходів селекції. Мікроорганізми вилучають із різних природних джерел (свіжої м'ясої сировини, фаршу, м'ясних, молочних, кисломолочних продуктів, овочів, фруктів та розсолів та сумішей для посолу), проводять селекцію у бажаному напрямі, застосовуючи як традиційні, так і сучасні генетичні методи.

Мета роботи — дослідження мікрофлори розсолів, які використовувалися для виготовлення м'ясних продуктів і плодоовочевих консерви.

У роботі використовували зразки розчинів для посолу та посолочні суміші.

Чисті культури мікроорганізмів одержували за загальними мікробіологічними методами на відповідних селективних середовищах. Для одержання ізольованих колоній кокової форми накопичувальну культуру висівали на агаризовані селективні середовища — м'ясопептонний агар (МПА) та МПА з 5 % NaCl. Для одержання паличкоподібних форм — використовували такі поживні середовища: на основі гідролізованого протеазою знежиреного молока (ГА), середовище de Man, Rogosa and Sharpe (MRS), середовище з дріжджовим екстрактом та глюкозою (ПК) [3 – 5]; спороутворювальних мікроорганізмів — м'ясо-пептонний агар після прогрівання розведень за температури 80°C упродовж 10 хвилин; плісеньових грибків та дріжджів — середовище Сабуро з антибіотиком; колиформних бактерій — шляхом внесення 1 см<sup>3</sup> розсолу або його серійних розведень у середовище Кесслер; бактерій групи протею — м'ясо-пептонний агар за методом Шукевича; бактерій з роду сальмонел у 25 г продукту [6 – 7].

Інкубування вели за оптимальної для кожного виду мікроорганізмів температури.

Морфологічні особливості культур встановлювали методом світлової мікроскопії пофарбованих за Грамом мікропрепаратів за допомогою мікроскопу Motic (Fischer Bioblock) із вмонтованою відеокамерою Top View 1000 зі збільшенням у 1000 разів.

Цілеспрямовану селекцію біохімічно-активних штамів стафілококів та молочнокислих бактерій, перспективних для використання посолу м'ясних продуктів, здійснювали за такими важливими для промислових штамів показниками як:

- ступінь кислотоутворення;
- ріст у широкому діапазоні температур від 0°C до 30 °C;
- стійкість до високих концентрацій NaCl (до 15 %);
- нітритредукувальна активність;
- каталазна активність;
- протеолітична активність;
- ароматоутворювальна активність;
- антагоністична активність щодо санітарно-показової мікрофлори (*Salmonella sp.*, *S. aureus*, *Proteus*, *Pseudomonas sp.*, *E. coli*, *Clostridium botulinum*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus sp.*)
- безпечність культур (непатогенність, нетоксичність та не вірулентність).

Для мікробіологічного дослідження було взято 6 зразків розсолів, які використовувалися для виготовлення м'ясних продуктів і плодоовочевих консерв. Дослідження вели за схемою, яка передбачала виділення штамів грампозитивних каталазопозитивних коків, молочнокислих бактерій.

Паралельно було виконано бактеріологічне дослідження кожного продукту на наявність санітарно-показової (БГКП, сульфитредукувальні клостридії, *Proteus spp.*), умовно-патогенної (*S. aureus*)

В обстежених зразках перелічені вище мікроорганізми були відсутні і це є позитивною ознакою, яка свідчить про високий рівень санітарно-гігієнічних умов виробництва цих продуктів. У результаті проведеного мікробіологічного дослідження було показано, що загальна чисельність мікрофлори у застосовуваних промислових розсолах була майже однаковою і коливалась в межах від  $1,3 \cdot 10^6$  КУО/см<sup>3</sup> до  $5,6 \cdot 10^6$  КУО/см<sup>3</sup> та розрізнялась за співвідношенням основних груп мікроорганізмів. Зокрема, у розсолах для плодоовочевих консервів переважали молочнокислі бактерії (35 – 43 %), тоді як у розсолах для балику зі свинини перевага була на боці кокових форм — мікрококів та стафілококів (33 – 36 %). Значну частку складали дріжджі (11 – 17 %) та спороутворювальні бактерії — від 17 % до 24 %. Вміст санітарно-показової мікрофлори не перевищував 11 %.

Колонії мікроорганізмів, виділені з дослідженого розсолу, були подібними за морфологією. У товщі агаризованих середовищ (МПА, МПА-С, MRS) колонії мали форму «човників» довжиною 1 мм, «гречаного зерна» або дисків.

За поверхневого росту спостерігали різні за кольором та розміром колонії, здебільшого дрібні (до 1 мм у діаметрі), білуваті (зрідка кремового, жовтого чи блідо-рожевого забарвлення), круглі, опуклі, гладкі, блискучі найчастіше з рівним краєм з діаметром 1 – 2 мм та до 5 мм.

У рідких середовищах отримували різноманітні за морфологією бактерії. Так, у середовищі МПБ більшість ізолятів мали форму коків від 0,5 до 2,5 мкм в діаметрі, зустрічались і тетракоки. Під час розвитку у рідкому середовищі MRS були присутні також ланцюжки коків, диплококи, а також окремі ниткоподібні, тоненькі, вигнуті палички різної довжини (0,7 – 1,1 мкм) та товщини (0,1 – 0,6 мкм), які інколи утворювали ланцюжки. У середовищах МПБ та МРС також була присутня окрема група бактерій у формі товстих роздутих паличок.

Усього із опрацьованих зразків було отримано 57 ізолятів. Для оцінки технологічності штамів було досліджено здатність до росту в певному діапазоні температури, в присутності NaCl та різної кислотності середовища, що є характерними для розсолів та готових ферментованих продуктів.

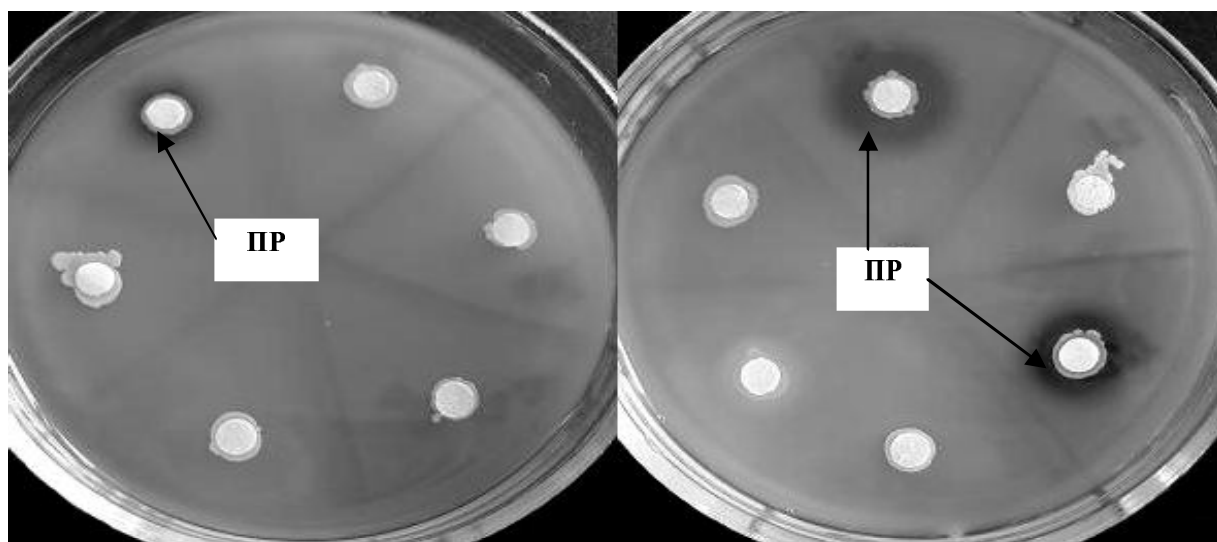
Культури росли у межах температури від 10 °С до 40 °С. За концентрації хлориду натрію 6,5 % зафіксовано ріст для п'яти штамів, за концентрації 15 % — два штами. Після дослідження стійкості до високих концентрацій хлориду натрію було відібрано 7 культур, які нагромаджували значну кількість життєздатних клітин у поживних середовищах.

Відібрані культури для зручності проведення тестування розділили на дві групи за морфологією. Перша група об'єднувала 2 культури коків, а друга — 5 паличкоподібних.

Встановлено, що виділені коки є грампозитивними та містять каталазу. Їхній рід визначали за сукупністю таких діагностичних тестів: за ростом на агарі з фуразолідоном; за здатністю гідролізу гліцерину у присутності еритроміцину; за експрес-методом «Діастаф»; за ростом на молочно-жовтково-сольовому агарі (МЖСА). Обстежені культури не розвивалися на селективному для мікрококів середовищі з фуразолідоном. На середовищі з еритроміцином отримали колонії мікроорганізмів з жовтим кольором середовища навколо бляшки. На МЖСА також спостерігався ріст мікроорганізмів. Зона затримки росту за експрес-тестом — «Діастаф» становила відповідно 26 та 22 мм. Отримані результати дозволяють віднести 2 досліджувані культури до роду *Staphylococcus*.

Скринінг штамів за протеолітичною активністю здійснювали на підставі здатності утворювати зону просвітлення на агаризованому середовищі з 10 % молока (рис.1). Переважна більшість штамів стафілококів була здатна до гідролізу молочних білків. Так, із 7 досліджених штамів: 3 штами утворювали зону просвітлення діаметром понад 10 см, 1 штам — від 13 см до 15 см, 1 штам — до 20 см, для решти двох протеолітичну активність взагалі не спостерігали.

За рівнем приросту вільних амінокислот у середовищі МПБ з додаванням 2 % глюкози та 4 % кухонної солі) упродовж 10 діб культивування, було встановлено, що наприкінці культивування встановлено зростання сумарної кількості вільних АК у середовищах інокульованих усіма культурами.



**Рис. 1** Ріст культур на агарізованому середовищі для визначення протеолітичної активності:  
 ПР — зона просвітлення, утворюється за наявності протеолітичної активності

Оцінювання нітритредукувальної активності у стафілококів та окремих штамів молочнокислих бактерій проводили за інтенсивністю розкладання нітриту натрію у поживному середовищі (МПБ з додаванням 2 % глюкози та 1,5 % NaCl) з початковим вмістом цієї солі — 300 мг/дм<sup>3</sup>. Після 18 діб інкубації за температури 25 °С зафіксовано зниження вмісту нітритів у середовищі за додавання кожної з досліджених культур.

Антимікробна дія притаманна не всім дослідженим штамам. Кожен з досліджених штамів мав свій характерний спектр інгібувальної дії щодо референс-штамів патогенних і умовно-патогенних бактерій. Більшу частку серед культур-антагоністів склали лактобацили, тоді як штами роду *Staphylococcus* значно поступалися їм за цією властивістю.

Таким чином, визначено наявність важливих технологічних ознак таких як нітратредукувальна, ароматоутворювальна та антагоністична активності у відібраних штамів бактерій. Це все дає змогу залучити їх до колекції перспективних для промисловості культур.

### Висновки

Проведено мікробіологічний аналіз 6 зразків розсолу з метою вивчення кількісного і якісного складу мікрофлори. Показано, що чисельність бактерій у см<sup>3</sup> розсолу, не перевищує мільйонів клітин. Визначено, що найпоширенішими родами у розсолах, які використовуються для консервування плодів і овочів є *Lactobacillus*, а у м'ясних розсолах — *Lactobacillus*, *Micrococcus* та *Staphylococcus*. Відібрано 2 високопродуктивні каталазопозитивні штами стафілококів і 5 штамів молочнокислих бактерій, які залучено до колекції перспективних для промисловості культур.

### Література

1. Шатровський О.Г. Конспект лекцій з курсу «МІКРОБІОЛОГІЯ» (для студентів 1 – 2 курсу денної та заочної форм навчання освітньо-кваліфікаційного рівня бакалавр 6.140101 «Готельно-ресторанна справа») / О.Г. Шатровський; / Харк. нац. акад. міськ. госп-ва; — Х.: ХНАМГ, 2012. — 132 с
2. Leroy F. Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation / F. Leroy, J. Verluyten, L. De Vuyst // Int. J. Food Microbiol. — 2006. — Vol. 106, № 3. — P. 270 – 285.
3. Банникова Л.А. Селекция молочнокислых бактерий и их применение в молочной промышленности. — М.: Пищ. промышленность, 1975. — 225 с.
4. М'ясна продукція та яйцепродукти. Нормативні документи: Довідник — У 4 т. / [За заг. ред. В.Л. Іванова]. — Львів: НІЦ «Леонорм-Стандарт», 2000. — Т.3. — 262 с. — (Серія «Нормативна база підприємства»).

5. Слюсаренко Т.П. Лабораторный практикум по микробиологии пищевых производств / Слюсаренко Т.П. — М.: Легкая и пищевая пром-ть, 1984. — 208с.
6. Журавская Н.К., Алехина Л.Т., Отряшенкова Л.М. Исследование и контроль мяса и мясопродуктов. — М.: Агропромиздат, 1985. — 296 с
7. Лабинская А.С. Микробиология с техникой микробиологических исследований. — М.: Медицина. — 1972. — 479 с.

### **ИССЛЕДОВАНИЕ КАЧЕСТВЕННОГО И КОЛИЧЕСТВЕННОГО СОСТАВА МИКРОФЛОРЫ РАССОЛОВ**

**С.Г. Даниленко, Л.Н. Коваленко, Л.П. Недоризанюк**

*Институт продовольственных ресурсов НААН*

**И.В. Панасюк**

*Национальный университет пищевых технологий*

*Изучен качественный и количественный состав микрофлоры рассолов. Исследовано микрофлору 2 образцов промышленных рассолов для ветчины. Показано, что количество бактерий в см<sup>3</sup> достигает 10<sup>7</sup> КОЕ, основную часть составляют роды *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*. По совокупности биологических и технологических признаков было отобрано 2 высокопроизводительных стафилококки и 5 штаммов молочнокислых бактерий.*

**Ключевые слова:** микрофлора рассолов, стафилококка, молочнокислые бактерии, ферментированные мясные продукты.