

МІКРОБІОЛОГІЯ

© М.Р. Мудрик, І.І. Кутчак, В.О. Петров, В.В. Баті, Н.В. Маркуш, О.Б. Левчук, Н.В. Бойко, 2013

УДК 579.23:579.67:579.842.1/.2:613.26

М.Р. МУДРИК, І.І. КУТЧАК, В.О. ПЕТРОВ, В.В. БАТІ, Н.В. МАРКУШ, О.Б. ЛЕВЧУК, Н.В. БОЙКО
Ужгородський національний університет, медичний факультет, кафедра мікробіології, вірусології,
імунології з курсом інфекційних хвороб, Ужгород

ОСОБЛИВОСТІ МІКРОБНОЇ БЕЗПЕКИ ТРАДИЦІЙНИХ СТРАВ ІЗ РОСЛИН¹

В роботі наведено результати мікробного обстеження їстівних рослин, які є компонентами традиційних страв населення країн регіону Чорного моря. Охарактеризовано видовий склад і відсоткове співвідношення бактерій, ізольованих із поверхні рослин. Виявлено здатність окремих штамів лакто- і біфідобактерій пригнічувати *in vitro* ріст штамів умовно-патогенних ентеробактерій *Pantoea agglomerans* і *Providencia rettgeri*, що може бути використано для попередження зумовлених ними опортуністичних інфекцій людини.

Ключові слова: умовно-патогенні ентеробактерії, штами лакто- і біфідобактерій, їстівні рослини, традиційні страви, якість і безпека їжі, опортуністичні інфекції

Вступ. Їстівні рослини є джерелом біологічно активних речовин, які позитивно впливають на здоров'я людини. Однак часто рослинна їжа може стати джерелом харчових токсикоінфекцій у зв'язку з наявністю на її поверхні патогенних та умовно-патогенних бактерій [5]. Використання рослинної їжі переважно в сирому вигляді, недосконалість нормативної бази з мікробної безпеки рослинних харчових продуктів, високий ризик її мікробної контамінації у процесі переробки і недотримання санітарних норм її обробки в разі підвищує ймовірність виникнення захворювань, пов'язаних із вживанням інфекційних рослинних продуктів.

Умовно-патогенні ентеробактерії, що раніше вважались типовими епіфітними мікроорганізмами, сьогодні стали предметом дослідження клініцистів у зв'язку зі зростанням частоти виникнення захворювань, зумовлених ними [3, 4] і встановленої у них резистентності до антибіотиків [6]. Здатність лакто- та біфідобактерій, ізольованих із молочних, кисло-молочних і ферментних продуктів пригнічувати ріст та розмноження деяких патогенних та умовно-патогенних грам-негативних бактерій [2] є добре відомою, однак інгібуюча дія штамів цих же родів, ізольованих із їстівних рослин на представники умовно-патогенних видів родини *Enterobacteriaceae* вивчена недостатньо.

Мета дослідження. Вивчити видову структуру бактерій, ізольованих із поверхні рослин, що входять до складу традиційних страв країн регіону Чорного моря, а також дослідити в експериментах *in vitro* та *in vivo* протимікробну активність корисних мікроорганізмів стосовно штамів *Pantoea agglomerans*, *Serratia odorifera*, *Providencia rettgeri*.

Матеріали та методи. Зразки рослин (овочів, фруктів, ягід, трав та спецій), що входять до складу традиційних страв України, Болгарії, Туреччини, Румунії, Росії та Грузії були рандомізовано відібрані для досліджень із різних місць продажу (супермаркети, відкриті вуличні ринки, приватні фермерські господарства). Для виділення умовно-патогенних ентеробактерій використовували середовища MacConkey і картопляний агар, для біфідобактерій та лактобактерій – середовище Блаурока та МРС агар. Ідентифікацію ізольованих культур здійснювали за допомогою біохімічних тест-систем ENTERO-test 24 і ANAERO-test 23 виробництва PLIVA-Lachema diagnostica s.r.o (Брно, Чеська Республіка).

Антагоністичні властивості штамів, ізольованих із поверхні часнику – *Lactobacillus catenaformis*, кропиви – *L. casei*, капусти – *L. delbrueckii* і *Bifidobacterium dentium* вивчали методами сумісного культивування і агарових блоків [1]. Тест-культурами ентеробактерій були відібрані штами, що характеризувалися високою частотою виділення: *Serratia odorifera* (ізолят із зеленої стручкової квасолі), 2 штами *P. agglomerans* (квасоля та морква), *P. rettgeri* (пелюстки троянд).

Для сумісного культивування використовували суспензії 48 год. культур лакто- та біфідобактерій і 24 год. культур ентеробактерій. Всі мікроорганізми у кількості 10^8 КУО/мл вносили в рідкі поживні середовища МПБ і МРС у співвідношенні 1:1. Для визначення зон пригнічення росту зазначених штамів ентеробактерій внаслідок впливу на них метаболітів лакто- і біфідобактерій методом агарових блоків, основним середовищем служив картопляний агар, засіяний 0,2 мл суспензії кожного тестованого штаму ентеробактерій із оптичною густиною 0,5 по Макфарланду. Газони лакто- і біфідобактерій, попередньо вирощені на середовищі МРС протягом 48 год., були вирізані стерильним пробковим свердлом (діаметр 1,5 см) у вигляді агарових блоків і внесені у лунки з основним поживним середовищем (картопляним

¹ Ця робота фінансована в рамках РП7 ЄС Тема 2: "Продукти харчування, сільське господарство, рибальство та біотехнології", проект "BaSeFood"; "Біоактивні компоненти в продуктах традиційного харчування"; Угода про надання гранту: 227118.

агаром). Після 24 год. культивування посівів при температурі 37 °С вимірювали зони затримки росту тест-культур. Високоактивними вважали штами бактерій-антагоністів, які зумовлювали затримку росту тест-культур більше 20 мм, середньо-активними – від 10 до 20 мм і не активними – до 10 мм.

Профілактичну активність штамів лакто- і біфідобактерій визначали на мишах лінії BALB/c, вводячи їм перорально по 200 мкл суспензії корисних мікроорганізмів, і через 24 год. тест-культури умовно-патогенних бактерій. Всі культури використовували у титрах 10⁸ КУО/мл.

Зміни внутрішніх органів інокульованих тварин досліджували макроскопічно в динаміці на 24, 48 і 72-й день експерименту.

Результати досліджень та їх обговорення. Видовий спектр і кількісне співвідношення ізольованих із поверхні рослин мікроорганізмів були неоднако-

вими для різних країн, проте схожими виявились тенденції їх розподілу: умовно патогенні бактерії траплялися найчастіше, нижчим виявився відсоток корисних мікроорганізмів, зовсім рідко виявляли класичних збудників харчових токсикоінфекцій. Рослинні інгредієнти пріоритетних традиційних страв, отримані з вуличних ринків, характеризувались максимальними рівнями мікробного забруднення у порівнянні зі взірцями, одержаними з супермаркетів чи приватних городів. Найбільшими рівнями мікробної контамінації характеризувались зелені частини рослин і корені (петрушка, шавель, кріп), а найнижчими – їх гладкі поверхні (помідори, перець, квасоля). У таблиці 1 представлені домінуючі види умовно-патогенних ентеробактерій і рослини, з яких вони ізольовані. Виявлено також, що з поверхні рослин, де було знайдено корисні мікроорганізми, зазначені штами ентеробактерій не виділялись.

Таблиця 1

Істівні рослини і традиційні страви, контаміновані умовно-патогенними ентеробактеріями

№	Рослина/страва	Досліджувана частина рослини	Місце придбання/вирощування	Країна
<i>Pantoea agglomerans</i>				
1	Щавель	Листя	Вуличний ринок	Україна
2	Петрушка	Корінь	Вуличний ринок	
3	Цибуля	Цибулина	Супермаркет	
4	Картопля	Бульба	Приватний город	
5	Кріп	Зелень	Супермаркет	
6			Приватний город	
7			Вуличний ринок	
8	Буряк	Коренеплід	Супермаркет	
9	Селера	Корінь	Вуличний ринок	
10	Капуста	Листя	Вуличний ринок	
11	Помідор	Плід	Приватний город	
12	Квасоля	Біб	Вуличний ринок	
13			Приватний город	
14	Огірок	Плід	Приватний город	
15	Сливи свіжі	Плід	Приватний город	
16	Сливи сушені	Плід	Супермаркет	
17	Диня	Ягода	Супермаркет	
18	Квіти бузини	Суцвіття	Приватний город	
19	Морква	Корінь	Вуличний ринок	
20			Супермаркет	
21	Морква	Корінь	Супермаркет	
22	Ячмінь	Зерно	Супермаркет	
23	Пшениця	Борошно	Супермаркет	
24	М'ята	Листя	Приватний город	
25	Квіти троянд	Пелюстки	Приватний город	
26	Боза	Ферментний напій	Домашнє приготування	
27	Зелена стручкова квасоля	Стручок	Супермаркет	Туреччина
28	Зелений сливовий соус	Соус	Супермаркет	Грузія
<i>Serratia marcescens</i>				
29	Петрушка	Зелень	Вуличний ринок	Україна
30	Кріп	Зелень	Вуличний ринок	Україна
<i>Serratia odorifera biogroup 1</i>				
31	Зелена стручкова квасоля	Стручок	Супермаркет	Туреччина
32	Червоний перець	Плід	Приватний город	Болгарія
<i>Providencia rettgeri</i>				
33	Квіти троянд	Пелюстки	Приватний город	Болгарія

В експериментах *in vitro* виявлено антагоністичну активність деяких штамів молочнокислих і біфідобактерій на умовно-патогенні ентеробактерії, зокрема на *P. agglomerans* і *P. rettgeri*, однак не на *S. odorifera*. В таблиці 2 наведені зони пригнічення росту умовно-патогенних бактерій в мм. Найбільш виразну антагоністичну дію спостерігали при застосуванні *L. casei* і *B. dentium* по відношенню до *P. rettgeri* і *L. catenaformis* стосовно штаму *P. agglomerans* (рис. 1 і 2).

Найбільш активні серед тестованих лакто- і біфідобактерій штами *L. catenaformis*, *L. casei* і *B. dentium* були використані нами в експериментах на мишах для дослідження їх антибактеріальних властивостей *in vivo*. Введення штаму *L. casei* за 24 год. до інокуляції суспензією *P. rettgeri* не попередило виникнення запалення внутрішніх органів підслідних тварин, у яких було здуття кишечника і некротичні ушкодження порожньої кишки на фоні загального посилення судинного малюнку інших відділів тонкого та товстого кишечника (табл. 3 і рис. 3).

Застосування з протективною метою штаму біфідобактерій *B. dentium* для попередження запальних процесів, ініційованих оральним введенням *P. rettgeri* забезпечило відносно більшу ефективність, однак і в цьому випадку

нами були відзначені зміни внутрішніх органів тварин, хоч і менш виразні у порівнянні з попередньою експериментальною групою і які в основному проявлялись збільшенням розмірів і кількості Пейєрових бляшок на 48 год. та здуттям всіх відділів кишечника на 72 год. експерименту (рис. 4).

І лише у випадку попереднього введення лабораторним тваринам штаму *L. catenaformis* за 24 год. до інокуляції мишей культурою *P. agglomerans* жодних видимих візуально змін внутрішніх органів не виявляли, що свідчить про наявність профілактичної активності у даного штаму лактобацил стосовно зазначеному штаму ентеробактерій. При макроскопічному дослідженні внутрішніх органів виявлено лише зростання кількості Пейєрових бляшок на 48 год. експерименту (табл. 3).

Дослідження мікробного складу випорожнень тварин, що були інокульовані *L. catenaformis* із наступним введенням їм суспензії *P. agglomerans* показали, що рівень лакто- та ентеробактерій, стрепто- та стафілококів у даної експериментальної групи був наближеним до їх вмісту у фекаліях тварин контрольної групи і лише кількість ентерококів суттєво підвищувався на 72 год. дослідження (табл. 4).

Таблиця 2

Антагоністична активність лактобацил і біфідобактерій стосовно штамів ентеробактерій

№	Умовно-патогенні бактерії, ізольовані з поверхні рослин	Протимікробна активність корисних мікроорганізмів (зони пригнічення росту, мм)			
		<i>L. catenaformis</i>	<i>L. delbrueckii</i>	<i>L. casei</i>	<i>B. dentium</i>
1	<i>Serratia odorifera</i>	15,3 ± 1,4	16,1 ± 1,2	16,1 ± 1,2	17,2 ± 1,6
2	<i>Pantoea agglomerans</i>	25,2 ± 2,4	16,7 ± 2,2	17,6 ± 3,4	16,2 ± 2,2
3	<i>Providencia rettgeri</i>	19,4 ± 2,1	19,2 ± 2,2	24,4 ± 2,2	25 ± 2,8



Рис. 1. Антагоністична активність лактобацил і біфідобактерій стосовно штаму ентеробактерій *P. Agglomerans*, визначена методом агарових блоків, де 1 – *L. casei*, 2 – *L. delbrueckii*, 3 – *L. catenaformis*, 4 – *B. dentium*.



Рис. 2. Антагоністична активність лактобацил і біфідобактерій стосовно штаму *P. Rettgeri*, визначена методом агарових блоків, де 1 – *L. catenaformis*, 2 – *L. delbrueckii*, 3 – *L. casei*, 4 – *B. dentium*.

Макроскопічні дослідження внутрішніх органів експериментальних тварин, інокульованих різними бактеріями

Бактерії	Час, год.	Результати макроскопічних досліджень
<i>L. casei</i> і через 24 год. <i>P. rettgeri</i>	48	Збільшення підщелепних лімфовузлів. Виразене здуття всіх відділів тонкого кишечника, збільшення розмірів і кількості Пейєрових бляшок. Посилений судинний малюнок кишечника. Некроз порожньої кишки.
	72	Збільшений (переповнений) жовчний міхур. Здуття товстого кишечника
<i>B. dentium</i> + <i>P. rettgeri</i>	48	Помірне збільшення Пейєрових бляшок
	72	Здуття всіх відділів тонкого і товстого кишечника
<i>L. catenaformis</i> і <i>P. agglomerans</i>	48	Збільшення кількості Пейєрових бляшок
	72	Патологічних змін не виявлено
Контрольна група		Патологічних змін внутрішніх органів не виявлено

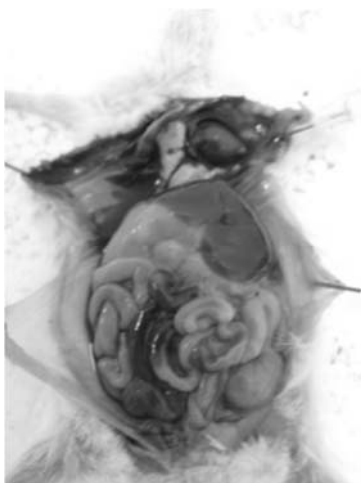


Рис. 3. Зміни внутрішніх органів мишей, інокульованих спочатку штамом *L. casei*, і через 24 год. штамом *P. rettgeri* на 48 год. експерименту (некротизація тонкого кишечника).

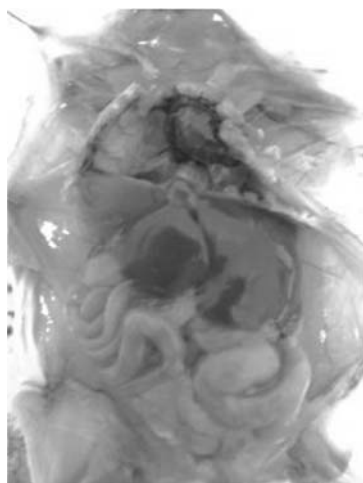


Рис. 4. Зміни внутрішніх органів мишей, інокульованих спочатку *L. casei*, і через 24 год. штамом *P. rettgeri* на 72 год. експерименту.

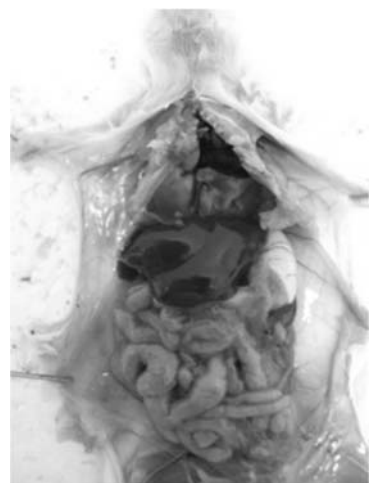


Рис. 5. Внутрішні органи контрольної групи мишей.

Таблиця 4

Зміни мікробного ценозу фекалій експериментальних тварин, що були орально інокульовані суспензією *L. catenaformis* і з наступним введенням *P. agglomerans*

Мікроорганізм	Кількість бактерій (КУО/г) на	
	48 год.	72 год.
<i>Lactobacillus</i> spp.	$1,4 \cdot 10^7$	$2 \cdot 10^8$
<i>Staphylococcus</i> spp.	$1 \cdot 10^7$	$1,9 \cdot 10^7$
<i>Streptococcus</i> spp.	$1 \cdot 10^8$	$1 \cdot 10^8$
<i>Enterococcus</i> spp.	0	$2 \cdot 10^6$
<i>Enterobacteriaceae</i>	$4 \cdot 10^8$	$4 \cdot 10^6$
<i>P. agglomerans</i>	0	0

Важливо, що *P. agglomerans* не було ізольовано зі зразків фекалій жодної з тварин даної групи.

Висновки. Контамінація рослинних продуктів умовно-патогенними бактеріями, переважно родини *Enterobacteriaceae*, є фактором високого ризику

виникнення захворювань. Поверхні традиційних їстівних рослин різних країн, в основному, характеризуються високим титром умовно-патогенних бактерій та низьким – корисних. Штами лактобактерій *L. catenaformis*, *L. casei* і *B. dentium*, що були

ізолювані з рослин, характеризуються вибірковою антагоністичною ефективністю *in vitro* та *in vivo* стосовно виділених із рослин штамів ентеробактерій *P. agglomerans*, *P. rettgeri*, але не *S. odorifera*.

Це доводить потенційну можливість конструювання на їх основі антимікробних препаратів і біологічних дезінфектантів, ефективних щодо збудників опортуністичних інфекцій.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Методы определения антибиотикопродуктивности и антибиотикорезистентности: методические указания к лабораторному практикуму / А. Н. Сизенцов. — Оренбург: ГОУ ОГУ, 2009. — 102 с.
2. Черногор Н. П. Антагоністична активність молочнокислих бактерій / Н. П. Черногор, В. Л. Большакова, А. І. Вінніков // Вісник Дніпропетровського університету: Біологія. Екологія. — 2006. — Вип. 14, Т. 2. — С. 187 — 191.
3. Cruz A. T. *Pantoea agglomerans* — a plant pathogen causing human disease / A. T. Cruz, A. C. Cazacu, C. H. Allen // Journal of Clinical Microbiology. — 2007. — Vol. 45, № 6. — P. 1989—1992.
4. Liberto M. C. Six cases of sepsis caused by *Pantoea agglomerans* in a teaching hospital / M. C. Liberto, G. Matera, R. Puccio, T. Lo Russo, E. Colosimo, E. Focà // New Microbiologica. — 2009. — № 32. — P. 119 — 123.
5. Lynch M. F. The growing burden of foodborne outbreaks due to contaminated fresh produce: risks and opportunities / M. F. Lynch, R. V. Tauxe, C. W. Hedberg // Epidemiology and Infection. — 2009. — № 137. — P. 307 — 315.
6. Mudryk M. R. Plant-isolated *Pantoea agglomerans* — new look in to potential pathogenicity / M. R. Mudryk // Microbiolohichniy zhurnal. — 2012. — Vol. 74, № 6. — p. 78-87.

M.R. MUDRYK, I.I. KUTCHAK, V.O. PETROV, V.V. BATI, N.V. MARKUSH, O.B. LEVCHUK, N.V. BOYKO

Uzhhorod National University, Medical Faculty, Department of Microbiology, Virology, Immunology with Courses of Infectious Diseases, Uzhhorod

PARTICULARITIES OF MICROBIAL SAFETY OF THE TRADITIONAL FOODS OF PLANT ORIGIN²

Results of microbial investigation of edible plants surfaces (vegetables, fruits, berries) which are traditionally consumed in the countries of the Black Sea region are presented in this paper. Variety of microbes, isolated from plant surface is characterized. The ability of some bacilli and bifidobacteria strains to inhibit *in vitro* and *in vivo* potentially pathogenic enterobacteria *Pantoea agglomerans* and *Providencia rettgeri* was shown. The data are useful in protection of human opportunistic infections.

Key words: potentially pathogenic enterobacteria, strains of lactobacilli and bifidobacteria, traditional edible plants, food safety, human opportunistic infections

Стаття надійшла до редакції: 12.11.2012 р.

² This work was funded under the EU FP7 Theme 2: “Food, agriculture, fisheries, and biotechnology”, Grant Agreement no: 227118.