

УДК 578.81

Науменко О.В., к.т.н., ст. науковий співробітник ©

E-mail: naumenkoo@list.ru

Інститут продовольчих ресурсів НААН, м.Київ, Україна

НАУКОВО-ПРАКТИЧНІ АСПЕКТИ ВИЯВЛЕННЯ ІНГІБУЮЧИХ РЕЧОВИН У МОЛОЧНІЙ СИРОВИНІ

Досліджено *in vitro* активність антибіотиків щодо промислових штамів *Lactococcus lactis ssp.*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus* та *Streptococcus thermophilus* з колекції відділу біотехнології ІПП. Встановлено їхнє природне походження, оскільки жоден з них не проявляв антибіотикорезистентність на рівні штамів з набутою стійкістю – значення мінімальної інгібуючої концентрації (МІК) було у межах 0,01-5,0 мг/кг. Показано, що більшість чутливих штамів належало до виду *S. thermophilus*. Запропоновано для аналізування впливу хімічних інгібіторів на лактобактерії визначати показник МІК₅₀ – концентрація інгібітора, за якої гине 50% клітин. Показник МІК₅₀ дає можливість оцінити ефективність використання тест-культур для визначення наявності інгібіторів у молочній сировині за їхнього вмісту менше мінімально інгібуючої концентрації.

Проведено спрямовану селекцію штамів лактобактерій за маркером чутливості до інгібуючих речовин та відібрано 5 індикаторних культур *S. thermophilus*. Встановлено межі чутливості відібраних тест-культур залежно від типу інгібіторного фактору. Опрацьовано мікробіологічний метод визначення інгібіторів у молочній сировині зі застосуванням нових тест-культур. Результати перевірки відібраних тест-культур у промислових умовах встановили їхню ефективність під час моніторингу молока-сировини на наявність хімічних інгібіторів.

Ключові слова: інгібуючі речовини, мінімальна інгібуюча концентрація, селекція, маркер, індикаторна культура, межа чутливості.

УДК 578.81

Науменко О.В., к.т.н., ст. научный сотрудник

Інститут продовольственных ресурсов НААН, г.Київ, Украина

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ВЫЯВЛЕНИЯ ИНГИБИРУЮЩИХ ВЕЩЕСТВ В МОЛОЧНОМ СЫРЬЕ

Исследованы *in vitro* активность антибиотиков по отношению к промышленным штаммам *Lactococcus lactis ssp.*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus* и *Streptococcus thermophilus* из коллекции отдела биотехнологии ИПП. Установлено их природное происхождение, поскольку ни один из них не проявлял антибиотикорезистентность на уровне штаммов с приобретенной устойчивостью - значения минимальной ингибирующей концентрации (МИК) было в пределах 0,01-5,0 мг/кг. Показано, что большинство чувствительных штаммов принадлежало к виду *S. thermophilus*. Предложено для анализа влияния химических ингибиторов на лактобактерии

определять показатель MIC_{50} - концентрация ингибитора, при которой погибает 50% клеток. Показатель MIC_{50} дает возможность оценить эффективность использования тест-культур для определения наличия ингибиторов в молочном сырье при их содержании меньше минимальной ингибирующей концентрации.

Проведена направленная селекция штаммов лактобактерий по маркеру чувствительности к ингибирующим веществам и отобрано 5 индикаторных культур *S. thermophilus*. Установлены границы чувствительности отобранных тест-культур в зависимости от типа ингибиторного фактора. Разработан микробиологический метод определения ингибиторов в молочном сырье с применением новых тест-культур. Результаты проверки отобранных тест-культур в промышленных условиях установили их эффективность во время мониторинга молочного сырья на наличие химических ингибиторов.

Ключевые слова: ингибирующие вещества, минимальная ингибирующая концентрация, селекция, маркер, индикаторная культура, предел чувствительности.

UDC 578.81

O. V. Naumenko, Ph. D., Senior Researcher

Institute of Food Resources of National Academy of Agrarian Sciences, Kiev, Ukraine

SCIENTIFIC AND PRACTICAL ASPECTS OF IDENTIFICATION OF INHIBITORY SUBSTANCES IN RAW MILK

*Antibiotics activity in relation to industrial strains of *Lactococcus lactis* ssp., *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus* and *Streptococcus thermophilus* from the collection of IFR biotechnology department was investigated in vitro. Their natural origin was established, because none of them showed antibiotic resistance on a level of strain acquired resistance - the value of the minimum inhibitory concentration (MIC) was in the range 0.01-5.0 mg/kg. It was shown that the most of sensitive strains belong to the species *S. thermophilus*. It was proposed for analysis of chemical inhibitors effect on lactic acid bacteria to determine MIC_{50} - the concentration of inhibitor at which 50% of the cells die. MIC_{50} indicator allows to estimate the effectiveness of use of test cultures to determine the presence of inhibitors in raw milk at concentrations less than the minimum inhibitory concentration.*

*Directed selection of strains by the marker of sensitivity to inhibitory substances was conducted and 5 indicator cultures *S. thermophilus* were selected. The sensitivity limits of the selected test cultures were established depending on the inhibitory factor type. A microbiological method for determining of inhibitors in raw milk using new test cultures was developed. Test results of selected test cultures in industrial conditions set their effectiveness during the monitoring of raw milk for the presence of chemical inhibitors.*

Keywords: *inhibiting substances, minimum inhibitory concentration, selection, marker, indicator culture, sensitivity limit.*

Для контролю інгібуючих речовин, зокрема залишків антибіотиків в молоці та молочних продуктах застосовують різні методи: мікробіологічні, ензиматичні, хроматографічні та інші [1]. Необхідно зауважити, що

мікробіологічні методи, що використовуються в багатьох країнах для визначення антибіотиків у молочних продуктах, вирізняються недостатньою стандартизованістю умов виконання, низькою відтворюваністю результатів, неоднаковою чутливістю та точністю. Деякі дослідники наводять загальний вміст різних антибіотиків, інші - вміст окремих антибіотиків [2-3].

У нашій країні на підприємствах молоко-сировину контролюють на вміст інгібуючих речовин згідно з чинним ГОСТ 23454. Метод цього стандарту, заснований на порівняльному визначенні дегідрогеназної активності чутливої до інгібіторів бактеріального росту тест-культури *S. thermophilus* за її розвитку у молоці, що досліджується, та стандартному зразку молока (який не містить інгібіторів). Проблеми цього методу визначення інгібуючих речовин на сьогодні є дуже актуальними. Це в першу чергу стосується обмеженого спектру та межі чутливості тест-культури, а також тривалості проведення аналізування. Водночас експрес-методи, що визначають наявність того чи іншого антибіотика впродовж лише 5-15 хв, тим не менше не можуть повністю замінити контроль інгібуючих речовин за їхньою сукупністю. Одним із раціональних шляхів вирішення цієї проблеми є створення простих стандартизованих методів аналізування, використання яких призведе до збільшення гарантії виявлення антибіотиків чи інших інгібіторів хімічної природи.

Метою роботи був відбір найчутливіших штамів лактобактерій до антибіотиків і залишків миюче-дезінфікуючих засобів для використання їх як тест-культур для визначення інгібуючих речовин у молочній сировині.

Матеріали та методи. Об'єктами досліджень були зразки молока-сировини, пастеризованого молока, штами молочнокислих бактерій з колекції ППР. Визначення інгібуючих речовин у молочній сировині проводили згідно з ГОСТ 23454-79 з індикатором метиленовим синім. Чутливість штамів до антибіотиків визначали за методом паперових дисків. Для дослідження було взято антибіотики виробництва г. Санкт-Петербург, НИЦФ, ТУ 9398-001-39484474-2000. При визначенні чутливості культур до антибіотиків добуву культуру бактерій, вирощену на відповідному поживному середовищі: гідролізованому молоці - для лактобактерій, середовищі МРС - для лактобацил, розводили стерильним фізіологічним розчином до густини 1,0 за стандартом мутності Мак-Ферлана. Посівний матеріал у кількості 0,2 см³ вносили у чашки Петрі з агаризованим середовищем, аналогічним середовищу вирощування, поверхневим методом. Чашки з культурою молочнокислих бактерій та індикаторними дисками культивували за температури 30 °С і 37 °С упродовж 24 год, вимірювали діаметр зони затримки росту у мм. Мінімальну інгібуючу концентрацію (МІК) антибіотиків, формаліну, перекису водню визначали за найменшою їхньою кількістю, що повністю затримувала ріст мікроорганізму в агаризованому поживному середовищі [4].

Результати дослідження. Наразі відомо, що стійкість мікроорганізмів до антибіотиків передається спадково, а значить, залежить від генотипу та стабільності штаму. Різні види та штами мікроорганізмів вирізняються один від одного за цією властивістю, що необхідно враховувати під час пошуку чутливих культур. Окрім того необхідно враховувати механізм виникнення

резистентності – природний чи набутий, інколи за рахунок генно-інженерного втручання. Наразі спостерігається збільшення нижньої межі антибіотикостійкості штамів лактобактерій, навіть щойновиділених із природної екології - самоквасних молочних продуктів. Оскільки мікрофлора останніх також змінюється через широке використання антибіотиків виробниками молока, у тому числі і приватними. Це призводить до виникнення адаптаційних змін та природної селекції штамів лактобактерій, стійких до таких концентрацій антибіотиків, які раніше інгібували їхній розвиток [5].

З цієї точки зору було цікавим дослідити відношення до антибіотиків різних видів лактобактерій з колекції відділу біотехнології, для того щоб визначити вид - перспективний для селекції антибіотикочутливих штамів. Результати скринінгових досліджень з визначення МІК шести антибіотиків представлено у таблиці 1.

Таблиця 1

Активність антибіотиків щодо промислових штамів молочнокислих бактерій *in vitro*

| Антибіотик | Мінімальна інгібуюча концентрація антибіотика, мкг/см ³ | | | |
|-----------------|--|---------------------------------|-----------------------------|----------------------------------|
| | <i>Lv. casei</i> (n=7) | <i>Lv. acidophilus</i> (n=6) | <i>Lc. lactis</i> (n=11) | <i>S. thermophilus</i> (n=23) |
| Ампіцилін | 0,10-0,50 | 0,01-0,50 | 0,02-0,20 | 0,01-0,02 |
| Бензилпеніцилін | 0,10-1,00 | 0,01-0,50 | 0,02-0,50 | 0,02-0,50 |
| Еритроміцин | 0,10-0,15 | 0,05-0,10 | 0,10-0,50 | 0,05-0,10 |
| Тетрациклін | 1,0-2,0 | 0,50-2,50 | 0,50-1,5 | 0,20-0,50 |
| Хлорамфенікол | 1,0-5,0 | 0,10-2,50 | 0,20-0,50 | 0,50-1,00 |
| Стрептоміцин | 1,0-4,5 | 0,5-1,0 | 0,10-1,00 | 0,5-1,0 |

Як свідчать результати проведеної роботи, найменше значення показника МІК встановлено для ампіциліну та бензилпеніциліну - 0,01-1,00 мкг/см³, залежно від досліджуваного штаму (це у 10-100 разів більше за норми залишкової кількості антибіотиків у молоці незбираному згідно з Постановами ЄС № 470/2009 та № 37/2010). Найвищі рівні МІК було отримано для хлорамфеніколу (до 5 мкг/см³), що майже у 1000 разів більше за допустимий рівень у сирому молоці. Слід звернути увагу на високі порогові концентрації антибіотиків, які спричиняли бактеріостатичну дію на мезофільні бактерії видів *Lc. lactis* та *Lv. casei*. Порівняння значень МІК для промислових штамів заквашувальних культур з літературними [6] показало, що жоден із досліджених штамів з колекції ІПР не проявляв антибіотикорезистентність на рівні штамів з набутою резистентністю. Це свідчить, в першу чергу, про їхнє природне походження. Водночас, слід зауважити, що деякі біотехнологи пропонують виробникам ферментованих молочних продуктів високорезистентні до антибіотиків штами лакто-, біфідобактерій, замовчуючи механізм виникнення цієї стійкості [5].

Якщо порівнювати види бактерій (взяті нами до вибірки), то з числа *S. thermophilus* було більше чутливих штамів щодо половини досліджених

антибіотиків порівняно з іншими видами бактерій. Тому наступний пошук антибіотикочутливих штамів проводили саме з числа бактерій виду *S. thermophilus*. У результаті застосування двох критеріїв селекційного відбору: антибіотикочутливості та високої молокозброджувальної активності було відібрано 5 штамів *S. thermophilus*. Проведено 3 цикли селекції методом ступінчатого відбору зі застосуванням обраних критеріїв та відібрано бактеріальні ізоляти, що характеризувались популяційною стабільністю (k_v = менше 10%) та були чутливими до всіх використаних антибіотиків, діаметр зони затримки росту $d > 25$ мм.

Додатково перевіряли відношення культур до залишків активних компонентів миюче-дезінфікуючих розчинів, а саме, перекису водню та формаліну методом глибинного посіву у агаризоване поживне середовище, яке містило спадаючі концентрації хімічних інгібіторів.

Межу чутливості культур визначали за МІК інгібітора, що затримувала ріст мікроорганізму порівняно з ростом культури без додавання інгібіторів. При цьому враховували 2 показники: МІК₅₀ – концентрація інгібітора, за якого гинуло 50% клітин та МІК₉₀ – концентрація інгібітора, за якого гинуло 90% клітин в популяції. МІК₅₀ означає, що половина клітин бактеріальної культури буде чутливою до цієї концентрації інгібітора, тому загальний ріст культури буде відрізнятися від контролю (ріст культури без антибіотика буде швидкішим). Як бачимо значення МІК₅₀ у 5-10 разів менші за МІК₉₀ залежно від антибіотика (табл. 2). Отримані данні свідчать про високу чутливість відібраних штамів *S. thermophilus* до досліджених антибіотиків (див. табл.2).

Таблиця 2

Значення межі антибіотикочутливості штамів *S. thermophilus*

| Антимікробний агент | Діапазон, (мкг/см ³) | МІК (мкг/см ³) | |
|---------------------|----------------------------------|----------------------------|-------|
| | | 50% | 90% |
| хлорамфенікол | 0,0001-2,5 | 0,01 | 0,1 |
| бензилпеніцилін | 0,0001-1,0 | 0,001 | 0,005 |
| тетрациклін | 0,001-2,0 | 0,01 | 0,1 |
| стрептоміцин | 0,001-5,0 | 0,1 | 0,5 |
| ампіцилін | 0,01-5,0 | 0,1 | 0,5 |

Крім того, визначення МІК₅₀ дає можливість оцінити перспективність використання відібраних культур для визначення наявності антибіотиків у молочній сировині за їхнього вмісту менше мінімально інгібуючої концентрації.

У результаті проведених досліджень створено колекцію індикаторних культур для визначення інгібіторів в молочній сировині. Відібрані тест-культури підвищили чутливість мікробіологічного методу визначання хімічних інгібіторів у молочній сировині згідно ГОСТ 23454, а саме: пеніциліна – в 10 разів; тетрацикліну та стрептоміцину – у 100 разів, вміст формаліну та перекису водню – у 10 разів. Окрім того, відібрані індикаторні культури дозволяють визначати залишковий вміст хлорамфеніколу та ампіциліну, хоча цих антибіотиків в ГОСТі 23454 не має.

Ефективність селекціонованих індикаторних культур було перевірено та підтверджено у промислових умовах, а саме: ПП Науково-виробничий фірмі «Лактіум», м. Київ; ЗАТ «Кагма» м. Кагарлик; ПГО «Асоціація підтримки вітчизняного товаровиробника» «ФІРМА-ЛАСКА», м. Кіровоград.

Висновки. Науково обґрунтовано та створено тест-систему для визначання інгібіторів росту лактобактерій. Проведено спрямовану селекцію штамів лактобактерій за маркером чутливості до інгібіторних речовин та відібрано 5 індикаторних культур *S. thermophilus*.

Перспективи подальших досліджень. Мікробіологічний метод згідно ГОСТу 23454 є арбітражним, чинним в Україні, і тому заслуговує на увагу. Оптимізація методу полягає у подальшому розширенні спектру та межі чутливості тест-культур, широке впровадження яких у промисловість дозволить об'єктивно оцінювати якість та безпечність молочної сировини.

Література

1. Семко К. Р. Системи забезпечення якісного визначення антибіотиків та інших речовин у молоці при лабораторних дослідженнях / К.Р. Семко, О.О. Салганська ; УААН, ІВМ, ДНКІБШМ // Ветеринарна біотехнологія : бюлетень. – К. : Дорадо, 2008. – № 13 (том 1) : Матеріали міжнар. наук.-практ. конф. "Сучасні проблеми біотехнології, стандартизації та забезпечення контролю якості ветеринарних препаратів, кормів та кормових добавок", присвяч. 10-річчю Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів. – С. 353-357.

2. Кальницкая О.И. Чувствительность микробиологической тест-системы «Дельвотест» к антибиотикам, обнаруживаемым в молоке // Молочная промышленность. – 2010, №10. – С.31-32.

3. Хромых И. Современные методики определения антибиотиков в молоке // Молочная промышленность. – 2010, № 3.- С.40.

4. Salomskiene J. Microbiological processes in the manufacture of rennet cheese and methods for their control. – Kaunas: KUT, 1997. – 46 p.

5. Артюхова С.И., Жидкова О.Н. Устойчивость к антибиотикам микроорганизмов закваски для сметанного продукта // Молочная промышленность. – 2009, №8. – С.24.

6. Mathur S., Singh R. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria—a review // International Journal of Food Microbiology. – 2005, № 105. – P.281-295.

Рецензент – д.с.-г.н., професор Цісарик О.Й.