

УДК: 636.09:637.12:579.864

Н. А. ПУСТОВІТ, аспірант

Л. М. ВИГОВСЬКА, кандидат ветеринарних наук

Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів, м. Київ

ВИВЧЕННЯ БІОЛОГІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ БАКТЕРІЙ РОДУ LACTOBACILLUS

У виробництві молочнокислих продуктів використовують різні види молочнокислих бактерій і дріжджів: молочнокислі стрептококи (*Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris*, *Streptococcus diacetylactis*, *Streptococcus acetoinicus*, *Streptococcus thermophiles*, *Leuconostoc cremoris*, *Leuconostoc lactis* і *Leuconostoc dextranicum*), болгарську паличку (*Lactobacillus bulgaricus*), ацидофільну паличку (*Lactobacillus acidophilus*), ароматоутворюючі бактерії, молочні дріжджі (*Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, аспорогенні *Torulopsis*, *Candida*, *Mycoderma*). Деякі молочнокислі бактерії виділяють ферменти, які частково розщеплюють білки на прості сполуки, що сприяє кращому засвоєнню продуктів. У статті наведені результати порівняльних досліджень біологічних властивостей (культурально-морфологічних, біохімічних, антибіотикорезистентності) виробничої культури роду *Lactobacillus plantarum* (BP) та культур, виділених із молока здорових корів.

Ключові слова: біологічні властивості, мікрофлора, молоко, нормофлора молока, антибіотикорезистентність.

Молоко є одним із найцінніших продуктів харчування кожної людини. По харчовій цінності воно може замінити будь-який продукт харчування, але не один продукт не може замінити молока. З найдавніших часів його використовували в лікувальних цілях і використовують по сьогоднішній час. «Источником здоровья», «Белой кровью» його називали філософи, так як воно являється фільтратом крові [1].

Молоко являє собою оптимальне поживне середовище для розвитку різноманітної мікрофлори, яка може вноситись із заквасками та попадати в нього із зовнішнього середовища [2].

Молоко різних тварин відрізняється по своєму складу, але в цілому воно містить білки – 33 г/л, жири – 35 г/л, вуглеводи – 47 г/л, незамінні амінокислоти, вітаміни (до 30 видів) і мінеральні речовини (макро- і мікроелементи). В натуральному молоці завжди присутні мікроорганізми, так як вим'я – відкритий орган [3].

Продукти, отримані з молока внаслідок молочнокислого бродіння (інколи за участі спиртового бродіння), називаються кисломолочними. Здавна вважалося, що кисломолочні продукти оздоровлюють організм, тому різні види кислого молока широко вживалися в їжу. Значно пізніше були науково обґрунтовані дієтичні і

лікувальні властивості цих продуктів. Вперше це було зроблено російським фізіологом і мікробіологом І. І. Мечниковим [4].

Частина молочнокислих бактерій виділяє антибіотики (низин, стрептоміцин та ін), які пригнічують збудники тифу, туберкульозу та інших хвороб. Тому кисломолочні продукти можуть бути використані при лікуванні туберкульозу, захворювань шлунково-кишкового тракту, недокрів'я і інших хвороб. Дієтичні властивості кисломолочних продуктів пояснюються позитивним впливом на організм людини мікроорганізмів і речовин, що утворюються при скисанні молока (молочної кислоти, спирту, вуглекислого газу, антибіотиків і вітамінів).

В останні роки перевагу віддають контролю за чутливістю культур до антибіотиків. Висока вибіркова біологічна активність в відношенні до хвороботворних мікробів дозволила використовувати їх для знищення збудників захворювань, чи хоча б пригнічення їх життєдіяльності і подальшого вивчення антагоністичних властивостей культур [4].

Метою досліджень була порівняльна оцінка біологічних властивостей виробничого штаму роду *Lactobacillus plantarum* (BP) та культур виділених із молока здорових корів.

Матеріали і методи. Матеріалом для дослідження були три польові ізоляти роду *Lactobacillus* та виробничий штам *Lactobacillus plantarum* (BP) із колекції Національного центру штамів мікроорганізмів (НЦШМ) Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів (ДНКІБШМ). Морфологічні властивості виділених культур з молока вивчали шляхом виготовлення мазків з добових бульйонних культур та фарбуванням їх за Грамом. Мікроскопія проводилась при збільшенні 100 під емульсією [5].

Концентрацію мікробних клітин визначали методом серійних розведень культур.

З метою вивчення культуральних властивостей культури культивували на рідкому і щільному середовищі МРС «Німедіа» впродовж 24 год за температури 37°C.

Для вивчення ферментативних властивостей досліджуваних культур проводили висіви уколом у стовпчик напіврідких живильних середовищ Гісса з цукрами [6, 7]; культивували 24 год за температури 37°C.

Антибіотикорезистентність визначали стандартним дискофузіальним методом. У роботі використовували комерційні диски з антибактеріальними препаратами виробництва «НИЦФ» Санкт-Петербург.

Результати досліджень. Через 24 год після висіву та культивування ліофільно-висушених культур ПН01, ПН02, ПН04, та виробничого штаму *L. plantarum* (BP) на рідке поживне середовище МРС «Німедіа» спостерігали ріст у вигляді помутніння середовища та осаду на дні пробірки, який при струшуванні легко розбивається, що характерно для роду *Lactobacillus* (таблиця 1).

В мазках, виготовлених з добової бульйонної культури і пофарбованих за Грамом, спостерігали однорідні грампозитивні палички правильної форми розміщені поодинокі або скупченнями, розміром 1,5-2 мкм (рисунок 1).

Таблиця 1

Результати культивування дослідних культур на рідкому середовищі МРС

Культури	Концентрація мікробних клітин, КУО/см ³	Контроль
ПН01	$1,5 \times 10^9$	0
ПН02	$1,5 \times 10^9$	0
ПН04	$1,5 \times 10^9$	0
<i>L. plantarum</i> (BP)	2×10^9	0



Рис. 1. Gr⁺ палички під мікроскопом, збільшення 100 під емульсією

На щільному поживному середовищі МРС «Німедіа» після 24 год інкубації за температури 37°C спостерігались окремі однорідні колонії, S-форми, округлі, випуклі з рівними краями, молочно-білого кольору.

Результати вивчення біохімічних властивостей культур на середовищах Гісса показані в таблиці 2. Виділені ізоляти ПН01, ПН02, ПН04 ферментували з утворенням кислоти без газу глюкозу та лактозу. Виробнича культура *L. plantarum* (BP) ферментувала з утворенням кислоти без газу глюкозу, лактозу, сахарозу та мальтозу. Ці результати свідчать про видову і родову приналежність культур до роду *Lactobacillus* згідно з визначником Берджі.

Антибіотикорезистентність визначали за діаметром інгібіції росту культури навколо дисків з антибіотиками до інгібіторів синтезу клітинної стінки (пеніциліни, цефалоспорини), інгібіторів синтезу білка (аміноглікозиди, тетрацикліни, левоміцетин, макроліти, лінкозаміди), інгібітори станскрипції і синтезу нуклеїнових кислот (фторхіноли, рифампіцин), нітрофуранів, азолів, які діють на цитоплазматичну мембрану бактеріальної клітини.

Біохімічні властивості досліджуваних культур

Цукри Гісса	Досліджувані культури			
	ПН01	ПН02	ПН04	<i>L. plantarum</i>
Глюкоза	++++	++++	++++	++++
Лактоза	++++	++++	++++	++++
Сахароза	-	-	-	++++
Мальтоза	-	-	-	++++
Арабіноза	-	-	-	-
Дульцит	-	-	-	-
Сорбіт	-	-	-	-
Манноза	-	-	-	-
Інозит	-	-	-	-
Ксилоза	-	-	-	-
Маніт	-	-	-	-
Рамноза	-	-	-	-

++++ - ферментації 100 %

- - відсутність ферментації

Ізолят ПН01 виявився малочутливим до клотримазолу (14 мм), чутливим до меропенему (22 мм, але наявні резистентні колонії), цефаклору (20 мм, наявні резистентні колонії) (рисунк 2).

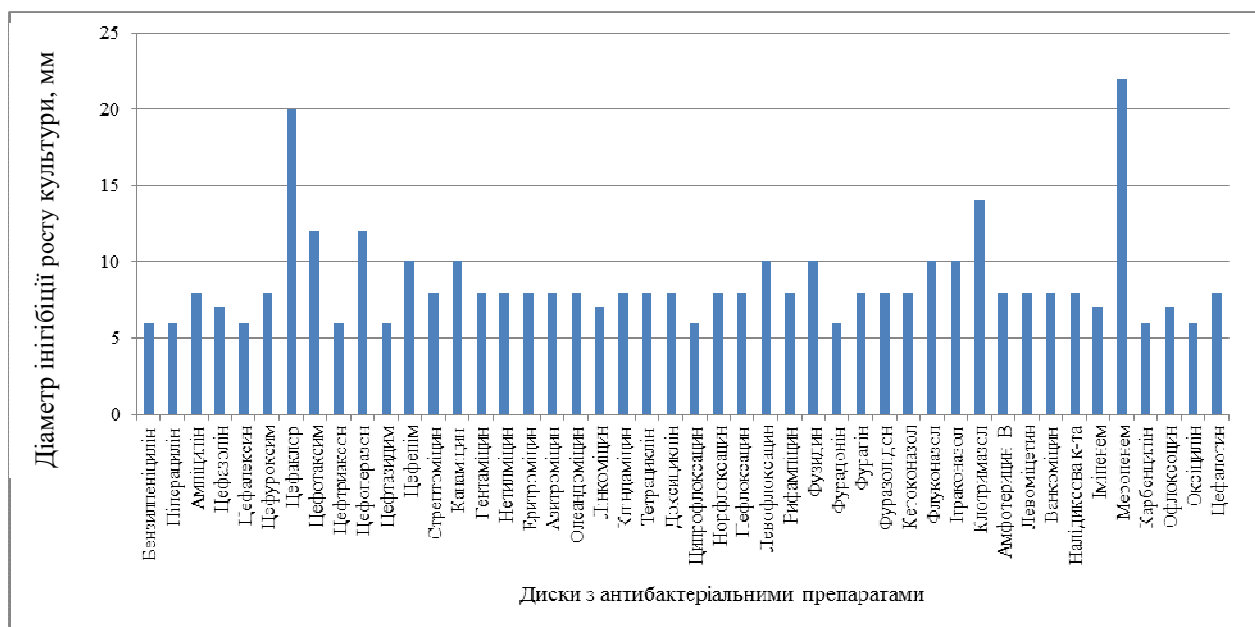


Рис. 2. Чутливість до антибактеріальних препаратів ізолята ПН01

Ізолят ПН02 проявляв чутливість до лінкоміцину (22 мм, наявні поодинокі резистентні колонії) (рисунк 3).

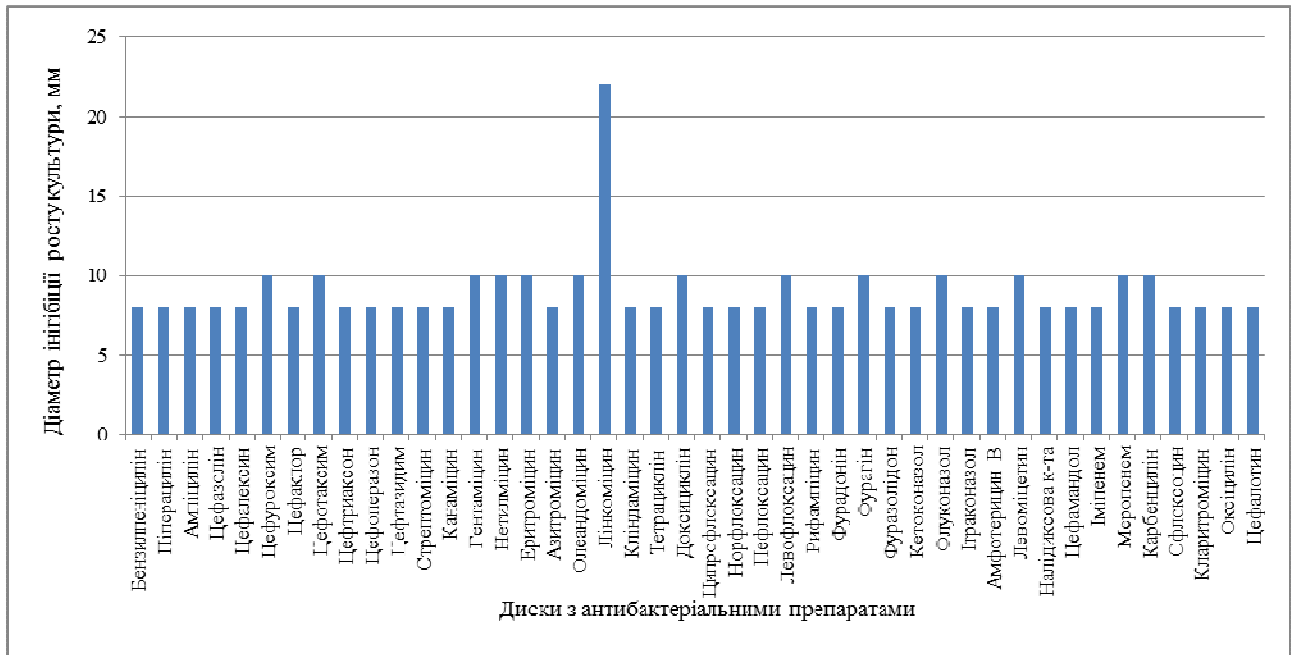


Рис. 3. Чутливість до антибактеріальних препаратів ізолята ПН02

Ізолят ПН04 виявився чутливим до левофлоксацину (16 мм), імпіненему (16 мм), малочутливим до ванкоміцину (14 мм) (рисунок 4).

Виробничий штам *L. plantarum* (BP) виявився високочутливим до цефотоксиму (30 мм); чутливим до лінкоміцину (18 мм), цефоперазону (24 мм), ципрофлоксацину (18 мм), цефаклору (16 мм), доксицикліну (22 мм), гентаміцину (22 мм), фурагіну (20 мм), левоміцетину (16 мм), нетилміцину (18 мм), олеандоміцину (16 мм), імпіненему (16 мм), малочутливим до цефазоліну (14 мм), цефалотину (14 мм) (рисунок 5).

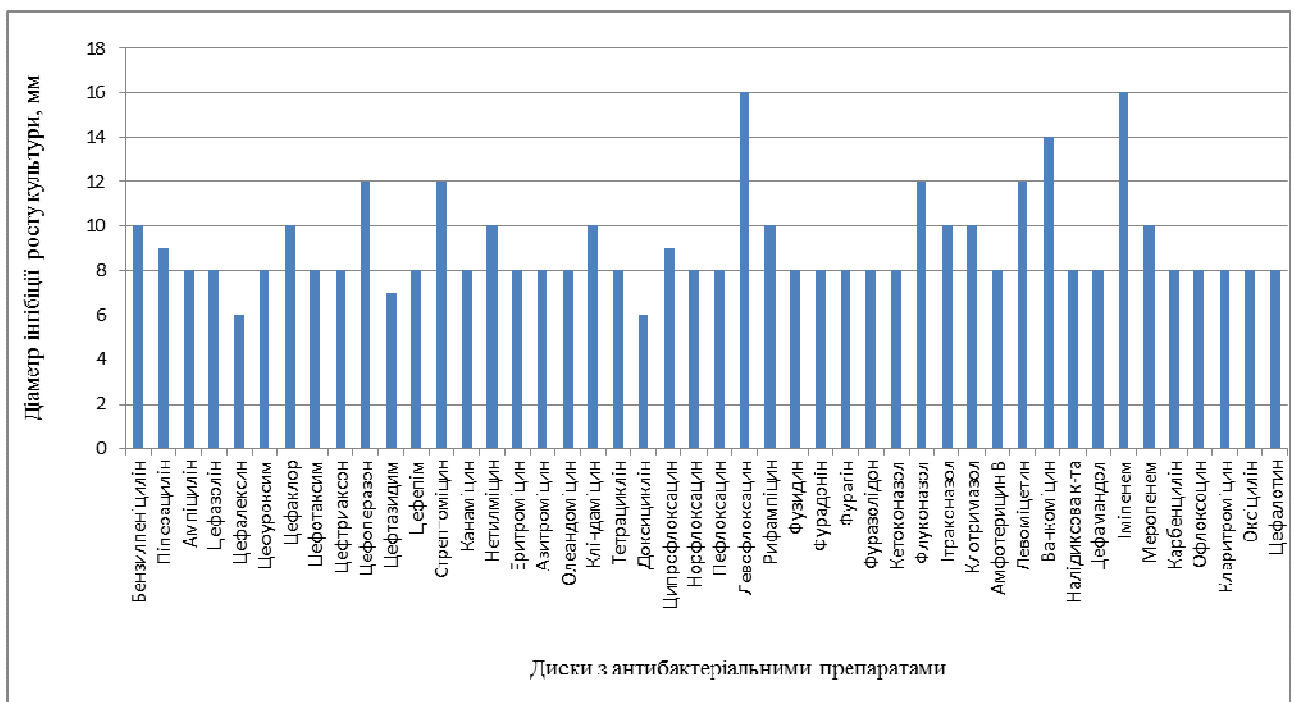


Рис. 4. Чутливість до антибактеріальних препаратів ізолята ПН04

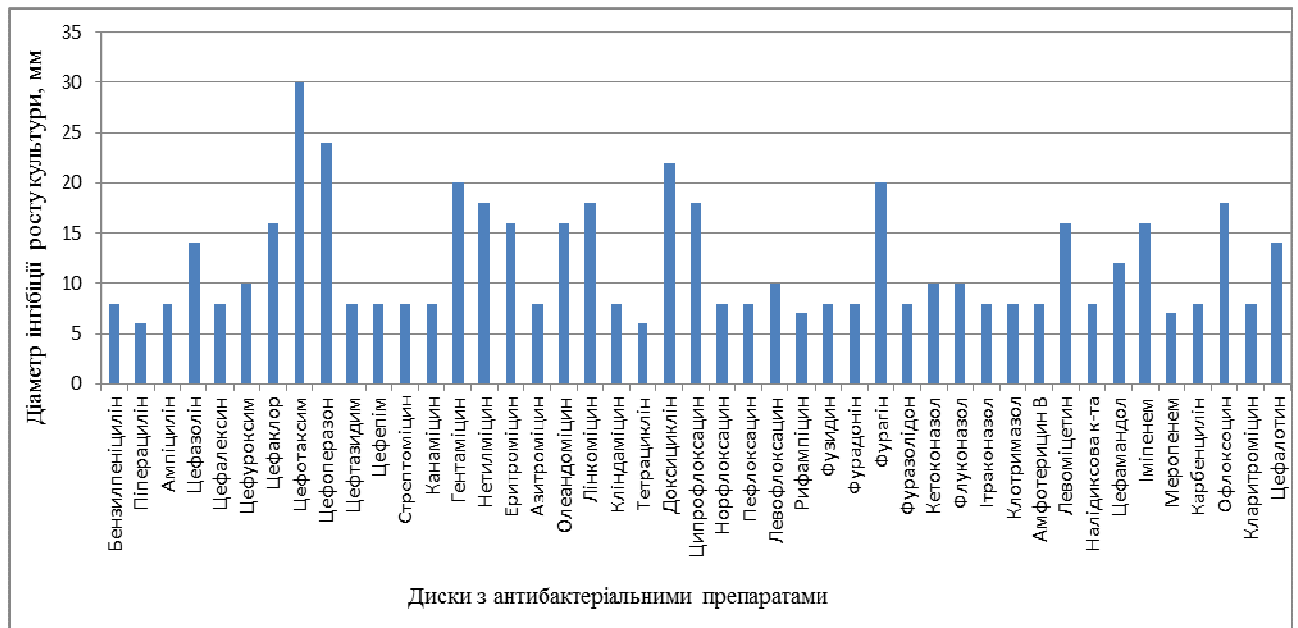


Рис. 5. Чутливість до антибактеріальних препаратів виробничої культури *L. plantarum* (BP)

Вважаємо, що виділені нами ізоляти є доволі перспективними в плані виробництва пробіотичних препаратів, так як, враховуючи їх стійкість до дії майже всіх відомих груп антибіотиків, їх можливо застосовувати при проведенні антибіотикотерапії, як тварин так і людини. Тобто, застосовувати в схемах лікування цілого ряду захворювання тварин, при яких призначають антибіотики.

Висновки та перспективи подальших досліджень.

1. За результатами проведених досліджень морфологічні властивості дослідних культур відповідають видовим ознакам роду *Lactobacillus*.

2. Біохімічні властивості дослідних культур притаманні представникам роду *Lactobacillus*.

3. Відмічалась резистентність у досліджених культур до азолів, цефалоспоринів, макролідів, фторхінолів, тетрациклінів, аміноглікозидів, нітрофуранів.

4. Вважаємо перспективним подальше вивчення біологічних властивостей досліджених культур в плані визначення антагоністичних, адгезивних та кислотоутворюючих властивостей.

Список використаної літератури:

8. Еремина И.А. Микробиология молока и молочных продуктов: Учебное пособие. – Кемерово, 2004. – С. 3.

9. Специфическая и неспецифическая микрофлора молока. - [Електронний ресурс - <http://bifidum.blogspot.com/>].

10. Биргер М. О. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования / Под. ред. М. О. Биргер. – 3 изд., перер. и доп. – М.: Медицина, 1982. – С. 172-181.

11. Литвина Л. А. Микробиология молока: учеб.-метод. пособие / Новосиб. гос. аграр. ун-т. Биол.-технол. фак.; сост.: Л.А. Литвина, В.Г. Горских, И. Ю. Анфилофьева. – Новосибирск: Изд-во НГАУ, 2012. – С. 3 - 15.

12. Герхарда Ф. Методы общей бактериологии Том 1 / Под ред. Ф. Герхарда и др; пер. с англ. – М.: Мир, 1983. – С. 60.
13. Градов Н.Б. и др. Лабораторный практикум по общей микробиологии. – М.: ДеЛипринт, 2001.- С.121-122.
14. Определитель бактерий Берджи. В 2-х т. Т.2: Пер. с англ. / Под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита, Дж. Стейли, С. Уильямса. – М.: Мир, 1997. – С. 574

ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БАКТЕРИЙ РОДА ЛАКТОБАЦИЛЛУС / Н. А. Пустовит, Л. Н. Выговская

*В производстве молочнокислых продуктов применяют различные виды молочнокислых бактерий и дрожжей: молочнокислые стрептококки (*Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris*, *Streptococcus diacetylactis*, *Streptococcus acetoinicus*, *Streptococcus thermophiles*, *Leuconostoc cremoris*, *Leuconostoc lactis* и *Leuconostoc dextranicum*), болгарскую палочку (*Lactobacillus bulgaricus*), ацидофильную палочку (*Lactobacillus acidophilus*), ароматобразующих бактерии, молочные дрожжи (*Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, аспорогенные *Torulopsis*, *Candida*, *Mycoderma*). Некоторые молочнокислые бактерии выделяют ферменты, которые частично расщепляют белки на простые соединения, что способствует лучшему усвоению продуктов. В статье приведены результаты сравнительных исследований биологических свойств (культурально-морфологических, биохимических, антибиотикорезистентности) производственной культуры рода *Lactobacillus plantarum* (BP) и культур выделенных из молока здоровых коров.*

Ключевые слова: биологические свойства, микрофлора, молоко, нормофлора молока, антибиотикорезистентность.

STUDY OF BIOLOGICAL PROPERTIES BACTERIA OF ЛАКТОБАЦИЛЛУС / N. A. Pustovit, L. M. Vygovska

*In the production of lactic acid products using various types of yeast and lactic acid bacteria: lactic streptococci (*Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris*, *Streptococcus diacetylactis*, *Streptococcus acetoinicus*, *Streptococcus thermophiles*, *Leuconostoc cremoris*, *Leuconostoc lactis* *Leuconostoc dextranicum*), bulgarian bacillus (*Lactobacillus bulgaricus*), bacillus acidophilus (*Lactobacillus acidophilus*), aromatoutvoryuyuchi bacteria, yeast milk (*Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Torulopsis*, *Candida*, *Mycoderma*). Some lactic acid bacteria secrete enzymes that partially digested proteins into simple compounds, which promotes better digestion products. The results of comparative studies of biological properties (cultural,*

morphological, biochemical, antibiotic resistance) production culture genus Lactobacillus plantarum (BP) and cultures isolated from milk of healthy cows.

Keywords: biological properties, microflora, milk, milk of normal flora, antimicrobial resistance.

Рецензент – доктор ветеринарних наук, член-кореспондент НААН України,
Ушкалов В. О.

Рукопис надійшов 23. 07. 2013р.