

Введение Неуклонный научно-практический интерес к изучению молочнокислых бактерий обусловлен теми эффектами, которые они оказывают на организм человека, а также способностями клеток и их метаболитов оказывать иммуномодулирующее, регулирующее, антагонистическое и ряд других положительных действий [1]. Полезное действие молочнокислых микроорганизмов объясняется их способностью образовывать и экскретировать биологически активные вещества и за счет этого оказывать бактерицидное и бактериостатическое действие на нежелательную микрофлору.

Антагонистическая активность микроорганизмов обусловлена действием неспецифических и специфических факторов. К неспецифическим относятся: образование молочной, уксусной и других кислот; создание низкого окислительно-восстановительного потенциала за счет утилизации кислорода; конкуренция за питательные вещества. Специфическими факторами являются: образование антибиотиков полипептидной или не идентифицированной природы, бактериоцинов, жирных кислот с короткой цепью [2]. Высокая биологическая и функциональная активность данной группы микроорганизмов [3] определяет их практическое применение в качестве пробиотиков для коррекции дисбаланса резидентной микрофлоры, а также в производстве продуктов функционального питания в различных отраслях пищевой промышленности. Коллективом авторов ведутся исследования по изучению влияния молочнокислой экзогенной ферментации на свойства говяжьих субпродуктов второй категории. Полученные ранее положительные результаты с точки зрения высоких функционально-технологических и изменений микроструктурных свойств ферментированного сырья [4-6] свидетельствуют о перспективности проведения дальнейших исследований. Субпродукты второй категории характеризуются высокой степенью обсемененности нежелательной микрофлорой, в связи с чем представлял особый интерес механизм действия исследуемых бактериальных заквасок на представителей патогенной и условно патогенной микрофлоры. Цель данного исследования заключается в сравнительной оценке антагонистической активности ряда промышленных бактериальных препаратов, используемых авторами в качестве агента биотехнологической модификации мясного сырья, в отношении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов. Экспериментальная часть Объектом исследования служили лиофильно высушенные молочнокислые закваски, используемые в качестве стартовых культур в технологическом процессе производства сыровяленых и сырокопченых колбас, а также лиофилизированный медицинский препарат Лактобактерин: 1) CHR Hansen Safe Pro B-LL-20 (содержат в составе *Pediococcus acidilactici*); 2) CHR Bactoferm F-SC-111 (*Staphylococcus carnosus*; *Lactobacillus sakei*); 3) Schaller Старт Стар (*Lactobacillus curvatus*, *Pediococcus pentosaceus*, *Staphylococcus carnosus*); 4) Danisco Texel DCM-1 (*Staphylococcus carnosus*, *Staphylococcus xylosus*). 5) Лактобактерин (заявленный

состав: *Lactobacillus plantarum* 8P-A3, или *L. plantarum* 38, или *L. fermentum* 90T-C4 или *L. fermentum* 39). Все описанные закваски предварительно ресуспендировали и поддерживали на питательной среде Мана - Рогоза - Шарпа (МРС). В качестве тест-культур в работе использовались условно-патогенные и патогенные микроорганизмы, предоставленные ФБУН «Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии»

Роспотребнадзора РФ: *Serratia marcescens* chas 26, *Escherichia coli* L1, *Klebsiella* L1, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* 88B-K, *Bacillus cereus*, *Salmonella*. Патогенные микроорганизмы культивировались в аэробных условиях на мясо-пептонном бульоне (МПБ). Оценку показателя антагонистической активности проводили двумя методами *in vitro*:

диффузионным методом (модификация блоков), и методом тестирования в жидких питательных средах [7]. При диффузионном методе блоков исследуемые молочнокислые закваски высевали в чашки Петри глубинным способом в агаризованную среду МРС и инкубировали при температуре 30°C в течение 24 ч для образования и накопления в агаре ингибиторных соединений. Затем стерильным пробочным сверлом вырезали агаровый блок с выросшей культурой молочнокислых заквасок и устанавливали его в другой чашке Петри на поверхности агаровой среды, засеянной сплошной культурой тест-штамма.

Чашку выдерживали в течение 1 часа в холодильнике для диффузии ингибиторных соединений из блока в толщу агара и предотвращения преждевременного роста тест-культуры. Дальнейшее инкубирование проводили при температуре 37°C в течение 24 ч. О степени антагонистической активности испытуемых молочнокислых заквасок судили по величине зоны ингибирования роста тест-культуры вокруг агарового блока [7]. При суспензионном методе исследования все бактериальные закваски культивировали в 3 мл жидкой среды МРС при температуре 37°C в течение 24 ч. Выросшие культуры обрабатывали хлороформом (0,1 мл на пробу) в течение 40 мин. Супернатант отделяли от клеток центрифугированием 15 мин при 3000 g. Полученные супернатанты исследуемых молочнокислых заквасок вносили в пробирки в количестве 0,4 мл к 0,1 мл взвесей суточных культур микроорганизмов с их содержанием 10⁹ кл/мл. В качестве контроля использовали взвесь патогенных микроорганизмов (0,1 мл) со средой МРС (0,4 мл), предварительно обработанной хлороформом. Опытные и контрольные пробы инкубировали в течение 1 ч при 37°C. После инкубирования в каждую пробу добавляют по 2,5 мл МПБ и инкубировали при температуре 37°C в течение 24 ч. Оптические плотности выросших культур опытных и контрольных образцов измеряли при длине волны 540 нм на спектрофотометре (толщина кюветы 10 мм). О степени антагонистической активности испытуемых молочнокислых заквасок судили по изменению плотности культуры патогенных микроорганизмов в опытных пробах по сравнению с контрольными.

Математическую обработку данных проводили в стандартной компьютерной

программе “ Excel 7.0.”. В работе все эксперименты были проведены не менее чем в трех повторностях. Группу данных считали однородной, если среднеквадратическое отклонение σ в ней не превышало 13%. Различие между группами считали достоверным при критерии вероятности $P0.05$. Результаты и их обсуждение

Максимальное накопление биологически активных веществ (ферментов, антибиотических веществ, бактериоцинов) происходит в конце экспоненциальной фазы роста [2]. Для выявления данной фазы были построены кривые роста бактериальных препаратов на жидкой накопительной среде МРС (рис. 1). Рис. 1 - Динамика роста бактериальных заквасок на селективной среде МРС

Как видно из рис.1, при культивировании исследованных заквасок экспоненциальные фазы роста находятся в промежутке времени с 4 до 31 ч. Поэтому для исследования использовались активизированные культуры, находящиеся в экспоненциальной фазе роста, т.е. после 24 ч инкубирования. Результаты по определению показателя антагонистической активности диффузионным методом представлены в табл. 1 и на рис. 2, 3. Таблица 1 - Зона подавления роста тест-культур № закваски

Закваска	Диаметр зоны подавления роста тест-культур, см
<i>Klebsiella</i> L1	3.0 ± 0.1
<i>L. monocytogenes</i> St.	3.2 ± 0.3
<i>epidermidis</i> B.	2.6 ± 0.2
<i>cereus</i> Salmonella	3.7 ± 0.2
<i>E. coli</i> S.	3.2 ± 0.3
<i>marcescens</i> St.	2.0 ± 0.1
<i>aureus</i> 1	2.9 ± 0.2
2	3.1 ± 0.2
3	3.2 ± 0.1
4	3.4 ± 0.1
5	3.0 ± 0.1
6	3.4 ± 0.3
7	3.4 ± 0.1
8	2.7 ± 0.1
9	3.7 ± 0.3
10	4.1 ± 0.3
11	3.1 ± 0.3
12	3.1 ± 0.2
13	3.2 ± 0.2
14	- - -
15	3.4 ± 0.2
16	3.2 ± 0.1
17	2.6 ± 0.2
18	3.2 ± 0.3
19	3.1 ± 0.2
20	3.8 ± 0.3
21	3.7 ± 0.3
22	2.9 ± 0.1
23	3.7 ± 0.3
24	3.0 ± 0.2

Данные табл.1 свидетельствуют, что все исследуемые нами молочнокислые закваски обладали антагонистической активностью в отношении тестерных микроорганизмов. Максимальная активность отмечалась у штаммов, входящих в состав медицинского препарата Лактобактерина. Они проявляли антагонистическую активность в отношении всех выбранных нами патогенных микроорганизмов. Также хорошей активностью обладали закваски CHR Bactoferm F-SC-111 (№2) и Schaller Старт Стар (№3). Они также подавляли рост тест-культур. Минимальной антагонистической активностью обладали бактерии закваски Danisco Texel DCM-1 (№4). Наблюдалось подавление роста лишь у *Salmonella* и *S. marcescens*. B. *cereus* *E. coli* L1 *Klebsiella* L1 *L. monocytogenes* 88B-K *S. marcescens* chas 26 *Salmonella* L1 *St. aureus* *St. epidermidis*

Рис. 2 - Антагонистическая активность бактериальных заквасок блочным методом (нумерация заквасок как в разделе «Экспериментальная часть») *B. cereus* *E. coli* L1 *Klebsiella* L1 *L. monocytogenes* 88B-K *S. marcescens* chas 26 *Salmonella* L1 *St. aureus* *St. epidermidis*

Рис. 3 - Антагонистическая активность Лактобактерина в отношении тест-культур блочным методом

Аналогичные результаты по антагонистической активности были получены с использованием суспензионного метода (рис.4). Как видно из рис. 4, все исследуемые нами молочнокислые закваски обладали антагонистической активностью в отношении описанных условно-патогенных и патогенных микроорганизмов. Максимальная активность отмечалась у штаммов,

входящих в состав закваски №1 и Лактобактерина (№5). Они в среднем на 98% подавляли рост всех изучаемых нами патогенов. Также хорошие показатели угнетения роста патогенных микроорганизмов показали представители закваски №3. Они также активно ингибировали патогенные микроорганизмы, и индекс ингибирования был незначительно меньше, в среднем на 10%. Закваска №2 не подавляла рост *Klebsiella* L1 и лишь на 30% угнетала *St. aureus*. Минимальное подавление патогенных штаммов наблюдалось у закваски №4. Она лишь примерно на 35% угнетала *B. cereus* и *E. coli* L1, на 9% *S. marcescens*. В отношении же остальных патогенных микроорганизмов она практически не проявляла антагонистической активности. Рис. 4 - Антагонистическая активность бактериальных заквасок суспензионным методом А - CHR Hansen Safe Pro B-LL-20; В - CHR Bactoferm F-SC-111; С - SC Halle Старт Старт; D - Danisco Texel DCM-1; E - Лактобактерин; 1 - *S. marcescens* chas 26; 2 - *E. coli* L1; 3- *Klebsiella* L1; 4- *St. epidermidis*; 5- *St. aureus*; 6- *Listeria monocytogeneis* 88B-K; 7- *B. cereus*; 8- *Salmonella*

Следовательно, все исследованные нами бактериальные закваски в той или иной степени обладали антагонистической активностью в отношении тестовых штаммов патогенных микроорганизмов. Величина антагонистической активности, очевидно, в первую очередь определяется родовой и видовой принадлежностью микроорганизмов, входящих в их состав. Так, в состав закваски Danisco Texel DCM-1 (№ 4), обладающей наименьшей антагонистической активностью, входят только *Staphylococcus carnosus* и *Staphylococcus xylosus*, в то время как в состав всех остальных заквасок (кроме CHR Hansen Safe Pro B-LL-20) входят *Lactobacillus*. А наиболее активный препарат Лактобактерин содержит только представителей лактобацилл. Следует отметить и высокую антагонистическую активность *Pediococcus acidilactici*, входящего в состав закваски CHR Hansen Safe Pro B-LL-20. Однако данная закваска не полностью проявила себя при анализе антагонистической активности диффузионным методом. Так, *Klebsiella* L1 оказалась не чувствительна к микроорганизмам этой закваски. Это дает нам основание предположить, что именно представители рода *Lactobacillus* играют решающую роль в подавлении роста патогенных микроорганизмов. Заключение Все исследуемые бактериальные закваски обладали антагонистической активностью в отношении условно-патогенных и патогенных микроорганизмов. Показатель антагонистической активности у различных бактериальных препаратов варьирует, причем наибольший индекс ингибирования отмечается у препаратов, содержащих в своем составе представителей рода *Lactobacillus*. Наименьшей активностью обладает молочнокислая закваска Danisco Texel DCM-1, состоящая из бактерий рода *Staphylococcus*. Из двух исследованных методов каждый имеет свои преимущества, определяющие выбор метода в тех или иных обстоятельствах. К преимуществам блочного метода можно отнести: наглядность, возможность одновременной оценки активностей набора штаммов-

антагонистов; к преимуществам суспензионного - более высокую дифференцированность.