

*Т.И. Дымар, Т.А. Савельева, Н.Н. Фурик, Н.К. Жабанос  
РУП «Институт мясо-молочной промышленности»*

**ТЕСТ-КУЛЬТУРЫ  
*STREPTOCOCCUS SALIVARIUS SUBSP. THERMOPHILUS*  
ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОСТАТОЧНЫХ КОЛИЧЕСТВ  
ИНГИБИРУЮЩИХ ВЕЩЕСТВ В МОЛОЧНОМ СЫРЬЕ**

*(Поступила в редакцию 21.03.2011)*

*Сообщается об определении чувствительности штаммов *Str. thermophilus* к антибиотикам широкого спектра действия – пенициллиновый, стрептомициновый, тетрациклиновый, цефалоспориновый ряд – и другим ингибиторам химической природы с целью подбора их в качестве тест-культур для постановки микробиологического теста определения наличия ингибирующих веществ в молоке-сырье в условиях практических лабораторий молокоперерабатывающих предприятий.*

**Введение.** Активное использование в животноводстве антибактериальных средств, а также повышение требований к пищевой ценности и подлинности молока обуславливают необходимость выбора оптимальных методов контроля качества и безопасности молока-сырья, учитывая при этом доступность и воспроизводимость методик, оперативность получения результатов, экономические факторы.

Наличие в молоке ингибиторов снижает скорость развития заквасочной микрофлоры, применяемой в производстве кисломолочных продуктов, что нарушает производственный процесс и приводит к серьезным финансовым потерям [1]. Загрязнение молока ингибирующими веществами искажает результаты редуцтазной и бродильных проб и может повлиять на результаты фосфатазной и пероксидазной проб, что снижает качество производимой продукции и наносит значимый ущерб молокоперерабатывающим предприятиям [2].

Но наиболее опасны последствия попадания остатков антибиотиков в организм человека. Пенициллин, стрептомицин, тетрациклин – антибиотики широкого спектра действия, которые могут вызывать нарушения жизнедеятельности не только микроорганизмов, но и влиять на состояние здоровья человека, особенно детей, вызывая аллергические и

токсические реакции, а также формировать антибиотикоустойчивые штаммы бактерий.

Международными требованиями, отраженными в нормативных документах Евросоюза, России, Республики Беларусь и других стран введены жесткие ограничения содержания антибиотиков и ингибирующих веществ в сельскохозяйственной продукции и продуктах питания.

С целью качественного и количественного определения антибиотиков используют метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), иммуноферментный анализ (ИФА), которые требуют дорогостоящего оборудования и высококвалифицированного персонала. Кроме того, сама процедура анализов достаточно трудоемка и продолжительна по времени. Это ограничивает широкое распространение данных методов.

Для решения проблемы контроля продукции животноводства на содержание антибиотиков необходимы простые в использовании, надежные и чувствительные методы анализа. Этим требованиям отвечает микробиологический тест с использованием индикаторных культур *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*, чувствительных к антибиотикам и другим ингибирующим веществам, отличающийся быстротой, относительно невысокой стоимостью и возможностью осуществления в производственных лабораториях молокоперерабатывающих предприятий. Метод описан в ГОСТ 23454 «Молоко. Методы определения ингибирующих веществ» и рекомендован к применению для контроля показателей молока.

Микробиологический метод определения ингибирующих веществ, как наиболее доступный, может использоваться для скрининговых целей, а положительные результаты, полученные с его помощью, должны служить основанием для дальнейших исследований молока-сырья методами ИФА или ВЭЖХ.

Цель настоящих исследований – изучение диапазона ингибирования развития молочнокислых бактерий р. *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* антибиотиками различных групп и подбор тест-культур для определения остаточных количеств ингибирующих веществ в молочном сырье.

**Материалы и методы исследований.** Объектом исследований явились штаммы молочнокислых бактерий р. *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* из Централизованной отраслевой коллекции промышленных штаммов молочнокислых микроорганизмов РУП «Институт мясо-молочной промышленности».

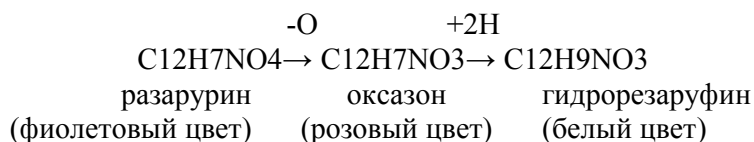
Исследования свойств культур термофильного стрептококка проводили по общепринятым микробиологическим методикам. Культуры выращивали в молоке и в стандартной питательной среде М17. Свертывающую активность определяли по времени образования сгустков микроорганизмами в стерильном обезжиренном молоке при инокулировании петлей и культивирования при оптимальной температуре  $(41 \pm 1) ^\circ\text{C}$ , а также оценивали органолептические свойства полученных сгустков.

*Титр клеток* определяли методом глубинного посева из последовательных разведений на чашки с агаризованной питательной средой М17 с дальнейшим подсчетом количества выросших колоний.

*Чувствительность культур термофильного стрептококка к содержанию ингибирующих веществ в питательной среде* определяли путем посева культур на чашки с плотной питательной средой М17, содержащей антибиотик в заведомо известной концентрации. Водные растворы антибиотиков готовили *ex tempora* и добавляли к расплавленной и охлажденной до  $(46 \pm 1) ^\circ\text{C}$  питательной среде. Исследуемые (16–18)-часовые культуры термофильных стрептококков, выращенные в жидкой питательной среде М17, сеяли штрихом по секторам: на одну чашку – до восьми культур. В качестве контроля служили посева на чашки с питательной средой М17, не содержащей антибиотик. Показатель чувствительности микроорганизма к антибиотику – отсутствие роста по штриху.

*Чувствительность культур молочнокислых микроорганизмов к содержанию ингибирующих веществ в молоке* определяли в соответствии с методикой, приведенной в ГОСТ 23454 «Молоко. Методы определения ингибирующих веществ» [3]. Метод основан на свойстве фермента редуктазы, выделяемого микроорганизмами, восстанавливать индикаторы резазурин или метиленовый голубой. Резазурин, легко отдающий свой кислородный атом, восстанавливается в оксазон, при этом молоко медленно изменяет свой цвет от синего через все оттенки лилового до розового, а затем и до белого [4].

Восстановление резазурина происходит по следующей схеме:



Образцы молока, содержащие ингибирующее вещество в концентрации, которая подавляет развитие тест-культуры термофильного стрептококка, после проведения опыта имеют фиолетовую окраску. Контролем в опыте служили пробирки с восстановленным молоком Fluka, в котором регламентировано отсутствие ингибирующих веществ. Контрольные пробирки после проведения опыта изменяют окраску своего содержимого на розовый или белый цвет. По изменению цвета содержимого пробирок с исследуемыми образцами судили о наличии в молоке ингибирующих веществ.

При использовании индикатора метиленового голубого в случае наличия в молоке ингибирующего вещества в концентрации, подавляющей развитие тест-культуры, содержимое пробирок имеет голубой цвет, а в контрольных образцах тест-культура развивается в молоке и наблюдается обесцвечивание метиленового голубого вследствие снижения окислительно-восстановительного потенциала.

Для проведения опыта использовали стерильное восстановленное молоко Fluka. В пробирку вносили ингибирующее вещество, по чувствительности к которому исследовали культуры термофильного стрептококка, в расчетном количестве, обеспечивающем необходимую концентрацию. В качестве контроля в опыте использовали пробирки с молоком без добавления ингибирующего вещества.

Выбор культур *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*, исследуемых концентраций ингибирующих веществ проводили исходя из требований ГОСТ 23454:

- проявлять чувствительность к содержащимся в молоке антибиотиков и ингибирующих веществ в следующих концентрациях: пенициллин – 0,01МЕ/мл, тетрациклин – 1 мкг/мл, стрептомицин – 10 мкг/мл, массовая доля перекиси водорода – 0,01%, формалина – 0,003%;

- сквашивать стерильное обезжиренное молоко при перевивке петлей и температуре культивирования (41±1) °С в течение не более 18 ч с

образованием плотного сгустка однородной консистенции, допускается вязкость, в поле зрения микроскопа в микроскопическом препарате – диплококки одиночные или собранные в цепочки;

- обеспечивать при проведении анализов в соответствии с методикой, описанной в ГОСТ 23454, изменение окраски индикаторов в контрольных пробах в условиях заведомо свободного от ингибирующих веществ молока.

**Результаты и их обсуждение.** *Подбор штаммов молочнокислых бактерий для определения ингибирующих веществ.* С целью подбора тест-культур из Централизованной отраслевой коллекции промышленных штаммов молочнокислых бактерий РУП «Институт мясо-молочной промышленности» было исследовано 57 штаммов молочнокислых бактерий р. *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*.

При отборе учитывались следующие свойства штаммов: свертывающая активность при инокуляции петлей и 5% посевного материала, микроскопический препарат, органолептические свойства молочных сгустков.

Далее исследована способность роста выбранных культур термофильного стрептококка на питательной среде с содержанием антибиотика.

В результате проведенных исследований отобраны 24 штамма, проявившие чувствительность к содержанию в питательной среде тетрациклина в концентрации 1 мкг/мл и стрептомицина в концентрации 30 мкг/мл. У 12 культур наблюдалось отсутствие роста на среде, содержащей пенициллин в концентрации 0,01 МЕ/мл, и у 12 – умеренный рост при интенсивном росте на контрольных чашках.

Отбирали штаммы, обеспечивающие изменение окраски индикаторов в контрольных пробах (заведомо свободного от ингибирующих веществ молока), в соответствии с методикой (ГОСТ 23454).

С целью подбора культур был осуществлен посев контрольных проб в пробирки со стерильным восстановленным молоком Fluka без добавления ингибирующего вещества с использованием 24 исследуемых штаммов термофильного стрептококка. Опыт проводился параллельно с индикатором резазурином фирмы SIGMA (США) и метиленовым голубым производства ОАО «Химреактив» (Россия, Санкт-Петербург). Содержимое контрольных пробирок при использовании индикатора резазурина должно изменять окраску из фиолетовой в розовую или белую, а

при использовании индикатора метиленового голубого – из голубой в белую.

В ходе проведения опыта три исследуемых штамма не изменили цвет содержимого контрольной пробирки с индикатором резазурином, четыре – с индикатором метиленовым голубым. Определено, что эти штаммы не обеспечивают требуемую направленность процесса ферментации молока при проведении анализа.

В результате проведенных исследований на данной стадии подбора отобрано 18 штаммов термофильного стрептококка, удовлетворяющих предъявляемым к ним требованиям.

Изучен *диапазон ингибирования* развития выбранных культур термофильного стрептококка антибиотиками различных групп. При этом определяли способность развития культур в молоке, содержащем определенную концентрацию ингибитора роста. Параллельно проводили опыты с использованием индикаторов резазурина и метиленового голубого.

Исследовали диапазон чувствительности тест-культур к спектру антибиотиков: тетрациклин, стрептомицин, пенициллин и амоксициллин (пенициллиновый ряд), эритромицин, цефазолин и цефтиофуру (цефалоспориновый ряд, часто используемый в ветеринарии для лечения маститов у коров). Кроме того, исследована чувствительность культур термофильного стрептококка к другим ингибирующим веществам (ИВ), встречающимся в молочном сырье: перекись водорода и формалин.

Для установления диапазона ингибирования важно определить *предел чувствительности* тест-культур к содержанию в молоке исследуемых антибиотиков и ингибирующих веществ (минимальную концентрацию, подавляющую развитие тест-культуры). С этой целью при постановке опыта варьировали концентрации ингибирующих веществ, вносимых в молоко. Время постановки реакции составило 1,5 ч.

Результаты исследований приведены в табл. 1. Для сравнения в ней приведены значения допустимых уровней концентрации исследованных ингибирующих вещества в молоке, соответствующие допустимым уровням содержания остаточных количеств фармацевтических препаратов в сыром молоке, указанным в техническом регламенте ТР 2010/018/ВУ или в ГОСТ 23454–79.

Таблица 1 – Минимальные концентрации ингибирующих веществ в молоке, подавляющие развитие культур *Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus*

№ п/п	№ штамма	Тетрациклин, мкг/мл	Пенициллин, ед/мл	Стрептомицин, мкг/мл	Эритромицин, мкг/кг	Амоксициллин, мкг/кг	Цефазолин, мкг/кг	Цефтиофул, мкг/кг	Перекись водорода, %	Формалин, %
		*	*	*	**	**	**	**	*	*
		1,0	0,01	10-30	40	4	50	100	0,01	0,005
1.	St 2	0,2	0,02	10	100	–	–	25	0,004	0,005
2.	St 8	0,2	0,04	10	100	–	–	25	0,004	0,005
3.	St 13	0,2	0,01	10	100	–	100	25	0,004	0,005
4.	St 25	0,2	0,02	30	100	–	–	25	0,01	0,005
5.	St 26	1,0	0,04	10	100	–	–	25	0,004	0,005
6.	St 33	0,2	0,04	30	100	32	–	25	0,002	0,005
7.	St 37/1	0,2	0,01	10	100	32	50	10	0,001	0,005
8.	St 42	0,2	0,02	10	40	–	–	10	0,001	0,0025
9.	St 57	1,0	0,02	5	40	–	100	25	0,001	0,0025
10.	St 58/1	1,0	0,02	10	100	–	–	25	0,001	0,005
11.	St 67	1,0	0,02	10	100	–	–	50	0,002	0,0025
12.	St 84/2	0,2	0,02	10	–	–	–	25	0,01	0,0025
13.	St 87/2	0,2	0,04	10	100	–	–	25	0,002	0,0025
14.	St 94	1,0	0,02	10	100	–	–	25	0,002	0,005
15.	St 95/1	1,0	0,04	30	–	32	50	25	0,002	0,0025
16.	St 96/3	0,2	0,02	30	100	32	–	50	0,01	0,005
17.	St 99/1	0,2	0,04	30	–	32	–	25	0,002	0,005
18.	St 104/2	0,2	0,04	10	100	–	–	25	0,002	0,0025

Примечания: \* концентрация ингибирующего вещества в молоке, соответствующая чувствительности метода по ГОСТ 23454;

\*\* концентрация ингибирующего вещества в молоке, соответствующая допустимому уровню содержания остаточных количеств фармацевтических ветеринарных препаратов в сыром молоке, указанному в ТР 2010/018/ВУ;

знак «–» значение не определено.

В результате исследований установлено, что антибиотик эритромицин, относящийся к группе макролидов, равно как и олеандомицин, описанный в ГОСТ 23454, определяется в молоке только по методике с индикатором метиленовым голубым, по методике с резазурином в указанных концентрациях данные антибиотики не определяются. Для остальных антибиотиков и ингибирующих веществ, используемых в ходе выполнения работ, данные, полученные с применением обоих индикаторов, достоверно совпадали.

Из табл. 1 видно, что все исследованные штаммы *Str. thermophilus* чувствительны к содержанию в молоке тетрациклина, причем 13 штам-

мов из 18 чувствительны даже к содержанию в молоке тетрациклина в концентрации (0,2 мкг/мл), то есть в 5 раз меньшей чувствительности метода. К содержанию в молоке тетрациклина в концентрации в 10 раз меньшей (0,1 мкг/мл) все исследованные штаммы проявили резистентность.

Установлено, что только две культуры (St 13 и St 37/1) чувствительны к содержанию в молоке пенициллина в концентрации, указанной в методе (0,01 МЕ/мл), но при увеличении концентрации в 2 раза (0,02 МЕ/мл) чувствительными оказались 12 культур. Все штаммы резистентны к содержанию в молоке амоксициллина в концентрации 4 мкг/кг, и только 5 штаммов (St 33, St 37/1, St 95/1, St 96/3, St 99/1) оказались чувствительными к концентрации 32 мкг/кг, превышающей допустимый уровень в 8 раз.

Определен один штамм (St 57), чувствительный к содержанию в молоке эритромицина в концентрации 40 мкг/кг, вместе с тем при увеличении концентрации антибиотика в 2,5 раза (100 мкг/кг) чувствительными оказались 8 культур (St 42, St 57, St 67, St 87/2, St 94, St 95/1, St 99/1, St 104/2).

Установлено, все исследованные штаммы чувствительны к содержанию в молоке стрептомицина в концентрации 30 мкг/мл. При уменьшении концентрации до 10 мкг/мл 5 штаммов проявили резистентность, а при уменьшении концентрации еще в 2 раза (5 мкг/мл) чувствительность не наблюдалась ни у одной из исследованных культур.

При исследовании чувствительности штаммов к антибиотикам цефалоспоринового ряда 3 культуры (St 37/1, St 57, St 95/1) установлена чувствительность к содержанию в молоке цефазолина в концентрации 50 мкг/кг, но при уменьшении концентрации в 2 раза (25 мкг/кг) все культуры оказались резистентными. Все культуры проявили чувствительность к содержанию в молоке цефтиофура в концентрации 100 мкг/кг, и только 2 штамма показали резистентность к его содержанию в концентрации, меньшей в 4 раза (25 мкг/кг).

Все исследованные культуры чувствительны к содержанию в молоке перекиси водорода с массовой долей 0,01%, а 4 из них (St 37/1, St 42, St 57, St 58/1) – к концентрации в 10 раз меньшей (0,001%), а также к содержанию формалина с массовой долей 0,005%, а 7 из них (St 42,



St 57, St 67, St 84/2, St 87/2, St 95/1, St 104/2) – к концентрации в 2 раза меньшей (0,0025%).

Таким образом, результаты проведенных исследований свидетельствуют, что микроорганизмы р. *Str. thermophilus* могут быть использованы в качестве тест-культур для проведения микробиологического теста. На основании полученных результатов подобраны 5 тест-культур, обеспечивающих проведение анализа в соответствии с ГОСТ 23454. В табл. 2 приведены результаты исследований свойств отобранных тест-культур.

Таблица 2 – Свойства тест-культур *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* для определения ингибирующих веществ в молоке

Свойство	Тест-культура				
	St 2	St 13	St 37/1	St 42	St 57
Свертывающая активность, ч	8,0	8,0	9,5	8,0	10,0
Микроскопический препарат	Диплококки, длинные цепочки кокков	Диплококки, короткие цепочки кокков	Диплококки, короткие цепочки кокков	Диплококки, длинные цепочки кокков	Диплококки, длинные цепочки кокков
Характер молочного сгустка	Плотный, однородный, вязкий	Плотный, однородный, невязкий	Плотный, однородный, невязкий	Плотный, однородный, невязкий	Плотный, однородный, невязкий
Титр клеток (16–18)-часовой молочной культуры, КОЕ/см <sup>3</sup>	3,8·10 <sup>8</sup>	2,6·10 <sup>8</sup>	5,5·10 <sup>8</sup>	5,0·10 <sup>8</sup>	4,2·10 <sup>8</sup>
Чувствительность к антибиотикам:					
- тетрациклин, мкг/мл;	0,2	0,2	0,2	0,2	1,0
- стрептомицин, мкг/мл;	10	10	10	10	5
- пенициллин, МЕ/мл;	0,02	0,01	0,01	0,02	0,02
- эритромицин, мкг/кг;	100	100	100	40	40
- цефтиофур, мкг/кг;	25	25	10	10	25
- цефазолин, мкг/кг	-	100	50	-	100
Чувствительность к ингибирующим веществам, массовая доля в молоке, %:					
- перекись водорода	0,004	0,004	0,001	0,001	0,001
- формалин	0,005	0,005	0,005	0,0025	0,0025

Как видно из табл. 2, отобранные в качестве тест-культур штаммы *Str. salivarius subsp thermophilus* активно сквашивали молоко при инокулировании петлей за 8–10 ч, при этом наблюдали образование плотного молочного сгустка однородной консистенции. Культуры накапливались в молоке в титре (2,6–5,5)·10<sup>8</sup> КОЕ/см<sup>3</sup> и проявили чувствительность в от-

ношении широкого спектра антибиотиков: тетрациклин – 0,2–1,0 мкг/мл, стрептомицин – 5–10 мкг/мл, пенициллин – 0,01–0,02 МЕ/мл, эритромицин – 40–100 мкг/кг, цефтиофур – 10–25 мкг/кг, цефазолин – 50–100 мкг/кг; и ингибирующих веществ: перекись водорода – массовая доля в молоке 0,001-0,004%; формалин – массовая доля в молоке 0,0025–0,005%.

**Заключение.** В результате исследований определен диапазон ингибирования развития тест-культур *Str. thermophilus* антибиотиками различных групп, установлены пороговые концентрации антибиотиков, определяемые в молоке микробиологическим методом с использованием данных тест-культур.

### Литература

1. Гудков, А.В. Сыроделие: технологические, биологические и физико-химические аспекты / А.В. Гудков. – Москва, 2003. – С. 414.
2. Inform agropecuario / С.М. Faginder [et al.]. Belo-Horizonte, 1988. – 155 с.
3. Молоко. Методы определения ингибирующих веществ. ГОСТ 23454. – Введ. 01.01.1985. – 1985. – 5 с.
4. Богатова, О.В. Определение качества молока: метод. указания к лабораторному практикуму / О.В. Богатова, Н.Г. Догарева. – Оренбург, 2002. – С. 24.
5. Кальницкая, О.И. Ветеринарно-санитарный контроль остаточных количеств антибиотиков в сырье и продуктах животного происхождения: автореф. дис. д-ра вет. наук: 16.00.06 / О.И. Кальницкая; ГОУВПО «Московский гос. ун-т прикладной биотехнологии». – Москва, 2008. – 17 с.

*T. Dymar, T. Savelieva, N. Furik, N. Zhabanos*  
**TEST CULTURES STREPTOCOCCUS SALIVARIUS  
SUBSP. THERMOPHILUS FOR DEFINITION OF RESIDUAL  
QUANTITIES OF INHIBITIV SUBSTANCES  
IN DAIRY RAW MATERIALS**

### Summary

It is informed on sensitivity definition *Str. thermophilus* strains to antibiotics of a wide spectrum of action – a penicillinic, streptomycinic, tetracyclenic, cephalosporinic number – and to other inhibitors of the chemical nature for the purpose of their selection as test cultures for statement of the microbiological test of definition of presence inhibitive substances in milk-raw materials in the conditions of practical laboratories milk plants.