

ВОЗДЕЙСТВИЕ АНТИБИОТИКОВ НА РАЗВИТИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ МОЛОКА

О.В. СЕЛИЦКАЯ, А.П. ОЛЕСЮК, Г.В. РОДИОНОВ, Р.М. КЕРТИЕВ

(РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева)

*Скорость размножения различных микроорганизмов в молоке неодинакова и зависит, главным образом, от температуры хранения. Исходная степень микробальной загрязнённости продукта, наличие и концентрация некоторых веществ химической природы также выступают факторами, обуславливающими развитие молочных микроорганизмов. Целью исследований явилось выявление характера дифференцированного воздействия антибиотиков на микробиологический состав молока-сырья и заквасок. Исследованы физико-химические и микробиологические показатели, технологические свойства заквасок чистых культур, полученных путём сквашивания молока с наличием антибиотиков. По результатам экспериментальных исследований было выявлено, что в процессе жизнедеятельности молочно-кислого стрептококка массовая доля жира в субстрате была на уровне от 0,36 до 0,42%, это почти в 2 раза ниже, чем в заквасках *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, что указывает на использование отдельных жировых компонентов и фракций для обеспечения метаболических процессов *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*.*

Ключевые слова: ингибиторы микроорганизмов, фазы роста, закваски, импедансный анализ.

Введение

Продукты растительного и животного происхождения наряду с растениями и животными имеют собственные механизмы защиты от развития микроорганизмов. Некоторые из этих механизмов относятся к субстрат-лимитирующим факторам и являются внутренними параметрами продукта (рН, Eh, влажность, содержание питательных веществ, антимикробные компоненты, биологические структуры), а другие, не зависящие от субстрата, принято причислять к внешним параметрам (температура хранения, относительная влажность окружающей среды, присутствие и концентрация газов, наличие и активность других микроорганизмов) [3, 15]. Кроме того, доказаны некоторые синергетические эффекты в отношении ингибирования микроорганизмов в результате использования комбинаций факторов (например, температура и присутствие антибиотиков) [3].

Загрязнение молока ингибирующими веществами, главным образом, антибиотиками, является одной из актуальных проблем молочной отрасли и её значение нарастает с каждым годом. Регулярное поступление в организм человека остаточных количеств антибиотиков, содержащихся в продуктах, приводит к выработке резистентности к их воздействию, а также возникновению аллергических реакций и дисбактериозов.

Антибиотические вещества могут попадать в молоко вследствие использования кормов, содержащих стимуляторы роста, а также в случаях несоблюдения сроков браковки молока в процессе лечения коров [10, 13].

Для изучения специфики воздействия антибиотиков на молочную микрофлору актуально установить характер этого влияния при различных температурах и разных сроках хранения молока и выявить силу влияния этих факторов.

Скорость роста, профили конституциональных и индуцибельных ферментов, чувствительность к температуре, рН среды, активности воды, консервантам – это свойства, присущие микрофлоре молока и молочных продуктов [1]. Как известно, в свежесвыдоенном молоке микробы не развиваются, что объясняется его бактерицидными свойствами. Молоко, охлажденное после выдаивания до низкой температуры, хранится длительное время, а в парном продолжительность бактерицидной фазы составляет всего 2 часа, после чего молоко начинает активно скисать. Развитие молочной микрофлоры проходит через четыре фазы или стадии: бактерицидную и бактериостатическую, смешанной микрофлоры, молочнокислых бактерий, дрожжей и плесеней.

Как известно, скорость размножения микробов разных групп в молоке неодинакова. Общепринято подразделять микроорганизмы на три группы, основываясь на их температурных потребностях для роста и развития: *психрофилы*, *мезофилы* и *термофилы* [3, 8, 9]. Хладоустойчивые (*психрофилы*) бактерии выживают при низкой температуре (ниже 0°C) и хорошо растут при 7°C [12, 14]. Для *мезофилов* температурный оптимум находится между 20–40°C, а микроорганизмы, хорошо растущие при температуре выше 45°C, относятся к термофилам [3, 5, 8]. Ввиду чего при различных температурах хранения молока для размножения различных групп бактерий могут создаваться более или менее благоприятные условия, и, как следствие, происходит разнонаправленное изменение компонентного состава молока.

Любое антибиотическое вещество специфично, характер его влияния и механизм биологического действия зависят от многих факторов, в частности, от времени действия, химической природы и концентрации препарата, вида организма и микроструктуры его клеток, от внешних условий [4, 11]. Антибиотические вещества могут задерживать рост клеток (оказывать цитостатическое действие), убивать их (т.е. проявлять цитоцидное действие) или растворять клеточную стенку, что непременно приводит к гибели клетки (цитолитическое действие) [4].

Впервые выявлены особенности дифференцированного воздействия отдельных ингибиторов (антибиотики) на микроорганизмы молока, его химический состав, на некоторые МКБ в динамике хранения и при различных температурах.

Знание дифференцированного воздействия антибиотиков на молоко и закваски для кисломолочных продуктов позволит контролировать процессы производства, осуществлять выпуск молочной продукции с требуемыми показателями качества и безопасности.

Методика исследования

Для изучения особенностей направленного воздействия антибиотиков на молочную микрофлору необходимо выявить характер этого влияния при разных параметрах хранения (температура и продолжительность), а также установить степень влияния этих факторов. В ходе исследований проводились микробиологические анализы молока и заквасок на тест-пластинах Петрифильм [6], а также на микробиологическом анализаторе *БакТрак 4300* изучалась кинетика роста микроорганизмов

и проводился импедансный анализ [7]. Исследована метаболическая активность микроорганизмов молока и отдельных культур МКБ в динамике при разных температурах и концентрациях антибиотика.

В процессе изучения физико-химических показателей молока и заквасок использовались как стандартные методики (ГОСТ), так и современное оборудование (*Bentley 2000* и *Somacount 300*).

В процессе исследований изучались специфичность воздействия четырёх концентраций антибиотиков на химический состав и микробиологические показатели молока при различных продолжительности и температуре хранения, а также воздействие различных антибиотиков на чистые культуры молочнокислых микроорганизмов.

Для исследования нами были выбраны следующие концентрации пенициллина в исходном молоке: на уровне, соответствующем пороговому (ПДУ) согласно ТР ТС 033/2013 «О безопасности молока и молочной продукции» (0,004 мг/кг); в 2 раза ниже ПДУ (0,002 мг/кг); в 2 раза выше ПДУ (0,008 мг/кг) и концентрация, в 4 раза превышающая ПДУ (0,016 мг/кг). Концентрации левомицетина были выбраны аналогично. ПДУ левомицетина установлен на отметке не более 0,0003 мг/кг, следовательно, нами изучались пробы молока с концентрациями 0,00015; 0,0003; 0,0006; 0,0012 мг/кг.

В процессе метаболизма микроорганизмы расщепляют питательные вещества (высокомолекулярные соединения – белки, пептиды, углеводы) и образуют низкомолекулярные заряженные молекулы. Принцип работы измерительной системы микробиологического анализатора БакТрак базируется на методике уменьшения некоего импеданса питательной среды (её сопротивления) с помощью электродов. В процессе инкубирования выстраивается через определённые интервалы времени некая кривая импедансного сигнала, аналогичная кривой роста микроорганизмов, поделенной на несколько типичных областей: начальная фаза (фаза адаптации или лаг-фаза), экспоненциальная, переходная (замедления роста), стационарная и фаза отмирания.

В процессе начальной фазы роста идёт адаптация метаболизма микроорганизмов к имеющемуся в среде субстрату (наблюдается, как правило, синтез рибосом, РНК, индуцибельных ферментов), после этого инициируется экспоненциальная фаза роста – численность микроорганизмов увеличивается в геометрической прогрессии, наблюдается максимальная скорость деления клеток. В результате накопления в субстрате токсических продуктов метаболизма и быстрого расходования питательных веществ субстрата наблюдается замедление роста бактерий, что впоследствии приводит к стационарной фазе импедансного анализа. Уровень низкомолекулярных метаболитов больше не увеличивается, и кривая роста идёт практически параллельно оси абсцисс. Чем больше осеменён микрофлорой исходный образец, тем быстрее выстраивается импедансная кривая.

Все исследования по влиянию антибиотиков на качественные показатели и молока и заквасок проводились в трёхкратной повторности.

Результаты исследований и их обсуждение

Результаты анализа, представленные на графиках (рис. 1) и в таблице 1, свидетельствуют о том, что на общую бактериальную обсеменённость молока в процессе инкубации при 24°C концентрация пенициллина оказала незначительное влияние (в контрольном образце установлено $5,6 \times 10^3$ КОЕ/мл, в опытном с концентрацией 0,016 мг/кг – $4,6 \times 10^3$ КОЕ/мл).

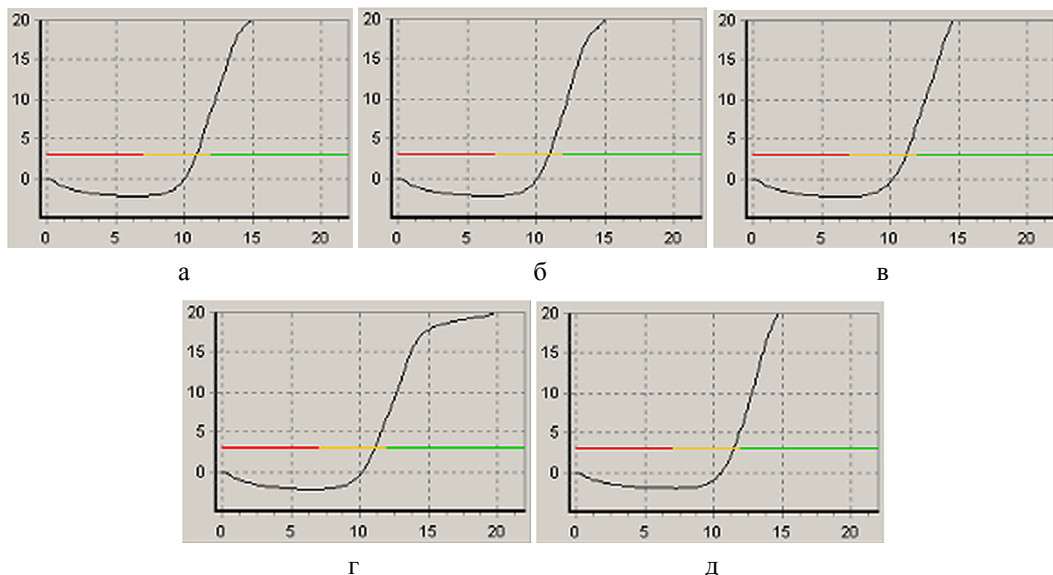


Рис. 1. Кинетика роста микроорганизмов молока при $t = 24^{\circ}\text{C}$: а – контроль (без пенициллина); б – образцы с концентрациями антибиотика: 0,002 мг/кг; в – 0,004 мг/кг; г – 0,008 мг/кг; д – 0,016 мг/кг

Температура культивирования оказала существенное влияние на увеличение численности микроорганизмов в образцах молока. Так при 37°C в момент фиксирования импеданса численность бактерий в контрольном образце составила $2,5 \times 10^6$ КОЕ/мл, а в опытном с концентрацией антибиотика 0,008 мг/кг – $1,9 \times 10^6$ КОЕ/мл, а с концентрацией 0,016 мг/кг – $1,7 \times 10^6$ КОЕ/мл (рис. 2).

Таблица 1

Импедансный анализ по изучению влияния пенициллина на микроорганизмы молока

Показатели	Контроль (без антибиотика)		Молоко, содержащее концентрации пенициллина							
			0,002 мг/кг		0,004 мг/кг		0,008 мг/кг		0,016 мг/кг	
Температура инкубации	24°C	37°C	24°C	37°C	24°C	37°C	24°C	37°C	24°C	37°C
Количество м-мов, КОЕ/мл	$5,6 \times 10^3$	$2,5 \times 10^6$	$5,5 \times 10^3$	$2,4 \times 10^6$	$4,3 \times 10^3$	$2,4 \times 10^6$	$4,7 \times 10^3$	$1,9 \times 10^6$	$4,6 \times 10^3$	$1,7 \times 10^6$
Время достижения импеданса	10,96	4,60	10,94	4,68	11,18	4,72	11,10	4,94	11,49	5,05

Исследования кинетики роста микроорганизмов молока с заданными концентрациями левомицетина в процессе инкубации при 24°C и 37°C не выявили существенных различий в показателе ОМЧ. В контрольном образце при 24°C установлено $4,6 \times 10^2$ КОЕ/мл, в опытных с концентрациями 0,00015; 0,0003 и 0,0006 мг/кг – от $5,1 \times 10^2$ до $6,1 \times 10^2$ КОЕ/мл (табл. 2).

Однако максимальная концентрация левомицетина (0,0012 мг/кг) оказала заметный ингибирующий эффект в отношении микроорганизмов молока, что подтверждает кривая импедансного анализа данного образца (рис. 3-д).

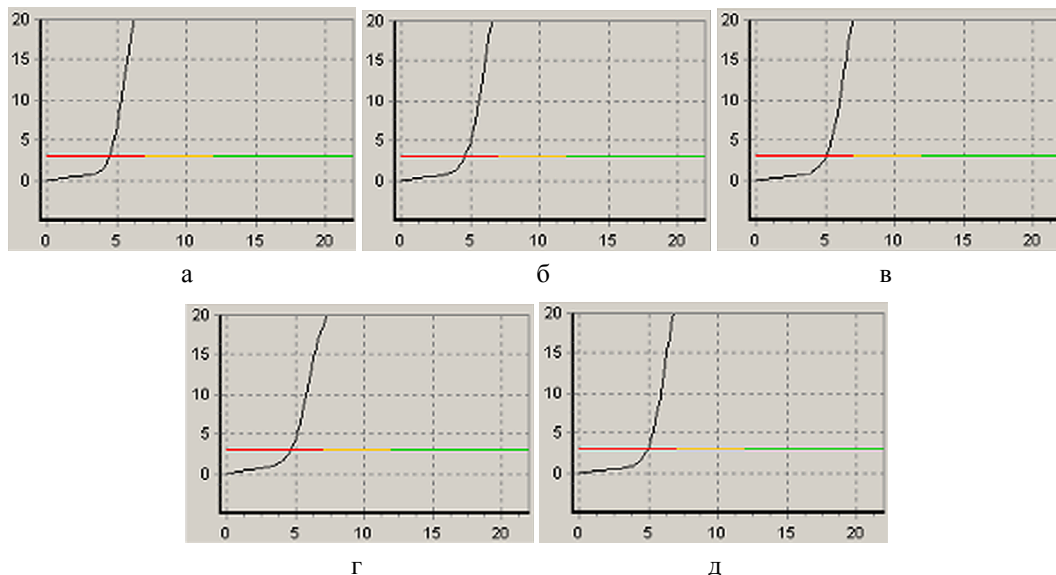


Рис. 2. Кинетика роста микроорганизмов молока при $t = 37^{\circ}\text{C}$: а – контроль (без пенициллина); б – образцы с концентрациями антибиотика: 0,002 мг/кг; в – 0,004 мг/кг; г – 0,008 мг/кг; д – 0,016 мг/кг

Таблица 2

Импедансный анализ по изучению влияния левомицетина на микроорганизмы молока

Показатели	Контроль (без антибиотика)		Молоко, содержащее концентрации левомицетина							
			0,00015 мг/кг		0,0003 мг/кг		0,0006 мг/кг		0,0012 мг/кг	
Температура инкубации	24°C	37°C	24°C	37°C	24°C	37°C	24°C	37°C	24°C	37°C
ОМЧ, КОЕ/мл	4,6×10 ²	1,3×10 ⁶	5,6×10 ²	1,3×10 ⁶	5,1×10 ²	1,3×10 ⁶	6,1×10 ²	1,4×10 ⁶	-	1,4×10 ⁶
Время достижения импеданса	13,5	5,27	13,29	5,29	13,39	5,31	13,20	5,21	-	5,26

Температура инкубирования 37°C также оказала несущественное влияние на численность микроорганизмов в образцах молока с различными концентрациями левомицетина. Время достижения импеданса в образцах наблюдалось от 5,21 до 5,31 часа и показатель ОМЧ составил от $1,3 \times 10^6$ до $1,4 \times 10^6$ КОЕ/мл (рис. 4).

Данные о количестве микроорганизмов различных групп (КМАФАнМ, молочнокислые бактерии – МКБ, дрожжи и плесневые грибы) в контрольных и опытных образцах в зависимости от концентрации антибиотиков (пенициллин, левомицетин), температуры (10, 24 и 37°C) и длительности (12 и 24 часа) хранения представлены в таблицах 3 и 4.

Выявлено, что анализируемые концентрации пенициллина оказывали незначительное влияние на показатели КМАФАнМ, количество МКБ, дрожжей и плесневых грибов. При температуре хранения 10°C общая бактериальная обсеменённость

молока через 24 часа составила $2,3 \times 10^5$ КОЕ/мл как в контрольном, так и в опытном образце с наивысшей концентрацией пенициллина. Значительно снижается в образцах с антибиотиком количество дрожжей и плесневых грибов.

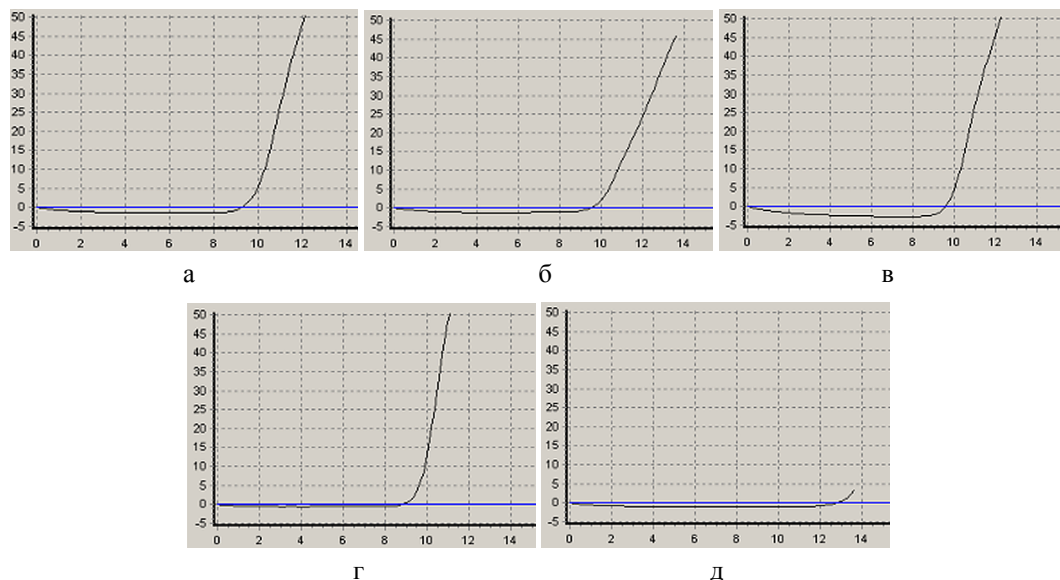


Рис. 3. Кинетика роста микроорганизмов молока при различных концентрациях левомицетина (t инкубации 24°C), мг/кг: а) контроль (без антибиотика), б) 0,00015, в) 0,0003, г) 0,0006, д) 0,0012

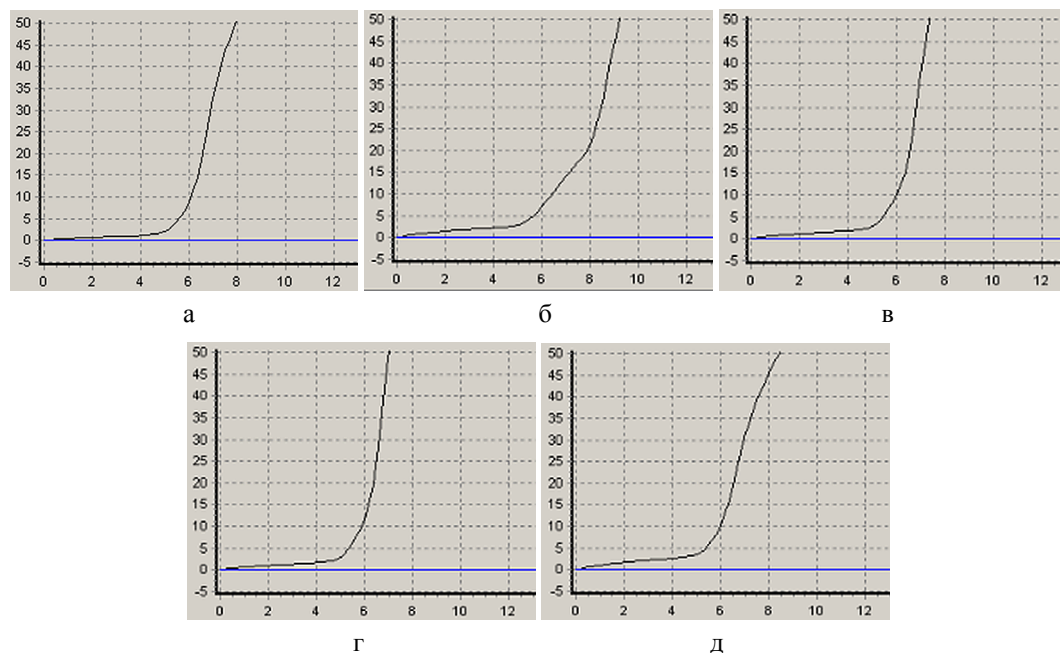


Рис. 4. Кинетика роста микроорганизмов молока при различных концентрациях левомицетина (t инкубации 37°C), мг/кг: а) контроль (без антибиотика), б) 0,00015, в) 0,0003, г) 0,0006, д) 0,0012

Концентрация пенициллина 0,016 мг/кг существенным образом повлияла на развитие МКБ молока при температуре хранения 24°C. По истечении 24 часов хранения число клеток молочнокислых бактерий в контрольном образце и опытных с концентрациями 0,002 мг/кг и 0,004 мг/кг составило $2,3 \times 10^4$ – $2,8 \times 10^4$ КОЕ/мл, а в образце с максимальной концентрацией антибиотика – сократилось до $7,2 \times 10^3$ КОЕ/мл (табл. 3).

Анализ влияния левомицетина на микрофлору молока показал, что при температуре 24°C через 24 часа хранения в контрольном образце количество клеток составило $4,5 \times 10^6$ КОЕ/мл, в то время как в опытном с концентрацией 0,00015 мг/кг – $2,4 \times 10^5$ КОЕ/мл, а с концентрацией 0,0012 мг/кг показатель КМА-ФАНМ – $7,3 \times 10^4$ КОЕ/мл (табл. 4).

Ввиду специфичности действия антибиотика на микрофлору заквасок важно определить характер его влияния на технологические свойства и химический состав молочной продукции. В связи с чем была поставлена цель провести исследования по влиянию определённых концентраций пенициллина в молоке (0,002; 0,004; 0,008; 0,016 мг/кг) на метаболизм заквасочных культур термофильного стрептококка и болгарской палочки. В наших исследованиях субстратом являлось стерильное обезжиренное молоко, в таблице 5 приведены его физико-химические и технологические показатели.

Для проведения эксперимента по выявлению воздействия изучаемых концентраций антибиотиков на чистые культуры промышленных штаммов *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* на первом этапе приготовили материнские закваски, которые вносились в количестве 5% к исходному молоку.

Для исследования химического состава заквасок из испытуемого материала получали надосадочную жидкость (супернатант). Для этого брали стерильные пробирки, вносили по 30 мл исследуемых образцов заквасок, по окончании сквашивания (12 часов) центрифугировали на приборе Janetzki K 23 при 8000 об/мин 10 минут для получения супернатанта.

В таблицах 6 и 7 представлены показатели химического состава и технологические свойства испытуемых заквасок, приготовленных на молоке с различными концентрациями пенициллина.

В ходе проведённых исследований по влиянию пенициллина на физико-химические, технологические и микробиологические показатели испытуемых образцов заквасок установлено, что с повышением концентрации антибиотика в исходном молоке в опытных образцах заквасок *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* повышается массовая доля белка, лактозы и сухого вещества по сравнению с контролем (табл. 6). Очевидно, это связано с питанием микроорганизмов, а молочный сахар является главным субстратом молочнокислого брожения, а вследствие ингибирующего эффекта антибиотиков наблюдалось подавление развития микрофлоры заквасок. А именно, в образце закваски с концентрацией пенициллина 0,016 мг/кг массовой доли лактозы оказалось на 0,47% выше по сравнению с контролем.

В образце закваски термофильного стрептококка, приготовленной на молоке с концентрацией антибиотика 0,016 мг/кг, время образования сгустка значительно увеличилось по сравнению с опытными образцами заквасок, приготовленных на молоке с 0,004 мг/кг и 0,008 мг/кг концентрациями пенициллина. Наблюдаемый ингибирующий эффект значительно ухудшил технологические свойства закваски, что говорит о недопустимости её применения при производстве кисломолочной продукции.

Плотность молочного сгустка в образцах заквасок с нарастанием концентрации пенициллина снижается. При максимальном уровне антибиотика (0,016 мг/кг) в требуемом для правильного технологического процесса временном диапазоне образование молочного сгустка вообще не наблюдалось.

Микробиологические показатели молока с исследуемыми концентрациями левомицетина при разных температурах хранения

Показатель	Контроль					Концентрация левомицетина, мг/кг														
	0,00015					0,0003					0,0006					0,0012				
	Время хранения, часов																			
0	12	24	12	24	12	24	12	24	12	24	12	24	12	24						
Температура хранения 10°C																				
КМАФАнМ, КОЕ/мл	4,4 × 10 ³	6,4 × 10 ⁴	2,3 × 10 ⁵	6,4 × 10 ⁴	1,9 × 10 ⁵	6,4 × 10 ⁴	1,5 × 10 ⁵	5,9 × 10 ⁴	6,2 × 10 ⁴	5,4 × 10 ⁴	8,1 × 10 ⁴									
МКБ, КОЕ/мл	1,4 × 10 ²	1,9 × 10 ²	7,3 × 10 ²	1,9 × 10 ²	7,5 × 10 ²	1,9 × 10 ²	7,4 × 10 ²	1,9 × 10 ²	6,6 × 10 ²	1,4 × 10 ²	2,1 × 10 ²									
Дрожжи и плесневые грибы, КОЕ/мл	5,9 × 10 ¹	6,1 × 10 ¹	9,0 × 10 ¹	3,1 × 10 ¹	4,2 × 10 ¹	2,2 × 10 ¹	3,0 × 10 ¹	2,3 × 10 ¹	3,1 × 10 ¹	1,4 × 10 ¹	2,0 × 10 ¹									
Температура хранения 24°C																				
КМАФАнМ, КОЕ/мл	4,4 × 10 ³	2,2 × 10 ⁵	4,5 × 10 ⁶	6,6 × 10 ⁴	2,4 × 10 ⁵	7,0 × 10 ⁴	4,4 × 10 ⁵	5,7 × 10 ³	8,3 × 10 ⁴	8,4 × 10 ³	7,3 × 10 ⁴									
МКБ, КОЕ /мл	1,4 × 10 ²	2,6 × 10 ³	2,3 × 10 ⁴	7,8 × 10 ²	6,6 × 10 ³	6,7 × 10 ²	4,8 × 10 ³	1,9 × 10 ²	4,1 × 10 ³	8,4 × 10 ²	3,2 × 10 ³									
Дрожжи и плесневые грибы, КОЕ/мл	5,9 × 10 ¹	1,9 × 10 ²	5,1 × 10 ²	1,2 × 10 ²	2,8 × 10 ²	1,2 × 10 ²	2,8 × 10 ²	1,1 × 10 ²	2,7 × 10 ²	1,0 × 10 ²	2,6 × 10 ²									
Температура хранения 37°C																				
КМАФАнМ, КОЕ /мл	4,4 × 10 ³	6,4 × 10 ⁵	2,5 × 10 ⁷	6,3 × 10 ⁵	2,4 × 10 ⁷	5,8 × 10 ⁵	2,1 × 10 ⁷	6,6 × 10 ⁵	2,4 × 10 ⁷	3,1 × 10 ⁵	1,2 × 10 ⁷									
МКБ, КОЕ /мл	1,4 × 10 ²	1,8 × 10 ⁴	2,3 × 10 ⁵	2,4 × 10 ⁴	2,3 × 10 ⁵	2,5 × 10 ⁴	2,2 × 10 ⁵	1,9 × 10 ⁴	1,9 × 10 ⁵	1,2 × 10 ⁴	7,3 × 10 ⁴									
Дрожжи и плесневые грибы, КОЕ/мл	5,9 × 10 ¹	1,6 × 10 ²	1,4 × 10 ²	1,8 × 10 ²	2,5 × 10 ²	1,8 × 10 ²	3,1 × 10 ²	1,7 × 10 ²	1,6 × 10 ²	6,4 × 10 ¹	9,3 × 10 ¹									

Таблица 5

Физико-химические свойства молока – субстрата для приготовления заквасок

Показатель	Значение
Массовая доля жира, %	1,57±0,031
Массовая доля белка, %	2,93±0,023
Массовая доля лактозы, %	4,13±0,038
Массовая доля сухого вещества, %	9,40±0,255
Температура замерзания, °С	-0,46±0,221
Содержание соматических клеток, тыс. в 1 см ³	5,00±0,5
Кислотность, °Т	16,00±0,50

Таблица 6

Химический состав и технологические свойства заквасок *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* при различной концентрации пенициллина

Показатель	Контроль	Концентрация пенициллина в закваске чистой культуры, мг/кг			
		0,002	0,004	0,008	0,016
Массовая доля жира, %	0,42±0,01	0,41±0,01	0,40±0,03	0,36±0,02	0,39±0,01
Массовая доля белка, %	0,68±0,02	0,71±0,01	0,73±0,01	0,74±0,01	0,82±0,01
Массовая доля лактозы, %	3,47±0,02	3,80±0,02	3,82±0,02	3,89±0,02	3,94±0,02
Массовая доля сухого вещества, %	5,33±0,04	5,67±0,02	5,69±0,04	5,75±0,04	5,95±0,03
Температура замерзания, °С	-0,36±0,02	-0,38±0,02	-0,39±0,02	-0,40±0,02	-0,41±0,02
Кислотность, °Т	100,00±2,00	99,00±2,0	94,00±1,0	89,00±3,0	80,00±3,00
Время образования сгустка, час.	3,50±0,40	3,60±0,30	4,00±0,40	4,50±0,40	12,00±0,40
Численность микроорганизмов, КОЕ /мл	$4,3 \times 10^6$	$1,5 \times 10^5$	$5,4 \times 10^4$	$1,9 \times 10^4$	$1,2 \times 10^3$

Клетка лактобактерий, как и любая другая прокариотическая клетка, имеет высокую скорость метаболизма и за 24 часа способна потреблять субстрат, который по массе в 30–40 раз превышает её собственную массу. Степень его интенсивности зависит, главным образом, от присутствия требуемых источников питания в молоке, а кроме того, от наличия микробных ферментов, позволяющих расщеплять эти

вещества для последующего их усвоения. Высокие протеолитические способности микроорганизмов определяют меньшую подверженность бактерий к различным колебаниям компонентного состава молока.

В зависимости от потребности в источниках азота молочнокислые бактерии (МКБ) подразделяют на следующие группы: нуждающиеся в целом комплексе витаминов и аминокислот – бактерии рода *Thermobacterium*; требующие для своего метаболизма цистеин и аммонийные соли – бактерии рода *Streptobacterium*; использующие аммонийные соли как единственный источник азота – МКБ рода *Streptococcus*.

Многие учёные полагают, что молочнокислые бактерии одинаково хорошо растут как в цельном, так и в обезжиренном молоке, следовательно, жир для их развития не требуется. Однако доказано, что некоторые жирные кислоты всё же влияют на метаболизм микроорганизмов молока. Рост молочнокислых стрептококков угнетает присутствие в субстрате каприловой, лауриновой и каприновой кислот, развитие отдельных молочнокислых палочек и кокков стимулируется под действием олеиновой кислоты, а 0,5% стеариновой кислоты приводит к прекращению кислотообразования [2, 3]. Наши исследования показали, что в заквасках *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* массовая доля жира была практически в 2 раза выше, чем в заквасках *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, это даёт основание предположить, что имели место отмеченные выше закономерности (табл. 7).

Таблица 7

Химический состав и технологические свойства заквасок *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* при различной концентрации пенициллина

Показатель	Контроль	Концентрация пенициллина в закваске чистой культуры, мг/кг			
		0,002	0,004	0,008	0,016
Массовая доля жира, %	0,70±0,01	0,72±0,02	0,71±0,01	0,70±0,02	0,66±0,02
Массовая доля белка, %	0,76±0,03	0,78±0,01	0,78±0,02	0,78±0,02	0,88±0,02
Массовая доля лактозы, %	3,51±0,04	3,55±0,03	3,56±0,03	3,57±0,03	3,98±0,21
Массовая доля сухого вещества, %	5,60±0,01	5,67±0,02	5,69±0,02	5,69±0,01	6,25±0,01
Температура замерзания, °С	0,36±0,02	0,36±0,01	0,37±0,01	0,37±0,03	0,41±0,01
Кислотность, °Т	158,00±2,00	157,00±1,50	152,00±2,00	140,00±2,50	128,00±2,00
Время образования сгустка, ч	5,50±0,30	5,80±0,20	16,00±0,30	-	-
Численность микроорганизмов, КОЕ /мл	$2,2 \times 10^6$	$1,6 \times 10^6$	$5,3 \times 10^5$	$7,7 \times 10^4$	$2,1 \times 10^4$

В процессе жизнедеятельности молочнокислого стрептококка массовая доля жира в субстрате была на уровне от 0,36 до 0,42%, что даёт основание предположить факт использования отдельных жировых компонентов и фракций для

обеспечения метаболических процессов данного микроорганизма. В образцах заквасок болгарской палочки массовая доля жира была в 2 раза выше, чем в заквасках термофильного стрептококка, что говорит о лучшей сохранности жировых фракций и их меньшего использования как питательного субстрата для болгарской палочки.

Снижение общего количества белка в контрольном образце заквасок может свидетельствовать о факте использования его в качестве питательного субстрата микроорганизмов. На наш взгляд, молочный белок в данном случае мог быть представлен свободными аминокислотами (напр., аргинин, серин), а также другими фракциями небелкового азота, в том числе мочевиной [2].

Полученные результаты свидетельствуют об избирательной реакции молочнокислых микроорганизмов на определённые концентрации пенициллина, что существенно влияет впоследствии на массовую долю основных питательных веществ (белок, жир, лактоза).

Для анализа влияния четырёх концентраций пенициллина на динамику роста чистых культур *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* и их комплексную закваску было проведено исследование на приборе БакТрак 4300 по методике импедансного анализа (рис. 5).

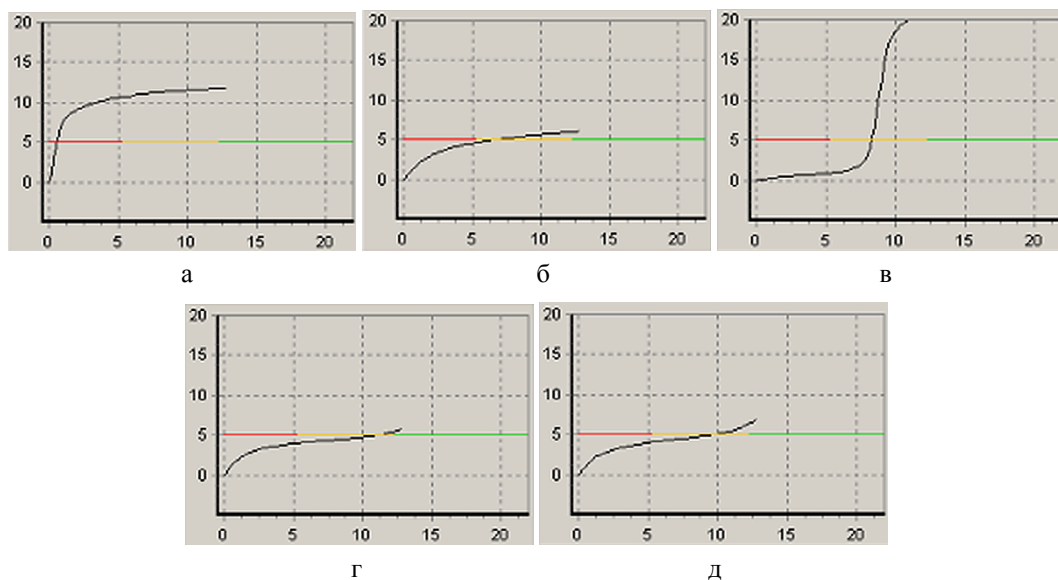


Рис. 5. Кинетика роста термофильного стрептококка при различных концентрациях пенициллина (t инкубации 37°C), мг/кг: а) контроль (без антибиотика), б) 0,002, в) 0,004, г) 0,008, д) 0,016

В таблице 8 представлены данные по влиянию изучаемых концентраций пенициллина на чистые культуры термофильного стрептококка и болгарской палочки, а также на их комплексную закваску.

Полученные результаты подчёркивают губительное действие концентраций пенициллина в молоке 0,008 и 0,016 мг/кг на рост чистой культуры болгарской палочки и на комплексную закваску двух культур *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* в соотношении 1:1.

Это подтверждают и графические результаты опыта: фиксируется слабый рост ниже прямой достижения импеданса (рис. 6, 7).

Импедансный анализ по изучению влияния пенициллина (0,002; 0,004; 0,008; 0,016 мг/кг) на чистые культуры молочнокислых бактерий

Показатели	Контроль	Концентрация пенициллина, мг/л			
		0,002	0,004	0,008	0,016
<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>					
Количество м-мов, КОЕ/мл	$4,3 \times 10^6$	$5,4 \times 10^4$	$1,5 \times 10^4$	$5,4 \times 10^3$	$1,9 \times 10^3$
Время достижения импеданса, ч	0,55	6,57	8,3	9,74	11,14
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>					
Количество м-мов, КОЕ/мл	$3,5 \times 10^6$	$1,6 \times 10^6$	$7,7 \times 10^2$	слабый рост	слабый рост
Время достижения импеданса, ч	0,85	1,88	12,42	-	-
<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> 50% + <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> 50%					
Количество м-мов, КОЕ/мл	$3,6 \times 10^6$	$1,7 \times 10^6$	$2,8 \times 10^3$	слабый рост	слабый рост
Время достижения импеданса, ч	0,79	1,82	10,66	-	-

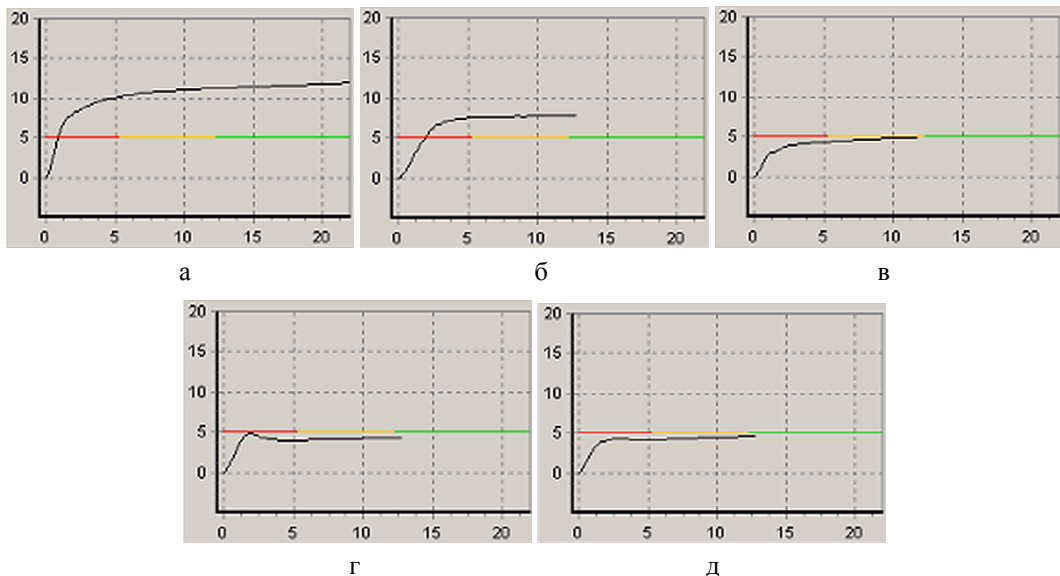


Рис. 6. Кинетика роста *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* под влиянием различных концентраций пенициллина (t инкубации 37°C): а) контроль, б) 0,002 мг/л, в) 0,004 мг/л, г) 0,008 мг/л, д) 0,016 мг/л

Анализ кривой роста культуры *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* под влиянием концентрации пенициллина 0,004 мг/кг указывает на эффект некой

активации развития штамма через 8 часов инкубирования (после момента достижения импеданса): экспоненциальная фаза роста культуры при данной концентрации более ярко выражена, чем в остальных образцах. Наблюдаемая особенность для культуры *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* является интересной и, по нашему мнению, требует более глубоких исследований.

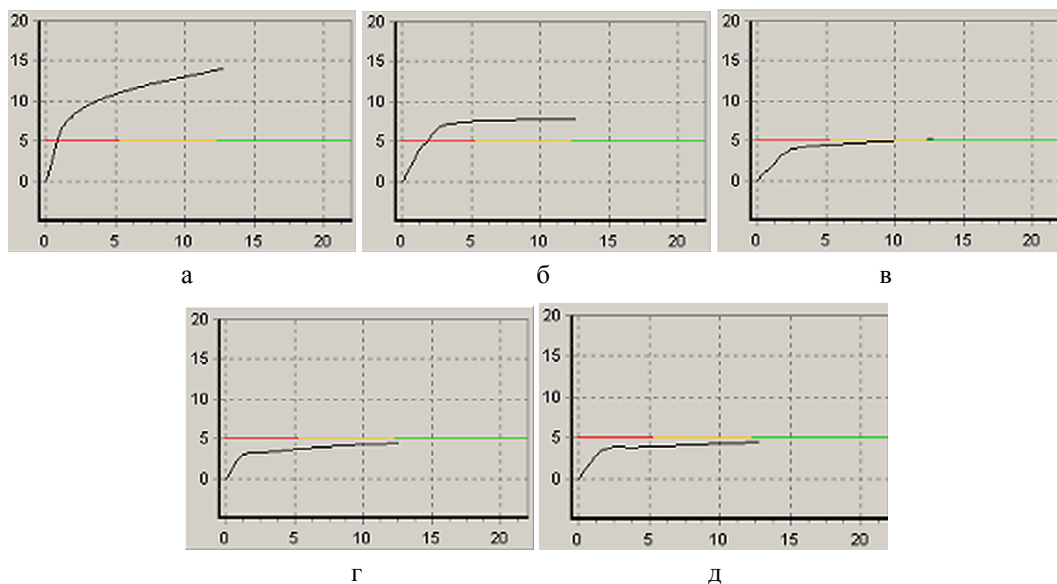


Рис. 7. Кинетика роста закваски *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* 50% + *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 50% под влиянием различных концентраций пенициллина (t инкубации 37°C):
а) контроль, б) 0,002 мг/л, в) 0,004 мг/л, г) 0,008 мг/л, д) 0,016 мг/л

Результаты наших исследований свидетельствуют о некоторых адаптационных закономерностях заквасок *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ввиду анализа динамики их роста и оценки химического состава (массовой доли лактозы, белка, жира).

Заключение

В ходе проведённых исследований можно прийти к выводам, что наблюдается определенная специфичность реакции молочнокислых микроорганизмов на изучаемые концентрации антибиотиков, что существенно влияет на химический состав, технологические характеристики и органолептические свойства молочной продукции.

Проведенные исследования по изучению влияния антибиотиков на химический состав и микробиологические показатели молока, а также по воздействию различных концентраций пенициллина и левомицетина на чистые культуры молочнокислых микроорганизмов позволяют сделать вывод, что на показатель КМАФАнМ в процессе инкубации наиболее существенное влияние оказала температура культивирования. Максимальное количество микроорганизмов в молоке было в контрольном образце при 37°C – $2,5 \times 10^6$ КОЕ/мл.

Выявлено, что с увеличением концентрации пенициллина в опытных образцах закваски массовая доля белка, лактозы и сухого вещества возрастает по сравнению с контролем. В образце закваски *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, приготовленной на молоке с концентрацией антибиотика 0,016 мг/кг, время образования

сгустка значительно увеличилось по сравнению с другими опытными образцами. Характер молочного сгустка с увеличением концентрации пенициллина в исследуемом ряду свидетельствует о снижении его плотности, а в образце с концентрацией ингибитора 0,016 мг/кг образование сгустка в требуемом для технологического процесса временном диапазоне не наблюдалось.

В ходе изучения влияния различных концентраций антибиотиков на чистые культуры молочнокислых бактерий в опытных образцах *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* отмечена лучшая сохранность жира (0,66–0,72%). В процессе метаболизма *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* жир в субстрате расходовался интенсивнее, концентрация в супернатантах его составила 0,36–0,42%, что указывает на факт вовлечения отдельных жировых фракций для обеспечения процессов жизнедеятельности термофильного стрептококка.

Библиографический список

1. Ганина В.И. В помощь микробиологу / В.И. Ганина // Молочная промышленность. – 2016. – № 10. – С. 40–41.
2. Горбатова К.К. Биохимия молока и молочных продуктов / К.К. Горбатова. – М.: Лёгкая и пищевая промышленность. – 1998. – 344 с.
3. Джей Дж.М. Современная пищевая микробиология / Дж.М. Джей М.Жд. Лёсснер, Д.А. Гольден; пер. 7-го англ.изд. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2012. – 886 с.
4. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках: Учебник. 6-е изд., перераб. и доп. / Н.С. Егоров. – М.: Изд-во МГУ; Наука, 2004. – 528 с.
5. Емцев В.Т. Общая микробиология / В.Т. Емцев, Е.Н. Мишустин О.В Селицкая. – Учебник. – Сер. 68 Профессиональное образование. – М.: Юрайт, 2017. – 253 с.
6. Методы микробиологического контроля с использованием петрифильмов МУК 4.2.2884–11. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2011. – 24 с.
7. Микробиологический анализатор БакТрак 4300 Инструкция пользователя. – SY-LAB Instruments GmbH. – 2002. – 74 с.
8. Экология микроорганизмов: учебник для студентов вузов / А.И. Нетрусов, Е.А. Бонч-Осмоловская В.М. Горленко и др.; под ред. А.И. Нетрусова. – М.: Издательский центр «Академия», 2004. – 272 с.
9. Amelunxen R.E. Microbial life at high temperatures: Mechanisms and molecular aspects / R.E. Amelunxen, A.L. Murdock, D.J. Kushner // Microbial life in Extreme Environments. New York: Academic Press. – 1978. – P. 217–278.
10. Callaway T.R. The effect of nisin and monensin on ruminal fermentations in vitro / T.R. Callaway, A.M.S. Carneiro de Melo J.B. Russell // Curr. Microbiol. 35. – 1997. – P. 90–96.
11. Jay J.M. Antibiotics as food preservatives / J.M. Jay, ed. A.H. Rose // Food Microbiology. New York: Academic Press. – 1983. – P. 117–143.
12. Jay J.M. The tentative recognition of psychrotrophic Gram-negative bacteria in 48 h by their surface growth at 10°C / J.M. Jay // Food Microbiology. – 1987. – P. 25–32.
13. Lana R.P. Effect of forage quality and monensin on the ruminal fermentations of fistulated cows fed continuously at a constant intake / R.P. Lana, J.B. Russell // J. Anim. Sci. 75. – 1997. – P. 224–229.
14. Morita R.Y. Psychrophilic bacteria / R.Y. Morita // Bacteriol. Rev. 39. – 1975. – P. 144–167.
15. Mossel D.A. The physiology of the microbial spoilage of foods / D.A.A. Mossel M. Ingram // J. Appl. Bacteriol. 18. – 1955. – P. 232–268.

EFFECT OF ANTIBIOTICS ON MILK MICROORGANISM GROWTH

O.V. SELITSKAYA, A.P. OLESYUK, G.V. RODIONOV, R.M. KERTIYEV

(Russian Timiryazev State Agrarian University)

*The reproduction rate of various microorganisms in milk may differ and depends mainly on the storage temperature. The initial degree of microbial contamination of the product, the presence and concentration of certain chemical substances also serve as factors that cause the development of dairy microorganisms. The research purpose is to identify the nature of the differential effects of antibiotics on the microbiological composition of raw milk, sourdoughs and fermented milk products. The authors studied physicochemical and microbiological indicators, the technological properties of the starter cultures obtained by milk fermentation with the use of antibiotics. According to the study results, during the life of lactic streptococcus the mass fraction of fat in the substrate was at a level of 0.36 to 0.42%, which is almost 2 times lower than in the starter cultures of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. This indicates that individual fat components and fractions are used to ensure the metabolic processes of *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*.*

Key words: *microorganism inhibitors, growth phases, ferments, impedance analysis.*

References

1. Ganina V.I. V pomoshch' mikrobiologu [Useful advice to the microbiologist] / V.I. Ganina // *Molochnaya promyshlennost'*. 2016; 10: 40–41. (In Rus.)
2. Gorbatova K.K. Biokhimiya moloka i molochnykh produktov [Biochemistry of milk and dairy products] / K.K. Gorbatova. – M.: Logkaya i pishchevaya promyshlennost'. 1998: 344. (In Rus.)
3. Dzhey, Dzh. M. Sovremennaya pishchevaya mikrobiologiya [Modern food microbiology] / Dzh. M. Dzhey, M. Zhd. Lossner D.A. Gol'den; translated version of 7th English edition. – M.: BINOM. Laboratoriya znaniy, 2012: 886. (In Rus.)
4. Yegorov N.S. Osnovy ucheniya ob antibiotikakh: Uchebnik [Basics of the study of antibiotics. Study manual]. 6th edition, revised and extended. / N.S. Yegorov. – M.: Izd-vo MGU; Nauka, 2004: 528. (In Rus.)
5. Yemtsev V.T. Obshchaya mikrobiologiya [General microbiology] / V.T. Yemtsev Ye.N. Mishustin O.V Selitskaya. – Uchebnik. – Ser. 68 Professional'noye obrazovaniye. – M.: Yurayt, 2017: 253. (In Rus.)
6. Metody mikrobiologicheskogo kontrolya s ispol'zovaniyem petrifil'mov MUK 4.2.2884–11 [Methods of microbiological control using petrifilms MUK 4.2.2884–11]. – M.: Federal'nyy tsentr gigiyeny i epidemiologii Rospotrebnadzora, 2011: 24. (In Rus.)
7. Mikrobiologicheskiy analizator BakTrak 4300 Instruktsiya pol'zovatelya [BakTrak 4300 Microbiological analyzer user manual]. – SY-LAB Instruments GmbH. – 2002: 74. (In Rus.)
8. Ekologiya mikroorganizmov: uchebnik dlya studentov vuzov [Ecology of microorganisms: study manual for university students] / A.I. Netrusov Ye.A. Bonch-Osmolovskaya V.M. Gorlenko et al.; ed. by A.I. Netrusov. – M.: Izdatel'skiy tsentr "Akademiya", 2004: 272. (In Rus.)
9. Amelunxen R.E. Microbial life at high temperatures: Mechanisms and molecular aspects / R.E. Amelunxen, A.L. Murdock, D.J. Kushner // *Microbial life in Extreme Environments*. New York: Academic Press. – 1978: 217–278. (In English)
10. Callaway T.R. The effect of nisin and monensin on ruminal fermentations in vitro / T.R. Callaway, A.M.S. Carneiro de Melo J.B. Russell // *Curr. Microbiol.* 35; 1997: 90–96. (In English)

11. *Jay J.M.* Antibiotics as food preservatives / J.M. Jay, ed. A.H. Rose // Food Microbiology. New York: Academic Press.1983: 117–143. (In English)
12. *Jay J.M.* The tentative recognition of psychrotrophic Gram-negative bacteria in 48 h by their surface growth at 10°C / J.M. Jay // Food Microbiology. 1987: 25–32. (In English)
13. *Lana R.P.* Effect of forage quality and monensin on the ruminal fermentations of fistulated cows fed continuously at a constant intake / R.P. Lana, J.B. Russell // J. Anim. Sci. 75. 1997: 224–229. (In English)
14. *Morita R.Y.* Psychrophilic bacteria / R.Y. Morita // Bacteriol. Rev. 39. 1975: 144–167. (In English)
15. *Mossel D.A.* The physiology of the microbial spoilage of foods / D.A.A. Mossel M. Ingram // J. Appl. Bacteriol. 18. 1955: 232–268. (In English)

Селицкая Ольга Валентиновна, к.б.н., доцент, заведующая кафедрой микробиологии и иммунологии, ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева. 127550, Россия, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49. E-mail: selitskayaolga@gmail.com Тел.:+7-499-976-09-66.

Олесюк Анна Петровна, ассистент кафедры молочного и мясного скотоводства, аспирант кафедры микробиологии и иммунологии, ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева. 127550, Россия, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49. E-mail: annakharkova58@mail.ru Тел.:+7-499-976-40-40.

Родионов Геннадий Владимирович, д-р с.-х.н., профессор, заведующий кафедрой молочного и мясного скотоводства, ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева. 127550, Россия, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49. E-mail: grodionov@rgau-msha.ru Тел.: +7-499-976-12-62.

Кертиев Руслан Магомедович, д-р с.-х.н., профессор кафедры молочного и мясного скотоводства, ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева. 127550, Россия, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49. E-mail: Vniipleholm@rgau-msha.ru Тел.: +7-499-976-40-40.

Olga V. Selitskaya, PhD (Bio), Associate Professor, Head of the Department of Microbiology and Immunology, Russian Timiryazev State Agrarian University. 127550, Russia, Moscow, Timiryazevskaya Str., 49. E-mail: selitskayaolga@gmail.com Phone: +7-499-976-09-66.

Anna P. Olesyuk, Assistant Professor, the Department of Dairy and Meat Cattle Breeding, postgraduate student of the Department of Microbiology and Immunology, Russian Timiryazev State Agrarian University. 127550, Russia, Moscow, Timiryazevskaya Str., 49. E-mail: annakharkova58@mail.ru Phone: +7-499-976-40-40.

Gennady V. Rodionov, DSc (Ag), Professor, Head of the Department of Dairy and Meat Cattle Breeding, Russian Timiryazev State Agrarian University. 127550, Russia, Moscow, Timiryazevskaya Str., 49. E-mail: grodionov@rgau-msha.ru Phone: +7-499-976-12-62.

Ruslan M. Kertiev, DSc (Ag), Professor, the Department of Dairy and Meat Cattle Breeding, FSBEI HE RSAU-MAA named after K.A. Timiryazev. 127550, Russia, Moscow, Timiryazevskaya Str., 49. E-mail: Vniipleholm@rgau-msha.ru Phone: +7-499-976-40-40.