

Л. А. ЕРЗИНКЯН, А. Б. АКОПОВА, Л. Г. АКОПЯН

ГЕМОЛИТИЧЕСКАЯ СПОСОБНОСТЬ НЕКОТОРЫХ ВЫСОКОФЕНОЛУСТОЙЧИВЫХ МОЛОЧНОКИСЛЫХ СТРЕПТОКОККОВ

При приготовлении лечебных и диетических молочных продуктов на протяжении многих лет использовалась ферментативная способность молочнокислых бактерий. Молочнокислые бактерии кисломолочных продуктов, попадая в желудочно-кишечный тракт человека и животного, часто не приживаются там из-за влияния высокой концентрации фенола, индола и прочих неблагоприятных условий. Нами была проведена работа по получению устойчивых к высоким концентрациям фенола и другим ингибиторам молочнокислых бактерий, что имеет важное практическое значение.

Наряду с характерными производственно-ценными свойствами и фенолустойчивостью молочнокислые бактерии не должны обладать гемолитической способностью, иначе они не могут быть применены в пищу.

Гемолитические бактерии на кровяном агаре образуют прозрачную зону просветления, что обуславливается разрушением эритроцитов. Известно, что молочнокислые бактерии в некоторой степени обладают свойствами вызывать ложный гемолиз, при котором эритроциты изменяют окраску на нехарактерную для гемолиза.

По данным Кашкина с сотр. [2], Ерзинкяна [1] и др., под влиянием ингибиторов изменяется типоспецифичность энтеропатогенных штаммов бактерий. На протяжении ряда лет нами проводились работы по выделению и получению негемолитических высокофенолустойчивых слабокислотообразующих молочнокислых стрептококков для получения лечебных и диетических легкоусвояемых кисломолочных продуктов.

Мы пользовались методом выделения штаммов, разработанным Ерзинкяном [1].

Сущность его заключается в том, что в молоке, содержащем 0,3—0,6% фенола, производится посев из взятых образцов кисломолочных продуктов, вследствие чего высокофенолустойчивые формы молочнокислых бактерий выдерживают, а неустойчивые погибают. Посев на чашках Петри дает колонии, из которых отбираются фенолустойчивые формы молочнокислых стрептококков. Выращивание культур в молоке и на чашках Петри в наших опытах производилось при температурах 15° и в пределах 27—30°. Образцы для выделения фенолустойчивых молочнокислых бактерий брались из мацуна, сыров и творога Лекинанканского, Апаранского, Кироваканского и Эчмиадзинского районов.

Были выделены 14 штаммов молочнокислых стрептококков, выросших при 15°, и 40 штаммов—при 27—30°С.

Все культуры выдерживали фенол в концентрации 0,35%. Сгусток фенолсодержащего молока получался несколько слабый, но ровный, количество бактерий в нем заметно уменьшилось, изменились их морфологические свойства. Так, в двухсуточной культуре штаммы молочнокислых бактерий, в молоке без фенола имеющие в основном диплококковую форму, в молоке с добавлением фенола были представлены в форме коротких (5—6 кокков в цепи) и длинных (15—30 кокков в цепи) цепочек стрептококков. Клетки молочнокислых стрептококков под влиянием фенола окрашивались неравномерно. Встречались как мелкие, так и крупные кокки, некоторые из которых при выделении из фенолсодержащего молока увеличивались в диаметре в 2—3 раза.

Отбор фенолустойчивых молочнокислых стрептококков производился также и по кислотообразующей способности (табл. 1).

Таблица 1.

Фенолустойчивость и кислотообразующая способность молочнокислых стрептококков

Количество штаммов	Источник выделения	Кислотность цельного молока в °Т, контроль	Средняя кислотность	
			молоко + 0,3% фенола	молоко + 0,35% фенола
9	Сыр нитчатый (чечил)	93—100	85	80
14	Сыр овечий	94—107	82	80
31	Мацун	94—104	82	80

Гемолитическая способность отобранных молочнокислых стрептококков изучалась на сывороточном и мясопептонном агаре с добавлением 1% глюкозы и 5% стерильной крови человека. Посевы молочнокислых стрептококков на чашках Петри производились глубинным и поверхностным способом. Поверхностный посев производился в виде бляшек, зигзагов и газона. Инкубация велась при температуре 27—30°C. Наблюдения за изменением среды и ростом колоний проводились через 24 часа. Для заражения среды использовались 2-суточные культуры молочнокислых бактерий.

В качестве контроля была использована культура *Escherichia coli*, штамм 113.

Результаты исследования показали, что на сывороточном агаре без крови (контроль) при глубинном и поверхностном посеве наблюдается хороший рост молочнокислых стрептококков. Поверхностные колонии этих культур крупные, 1 мм в диаметре, выпуклые, с гладкими краями, желтоватого цвета. Глубинные колонии круглые и чечевичеобразные, но по величине мельче (табл. 2).

На среде МПА с добавлением 1%-ой глюкозы без крови (контроль) они слабо растут при температуре 27—30°C, тогда как штаммы, культивируемые при 15°C, давали хороший сильный рост. В обоих условиях роста поверхностные колонии заметно крупнее, чем на сывороточном агаре, цвет колоний желтоватый. Глубинные колонии мельче поверхностных (табл. 3).

В наших опытах при выращивании испытуемых высокофенолустойчивых молочнокислых стрептококков на агаризированных средах с до-

Рост фенолустойчивых молочнокислых стрептококков на сывороточном агаре с кровью

Количество штаммов	Температура выращивания	Поверхностный посев		Глубинный посев
		сплошной	бляшками	
7	27—30°	Сильный рост. Цвет среды не изменился. Вокруг колонии зон просветления нет.	Сильный рост. Цвет среды не изменился. Вокруг колонии зон просветления нет.	Сильный рост. Цвет среды не изменился. Вокруг бляшек зон просветления нет.
17	27—30°	Сильный рост. Цвет среды не изменился. Колонии серого цвета, расплывчатые, круглые, диаметром 1,2 мм.	Сильный рост. Цвет среды с тыльной стороны потемнел. Вокруг бляшек цвет среды не изменился.	Сильный рост. Среда потемнела. Вокруг колонии окрашенная зона темно-серого цвета.
14	15°	Обильный рост. Среда потемнела, колонии расплывчатые, диаметром 1,2 мм.	Обильный рост, колонии белого или серого цвета. Среда потемнела, вокруг бляшек и зигзагов наблюдались светло-белые непрозрачные зоны просветления.	Обильный рост. Среда потемнела. Вокруг колоний зон просветления нет.
16	27—30°	Сильный рост. Среда прозрачная.	Сильный рост. Вокруг бляшек прозрачная, просветленная зона.	Сильный рост. Вокруг колонии прозрачная бесцветная зона просветления.
Е. coli, штамм 113	27—30°	Обильный рост. Вокруг колонии зоны просветления, периферическая часть которой коричневато-зеленая, а центральная—бесцветная.	Обильный рост. Вокруг бляшек зоны просветления. Периферическая часть коричневато-зеленого цвета, центральная—бесцветная.	Обильный рост. Вокруг колоний прозрачная бесцветная зона просветления.
Контроль, без добавления крови	27—30°	Сильный рост. Цвет среды не изменился. Колонии круглые диаметром в 1 мм с гладкими краями желтоватого цвета.	Сильный рост. Цвет среды не изменился.	Сильный рост. Цвет среды не изменился. Колонии круглые диаметром 0,8—0,9 мм, чечевицеобразные.

бавлением 5% человеческой крови из 54 штаммов вызывали гемолиз 16 культур. Эти штаммы на МПА и сывороточном агаре с кровью образовывали хороший рост как при глубинном, так и при поверхностном посеве. Вокруг отдельных колоний и бляшек обнаруживалась зона просветления. Из остальных 38 штаммов молочнокислых стрептококков, культивированных при температуре 27—30°, семь дали хороший рост на сывороточном агаре с кровью и слабый рост на МПА с добавлением 5% крови и 1% глюкозы. В обоих случаях питательная среда не изменила своего цвета. Вокруг выросших колоний и бляшек образование зон просветления не наблюдалось (рис. 1). Остальные 31 штамм молочнокислых бактерий

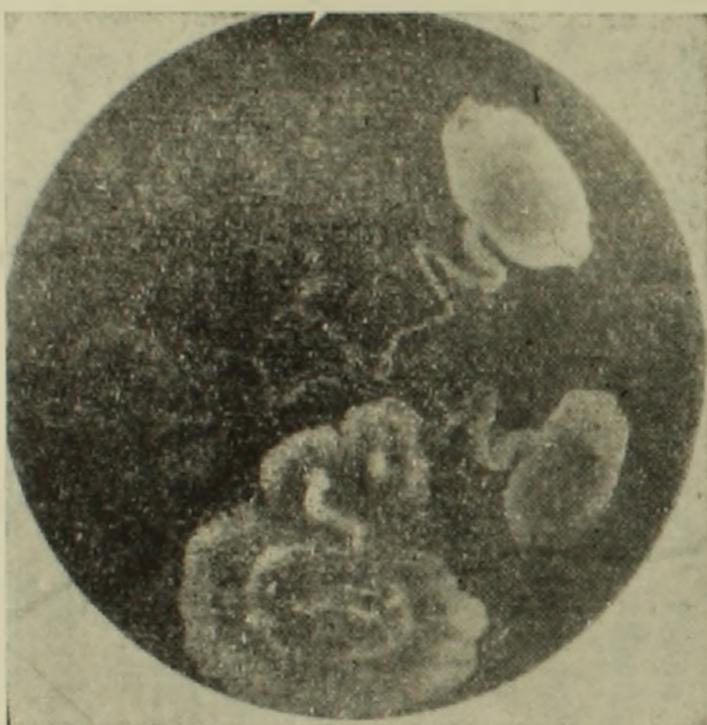


Рис. 1. На среде МПА+1% глюкозы, контроль—*E. coli*, 113. Вокруг бляшек бесцветная зона просветления. Опыт—4 штамма молочнокислых стрептококков. Вокруг бляшек зон просветления нет.

вызывают изменения цвета среды, не характерные, однако, для гемолиза. При глубинном посеве вся среда принимает темно-серую окраску, а вокруг колоний образуется непрозрачная зона просветления, тогда как поверхностные колонии тех же культур при посеве бляшками вызывают потемнения цвета среды только с тыльной стороны роста колонии. При посеве газоном не наблюдается изменения цвета среды.

Колонии вышеупомянутых 31 штамма бактерий сероватого цвета, круглые, крупные, хорошо растут на сывороточном агаре и слабо—на МПА+1% глюкозы.

Несколько отличаются штаммы фенолустойчивых молочнокислых стрептококков, выделенные при 15°. У них наблюдается хороший рост колоний на испытанных двух средах с кровью. При этом как глубинные, так и поверхностные колонии изменяют окраску среды, и она приобретает темно-серый цвет.

Поверхностные колонии на средах с кровью при температуре 27—30° расплывчатые, крупные, по сравнению с контрольными, серого или белого цвета. Вокруг бляшек и зигзагов отмечается слабовыраженная полоска светлой зоны просветления.

Рост фенолоустойчивых молочнокислых стрептококков на мясопептонном агаре +1% глюкозы с кровью

Количество штаммов	Температура выращивания	Поверхностный посев		Глубинный посев
		сплошной	бляшки	
7	27—30°	Слабый рост. Цвет среды не изменился. Вокруг колоний зоны просветления нет.	Слабый рост. Цвет среды не изменился. Вокруг бляшек зоны просветления нет.	Слабый рост. Цвет среды не изменился. Вокруг колоний зоны просветления нет.
17	27—30°	Слабый рост. Цвет среды не изменился. Колонии серого цвета, расплывчатые, круглые, диаметром 1,3 мм.	Слабый рост. Цвет среды с тыльной стороны потемнел. Вокруг бляшек цвет среды не изменился.	Слабый рост. Среда потемнела. Вокруг колоний окрашенная зона темно-серого цвета.
14	15°	Обильный рост. Среда окрасилась в темно-серый цвет. Колонии расплывчатые, диаметром 1,3 мм.	Обильный рост. Колонии белого или серого цвета. Среда потемнела, вокруг бляшек и зигзагов непрозрачные просветленные зоны светло-белого цвета.	Обильный рост. Среда темно-серого цвета. Вокруг колоний зоны просветления.
16	27—30°	Сильный рост. Вокруг колоний прозрачная, бесцветная зона просветления.	Сильный рост. Вокруг бляшек прозрачная, бесцветная зона просветления.	Сильный рост. Вокруг колоний прозрачная, просветленная зона.
E. coli, штамм 113	27—30°	Обильный рост. Вокруг колоний зона окраски. Периферическая часть коричневато-зеленого цвета, центральная—бесцветная.	Обильный рост. Вокруг бляшек зоны просветления. Периферическая часть коричневато-зеленого цвета, центральная—бесцветная.	Обильный рост. Вокруг колоний зоны просветления.
Контроль, без добавления крови	27—30°	Слабый рост. Цвет среды не изменился. Колонии круглые, желтоватые, диаметром 1,2 мм.	Слабый рост. Цвет среды не изменился.	Слабый рост. Цвет среды не изменился. Колонии круглые, диаметром 1,0 мм.

Глубинные колонии окрашивают среду в темно-серый цвет. Вокруг зон просветления не наблюдалось.

Таким образом, среди высокофенолустойчивых форм молочнокислых стрептококков встречаются гемолитические формы. Из проверенных нами фенолустойчивых штаммов молочнокислых стрептококков в 30% случаев культуры оказались гемолитическими.

Гемолитические фенолустойчивые молочнокислые стрептококки, выделенные из кисломолочных продуктов, обладают высокой кислотообразующей способностью. На вторые сутки они образуют ровный, плотный сгусток.

Негемолитические штаммы фенолустойчивых молочнокислых стрептококков можно разделить на 2 группы: штаммы, дающие хороший рост без изменения окраски среды; штаммы, дающие хороший рост с изменением окраски среды на нехарактерную окраску для гемолиза.

Институт микробиологии
АН АрмССР

Поступило 20.VIII 1970 г.

Լ. Ա. ԵՐԶԻՆԿՅԱՆ, Ա. Բ. ԱԿՈՊՈՎԱ, Լ. Հ. ՀԱԿՈՔՅԱՆ

ԲԱՐՉՐԱՖԵՆՈԼԱԴԻՄԱՑԿՈՒՆ ՈՐՈՇ ԿԱԹՆԱԹԹՎԱՅԻՆ
ՍՏՐԵՊՏԱԿՈԿԵՐԻ ՀԵՄՈԼԻՏԻԿ ՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆԸ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Բարձրաֆենոլադիմացկուն կաթնաթթվային ստրեպտոկոկների մեջ պատահում են հեմոլիտիկ ձևեր: Մեր փորձարկած ֆենոլադիմացկուն կաթնաթթվային ստրեպտոկոկների 30%-ը հեմոլիտիկ էին:

Թթու կաթնամթերքներից մեկուսացված ֆենոլադիմացկուն կաթնաթթվային ստրեպտոկոկները օժտված են թթու արտադրելու բարձր ունակությամբ (90—107° թյուրներ), առաջացնելով հավասար, պինդ մակարդ:

Բարձրաֆենոլադիմացկուն կաթնաթթվային ստրեպտոկոկների ոչ հեմոլիտիկ շտամները կարելի է բաժանել երկու խմբի՝ շտամներ, որոնք լավ աճելու հետ միաժամանակ չեն փոխում սննդամիջավայրի գույնը. շտամներ, որոնք լավ աճելու հետ միաժամանակ փոխում են սննդամիջավայրի գույնը հեմոլիզի համար ոչ բնորոշ գույնի:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Ерзинкян Л. А. Биологические особенности некоторых рас молочнокислых бактерий. Изд. АН АрмССР, Ереван, 1971.
2. Кашкин П. Н., Елинов Н. Г., Кашкин К. П. Микробиология. Изд. «Медицина». 1968.
3. Квасников Е. И. Биология молочнокислых бактерий. Ташкент. 1960.
4. Королева Н. С. Техническая микробиология кисломолочных продуктов. Изд. «Пищевая промышленность». М., 1966.
5. Скородумова А. И. Практическое руководство по технической микробиологии молока и молочных продуктов. Пищепромиздат, М., 1963.
6. Фробишер М. Основы микробиологии. Изд. «Мир», М., 1960.