

З. Е. Егорова, доцент; Н. В. Гончарова, мл. науч. сотрудник;  
Т. М. Шачек, ассистент; О. В. Гудинская, студентка

### ИЗУЧЕНИЕ ВИДОВОГО СОСТАВА БАКТЕРИАЛЬНОЙ МИКРОБИОТЫ КОРНЕПЛОДОВ МОРКОВИ

The bacterial microbiota of carrot surface is characterized. Morphological, biochemical properties of 32 isolates from a surface of 85 samples of just reaped carrot and of carrot that has been stored are investigated. The results of study of isolates fermentative activity are presented. The results of researches testify that all isolates from root crops of carrots surface produced catalaza, about 88% – restored nitrates to nitrites, 50% – showed ability to hydrolysis of starch, about 60% – produced proteolytical enzymes. It is shown, that during the storage of root crops the share of sporeforming bacteria increases in the structure of microbiota of carrots surface. The most part of them is identified by the authors as *Bacillus licheniformis* and *Bacillus pumilus*.

**Введение.** Исследования поверхностной микробиоты овощного сырья имеют научную и практическую значимость. Есть данные о том, что отдельные ее представители, в частности штаммы, относящиеся к роду *Bacillus*, могут быть продуцентами ряда бактерицидных веществ и важных ферментов [1, 2]. Еще в середине прошлого столетия отмечалось, что по количеству продуцируемых антибиотических веществ бактерии рода *Bacillus* уступают лишь актиномицетам. Большое значение в народном хозяйстве имеют ферменты бацилл, широко применяемые в легкой и пищевой промышленности, производстве парфюмерии и косметики, сельском хозяйстве, микробиологической промышленности, ветеринарии и медицине. Перспективным является использование живых культур микроорганизмов рода *Bacillus*, обладающих пробиотическими свойствами, для создания профилактических и лечебных препаратов. За последние годы на основе штаммов этой группы бактерий разработано более десятка эффективных препаратов пробиотического действия. Устойчивость споровых микроорганизмов к неблагоприятным факторам окружающей среды, в частности к воздействию высоких температур, открывает новые горизонты производства функциональных продуктов питания.

В то же время отмечают случаи обнаружения в составе эпифитной микробиоты овощного сырья патогенных видов микроорганизмов, а также термоустойчивых штаммов, способных вызывать порчу готовых пищевых продуктов [3]. Часто выделяемые из растительного сырья *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, а также споровые аэробы группы *Bacillus cereus* имеют важное значение в пищевой гигиене в связи с гидролитическим действием на компоненты продуктов питания, возможностью роста при температурах холодильного хранения, а также способностью некоторых штаммов продуцировать токсичные вещества [4].

Среди овощей, наиболее часто применяемых для промышленной переработки, свежая

морковь занимает ведущее место. Наличие многих полезных веществ и соединений обуславливает ее использование в приготовлении разнообразных пищевых продуктов, в том числе для детского и лечебно-профилактического питания. Тем не менее современные данные о свойствах типичных представителей бактериальной поверхностной микробиоты корнеплодов немногочисленны и разрозненны.

С учетом вышеизложенного целью данной работы было изучение видового состава бактериальной микробиоты корнеплодов моркови.

**Объекты и методы исследований.** Объектами исследований были чистые культуры микроорганизмов – представители доминирующей бактериальной микробиоты корнеплодов моркови. Для исследований использовали свежую морковь урожая 2004–2005 г., как свежубранную, так и хранившуюся в течение 1–5 мес в овощехранилищах при температуре  $(0 \pm 1)^\circ\text{C}$ . Всего было изучено 32 чистые культуры микроорганизмов, выделенных с поверхности 85 образцов корнеплодов моркови.

Выделение чистых культур аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов осуществляли, используя общепринятые методы (рис. 1).



Рис. 1. Схема выделения чистых культур микроорганизмов с поверхности моркови

Схема идентификации некоторых видов бацилл

№ теста	Вид теста	Результат теста	Результат идентификации или следующий шаг
1	Каталаза	+	2
		-	17
2	Реакция Фогес-Проскауэра	+	3
		-	10
3	Рост в анаэробном агаре	+	4
		-	9
4	Рост при 50°C	+	5
		-	6
5	Рост в МПБ с 7% NaCl	+	<i>B.licheniformis</i>
		-	<i>B.coagulans</i>
6	Кислота и газ на среде с глюкозой	+	<i>B.polymyxa</i>
		-	7
7	Восстановление NO <sub>3</sub> до NO <sub>2</sub>	+	8
		-	<i>B.alvei</i>
8	Параспоральные тельца в спорангии	+	<i>B.thuringiensis</i>
		-	<i>B.cereus</i>
9	Гидролиз крахмала	+	<i>B.subtilis</i>
		-	<i>B.pumilus</i>
10	Рост при 65°C	+	<i>B.stearothermophilus</i>
		-	11
11	Гидролиз крахмала	+	12
		-	15
12	Кислота и газ на среде с глюкозой	+	<i>B.macerans</i>
		-	13
13	Ширина клеток 1 мкм и более	+	<i>B.megaterium</i>
		-	14
14	рН среды для образования ацетона менее 6,0	+	<i>B.circulans</i>
		-	<i>B.firmus</i>
15	Рост в анаэробном агаре	+	<i>B.laterosporus</i>
		-	16
16	Кислота на среде с глюкозой	+	<i>B.brevis</i>
		-	<i>B.sphaericus</i>
17	Рост при 65°C	+	<i>B.stearothermophilus</i>
		-	18
18	Гидролиз казеина	+	<i>B.larvae</i>
		-	19
19	Параспоральные тельца	+	<i>B.popilliae</i>
		-	<i>B.lentimorbus</i>

Используемые нами для выявления микроорганизмов питательные среды, их состав и приготовление соответствовали требованиям ГОСТ 10444.1.

Принадлежность выделенных микроорганизмов к типичным группам мезофильных или термофильных бацилл устанавливали по культуральным особенностям развития, оптимальному температурному интервалу роста, морфологическим признакам, способности к спорообразованию в аэробных условиях, положительной окраске по Граму, наличию каталазы.

Культуральные признаки бактерий описывали по характеру роста колоний на мясо-пептонном агаре и мясо-пептонном бульоне. Морфологические признаки микроорганизмов определяли путем микроскопирования мазков, окрашенных по Граму. С целью максимального выявления среди исследуемых штаммов спорообразующих видов проводили стимулирование

спорообразования путем лимитирования чистых культур микроорганизмов по источникам углерода и азота [2] с последующим микроскопированием мазков, окрашенных по методу Пешкова [5].

Идентификацию чистых культур до вида осуществляли по культуральным, морфологическим, физиологическим и биохимическим свойствам согласно определителю бактерий Берджи (Bergey), используя ключ для идентификации бактерий рода *Bacillus*, опубликованный в [5] (табл. 1). Дополнительно к указанным признакам исследовали способность микроорганизмов разжижать желатин.

**Результаты исследований и их обсуждение.** Исследования морфологических свойств выделенных микроорганизмов показали, что все изученные штаммы имели палочкообразную форму, большинство из них (более 90%) положительно или вариабельно окрашивались по Граму.

Результаты исследований способности выделенных культур микроорганизмов к спорообразованию представлены в табл. 2.

Таблица 2  
Доля спорообразующих микроорганизмов в выделенных культурах

Образцы моркови	Количество выделенных культур микроорганизмов	
	всего	спорообразующих
Свежеубранные	17	5
Хранившиеся	15	12
<i>Итого</i>	32	17

Как видно из данных табл. 2, в составе поверхностной микробиоты свежеубранных корнеплодов моркови преобладали (более 70%) аспорогенные формы микроорганизмов. В процессе хранения происходило отмирание этих видов микроорганизмов, в результате чего на их долю приходилось лишь 20% штаммов, выделенных с поверхности хранившейся моркови.

Результаты по определению способности выделенных культур микроорганизмов к продукции различных ферментов приведены в табл. 3.

Таблица 3  
Ферментативная способность отдельных представителей поверхностной микробиоты моркови

Образцы моркови	Количество штаммов, обладающих ферментативной активностью			
	А	К	Ж	НР
Свежеубранные	4	17	7	16
Хранившиеся	12	15	12	12
<i>Всего</i>	16	32	19	28

Примечание. А – амилалитическая, К – каталазная, Ж – желатиназная, НР – нитратредуктазная.

Данные табл. 3 свидетельствуют о том, что все представители поверхностной микробиоты корнеплодов моркови продуцировали каталазу, подавляющая часть (около 88%) выделенных чистых культур восстанавливали нитраты в нитриты, половина изученных нами штаммов проявляли способность к гидролизу крахмала, около 60% всех выделенных культур продуцировали желатиназу.

Данные, отражающие способность спорообразующих микроорганизмов к продукции вышеперечисленных ферментов, представлены на рис. 2.

Анализируя приведенные на рис. 2 результаты, следует отметить, что в процессе хранения корнеплодов в составе эпифитной микробиоты увеличилась доля микроорганизмов, об-

ладающих протеолитической активностью (с 60% в свежееубранной моркови до 92% в хранившихся корнеплодах), в то же время уменьшилась доля микроорганизмов, гидролизующих крахмал (с 80 до 50%). При этом все изученные нами виды ферментативной активности проявили 60% спорообразующих микроорганизмов, выделенных с поверхности свежееубранных моркови, и 50% штаммов, выделенных с поверхности хранившихся корнеплодов.

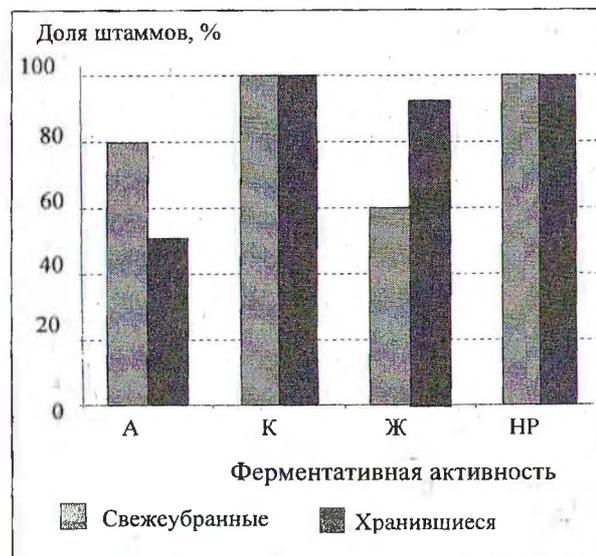


Рис. 2. Способность спорообразующих штаммов к продукции ферментов:

А – амилалитических, К – каталазы, Ж – желатиназы, НР – нитратредуктазы

Также необходимо отметить тот факт, что все спорообразующие штаммы, выделенные с поверхности свежееубранных и хранившейся моркови, обладали способностью в разной степени (табл. 4) восстанавливать нитраты до нитритов.

Таблица 4  
Количество штаммов

Образцы моркови	Степень продукции нитратредуктазы		
	+++	++	+
Свежеубранные	2	2	1
Хранившиеся	3	5	4
<i>Всего</i>	5	7	5

Примечание. +++ – высокая; ++ – средняя; + – низкая.

В ряде источников литературы [6] указывается на возможную роль микроорганизмов в накоплении нитритов в овощных консервированных продуктах при их хранении. Учитывая то обстоятельство, что изученные нами культуры относятся к споровым формам, можно предполагать наличие у них достаточной устойчивости к различным неблагоприятным

воздействиям, в том числе термическим. Следовательно, возможность сохранения этих микроорганизмов в продукте после стерилизации вполне вероятна.

Результаты видовой идентификации выделенных нами спорообразующих штаммов микроорганизмов представлены в табл. 5 и на рис. 3.

Анализируя полученные данные, следует отметить, что большинство (53%) выделенных нами чистых культур микроорганизмов относится к виду *Bacillus licheniformis*, на долю микроорганизмов вида *Bacillus pumilus* приходится около 23,5%. Два неидентифицированных штамма (11,7%) по своим физиолого-биохимическим свойствам близки виду *Bacillus cereus*. Необходимо заметить, что вид *Bacillus licheniformis* является доминирующим среди

споровой эпифитной микробиоты как свежееубранной моркови, так и хранившихся корнеплодов.

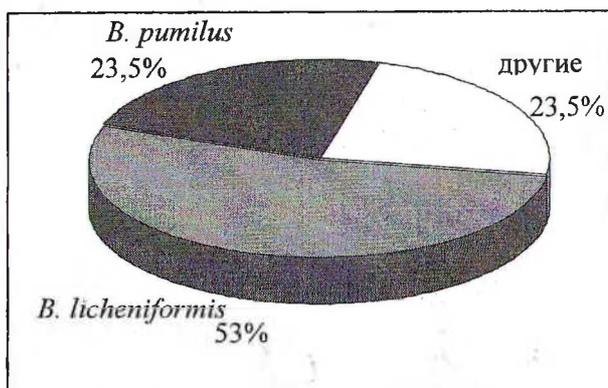


Рис. 3. Видовой состав поверхностной микробиоты моркови

Таблица 5

Физиолого-биохимическая характеристика спорообразующих микроорганизмов – представителей поверхностной микробиоты моркови

Обозначение штамма	Свойства штаммов							
	Образование каталазы	Образование ацетилметилкарбинола	Рост в анаэробном агаре	Рост при 50°C	Рост в питательном бульоне с 7% NaCl	Гидролиз крахмала	Редукция нитратов	Разжижение желатина
<i>Bacillus licheniformis</i>								
Типовой штамм	+	+	+	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+	+	++	+
4	+	+	+	+	+	+	++	+++
7	+	+	+	+	+	++	++	++
8	+	+	+	+	+	+++	++	+
10	+	+	+	+	+	+	+	+++
11	+	+	+	+	+	+	+++	+++
15	+	+	+	+	+	+	+	+++
20	+	+	+	+	+	+	+++	+++
27	+	+	+	+	+	+++	+++	+++
<i>Bacillus pumilus</i>								
Типовой штамм	+	+	-	d	+	-	+	+
29	+	+	-	+	+	-	+++	+++
30	+	+	-	+	+	-	++	+
31	+	+	-	+	+	-	+++	+++
48	+	+	-	+	+	-	+	+++
Другие								
1	+	+	+	-	+	-	++	-
2	+	+	+	-	+	+	++	-
12	+	+	+	-	+	-	+	++
26	+	+	+	-	+	-	+	-

Примечание. Свойства типовых штаммов приведены согласно определителю бактерий Берджи (Bergey); +++ – высокая степень выраженности признака; ++ – средняя; +- – низкая; -- – признак не выражен; d – признак варьирует.

В то же время, микроорганизмы, идентифицированные нами как *Bacillus pumilus*, были выделены только с поверхности корнеплодов в процессе хранения (рис. 4). Полученные нами данные по видовому составу эпифитной микробиоты корнеплодов моркови согласуются с результатами других исследователей [7].

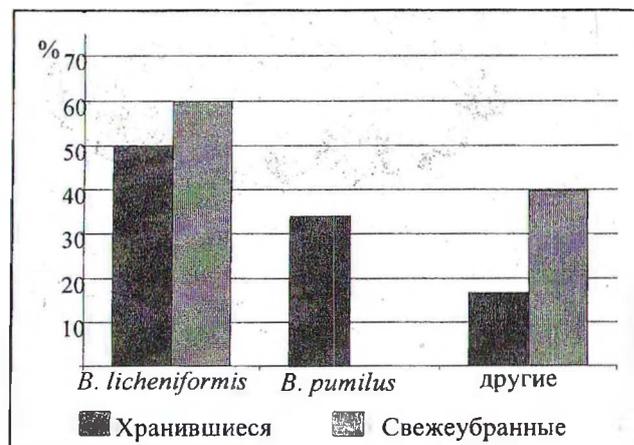


Рис. 4. Видовой состав споровой микробиоты свежесобранной и подвергнутой хранению корнеплодов моркови

**Выводы.** Таким образом, на основании полученных результатов можно сделать заключение о том, что бактериальная поверхностная микробиота корнеплодов моркови представлена главным образом палочковидными формами с преобладанием спорных видов микроорганизмов. При этом по биоразнообразию видовой состав эпифитной микробиоты свежесобранной моркови отличается от микробиоты хранившихся корнеплодов преобладанием неспорных форм бактерий, которые отмирают в процессе хранения овощного сырья, в результате чего в составе бактериальной эпифитной микробиоты хранившихся корнеплодов доминируют спорообразующие виды.

Все изученные нами микроорганизмы являлись каталазоположительными, большинство штаммов в той или иной степени обладали способностью к продукции нитратредуктазы, многие гидролизвали крахмал и разжижали желатин. При этом в составе спорной микробиоты хранившихся корнеплодов доля бактерий, обладающих всеми изученными видами ферментативной активности, была несколько ниже, чем среди микроорганизмов, выделенных с поверхности свежесобранной моркови. Кроме того, нами было отмечено, что ферментативная активность, в частности нитратредуцирующая способность, была более выражена у спорообразующих микроорганизмов – представителей эпифитной микробиоты свежесобранной моркови.

Видовое разнообразие бактериальной поверхностной микробиоты хранившейся моркови достаточно ограничено, что может быть связано со строением и составом покровных тканей корнеплодов, обеспечивающих недоступность питательных веществ для бактерий, а также с неблагоприятными для роста и развития микроорганизмов условиями хранения овощей.

Большинство выделенных нами культур было отнесено к виду *Bacillus licheniformis*. Однако следует указать, что штаммы различались между собой по морфологическим признакам, архитектонике колоний, степени проявления ферментативной активности. Сказанное может быть косвенным свидетельством подверженности эпифитных микроорганизмов естественной изменчивости в процессе хранения растительного сырья.

Учитывая способность микроорганизмов группы *subtilis-licheniformis* выживать в процессе стерилизации и вызывать порчу овощных консервов, а также принимая во внимание сведения о способности некоторых штаммов *Bacillus licheniformis*, традиционно считающихся сапрофитами, продуцировать токсины, полученные нами результаты свидетельствуют о целесообразности проверки термоустойчивости исследованных изолятов *Bacillus licheniformis*.

#### Литература

1. Смирнов, В. В. Спорообразующие аэробные бактерии – продуценты биологически активных веществ / В. В. Смирнов, С. Р. Резник, И. А. Василевская. – Киев: Наук. думка, 1982. – 280 с.
2. Бациллы. Генетика и биотехнология / под ред. К. Харвуда. – М.: Мир, 1992. – 531 с.
3. Research on factors allowing a risk assessment of spore-forming pathogenic bacteria in cooked chilled foods containing vegetables: a FAIR collaborative project / F. Carlin [et al.] // Int. J. of Food Microbiology. – 2000. – Vol. 60, Iss. 2–3. – P. 117–135.
4. Pirttijärvi, T. S. M. Properties of *Bacillus cereus* and other bacilli contaminating biomaterial-based industrial processes / T. S. M. Pirttijärvi, M. A. Andersson, M. S. Salkinoja-Salonen // Int. J. of Food Microbiology. – 2000. – Vol. 60, Iss. 2–3. – P. 231–239.
5. Практикум по микробиологии / А. И. Нетрусов [и др.]; под ред. А. И. Нетрусова. – М.: Академия, 2005. – 608 с.
6. Измерров, И. Ф. Нитриты / И. Ф. Измерров. – М.: Химия, 1990. – 34 с.
7. Deak, T. Simplified identification of aerobic spore-formers in the investigation of foods / T. Deak, Eva Timar // Int. J. of Food Microbiology. – 1988. – Vol. 6, Iss. 2. – P. 115–125.