

УДК 579.67:579.872.1

ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ОСНОВНЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПРОПИОНОВОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ

Хаева О. Э.¹, Икоева Л. П.², Цугжиев Б. Г.³

¹*ФГБОУ ВО «Северо-Осетинский государственный университет имени Коста Левановича Хетагурова», Владикавказ, РСО-Алания, Россия*

²*ФГБНУ ФНЦ «Владикавказский научный центр Российской академии наук – Северо-Кавказский научно-исследовательский институт горного и предгорного сельского хозяйства», с. Михайловское, РСО-Алания, Россия*

³*ФГБОУ ВО «Горский государственный аграрный университет», Владикавказ, РСО-Алания, Россия*

E-mail: oksana_haeva@mail.ru

Представлены материалы по изучению биологических свойств штаммов пропионовокислых бактерий, выделенных из образцов квашенной капусты и томатов. По морфологическим признакам клетки выделенных штаммов – неподвижные палочки, не образующие спор и окрашивающиеся по Граму положительно. Определена способность штаммов ферментировать углеводы в биохимических тестах. В результате проведенных исследований изучаемые штаммы бактерий были отнесены к *Propionibacterium freudenreichii*, *Propionibacterium jensenii*. Изучена устойчивость штаммов микроорганизмов к действию агрессивных химических факторов среды. Культуры пропионовокислых бактерий характеризуются устойчивостью к секретам желудочно-кишечного тракта.

Ключевые слова: род *Propionibacterium*, *Propionibacterium freudenreichii*, *Propionibacterium jensenii*, пропионовокислые бактерии, штамм, идентификация, желчестойчивость.

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы биотехнологические исследования направлены на создание эффективных продуктов функционального питания и совершенствование выпускаемых форм этих пробиотических препаратов на основе живых культур микроорганизмов для коррекции микрофлоры человека и для лечения патологических состояний организма, поэтому поиск новых видов микроорганизмов для использования их в производстве пробиотических препаратов продолжается многими исследователями [1–3]. Пропионовокислые бактерии способны активно продуцировать экзометаболиты – витамин В₁₂, пропионовую и фолиевую кислоты, и снижать генотоксическое влияние ряда химических соединений и УФ – лучей за счет высоких иммуногенных и антимутогенных свойств [4, 5], благодаря чему наряду с бифидо- и лактобактериями успешно используются для создания пробиотических препаратов [3, 6].

Цель нашей работы - выделение чистых культур пропионовокислых бактерий, определение их видовой принадлежности на основе физиолого-биохимических тестов и изучение их биологических свойств.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Источниками для выделения штаммов пропионовокислых бактерий были образцы квашеной капусты и томатов. Выделение культур микроорганизмов проводили в жидких питательных средах – молочно-кальциевом бульоне и кукурузно-глюкозной среде рН до автоклавирования 7,0–7,2. Бактериальные изоляты культивировали при 36±1 °С в течение 5 суток [5].

Выделение чистых культур проводили методом Дригальского, с последующей доочисткой методом посева «штрихом», как это принято в работах по микробиологии [7].

Для исследования морфологических особенностей колоний исследуемых штаммов применяли кукурузно-глюкозный агар. Бактериальные изоляты культивировали при 36±1 °С в течение 5 суток [5]. При их описании учитывали следующие признаки: профиль, форма, размер, поверхность, блеск и прозрачность, цвет, край, структура и консистенция.

Идентификацию пропионовокислых бактерий проводили на основе физиолого-биохимических тестов [7]. Штаммы идентифицировались до вида с помощью диагностических ключей определителя бактерий Берджи [8] и с учетом характеристик этих микроорганизмов в первоисточниках [4].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Впервые в условиях РСО-Алания выделены изоляты пропионовокислых бактерий из образцов квашеной капусты и томатов. Результаты первичного выделения местных штаммов приведены в таблице 1.

Таблица 1

Характеристика выделенных штаммов

№	Шифр штамма	Источник выделения	Микроскопическая
1	АС-1	Квашенная капуста	Монококки
2	АС-2	Квашенная капуста	Диплококки
3	АС-3	Квашенная капуста	Монококки
4	АС-4	Квашенная капуста	Палочки
5	АС-5	Квашенная капуста	Палочки
6	АС-6	Квашенная капуста	Диплококки
7	АС-7	Квашенная капуста	Палочки
8	АС-8	Томаты	Монококки
9	АС-9	Томаты	Палочки
10	АС-10	Томаты	Тетракокки
11	АС-11	Томаты	Монококки
12	АС-12	Томаты	Диплококки

В процессе предварительных исследований из выделенных 12 штаммов было отобрано 4 штамма микроорганизмов палочковидной формы (АС–4, АС–5, АС–7, АС–9), с наиболее стабильными технологическими свойствами (табл. 1).

Для определения таксономического статуса штаммов АС–4, АС–5, АС–7, АС–9 были изучены диагностические важные признаки (культуральные, морфологические, физиологические и биохимические).

Морфологически – это неспорообразующие, неподвижные, грамположительные, слегка овальные палочки, одиночные или расположенные парами. Толщина клеточной стенки с возрастом культуры несколько менялась, находясь в пределах 21,0–25,0 нм. При окрашивании раствором ацетата свинца можно различить два слоя клеточной стенки. На микропрепаратах, приготовленных методом отрицательного контрастирования, обнаруживали большое число мембранных телец. На твердой питательной среде штаммы образуют колонии кремового цвета. Колонии выпуклые, гладкие, полупрозрачные, край гладкий. По штриху рост умеренный, видна цепь изолированных колоний. В жидких питательных средах образуют тяжелый тянущийся осадок.

Метаболизм пропионовокислых бактерий бродильный, но они могут расти и в присутствии кислорода (факультативные анаэробы). Штаммы рода *Propionibacterium* являются гомоферментативными, способны к росту в средах с углеродсодержащими соединениями [4]. Данная характеристика важна для штаммов микроорганизмов, поскольку позволяет определить целесообразность их применения в составе закваски для конкретного молочного продукта [2]. Изучаемые штаммы были проанализированы по способности к сбраживанию углеводов. Штаммы АС–4, АС–5, АС–7 сбраживают лактозу, глюкозу, галактозу, фруктозу, рамнозу, маннозу, не сбраживает мальтозу, сахарозу; маннит, сорбит, арабинозу, раффинозу, ксилозу, дульцит. Штамм АС–9 сбраживает мальтозу, сахарозу, лактозу, глюкозу, галактозу, фруктозу, маннозу, раффинозу, сорбит, не сбраживает маннит, арабинозу, ксилозу, рамнозу, дульцит. Культуры исследуемых штаммов не восстанавливают нитраты и не разжижают желатин.

На основании анализа материалов исследования культуральных, морфологических и биохимических свойств выделенные местные штаммы были отнесены к роду *Propionibacterium*. Штаммы АС–4, АС–5, АС–7 мы отождествляем с видом *Propionibacterium freudenreichii*, штамм АС–9 – с видом *Propionibacterium jensenii*.

Изучение влияния на исследуемые пропионовокислые бактерии фенола, хлористого натрия и соляной кислоты показало, что исследуемые штаммы способны противостоять химически агрессивным факторам среды (табл. 2).

Как следует из данных таблицы 2, штамм АС–9 бактерий рода *Propionibacterium* продолжал расти в присутствии 0,4 %-ной концентрации фенолов в среде культивирования. Штаммы АС–4, АС–5, АС–7 проявили меньшую фенолоустойчивость: максимальная концентрация фенолов, при которой наблюдался рост культур данных штаммов, составила всего 0,2 %. Бактерии рода *Propionibacterium* оказались и достаточно солеустойчивыми. Рост клеток наблюдался при 4 % хлористого натрия в среде культивирования для штаммов

АС-4, АС-5, АС-9, а штамм АС-7 развивался при более низкой концентрации поваренной соли – 5,5 %.

Таблица 2

Устойчивость пропионовокислых бактерий к химически агрессивным факторам среды

Фактор среды	Концентрация в среде культивирования, %	Штаммы пропионовокислых бактерий			
		АС-4	АС-5	АС-7	АС-9
фенол	0,4	–	–	–	+
	0,2	+	+	+	+
хлорид натрия	2,0	+	+	+	+
	4,0	+	+	+	+
	5,5	–	–	+	–

Условные знаки: «+» – положительный результат, «–» – отрицательный результат.

Устойчивость выделенных штаммов пропионовокислых бактерий к действию соляной кислоты была изучена на жидкой питательной кукурузно-глюкозной среде, засеянной тестируемыми бактериями, устанавливая соляной кислотой значения рН от 2,0 до 4,0. Изучаемые штаммы показывают не только хорошую устойчивость к низким рН, но и способность к дальнейшему росту и размножению.

На рисунке 1 представлен график выживаемости исследуемых штаммов пропионовокислых бактерий к действию кислой реакции среды.

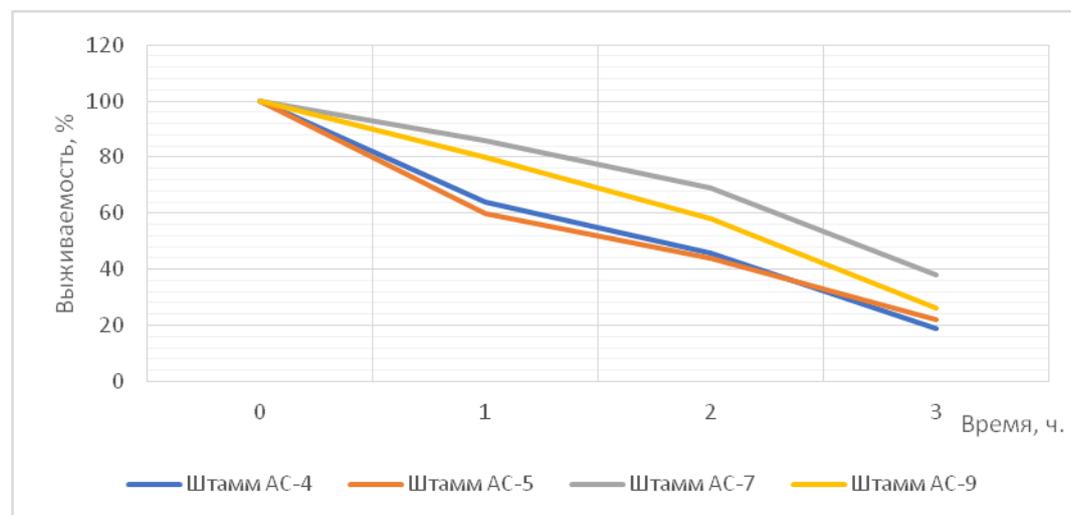


Рис. 1. Выживаемость при рН 2 штаммов рода *Propionibacterium* АС-4, АС-5, АС-7, АС-9.

Как видно из рис.1, заметное снижение количества жизнеспособных клеток происходит с увеличением времени инкубации. Выживаемость культур вида *Propionibacterium freudenreichii* значительно варьировала, так при pH 2 через 1 час инкубации количество жизнеспособных клеток для штамма AC-7 составляет 86 %, а для штаммов AC-4 и AC-5 сохраняется соответственно 64 и 60 %. Устойчивость к кислотности и выживаемость штамм AC-9 вида *Propionibacterium jensenii* составляла 80 % количества жизнеспособных клеток.

Таким образом, изученные физиолого-биохимические свойства (достаточно высокая степень феноло-, соле- и кислотоустойчивости) является доказательством приспособленности изучаемых микроорганизмов к агрессивным химическим факторам среды.

При отборе пробиотических штаммов – одной из важнейших характеристик, является их резистентность к желудочному соку. Желчь поступает в дуоденальный отдел тонкого кишечника, что обуславливает отмирание большого количества бактерий, так как их клеточные мембраны, состоящие из липидов и жирных кислот, очень чувствительны к солям желчных кислот. В связи с этим эффективность пробиотических микроорганизмов зависит от их устойчивости к желчи [3]. Жизнеспособность изучаемых штаммов пропионовокислых бактерий в желудочном соке изучали путем выращивания суточной культуры микроорганизмов на кукурузно-глюкозной среде, содержащей концентрат аптекарской желчи в количестве – 0,3 % и 0,5 %. Бактериальный рост анализировался путем подсчета жизнеспособных колоний после 0, 2 и 4 часа культивирования и при дальнейшем инокулировании в кукурузно-глюкозный агар при 37 °С в течение 48 часов [5]. Штаммы исследуемых культур пропионовокислых бактерий показали значительную устойчивость к действию желчи. Было установлено, что увеличение времени инкубации и концентрата желчи в питательной среде до 0,5 %, приводит к снижению количества жизнеспособных клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, выделенные штаммы бактерий в соответствии с определителем бактерий Берджи [8] были отнесены к роду *Propionibacterium*. Результаты исследования культурально-морфологических и физиолого-биохимических свойств позволяют выделенные и исследуемые штаммы предварительно отнести штаммы AC-4, AC-5, AC-7 к виду *Propionibacterium freudenreichii*, штамм AC-9 – виду *Propionibacterium jensenii*. Исследуемые штаммы показали хорошую устойчивость к агрессивным факторам среды, низким значениям pH и действию желчи, что является косвенным показателем жизнеспособности клеток, которая возможно служит основанием для дальнейшего изучения выделенных новых штаммов пропионовокислых бактерий в качестве основы пробиотических препаратов.

Список литературы

1. Saarela R. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties / R. Saarela, G. Mogensen, R. Fonden, J. Matto, S. Matilla // Journal of Biotechnology. – 2000. – Vol. 84. – P. 197–215.

2. Карапетян К. Дж. Сравнительная оценка ряда свойств новых штаммов молочнокислых бактерий / К. Дж. Карапетян // Биолог. журн. Армении. – 2009. – № 4 (61). – С. 36–42.
3. Хамагаева И.С. Исследование пробиотических свойств комбинированной закваски / И. С. Хамагаева, И. В. Бояринаева, Н. Ю. Потапчук // Техника и технология пищевых производств. – 2013. – № 1 (28). – С. 54–58.
4. Воробьева Л. И. Пропионовокислые бактерии / Л. И. Воробьева. – М.: Изд-во МГУ, 1995. – 288 с.
5. Хаева О. Э. Выделение и изучение пропионовокислых бактерий к кислотному стрессу / О. Э. Хаева, Л. П. Икоева // Известия ГГАУ. – 2018. – Т. 55, Ч. 2, № 2. – С. 152–156.
6. Кузнецова Т. В. Выделение и селекция пропионовокислых бактерий, обладающих анганостической активностью / Т. В. Кузнецова, А. Е. Халымбетова, М. Г. Саубенова // Actualscience. – 2015. – Т. 1, № 2. – С. 19–20.
7. Прунтова О. В. Лабораторный практикум по общей микробиологии / О. В. Прунтова, О. Н. Сахно. – Владимир: Изд-во ВлГУ, 2005. – 76 с.
8. Определитель бактерий Берджи: В 2 т. – Т. 2.– Пер. с англ. / Под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита, Дж. Стейли, С. Уильямса. – М.: Мир, 1997. – 325 с.

IDENTIFICATION AND BASIC BIOLOGICAL PROPERTIES OF PROPIONIC ACID BACTERIA

Khaeva O. E.¹, Ikoeva L. P.², Tsugkiev B. G.³

¹*FSBEI HE North Ossetian State University after Kosta Levonovich Khetagurov, Vladikavkaz, Russia*

²*Federal Agency of Scientific Organizations North Caucasus Research Institute of Mountain and Foothill Agriculture, RAS, village Mikhaylovskoye, Russia*

³*FSBEI HE Gjrsky State Agrarian University, Vladikavkaz, Russia*

E-mail: oksana_haeva@mail.ru

The materials on studying of biological properties of the propionic aced bacteria strains isolated on samples of sauerkraut and tomatoes were displayed. The studies were conducted in the laboratory of Microbiology, Research Institute of Biotechnology, FSBEI HE Gorsky State Agrarian University. On morphological features of a cage of the allocated strains are fixed bacilli, which aren't argumentative and staining by Gram is positive. The ability of strains to ferment carbohydrates in biochemical tests was defined. The cultures of the studied strains are not restored nitrates and are not gelatinolytic. The research results showed that the studied bacterial strains of AC-4, AC-5, AC-7 were related as *Propionibacterium freudenreichii* and a strain of AC-9 – *Propionibacterium jensenii*. Resistance of strains of microorganisms to action of aggressive chemical factors of the environment is studied. The cultures of propionic aced bacteria are characterized by resistance to the secrets of the gastro-intestinal tract. The study of propionic acid bacteria tolerance to acid showed that the different amounts of bile and the incubation time of cells of isolated propionic acid bacteria strains influenced their survival. The survival of a strain of AC-7 of propionic aced bacteria at pH 2 in 1 hour of an incubation was 86 %, and for a strain of AC-4, AC-5 and AC-9 remain 64, 60 and 80 % of the number of viable cells. The study of propionic acid bacteria tolerance to bile showed that the different amounts of

bile and the incubation time of cells of isolated propionic acid bacteria strains influenced their survival.

Keywords: *Propionibacterium*, *Propionibacterium freudenreichii*, *Propionibacterium jensenii*, propionic acid bacteria, strain, identification, bile tolerance.

References

1. Saarela R., Mogensen G., Fonden R., Matto J., Matilla S., Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties, *Journal of Biotechnology*, **84**, 197 (2000).
2. Karapetyan K. J., Comparative evaluation of a number of properties of new strains of lactic acid bacteria *Biological. journal of Armenia*, **4(61)**, 36 (2009).
3. Khamagaev I. S., Boyarinoва I. V., Potapchuk N. Yu., The study of the probiotic properties of combined sourdough, *Technique and technology of food production*, **1 (28)**, 54 (2013).
4. Vorobyova L. I., Propionic acid bacteria, 288 (*publ. of the Moscow State University*, 1995).
5. Khaeva O. E., Ikoeva L. P., Isolation and study of propionic acid bacteria resistance to acid stress, *Proceedings of Gorsky State Agrarian University*, **55 (2)**, **2**, 152 (2018).
6. Kuznetsova T. V., Khalymbetova A. E., Saubenova M. G., Isolation and selection of propionic acid bacteria having an antagonistic activity, *Actualscience*, **1, 2**, 19 (2015).
7. Pruntova O. V., Sahnо O. N., Laboratory workshop on general microbiology, 76 (*publ. of the Vladimir State University*, 2005).
8. Hoult J., Krieg N., Snita P., Staley J., Williams S., Bergey's manual of determinative bacteriology, 1 vol., 325 (*Mir Publishing House, Moscow*, 1997).