

# Использование комплекса питательных сред для выявления заквасочных культур в кисломолочных продуктах

Т.П.Морозова, Л.В.Домотенко, Я.В.Подкопаев, И.С.Косилова, К.В.Детушев, А.П.Шепелин

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»,  
Оболенск, Московская область, Российская Федерация

Изучена возможность использования комплекса питательных сред производства ФБУН ГНЦ ПМБ для выявления, первичной идентификации и подсчета жизнеспособных молочнокислых бактерий и бифидобактерий в коммерческих образцах кисломолочных продуктов.

**Ключевые слова:** молочнокислые микроорганизмы, лактобактерии, термофильный стрептококк, лактококки, бифидобактерии, питательные среды, MRS agar, agar M17, среда ОББ, среда Бликфельдта

**Для цитирования:** Морозова Т.П., Домотенко Л.В., Подкопаев Я.В., Косилова И.С., Детушев К.В., Шепелин А.П. Использование комплекса питательных сред для выявления заквасочных культур в кисломолочных продуктах. Бактериология. 2020; 5(1): 25–32. DOI: 10.20953/2500-1027-2020-1-25-32

## Using of the nutrient complex for the identification of filling crops in dairy products

T.P.Morozova, L.V.Domotenko, Ya.V.Podkopaev, I.S.Kosilova, K.V.Detushev, A.P.Shepelin

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation

The possibility of using the nutrient media complex produced by SCRAMB for the isolation, primary identification and counting of viable lactic acid bacteria and bifidobacteria in the fermented milk products was studied.

**Key words:** Lactic acid bacteria, Lactobacillus, Streptococcus thermophilus, Lactococcus, Bifidobacterium, MRS agar, M 17 agar, OBB medium, Blikfeldt's medium

**For citation:** Morozova T.P., Domotenko L.V., Podkopaev Ya.V., Kosilova I.S., Detushev K.V., Shepelin A.P. Using of the nutrient complex for the identification of filling crops in dairy products. Bacteriology. 2020; 5(1): 25–32. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2020-1-25-32

Качество продуктов питания является важнейшим фактором формирования здорового образа жизни и здоровья российских граждан. Принятая постановлением Правительства РФ в 2016 г. «Стратегия повышения качества пищевой продукции в Российской Федерации до 2030 года» представляет собой основу для формирования национальной системы управления качеством пищевой продукции. В соответствии со «Стратегией» производимые и обрабатываемые на рынке пищевые продукты должны быть, с одной стороны, безопасными по микробиологическим показателям и, с другой, надлежащего качества [1]. Микробиологические показатели качества установлены техническими регламентами таможенного союза [2, 3].

### Для корреспонденции:

Домотенко Любовь Викторовна, кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории разработки питательных сред ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская область, г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ  
Телефон: (4967) 36-0003  
E-mail: domotenko@obolensk.org

Статья поступила 30.01.2020 г., принята к печати 27.03.2020 г.

Для кисломолочных продуктов понятие микробиологического качества связано с отсутствием патогенных и условно-патогенных микроорганизмов и наличием жизнеспособных заквасочных молочнокислых микроорганизмов. Состав заквасок может быть представлен одним или несколькими микроорганизмами, обеспечивающими свойства кисломолочного продукта. К наиболее важным бактериальным заквасочным культурам относятся молочнокислые бактерии, пропионовокислые бактерии и бифидобактерии.

В соответствии с техническими регламентами содержание молочнокислых микроорганизмов определяется классическим культуральным методом с использованием питательных сред. Получение достоверных и воспроизводимых

### For correspondence:

Lubov V. Domotenko, PhD (Chemistry), Leading Researcher of the Laboratory of Culture Media of the laboratory of culture media development, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор

Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation  
Phone: (4967) 36-0003  
E-mail: domotenko@obolensk.org

The article was received 30.01.2020, accepted for publication 27.03.2020

результатов большинства испытаний зависит от качества питательных сред. В лабораториях, занятых микробиологическими исследованиями пищевых продуктов, объектов окружающей среды, основными целями являются обнаружение, выделение, подсчет, поддержание и выращивание самых разнообразных микроорганизмов. Поэтому стандартные питательные среды, удовлетворяющие установленным критериям эффективности, являются необходимым условием надежных результатов любого микробиологического исследования.

Спектр питательных сред, применяемых для определения и подсчета технологически значимой микрофлоры в молочнокислых продуктах, обозначен в действующих нормативных документах. Для выявления и подсчета *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ГОСТ ISO 27205-2013 предписывает использование MRS агара, для *Lactobacillus acidophilus* – селективный вариант MRS агара с клиндамицином и ципрофлоксацином, для лактококков и *Streptococcus thermophilus* – агара М17, а для бифидобактерий – TOS с мупироцином [4]. Для выявления и подсчета молочнокислых микроорганизмов ГОСТ 33951-2016 определяет использование питательных сред лабораторного приготовления на основе гидролизованного молока и различных пептонов [5]. Требованиями ГОСТ Р 56139-2014 для подсчета молочнокислых бактерий регламентируется применение MRS агара, стерилизованного обезжиренного молока, а для бифидобактерий – модифицированной печеночно-цистеиновой среды Блаурокка, бифидум-среды, TOS-пропионатного агара с мупироцином лития [6]. Питательная среда TOS–MUP также рекомендована для подсчета презумптивных бифидобактерий требованиями ГОСТ ISO 29981-2013 [7]. Для подсчета бифидобактерий ГОСТ 33924-2016 устанавливает метод селективного подсчета бифидобактерий с использованием питательной среды ОББ с диклоксациллином или неомицином.

Во ФБУН ГНЦ ПМБ разработаны и выпускаются промышленные сухие питательные среды для культивирования и подсчета молочнокислых микроорганизмов и бифидобактерий:

1) MRS агар – питательная среда для выделения, подсчета и культивирования лактобацилл сухая (сертификат соответствия РОСС RU АГ 58. НОО 489) предназначена для культивирования, выделения и подсчета всех видов *Lactobacillus* из пищевых продуктов и других тестируемых материалов. Выпускается в двух модификациях: модификация 1 – плотная среда; модификация 2 – полужидкая среда;

2) агар М17 – питательная среда для определения и подсчета молочнокислых стрептококков сухая (сертификат соответствия РОСС RU. АГ 58. НОО 636) предназначена для определения и подсчета молочнокислых стрептококков в йогурте и в других молочнокислых продуктах, содержащих *Streptococcus thermophilus*;

3) среда ОББ – питательная среда для определения и подсчета бифидобактерий сухая (сертификат соответствия РОСС RU. АГ 58. НОО 634) предназначена для определения и подсчета бифидобактерий. Выпускается в двух модификациях: модификация 1 – плотная среда; модификация 2 – полужидкая среда;

4) среда Бликфельдта – питательная среда для выявления молочнокислых бактерий сухая (сертификат соответствия РОСС RU. АГ 58. НОО 635) предназначена для выявления общего количества молочнокислых микроорганизмов в исследуемом образце. Выпускается в двух модификациях: модификация 1 – бульон; модификация 2 – полужидкая среда.

Целью данной работы являлось изучение возможности использования комплекса питательных сред производства ФБУН ГНЦ ПМБ (Оболенск) для выявления и подсчета жизнеспособных молочнокислых бактерий и бифидобактерий в коммерческих образцах кисломолочных продуктов.

## Материалы и методы

В работе использовали следующие питательные среды: MRS агар (модификация 1), серия 3, годен до 07.2021; MRS агар полужидкий (модификация 2) серия 3, годен до 07.2021; агар М17 серия 1, годен до 06.2021; среда ОББ (модификация 1) серия 2, годен до 06.2021; среда ОББ полужидкая (модификация 2) серия 2, годен до 06.2021; среда Бликфельдта полужидкая (модификация 2) серия 1, годен до 06.2021.

Среды готовили в соответствии с инструкциями по приготовлению для каждой используемой среды.

Дополнительно готовили MRS агар (модификации 1 и 2) с селективной добавкой (5,0 мг/л диклоксациллина, 3,0 г/л хлористого лития и 0,3 г/л цистеина гидрохлорида) и среду ОББ (модификация 1) с селективной добавкой (10 мг/л неомицина).

В работе использовали диклоксациллина натриевую соль моногидрат (Dicloxacillin sodium salt monohydrate, Sigma, кат. № D 9016), неомицина трисульфат гидрат (Neomycin trisulfate salt hydrate, Sigma, кат. № N 1876).

Стерильные полужидкие среды в пробирках (среда ОББ модификации 2 и MRS агар модификации 2) перед работой регенерировали путем прогрева в кипящей водяной бане в течение 10 мин.

Анаэробные условия для инкубирования чашек Петри с бактериологическими посевами создавали в анаэростатах АЭ-01 с использованием газогенерирующих пакетов (BD GasPak EZ Anaerobe Pouch System with Indicator Sachets, Becton Dickinson, кат. № 260683).

## Образцы исследуемых коммерческих молочнокислых продуктов

Все образцы исследовали в пределах срока годности. На этикетках для некоторых образцов приведен состав молочнокислых заквасок и пробиотиков, для других же отмечено использование йогуртовой закваски без обозначения спектра используемых заквасочных культур. Характеристика исследуемых образцов представлена в таблице 1.

## Пробоподготовка образцов

Подготовку образцов к анализу проводили согласно ГОСТ ISO 68871-2017 [9]. Перед исследованием упаковку образца протирали 70%-м этанолом, содержимое тщатель-

Таблица 1. Характеристика образцов исследуемых молочнокислых продуктов

№ образца	Продукт, ГОСТ или ТУ	Производитель	Состав заквасочных и пробиотических микроорганизмов	Концентрация микроорганизмов в продукте, заявленная производителем, КОЕ/г
1.	«Варенец Останкинский термостатный», ГОСТ 31667-2012	ООО Останкинский молочный комбинат, Москва	Термофильный стрептококк	Молочнокислые м/о – не менее $1,0 \times 10^7$
2.	«Bio Баланс. Биоюгурт, обогащенный бифидобактериями», ТУ 10.51.52-042-13605199	Молочный комбинат Владимирский, филиал АО «Данон Россия»	Йогуртовые культуры и пробиотические культуры (бифидобактерии)	Молочнокислые м/о – не менее $1,0 \times 10^7$ ; бифидобактерии не менее $1,0 \times 10^6$
3.	«Биолакт Тема кисломолочный», ТУ 10.86.10-036-13605199	АО «Данон Россия», филиал, Санкт-Петербург	Термофильный стрептококк и ацидофильная палочка	Молочнокислые м/о – не менее $1,0 \times 10^7$ ; лактобактерии – не менее $1,0 \times 10^7$
4.	«Гадкий Я. Йогурт. Персик-маракуйя двухслойный», ТУ 9222-001-00419185-14	ООО «Пробиотик плюс», Московская область	Термофильный стрептококк и болгарская палочка	Молочнокислые м/о – не менее $1,0 \times 10^7$
5.	«Биоюгурт Активиа термостатный», ТУ 10.51.52-008-48779702	АО «Данон Россия», Московская область	Йогуртовая закваска, бифидобактерии ActiRegularis	Молочнокислые м/о – не менее $1,0 \times 10^7$ ; бифидобактерии – не менее $3,4 \times 10^7$
6.	«Actimel. Кисломолочный напиток. Гранат», ТУ 10.51.52-013-45779702	АО «Данон Россия», Московская область	Йогуртовая закваска, обогащенная <i>Lactobacillus casei imunitass</i>	Молочнокислые м/о – не менее $1,0 \times 10^7$ ; лактобактерии – не менее $1,0 \times 10^7$
7.	«Напиток Имунеле кисломолочный фруктовый ароматизированный», ТУ 10.86.10-142-05268977-2014	АО «Вимм-Билль-Данн», Москва	Закваска и пробиотические культуры ( <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Lactobacillus casei</i> )	Молочнокислые м/о – не менее $1,0 \times 10^6$ ; пробиотические культуры – не менее $1,0 \times 10^6$

Обозначение: м/о – микроорганизмы.

но перемешивали, в асептических условиях отбирали  $10 \pm 1$  г исследуемого образца в стерильную колбу объемом 200 см<sup>3</sup>, добавляли забуференную пептонную воду (ГНЦ ПМБ, Оболенск, сертификат соответствия РОСС RU. АГ 58. НОУ490) до получения общей навески  $100 \pm 1$  г и тщательно перемешивали на встряхивателе «Vortex». После этого готовили ряд десятикратных разведений в 0,9%-м растворе хлорида натрия до разведения  $10^{-8}$  (включая исходное разведение при пробоподготовке) и производили посев трех последних разведений на питательные среды.

### Посев и учет результатов

Все исследуемые образцы высевали на следующие среды: MRS агар модификаций 1 и 2, агар M17, среду Бликфельдта модификации 2, а образцы 2 и 5, обогащенные бифидобактериями, дополнительно высевали на среду ОББ (модификации 1 и 2) с селективной добавкой и без нее, а также на MRS агар (модификации 1 и 2) с селективной добавкой. Посев и учет результатов производили в соответствии с ГОСТ 33951-2016, ГОСТ ISO 7889-2015 [6, 10].

По 1,0 мл из разведений  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  и  $10^{-8}$  каждого исследуемого образца вносили в стерильные чашки Петри или в пробирки, а затем добавляли стерильную плотную питательную среду (MRS агар модификации 1, агар M17 или ОББ модификации 1), охлажденную до температуры  $45 \pm 1^\circ\text{C}$ , по 15 мл в чашку Петри или по 9 мл в пробирку, аккуратно перемешивали и оставляли до полного застывания. Посевы в чашках Петри в MRS агаре и среде ОББ инкубировали в анаэробных условиях, а посевы в агаре M17 – в аэробных условиях при температуре  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  в течение 48–72 ч. В аэробных и аналогичных временных и температурных условиях инкубировали посевы в пробирках. Посевы образцов (кроме образца 1) в агаре M17 дополнительно инкубировали при температурах  $45 \pm 1^\circ\text{C}$  в течение 48 ч и комнатной температуре ( $20\text{--}25^\circ\text{C}$ ) в течение 5 дней для дифференциации термофильного стрептококка и лактококков.

В полужидкие среды (MRS агар модификации 2, среда ОББ модификации 2, среда Бликфельдта модификации 2), разлитые в пробирки, вносили по 1 мл каждого разведения

исследуемого образца в толщу столбика, аккуратно перемешивали и инкубировали посевы в аэробных условиях при температуре  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  в течение 24–48 ч.

Учет результатов производили визуально, учитывая характер роста и количество выросших колоний.

Расчет концентрации микроорганизмов, присутствовавших в исходной пробе, проводили по следующей формуле:

$$N = \frac{\sum C}{V \times d \times (n_1 + 0,1n_2)},$$

где  $N$  – концентрация микроорганизмов в исходной пробе;  $\sum C$  – общее подсчитанное количество выросших колоний во всех чашках Петри или пробирках;  $V$  – объем посевного материала, внесенного в чашку Петри или пробирку, мл;  $n_1$  – количество чашек Петри или пробирок, на которых производили подсчет колоний в меньшем разведении;  $n_2$  – количество чашек Петри или пробирок, на которых производили подсчет колоний в большем разведении;  $d$  – степень разведения, из которого осуществляли бактериологический посев.

### Идентификация микроорганизмов

Идентификацию, т.е. подтверждение выявления на питательных средах лактобацилл, или термофильного стрептококка, или бифидобактерий, или молочнокислых микроорганизмов, проводили по характеру роста на соответствующих питательных средах и методом световой микроскопии с окраской по Граму.

Окончательную идентификацию осуществляли методом времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF MS) с использованием масс-спектрометрической системы идентификации MALDI Biotyper 3.0 Microflex (Bruker).

В процессе проведения идентификации учитывали значение индекса совпадения (Score Value): показатель свыше 2,300 свидетельствовал о достоверной видовой идентификации; от 2,000 до 2,299 – о достоверной идентификации до рода и вероятной идентификации до вида; от 1,700 до 1,999 – о вероятной идентификации до рода; от 0,000 до 1,699 – о получении недостоверного результата.

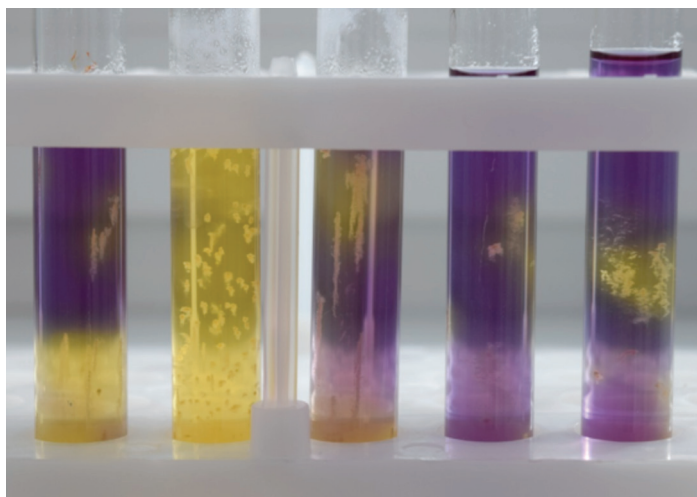


Рис. 1. Колонии с различной морфологией, выросшие из образцов 4 и 6 на среде Бликфельдта модификации 2 через 24 ч инкубирования.

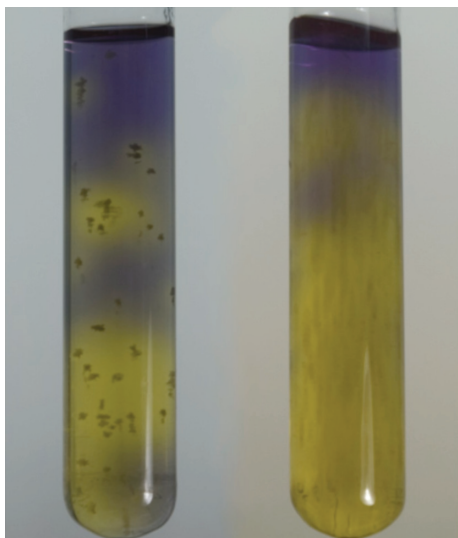


Рис. 2. Рост тест-штаммов на среде Бликфельдта модификации 2 через 18 ч инкубирования: слева – *S. thermophilus* ATCC 19258; справа – *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842.

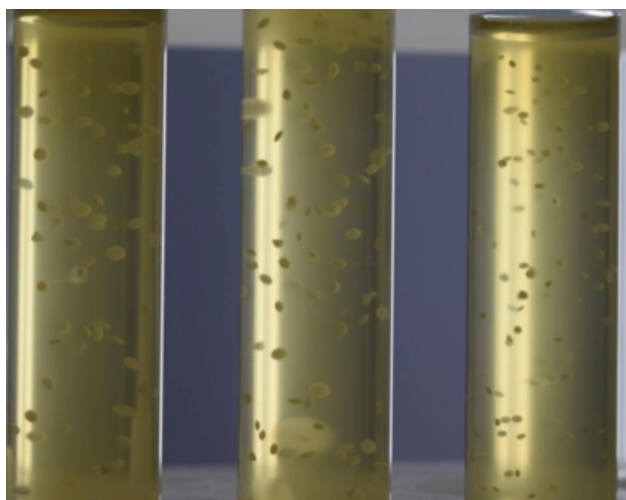


Рис. 3. Колонии термофильного стрептококка, выросшие из образца 7 в пробирках с агаром М17 через 24 ч инкубирования, разведение  $10^{-7}$ .

Для проведения идентификации методом MALDI TOF MS выделенные культуры пересевали поверхностным способом на питательную среду № 1 ГРМ с добавлением 4,0 г/л глюкозы и 5,0 г/л лактозы и на MRS агар (модификация 1). Посевы инкубировали в микроаэрофильных условиях.

### Результаты и обсуждение

В ходе исследования проанализировано 7 образцов молочнокислых продуктов, два из которых (образцы 2 и 5) обогащены бифидобактериями и два (образцы 6 и 7) – пробиотическими культурами *Lactobacillus rhamnosus* и *Lactobacillus casei*. При посеве исследуемых образцов на питательные среды получены следующие результаты.

На среде Бликфельдта в модификации 2 рост микроорганизмов наблюдали через 24 ч во всех образцах в виде «тяжей», «шариков» и «звездочек» различных размеров и степени четкости с изменением цвета среды вокруг колоний с пурпурного на желтый при росте единичных колоний из разведения  $10^{-8}$  и с изменением цвета всего столбика среды и наличием прозоны в его верхней части из разведения  $10^{-6}$  (рис. 1). По наличию колоний разных типов в одном образце можно предположить использование не менее двух видов заквасочных культур. При посеве на данную питательную среду тест-штаммов отмечали рост *Streptococcus thermophilus* ATCC 19258 в виде компактных «шариков» и «звездочек», в то время как штамм *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842 рос в виде «тяжей» (рис. 2).

На агаре М17 посевы образцов (кроме образца 1) инкубировали при двух температурах –  $45 \pm 1^\circ\text{C}$  и комнатной ( $20\text{--}25^\circ\text{C}$ ) – с целью дифференциации термофильного стрептококка от лактококков, которые могут входить в состав заквасок. Требованиями ГОСТ ISO 27205-2013 для выявления лактококков из многовидовой закваски определена температура  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ . Посевы образца 1 инкубировали при  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ . Колонии микроорганизмов, выросших на среде при температуре инкубации  $45 \pm 1^\circ\text{C}$ , имели вид «дисков» (рис. 3). При комнатной температуре колонии были значительно мельче и напоминали «манную крупу». В мазках, приготовленных из колоний, выросших при температуре  $45 \pm 1^\circ\text{C}$ , обнаруживаются крупные единичные и соединенные в цепочки кокки (рис. 4а), а при комнатной температуре – более мелкие кокки (рис. 4б).

На MRS агаре в модификации 1 через 48–72 ч инкубации наблюдали рост культур изо всех образцов в толще агара в виде «чечевицы», а на поверхности – в виде мелких белых полупрозрачных колоний. На полужидком MRS агаре (модификация 2) рост обнаружен через 24–28 ч инкубации в виде «комет» и «тяжей» (рис. 5). При микроскопии мазков из выросших колоний наблюдали грамположительные неспорообразующие палочки – от длинных и тонких до коротких, типичных для лактобацилл (рис. 6).

При посеве образца № 1 на MRS агаре в обеих модификациях вырастали очень мелкие колонии, образованные кокками.

С использованием селективного варианта полужидкого MRS агара через 24 ч инкубации в образцах 2 и 5 наблюдали рост культур в виде «комет» и «тяжей». На селективном

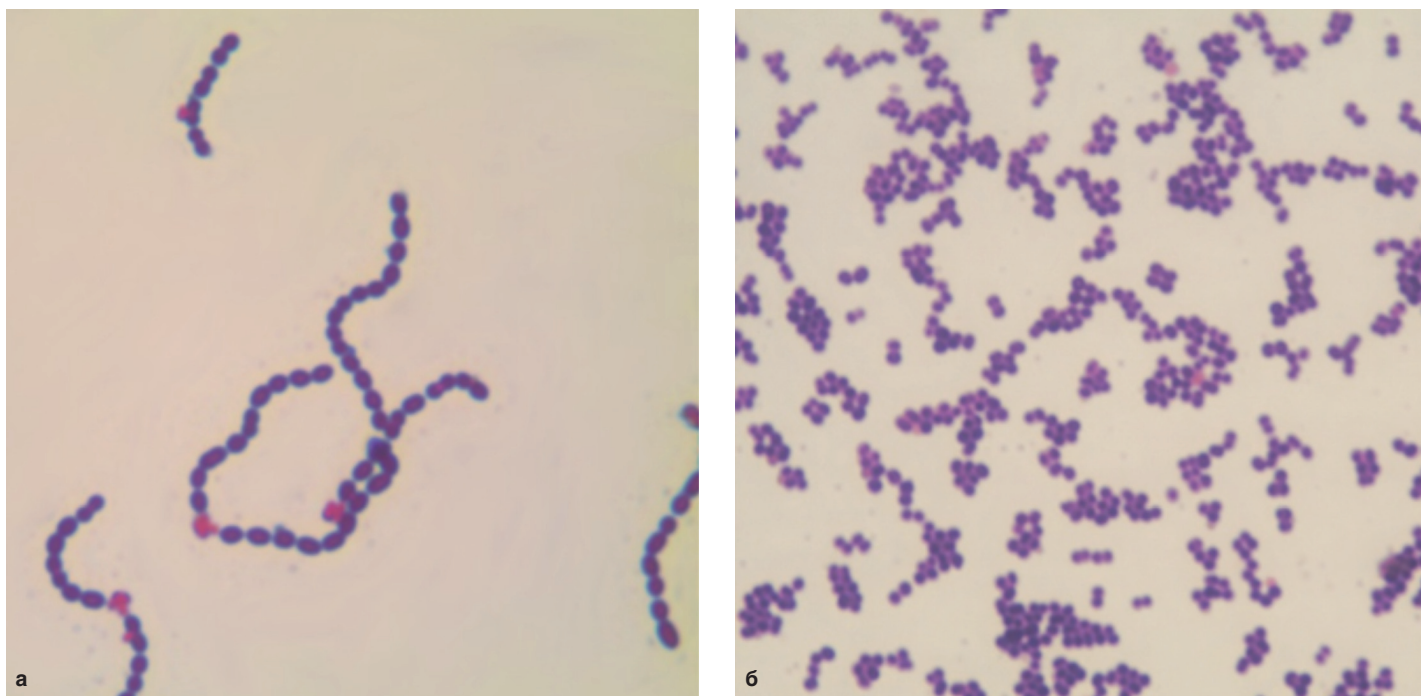


Рис. 4. Микрофотография окрашенных по Граму клеток бактерий, выросших из образца 5 на Агаре M17: а – при температуре  $45 \pm 1^\circ\text{C}$ ; б – при комнатной температуре. Увеличение  $\times 1000$ .

варианте MRS агара в модификации 1 через 48–72 ч инкубации в анаэробных условиях выросло небольшое количество колоний, предположительно относящихся к роду *Bifidobacterium*.

На среде ОББ в модификации 1 при анализе образцов 2 и 5, в которых производителем заявлено содержание бифидобактерий, через 48–72 ч инкубации посевов рост культур наблюдали в виде «дисков» и «шариков» в толще агара, а на среде ОББ в модификации 2 через 24–48 ч – в виде «тяжей», «комет» и очень мелких колоний в виде «манной крупы» с наличием прозоны в верхней части столбика среды. Аналогичный характер роста отмечен на селективном варианте среды ОББ с неомицином (рис. 7).

В мазках всех культур, выделенных на селективных средах из образцов 2 и 5, присутствовали типичные клетки бифидобактерий в виде грамположительных, неподвижных, неспорообразующих палочек с выраженным полиморфизмом: прямые, изогнутые или разветвленные палочки, раздвоенные Y- или V-образной формы, булавовидные, расположенные одиночно, цепочками или скоплениями в виде «китайских иероглифов».

Выросшие колонии из всех образцов на разных средах были подсчитаны, используя разведение, из которого росло 15–200 колоний на чашке, и рассчитывали суммарное количество характерных микроорганизмов в исследуемом образце. Результаты представлены в табл. 2. Анализ полученных данных по количественному содержанию молочнокислых микроорганизмов и бифидобактерий в исследуемых образцах показал полное их соответствие заявленным производителями показателям.

На основе характера роста на питательных средах и результатов микроскопического исследования проведена предварительная идентификация выросших культур до рода (табл. 3). Из всех образцов выделен и идентифицирован

*Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus*. Вторая обязательная для йогуртовой закваски культура – болгарская палочка – выделена и идентифицирована только как *Lactobacillus* spp. В образцах 5 и 6 идентифицированы лактококки, а в образцах 2 и 5 – бифидобактерии.

Для уточнения видовой принадлежности выделенные культуры после субкультивирования дополнительно идентифицированы методом MALDI-TOF MS. Идентификацию бифидобактерий масс-спектрометрией не осуществляли, поскольку не производили пересев на плотные питательные среды для бифидобактерий поверхностным способом. Полученные данные представлены в таблице 3.

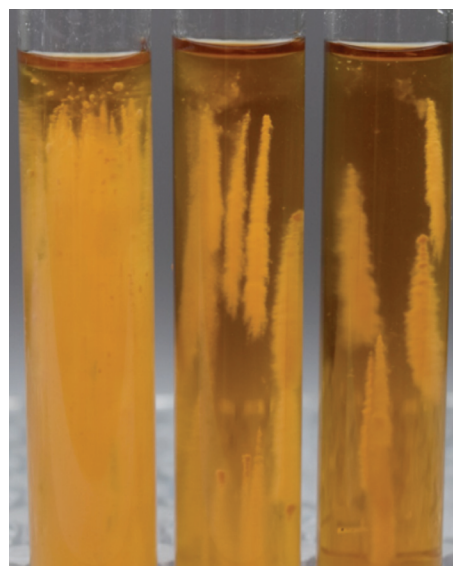


Рис. 5. Колонии лактобактерий, выросшие из образца 6 на MRS агаре модификации 2 через 48 ч инкубирования. Слева направо: разведения  $10^{-6}$ – $10^{-8}$ .

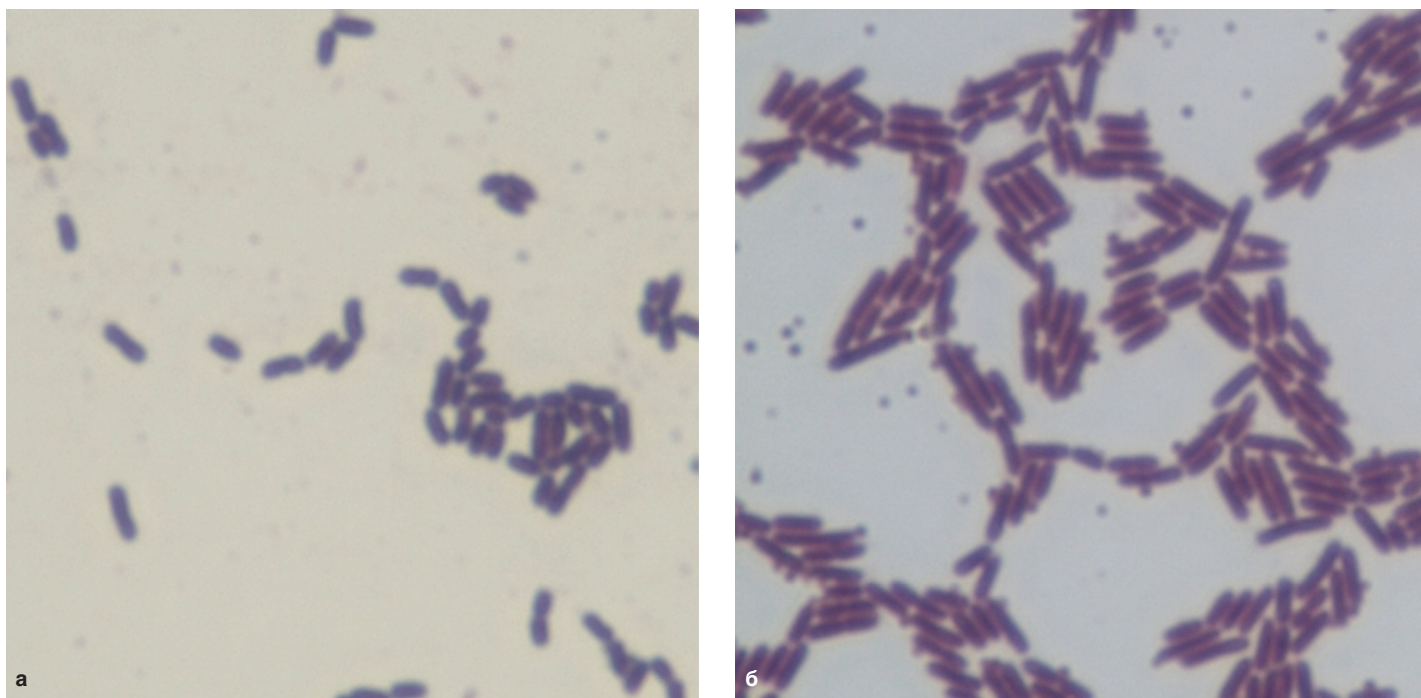


Рис. 6. Микрофотография окрашенных по Граму клеток лактобактерий, выросших на MRS агаре модификации 2: а – из образца 6; б – из образца 7. Увеличение  $\times 1000$ .

Анализируя результаты, полученные методом MALDI TOF MS, можно отметить, что из 7 исследуемых образцов удалось идентифицировать 6 различных культур. Полное совпадение состава заявленных заквасочных культур с выделенными и идентифицированными отмечалось в образцах 1 и 3, содержащих в своем составе *S. salivarius ssp. thermophilus* (образец 1), *L. acidophilus* и *S. salivarius ssp. thermophilus* (образец 3).

В ходе исследований образца 2 выделены и идентифицированы молочнокислые бактерии *L. rhamnosus* и *S. salivarius ssp. thermophilus*, которые, как правило, входят в йогуртовую закваску.

В образце 4 выделенные культуры идентифицированы как *S. salivarius ssp. thermophilus* и *L. delbrueckii ssp. lactis*, заявлены термофильный стрептококк и болгарская палочка.

Из образца 5, содержащего йогуртовую закваску и обогащенный бифидобактериями *ActiRegularis*, выделены и идентифицированы *L. delbrueckii ssp. lactis*, *Lactococcus lactis*, *S. salivarius ssp. thermophilus*.

Культуры, выделенные из образца 6, идентифицированы как *L. rhamnosus*, *L. casei*, *Lactococcus lactis* и *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus*, а из образца 7 – как *L. rhamnosus*, *L. casei* и *S. salivarius ssp. thermophilus*.

Учитывая, что для всех идентифицированных культур лактобактерий и лактококков в образцах с 4 по 7, за исключением *L. rhamnosus* в образце 7, индекс совпадения был ниже 2,300, полученные результаты по их видовой принадлежности могут быть неточными.

Несоответствие между бактериальными видами и даже иногда родами, заявленными на этикетке кисломолочных продуктов и идентифицированными MALDI TOF MS, отмечено в некоторых публикациях [11, 12]. Возможно, расширение справочных баз данных позволит проводить более точную идентификацию видов *Lactobacillus*, или для достижения более надежной идентификации необходимо использовать сочетание MALDI TOF масс-спектрометрии с генотипическими методами [13].

Анализ полученных данных показал, что для выявления и подсчета заквасочных культур необходимо использовать следующие питательные среды:

- общее количество молочнокислых микроорганизмов и бифидобактерий следует исследовать на среде Бликфельда модификации 2, где наблюдается характерный рост культур с изменением цвета среды с пурпурного на желтый;

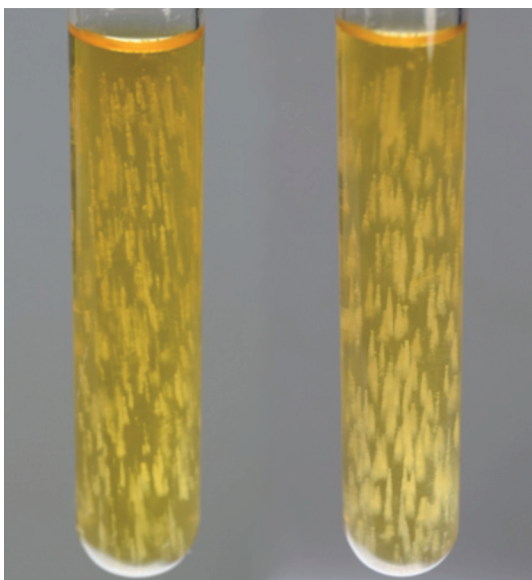


Рис. 7. Рост колоний бифидобактерий из образца 5 на среде ОББ модификации 2 с неомицином через 24 ч инкубирования, разведение  $10^{-6}$ .

Таблица 2. Концентрация микроорганизмов в исследуемых образцах, выявленных на разных питательных средах (КОЕ/г)

№ образца	Среда Бликфельдта мод. 2	MRS агар		Агар М17		MRS агар с СД			Среда ОББ	
		мод. 1	мод. 2	при 45 ± 1°C (37°C – для образца 1)	при комнатной температуре	мод. 1	мод. 2	мод. 1	мод. 1 с СД	мод. 2
1	2,5 × 10 <sup>8</sup>	1,6 × 10 <sup>6</sup> очень мелкие колонии	1,9 × 10 <sup>6</sup> очень мелкие колонии	1,87 × 10 <sup>8</sup>	–*	–	–	н/в**	н/в	н/в
2	3,0 × 10 <sup>8</sup>	2,0 × 10 <sup>8</sup>	1,8 × 10 <sup>8</sup>	2,2 × 10 <sup>8</sup>	–	4,2 × 10 <sup>4</sup>	1,3 × 10 <sup>5</sup>	3,0 × 10 <sup>8</sup>	1,9 × 10 <sup>7</sup>	2,8 × 10 <sup>8</sup>
3	1,0 × 10 <sup>7</sup>	1,0 × 10 <sup>7</sup>	4,0 × 10 <sup>7</sup>	6,0 × 10 <sup>7</sup>	–	–	–	н/в	н/в	н/в
4	1,0 × 10 <sup>8</sup>	1,0 × 10 <sup>8</sup>	8,0 × 10 <sup>7</sup>	1,8 × 10 <sup>7</sup>	–	–	–	н/в	н/в	н/в
5	1,9 × 10 <sup>8</sup>	1,5 × 10 <sup>8</sup>	1,2 × 10 <sup>8</sup>	8,5 × 10 <sup>7</sup>	1,0 × 10 <sup>6</sup>	1,4 × 10 <sup>6</sup>	2,2 × 10 <sup>6</sup>	2,0 × 10 <sup>8</sup>	2,6 × 10 <sup>7</sup>	2,8 × 10 <sup>8</sup>
6	1,0 × 10 <sup>8</sup>	7,0 × 10 <sup>7</sup>	7,0 × 10 <sup>8</sup>	1,1 × 10 <sup>8</sup>	9,0 × 10 <sup>6</sup>	–	–	н/в	н/в	н/в
7	1,65 × 10 <sup>8</sup>	1,6 × 10 <sup>7</sup>	1,0 × 10 <sup>7</sup>	2,1 × 10 <sup>7</sup>	–	–	–	н/в	н/в	н/в

Обозначение: \* «–» – рост отсутствует; \*\* «н/в» – не высевали.

Таблица 3. Идентификация культур, выделенных из исследованных образцов

№ образца	Состав заквасок, заявленный производителем	Идентификация по характеру роста и микроскопии	Идентификация MALDI-TOF MS	Индекс совпадения
1	Закваска термофильного стрептококка	<i>Streptococcus salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i> <i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Streptococcus salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i> <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ;	2,028 2,425
2	Йогуртовая закваска, бифидобактерии	<i>Streptococcus salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i> <i>Bifidobacterium</i> spp.	<i>Streptococcus salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i>	2,085
3	Термофильный стрептококк и ацидофильная палочка	<i>Lactobacillus</i> spp. <i>Streptococcus salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i> ; <i>Streptococcus salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i>	2,452 2,035
4	Термофильный стрептококк и болгарская палочка	<i>Lactobacillus</i> spp. <i>Streptococcus salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i> ; <i>Streptococcus salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i>	2,031 1,852
5	Йогуртовая закваска, бифидобактерии ActiRegularis	<i>Lactobacillus</i> spp. <i>Streptococcus salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i> <i>Lactococcus Bifidobacterium</i> spp.	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i> ; <i>Streptococcus salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i> ; <i>Lactococcus lactis</i>	2,277 1,956 2,269
6	Йогуртовая закваска, обогащенная <i>Lactobacillus casei imunitas</i>	<i>Lactobacillus</i> spp. <i>Streptococcus salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i> <i>Lactococcus</i>	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ; <i>Lactobacillus casei</i> ; <i>Lactococcus lactis</i> ; <i>Streptococcus salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i>	2,298 2,029 2,224 1,852
7	Закваска и пробиотические культуры ( <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Lactobacillus casei</i> )	<i>Lactobacillus</i> spp. <i>Streptococcus salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i>	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ; <i>Lactobacillus casei</i> ; <i>Streptococcus salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i>	2,436 2,029 2,035

– для термофильного стрептококка необходимо использовать агар М17, на котором в аэробных условиях при температуре 45°C рост молочнокислых бактерий и бифидобактерий подавляется;

– для лактококков необходимо образцы кисломолочных продуктов высевать на агар М17 и инкубировать посеvy при температуре 30 °C;

– для лактобактерий предпочтительнее использовать MRS агар, где термофильный стрептококк при анаэробных условиях не растет или растет в виде очень мелких колоний;

– для бифидобактерий рекомендовано использование среды ОББ, в смешанных культурах – селективного варианта среды ОББ с неомицином или селективного варианта MRS агара с цистеином гидрохлоридом, хлористым литием и диклосациллином, при использовании которых рост лактобактерий и термофильного стрептококка подавляется.

## Выводы

Проведенное исследование показало, что использование комплекса питательных сред производства ФБУН ГНЦ ПМБ (Оболensk) для выделения и подсчета молочнокислых бактерий и бифидобактерий при микробиологическом анализе кисломолочных продуктов позволяет выявлять спектр технологически значимой заквасочной микрофлоры, такой как

термофильный стрептококк, лактобактерии и лактококки, а также бифидобактерии.

## Информация о финансировании

Финансирование данной работы не проводилось.

## Financial support

No financial support has been provided for this work.

## Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interest.

## Литература

1. Стратегия повышения качества пищевой продукции в Российской Федерации до 2030 года. Распоряжение Правительства Российской Федерации от 29 июня 2016 г. № 1364-р.
2. О безопасности пищевой продукции: Технический регламент Таможенного союза. ТР ТС 021/2011.
3. О безопасности молока и молочной продукции: Технический регламент Таможенного союза. ТР ТС 033/2013.
4. Продукты кисломолочные. Бактериальные заквасочные культуры: ГОСТ ISO 27205-2013.
5. Молоко и молочная продукция. Методы определения молочнокислых микроорганизмов: ГОСТ 33951–2016.

6. Продукты пищевые функциональные. Методы определения и подсчета пробиотических микроорганизмов: ГОСТ Р 56139-2014.
7. Продукты молочные. Подсчет presumptивных бифидобактерий. Метод определения количества колоний при температуре 37°C: ГОСТ ISO 29981-2013.
8. Молоко и молочная продукция. Методы определения бифидобактерий: ГОСТ 33924-2016. Введен 01.09.2017. М.: Стандартиформ; 2016.
9. Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Подготовка проб, исходной суспензии и десятикратных разведений для микробиологических исследований. Часть 1. Общие правила подготовки исходной суспензии и десятикратных разведений: ГОСТ ISO 6887-1-2015.
10. Йогурт. Подсчет характерных микроорганизмов. Методика подсчета колоний микроорганизмов после инкубации при температуре 37°C: ГОСТ ISO 7889-2015.
11. Angelakis E, Million M, Henry M, Raoult D. Rapid and Accurate Bacterial Identification in Probiotics and Yoghurts by MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Journal of Food Science*. 2011 Oct;76(8):M568-72. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2011.02369.x
12. Duskova M, Sedo O, Ksicova K, et al. Identification of Lactobacilli Isolated From Food by Genotypic Methods and MALDI-TOF MS. *Int J Food Microbiol*. 2012 Oct 1;159(2):107-14. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.07.029
13. Anderson AC, Sanunu M, Schneider C, et al. Rapid species-level identification of vaginal and oral lactobacilli using MALDI-TOF MS analysis and 16S rDNA sequencing. *BMC Microbiol*. 2014 Dec 14;14:312. DOI: 10.1186/s12866-014-0312-5

## References

1. Strategy on improvement of the quality of food products in the Russian Federation until 2030, adopted by the Governmental Order of 29 June 2016 No. 1364-p.
2. Technical regulations of Customs Union. On food safety. TR TS 021/2011 (TR CU 021/2011).
3. Technical regulations of Customs Union. On the safety of milk and dairy products. TR TS 033/2013 (TR CU 033/2013).
4. Fermented milk products. Bacterial starter cultures. Standard of identity. GOST ISO 33951–2016.
5. Milk and milk products. Methods for determination of the lactic acid bacteria. GOST 33951–2016.
6. Functional foods and foods for special dietary uses. Methods for detection and enumeration of probiotic microorganisms. GOST R 56139-2014.
7. Milk products. Enumeration of presumptive bifidobacteria. Colony count technique at 37°C. GOST ISO 29981-2013.
8. Milk and milk products. Methods for determination of the bifidobacterium. GOST 33924-2016.
9. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination. Part 1. General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions. GOST ISO 6887-1-2015.
10. Yogurt. Enumeration of characteristic microorganisms. Colony-count technique after incubation at 37°C. GOST ISO 7889-2015.
11. Angelakis E, Million M, Henry M, Raoult D. Rapid and Accurate Bacterial Identification in Probiotics and Yoghurts by MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Journal of Food Science*. 2011 Oct;76(8):M568-72. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2011.02369.x
12. Duskova M, Sedo O, Ksicova K, et al. Identification of Lactobacilli Isolated From Food by Genotypic Methods and MALDI-TOF MS. *Int J Food Microbiol*. 2012 Oct 1;159(2):107-14. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.07.029

13. Anderson AC, Sanunu M, Schneider C, et al. Rapid species-level identification of vaginal and oral lactobacilli using MALDI-TOF MS analysis and 16S rDNA sequencing. *BMC Microbiol*. 2014 Dec 14;14:312. DOI: 10.1186/s12866-014-0312-5

## Информация об авторах:

Морозова Татьяна Павловна, научный сотрудник лаборатории разработки питательных сред ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора  
 Адрес: 142279, Московская область, г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ  
 Телефон: (4967) 36-0003  
 E-mail: morozova@obolensk.org

Подкопаев Ярослав Васильевич, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории разработки питательных сред ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора  
 Адрес: 142279, Московская область, г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ  
 Телефон: (4967) 36-0003  
 E-mail: podkopaev@obolensk.org

Косилова Ирина Сергеевна, младший научный сотрудник лаборатории разработки питательных сред ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора  
 Адрес: 142279, Московская область, г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ  
 Телефон: (4967) 36-0003  
 E-mail: kosilova.irina@gmail.com

Детушев Константин Владимирович, младший научный сотрудник отдела коллекционных культур ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора  
 Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ  
 Телефон: (4967) 31-1919,  
 E-mail: detushevkv@obolensk.org

Шепелин Анатолий Прокопьевич, доктор биологических наук, заместитель директора ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора  
 Адрес: 142279, Московская область, г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ  
 Телефон: (4967) 36-002  
 E-mail: shepelin@obolensk.org

## Information about authors:

Tatiana P. Morozova, researcher of the laboratory of culture media development, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rospotrebnadzor  
 Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation  
 Phone: (4967) 36-0003  
 E-mail: morozova@obolensk.org

Yaroslav V. Podkopaev, PhD (Biology), researcher of the laboratory of culture media development, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rospotrebnadzor  
 Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation  
 Phone: (4967) 36-0003  
 E-mail: podkopaev@obolensk.org

Irina S. Kosilova, junior researcher of the laboratory of culture media development, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rospotrebnadzor  
 Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation  
 Phone: (4967) 36-0003  
 E-mail: kosilova.irina@gmail.com

Konstantin V. Detushev, junior researcher, collection cultures department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology  
 Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation  
 Phone: (4967) 31-1919  
 E-mail: detushevkv@obolensk.org

Anatoly P. Shepelin, PhD, DSc, (Biology), deputy director, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rospotrebnadzor  
 Address: SRCAMB, 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation  
 Phone: (4967) 36-0020  
 E-mail: shepelin@obolensk.org