УДК 637.065:637.075

Видовий склад бактерій роду *Enterococcus* молока сирого та сиру кисломолочного «домашнього» виробництва, їх чутливість до антибактеріальних препаратів

Ю.В. Горюк¹, М.Д. Кухтин¹, Ю.Б. Перкій¹, В.В. Горюк², В.І.Семанюк³
goruky@mail.ru

¹Тернопільська дослідна станція Інституту ветеринарної медицини НААН,
вул. Тролейбусна, 12, м. Тернопіль, 46027, Україна;

²Подільський державний аграрно-технічний університет,

вул. Шевченка, 13, м. Кам'янець–Подільський, Хмельницька область, 32301, Україна;

³Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького,
вул. Пекарська, 50, м. Львів, 79010, Україна

Проведено дослідження молока сирого та сиру кисломолочного щодо видового складу бактерій роду *Enterococcus* та визначення їх чутливості до антибактеріальних препаратів. Встановлено, що з молока сирого та сиру кисломолочного виділялося в основному три види ентерококів: *E. faecalis*, *E. faecium* та *E. durans*. При цьому основну частину ентерококів молока сирого та сиру кисломолочного складав вид *E. faecalis* $53,4 \pm 4,22$ та $73,4 \pm 6,71\%$ відповідно. Кількість *E. faecium* виділених з молока сирого складала $34,7 \pm 2,15\%$, що в 2,86 раза більше відповідно вмісту їх у сирі кисломолочному, а вид *E. durans* складав від $5,3 \pm 0,47$ до $9,3 \pm 0,74\%$. Чутливість до антибактеріальних препаратів у *E. faecalis* виділеного з кисломолочного сиру була значно нижча, порівняно з штамами *E. faecalis* ізольованих із молока сирого. Так, такі протимікробні препарати, які були майже в 100 % активними до *E. faecalis* виділеного з молока, як ванкоміцин, фурамаг, амоксицилін, проявляли нижчу ефективність до *E. faecalis* з кисломолочного сиру, чутливість складала від 97,2 до 82,6%. Чутливість *E. faecalis* з кисломолочного сиру до інших антибактеріальних препаратів, які були взяті у дослід складала в 1,3 – 37,0 раза ($p \leq 0,05$) меншою, порівняно з *E. faecalis* з молока сирого.

Ключові слова: ентерококи, молоко сире, сир кисломолочний, антибіотикостійкість, агропродовольчий ринок.

Идентификация бактерий рода *Enterococcus* выделенных из молока сырого и творога «домашнего» производства и их чувствительность к антибактериальным препаратам

Ю.В. Горюк¹, Н.Д. Кухтин¹, Ю.Б. Перкій¹, В.В. Горюк², В.И. Семанюк³
goruky@mail.ru

¹Тернопольская опытная станция Института ветеринарной медицины НААН,
ул. Тролейбусная, 12, г. Тернополь, 46027, Украина;

²Подольский государственный аграрно-технический университет,

ул. Шевченко, 13, г. Каменец–Подольский, Хмельницкая область, 32301, Украина;

³Львовский национальный университет ветеринарной медицины и биотехнологий имени С.З. Гжицкого,
ул. Пекарская, 50, г. Львов, 79010, Украина

Citation:

Horyuk, Yu.V., Kukhtyn, M.D., Perkiy, Yu.B., Horyuk, V.V., Semenyuk, V.I. (2016). Identification of *Enterococcus* isolated from raw milk and cottage cheese «home» production and study of their sensitivity to antibiotics. *Scientific Messenger LNUVMBT named after S.Z. Gzhytskyj*, 18, 3(70), 44–48.

Проведено исследование молока сырого и творога стосовно видового состава бактерий рода *Enterococcus* и определения их чувствительности к антибактериальным препаратам. Установлено, что из молока сырого и творога выделялось в основном три вида энтерококков: *E. faecalis*, *E. faecium* и *E. durans*. При этом основную часть энтерококков молока сырого и творога составлял вид *E. faecalis* $53,4 \pm 4,22$ и $73,4 \pm 6,71\%$ соответственно. Количество *E. faecium* выделенных из молока сырого составляла $34,7 \pm 2,15\%$, что в 2,86 раза больше содержания их в твороге, а вид *E. durans* составлял от $5,3 \pm 0,47$ до $9,3 \pm 0,74\%$. Чувствительность к антибактериальным препаратам в *E. faecalis* выделенного из творога была значительно ниже, по сравнению со штаммами *E. faecalis* изолированных из молока сырого. Противомикробные препараты, которые были почти в 100% активными до *E. faecalis* выделенного из молока, (ванкомицин, фурамаг, амоксициллин) проявляли низкую эффективность по отношению к *E. faecalis* выделенного с творога, чувствительность составляла от 97,2 до 82,6%. Чувствительность *E. faecalis* выделенного с творога по отношению к другим антибактериальным препаратам, которые были взяты в опыт была в 1,3 – 37,0 раза ($p \leq 0,05$) меньше по сравнению с *E. faecalis* с молока сырого.

Ключевые слова: энтерококки, молоко сырое, творог, антибиотикостойчивость, агропродовольственный рынок.

Identification of *Enterococcus* isolated from raw milk and cottage cheese «home» production and study of their sensitivity to antibiotics

Yu.V. Horyuk¹, M.D. Kukhtyn¹, Yu.B. Perkiy¹, V.V. Horyuk², V.I. Semenyuk³
goruky@mail.ru

¹Ternopil research station of the Institute of veterinary medicine NAAS,
Trolley Str., 12, Ternopil, 46027, Ukraine

²Podolski State Agricultural and Technical University,
Shevchenko Str., 13, Kamenets-Khmelnytsky region, 32301, Ukraine

³Lviv national university of veterinary medicine and biotechnologies named after S. Gzhytskyj,
Pekarska Str., 50, Lviv, 79010, Ukraine

The investigation of the unpasteurized milk and lactic cheese as for the species of the *Enterococcus* bacteria genus has been made as well as the determination of their sensitivity to anti-infective drugs. It has been established that mainly three types of enterococci have escaped of the unpasteurized milk and lactic cheese: *E. faecalis*, *E. faecium* and *E. durans*. Thus the main part of enterococci of the unpasteurized milk and lactic cheese has composed a kind of *E. faecalis* 53.4 ± 4.22 and $73.4 \pm 6.71\%$ respectively. The quantity of *E. faecium* escaped of the unpasteurized milk has been $34.7 \pm 2.15\%$, that is 2.86 times more in accordance with their content in the lactic cheese, and the genus *E. durans* ranged from 5.3 ± 0.47 to $9.3 \pm 0.74\%$. The sensitivity to anti-infective drugs in *E. faecalis* escaped of the lactic cheese has been significantly lower compared to *E. faecalis* strains escaped of the unpasteurized milk. Yes, such anti-infective drugs that have been almost 100% active to *E. faecalis* escaped of milk as vancomycin, furamag, amoxicillin have shown lower efficiency to *E. faecalis* of the lactic cheese, the sensitivity ranged from 97,2 to 82,6%. The sensitivity of *E. faecalis* of the lactic cheese to other anti-infective drugs that have been taken into the experiment has been 1,3 – 37,0 times ($p \leq 0,05$) lower compared to *E. faecalis* of the unpasteurized milk.

Keywords: enterococci, raw milk, cheese, antibiotic resistance, the agri-food market.

Вступ

Важливу і значну групу мікроорганізмів сирого молока і молочних продуктів складають бактерії роду *Enterococcus*. Ці мікроорганізми завжди присутні в молоці і складають так звану первинну мікрофлору (Garg and Mital 1991; Franz et al., 2003; Garmasheva and Kovalenko, 2011; Gashhuk, 2013). Проте погляди на наявність ентерококів у харчових продуктах неоднозначні. Деяка частина вчених вважає їх представниками нормальної мікрофлори оскільки вони проявляють пробіотичні властивості (Zaharenko, 2011; Karnauh and Bazaleeva, 2013). Інша частина науковців схильється до думки, що цей вид відноситься до умовно-патогенних бактерій і може спричиняти різні запальні захворювання, харчові отруєння у людей і тварин (Garg and Mital 1991).

Останнім часом дослідження вказують про зв'язок між стійкістю бактерій до протимікробних препаратів, які виділені з продуктів харчування, та наявні у мікрбіоценозі людини. При цьому вважається, що продукти харчування є одним із шляхів передачі антибіотикорезистентності даних бактерій, які здатні спричиняти захворювання у людей (Franz et al., 2003;

Garmasheva and Kovalenko, 2011; Peretjatko, 2012; Gashhuk, 2013).

Мета роботи – вивчити видовий склад ентерококів молока сирого та кисломолочного сиру і порівняти їх стійкість до антибактеріальних препаратів.

Матеріал і методи досліджень

Проведено дослідження 65 проб молока сирого та 61 проби кисломолочного сиру «домашнього» виробництва, які реалізовувалися на агропродовольчих ринках міста Тернопіль. Відбирання та доставляння проб у лабораторію проводили згідно з ДСТУ 7357:2013 (DSTU 7357:2013). Виділення ентерококів проводили на середовищі ентерококагар. До роду *Enterococcus* відносили кокові форми бактерій, грам-позитивні, каталазонегативні, які відповідали вимогам тестів Шермана: – росли у поживному бульйоні за температури + 45 °С, в середовищі з вмістом 6,5% натрію хлориду, за рН 9,6 од., з вмістом 40% жовчі, витримували температуру 60 °С упродовж 30 хв. Подальшу видову ідентифікацію проводили за допомогою тест-системи ЕН-КОККУС-тест («ERBA-Lachema Diagnostika», Чехія).

Визначення чутливості виділених штамів ентерококів до антимікробних препаратів проводили диско-дифузійним методом Bauer–Kirby з використанням стандартних комерційних дисків з антибактеріальними препаратами: ампіциліну (10,0 мкг), амоксициліну (10,0 мкг), цефтріаксону (30,0 мкг), цефтазидіму (30,0 мкг), гентаміцину (10,0 мкг), стрептоміцину (10,0 мкг), канаміцину (30,0 мкг), лінкоміцину (15,0 мкг), тетрацикліну (10,0 мкг), норфлуксацину (10,0 мкг), офлоксацину (5,0 мкг), левофлуксацину (5,0 мкг), фурамагу (300,0 мкг) на середовищі Мюллер–Хінтон (HiMedia, India). Приготування мікробних суспензій проводили відповідно до оптичного стандарту каламутності 1,0 одиниць за шкалою McFarland з використанням приладу Densi–LaMeter (PLIVA–Lachema Diagnostika, Чехія) (Nakaz MOZ Ukrainy № 167 vid 05.04.2007).

Результати та їх обговорення

Для того щоб дати повну ветеринарно–санітарну оцінку кисломолочному сиру «домашнього» виробництва, який реалізується на агропродовольчих ринках, щодо контамінації бактеріями роду *Enterococcus*, нами було проведено їх видову ідентифікацію та визначено чутливість до антибактеріальних препаратів.

Результати ідентифікації бактерій роду *Enterococcus* виділених з молока сирого, яке було придбане на агропродовольчих ринках наведено на рис. 1.

Рис. 1. Видовий склад бактерій роду *Enterococcus* виділених з молока сирого, яке реалізовується на агропродовольчих ринках

Як видно з даних рис. 1, що з сирого молока нами було виділено та ідентифіковано три види бактерій роду *Enterococcus*: *E. faecalis*, *E. faecium* та *E. durans*. Основна частина виділених ентерококів молока сирого представлена видом *E. faecalis* – 53,4 ± 4,22%, частка *E. faecium* в 1,5 раза менша ($p \leq 0,05$) і складала 34,7 ± 2,15%, а кількість *E. durans* не перевищувала 10% від усіх ідентифікованих ентерококів. Ентерококи, які проявляють споріднені властивості і слабо диференціюються складали 2,6 ± 0,17%.

На рис. 2 наведено дані ідентифікації бактерій роду *Enterococcus* виділених з кисломолочного сиру «домашнього» виробництва, який був виготовлений з молока сирого.

Дані рис. 2 вказують на домінування у видовому складі кисломолочного сиру мікроорганізмів *E. fae-*

calis, який складає 73,4 ± 6,71%, що в 1,37 раза ($p \leq 0,05$) більше, порівняно з молоком сирим.

Рис. 2. Видовий склад бактерій роду *Enterococcus* виділених з сиру кисломолочного «домашнього» виробництва, який реалізовувався на агропродовольчих ринках

Кількість бактерій *E. faecium* у сирі кисломолочному складала 12,1 ± 1,08 %, що в 2,86 раза ($p \leq 0,01$) менше ніж їх вміст у молоці сирому, а вид *E. durans* складав 5,3 ± 0,47%. Також відмічали збільшення в 3,5 раза ($p \leq 0,01$) частки не ідентифікованих видів ентерококів у кисломолочному сирі до 9,2 ± 0,82%, порівняно з молоком.

Отже, проведені дослідження вказують, що з поміж видового складу ентерококів молока сирого і кисломолочного сиру «домашнього» виробництва домінує вид *E. faecalis*, який складає 53,4 ± 4,22% та 73,4 ± 6,71% відповідно, і на нашу думку має фекальне походження. Дані дослідження вказують на те, що в зв'язку з переважанням фекального ентерококу у кисломолочному сирі необхідно регламувати їх кількісне значення при розробці санітарно–гігієнічних критеріїв для оцінки безпечності кисломолочного сиру «домашнього» виробництва. Адже надмірне зростання цього виду є не тільки показником порушення санітарно–гігієнічних вимог виробництва, але й може бути причиною інфікування людей даним продуктом.

Наступною частиною нашого дослідження було визначити та порівняти чутливість бактерій *E. faecalis*, як основного представника роду *Enterococcus*, виділеного з молока сирого та сиру кисломолочного «домашнього» виробництва, що реалізуються на агропродовольчих ринках до антибактеріальних препаратів. На рис. 3 наведено результати досліджень чутливості до антибактеріальних препаратів бактерій *E. faecalis* виділеного з сирого молока, яке реалізовувалося на агропродовольчих ринках.

Як видно з даних рис. 3, що мікроорганізми *E. faecalis* виділені з молока сирого в 100% випадків були чутливими до глікопептидного антибіотика – ванкоміцину, який традиційно використовують для лікування різних септичних захворювань спричинених ентерококами у людей, коли інші антибіотики не допомагають. Практично, в 100% був активний фурамаг до бактерій *E. faecalis*, чутливість його складала 95,6 ± 2,2%.

Рис. 3. Чутливість до антибактеріальних препаратів бактерій *E. faecalis*, виділених з сирого молока, яке реалізовується на агропродовольчих ринках

Із трьох препаратів фторхінолонового ряду найбільш ефективним щодо *E. faecalis* був офлоксацин, який пригнічував ріст у $64,3 \pm 4,3\%$ штамів культур, а чутливість лево- і норфлоксацину складала $50,5 \pm 3,1$ та $44,1 \pm 2,7\%$ відповідно.

Слабку протиентерококову активність проявляли препарати тетрациклін, лінкоміцин, канаміцин, гентаміцин, рівень чутливості до даних антибіотиків складав від 7,1 до 33,5%. Цефалоспорины третього покоління цефтазідім і цефтріаксон проявляли середню ефективність щодо пригнічення росту *E. faecalis* від $43,2 \pm 3,3$ до $64,7 \pm 4,5\%$.

E. faecalis проявляв значну чутливість до бета-лактамних антибіотиків амоксициліну та ампіциліну. При цьому чутливість до ампіциліну складала $74,2 \pm 4,6\%$, а до амоксициліну з клавулановою кислотою – була у 100%. Очевидно клавуланова кислота посилює протиентерококову дію у амоксициліну.

На рис. 4 наведено результати досліджень чутливості *E. faecalis* виділеного з кисломолочного сиру «домашнього» виробництва до антибактеріальних препаратів. Як видно з даних рис. 4, що чутливість у *E. faecalis* виділеного з кисломолочного сиру значно нижча, порівняно з штамми *E. faecalis* ізольованих із молока сирого. Так, протимікробні препарати (ванкоміцин, фурамаг, амоксицилін), які були майже в 100 % активними до *E. faecalis* виділеного з молока, проявляли нижчу ефективність до *E. faecalis* виділених з кисломолочного сиру, чутливість складала від 97,2 до 82,6%.

Чутливість *E. faecalis* виділеного з кисломолочного сиру до інших антибактеріальних препаратів, які були взяті у дослід була в 1,3 – 37,0 раза ($p \leq 0,05$) менша, порівняно з *E. faecalis* виділених з молока сирого.

Отже, підсумовуючи проведені дослідження можна відзначити, що ентерококи, які виділяються з кисломолочного сиру домашнього виробництва, що реалізується на агропродовольчих ринках проявляють підвищену стійкість до протимікробних препаратів, порівняно з ентерококами виділених з молока сирого. Очевидно, це пов'язане з тим, що технологія виготовлення кисломолочного сиру в домашніх умовах передбачає використання кислого молока з високою титрованою кислотністю та з наступною довготривалою температурною обробкою. Висока кислотність і температура, як надзвичайний фактор, стимулює у клітинах *E. faecalis* стрес протеїни в результаті чого виробляється підвищена стійкість до дії чинників навколишнього середовища. У даному випадку ми можемо відмітити формування стійкості до антибактеріальних препаратів.

Таким чином, дослідження вказують на можливість селекціонування у кисломолочному сиру «домашнього» виробництва бактерій виду *E. faecalis* з стійкими властивостями до антибіотиків. Це в свою чергу може формувати стійкі штами даних бактерій у шлунково-кишковому тракті людей – споживачів кисломолочного сиру.

Рис. 4. Чутливість до антибактеріальних препаратів *E. faecalis*, виділеного з сиру кисломолочного «домашнього» виробництва, який реалізовувався на агропродовольчих ринках

Висновки

1. З поміж видового складу ентерококів молока сирого і кисломолочного сиру «домашнього» виробництва домінує вид *E. faecalis*, який складає $53,4 \pm 4,22\%$ та $73,4 \pm 6,71\%$ відповідно, і на нашу думку має фекальне походження. Збільшення, в середньому в 1,4 раза кількості бактерій *E. faecalis* в кисломолочному сирі, очевидно пов'язане з додатковим забрудненням його під час технології виготовлення, зберігання та реалізації, або цей вид є більш стійкий, порівняно з іншими видами до температури, яку використовують під час виготовлення сиру в домашніх умовах.

2. Ентерококи, які виділяються з кисломолочного сиру «домашнього» виробництва, що реалізується на агропродовольчих ринках, проявляють підвищену стійкість до протимікробних препаратів, порівняно з ентерококами виділених з молока сирого.

Подальші дослідження будуть спрямовані на вивчення морфологічних, біохімічних та патогенних властивостей ентерококів виділених із проб сиру кисломолочного «домашнього» виробництва, який реалізується на агропродовольчих ринках.

Бібліографічні посилання

- Garmasheva, I.L., Kovalenko, N.K. (2011). Biologicheskaja aktivnost' i bezopasnost' jenterokokkov. Mikrobiologichnij zhurnal. 73, 4, 77–84 (in Russian).
- Gashhuk, Je.C. (2013). Identyfikacija bakterij rodu Enterococcus vydilyenyh z doi'l'nogo ustatkuvannya ta

moloka syrogo. Naukovyj visnyk L'vivs'kogo nacional'nogo universytetu veterynarnoi' medycyny ta biotehnologij im. G'zhyc'kogo. 15, 1 (1), 281–285 (in Ukrainian).

- Zaharenko, S.M. (2011). Jenterokokkovye probiotiki v predstavlenii sovremennogo vracha. Gastrojenterologija Sankt–Peterburga. 4, 13–17 (in Russian).
- Karnauh, Je.V., Bazaleeva, A.N. (2013). Probiotiki v korrekcii kishechnogo mikrobiocenoza. Problemi ekologichnoi ta medichnoi genetiki i klinichnoi imunologii. 1, 204–215 (in Ukrainian).
- Peretjatko, O.G. (2012). Mikrobiologichnij monitoring antybiotykorezystentnosti mikroorganizmiv rodu Enterococcus. Visnyk problem biologii i medycyny. 2(1), 120–123 (in Ukrainian).
- Garg, S.K., Mital B.K. (1991). Enterococci in Milk and Milk–Products. Critical Reviews in Microbiology, 18(1), 15–45.
- Giraffa, G. (2002) Enterococci from foods. Fems Microbiology Reviews. 26(2), 163–171.
- John, E.C., Yvonne, J., Nicholas, J.S. and Mary, F.H. (2001). A survey of the prevalence of Escherichia coli O157 in raw meats, raw cow's milk and raw–milk cheeses in south–east Scotland. International Journal of Food Microbiology, 66, 63–69.
- Franz, C., Stiles, M.E., Schleifer, K.H. & Holzapfel W.H. (2003). Enterococci in foods – a conundrum for food safety. International Journal of Food Microbiology. 88(2–3), 105–122.

Стаття надійшла до редакції 3.10.2016