

УДК 579.678 : 664.1

Профессор Н.Г. Кульнева, доцент О.Ю. Гойкалова,
аспирант А.И. Шматова

(Воронеж. гос. ун-т. инж. технол.) кафедра технологии броидильных и сахаристых производств.
тел. (473) 255-07-51

E-mail: olga_bojko2005@mail.ru

Professor N.G. Kulneva, associate Professor O.Iu. Goikalova,
graduate A.I. Shmatova

(Voronezh state university of engineering technologies) Department of fermentation and
sugar industries technology. phone (473) 255-07-51

E-mail: olga_bojko2005@mail.ru

Исследование бактериостатических свойств хлорсодержащего препарата для свеклосахарного производства

Investigation of bacteriostatic properties of chlorinated compounds for beet-sugar industry

Реферат. Одной из важнейших причин снижения качества сахара-песка является бактериальная обсемененность сахарной свеклы. Это связано с тем, что свеклосахарное производство является хорошим объектом для развития разных групп микроорганизмов. Основными источниками инфицирования продуктов сахарного производства могут быть почва, вода, воздух, тара, упаковочные материалы, транспортные средства, спецодежда, инвентарь. Чем выше обсемененность свеклы микроорганизмами, тем больше они разлагают сахарозы и выделяют побочных продуктов метаболизма. В связи с этим существует необходимость снижения негативного воздействия различных групп микроорганизмов и уменьшения потерь сахарозы от разложения. В соответствии с изложенной проблемой были проведены исследования по определению бактериостатических свойств хлорсодержащего препарата для сахарного производства. В качестве объекта исследования использовали культуральную жидкость, обсемененную чистой культурой *Leuconostoc mesenteroides* и обработанную реагентом. В экспериментах определяли накопление биомассы *L. mesenteroides* нефелометрическим методом путем измерения оптической плотности суспензии бактерий. Установлено, что через 24 ч культивирования бактерий уровень оптической плотности среды в контроле и активная кислотность были значительно выше по сравнению с образцом, обработанным бактерицидным препаратом. Численность микроорганизмов в питательной среде определяли методом Виноградского-Шульгиной-Брида. По результатам исследования в контроле содержание клеток $1,7 \cdot 10^{16}$, в опыте с введением хлорсодержащего препарата $5,8 \cdot 10^{14}$. Результаты эксперимента свидетельствуют, что исследуемый хлорсодержащий препарат обладает бактериостатическим действием в отношении грамположительных сапрофитных кокков *L. mesenteroides* и может быть рекомендован к использованию в условиях свеклосахарного производства.

Summary. One of the major causes of decline in the quality of granulated sugar is bacterial contamination of sugar beet. This is due to the fact that the beet-sugar industry is a good object for the development of different groups of microorganisms. The main sources of infection of products of sugar manufacture can be soil, water, air, packaging, packaging materials, vehicles, clothing, equipment. The higher the beet contamination with the microorganisms, the more they decompose sucrose and secrete metabolic by-products. In this regard, there is a need to reduce the negative impact of various groups of microorganisms and to minimize the loss of sucrose from decomposition. In accordance with the problem given the studies to determine the bacteriostatic properties of chlorinated compounds for sugar production were carried out. We used the cultivated fluid colonized with a pure culture of *Leuconostoc mesenteroides* and reagent treated as an object of study. In the experiments, we determined the accumulation of biomass of *L. mesenteroides* with nephelometric method by measuring the optical density of bacterial suspension. It was found out that after 24 hours of bacterial culturing the level of optical density in the control and active acidity were considerably higher compared with the sample treated with germicide. The number of microorganisms in the nutrient medium was determined by Vinogradsky-Shulgina-Brid's method. According to the study in the control the cell contents is $1,7 \cdot 10^{16}$, in experiment with the introduction of the chlorinated compound it is $5,8 \cdot 10^{14}$. The experimental results show that the investigated chlorinated compound has bacteriostatic action against grampositive cocci saprophytic of *L. mesenteroides* and can be recommended for use in a sugar beet production.

Ключевые слова: свеклосахарное производство, *Leuconostoc mesenteroides*, хлорсодержащий препарат, бактериостатическое действие.

Keywords: beet sugar production, *Leuconostoc mesenteroides*, chlorinated compound, bacteriostatic action.

© Кульнева Н.Г., Гойкалова О.Ю., Шматова А.И., 2014

Для повышения сохранности сахарной свеклы, роста хозяйственной и экономической эффективности ее переработки большое внимание уделяется разработке новых способов обработки свекловичной стружки с применением бактерицидных препаратов широкого спектра действия.

Нами был изучен хлорсодержащий препарат, обладающий фунгицидными, вирулентными и спороцидными свойствами [1].

Целью работы явилось исследование бактериостатического действия хлорсодержащего препарата, т.к. конкретные данные о его влиянии на рост микроорганизмов отсутствуют. Для достижения поставленной цели проводили ряд экспериментов, связанных с культивированием микроорганизмов на среде, содержащей исследуемый препарат.

Объектом исследования служила чистая культура бактерий *Leuconostoc mesenteroides* штамм В-4177, полученная из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПИ, г. Москва). Физиологически активную культуру *L. mesenteroides* вносили в свежую селективную питательную среду, рекомендованную ВКПИ, инкубировали в термостате при 37 °С в анаэробных условиях в течение 5 суток. Хлорсодержащий препарат вносили в питательную среду (MRS (г/дм³): Бактопептон – 10,0; мясной экстракт – 10,0; дрожжевой экстракт – 5,0; глюкоза – 20,0; твин 80 – 1,0; аммоний лимоннокислый – 2,0; натрий уксуснокислый – 5,0; MgSO₄·7H₂O – 0,1; MnSO₄·5H₂O – 0,05; Na₂HPO₄ – 2,0; агар – 20,0) в количестве 2 см³ при pH 6,5 и температуре 30 °С. В качестве контроля использовали питательную среду без добавления препарата [1].

Накопление биомассы *Leuconostoc mesenteroides* контролировали нефелометрическим методом путем измерения оптической плотности питательной среды на разных этапах процесса культивирования. Рабочая длина волны была выбрана в соответствии с положениями, что для измерения светорассеяния выбирается светофильтр, обеспечивающий максимум пропускания света данной суспензии. В нашем случае рабочая длина волны – 560 нм [3]. Данный метод основан на том, что микроорганизмы в большинстве случаев не окрашены и почти прозрачны, поэтому суспензия клеток поглощает свет в видимой области спектра незначительно. Уменьшение интенсивности света после прохождения через суспензию связано, главным образом, с его рассеянием. В определенных пределах количество света, рассеивае-

мого суспензией микроорганизмов, пропорционально содержанию клеток [2].

Количественный анализ накопления биомассы бактерий проводили на фиксированных мазках по методу Виноградского-Шульгиной-Брида [4]. Метод предназначен для определения численности микроорганизмов в различных естественных субстратах. Отбор суспензии был произведен по истечении 24 ч – время, когда было достигнуто максимальное количество клеток в питательной среде. Для подсчета клеток брали строго определенное количество исследуемой суспензии, наносили микропипеткой на хорошо обезжиренное сухое предметное стекло. К капле суспензии добавляли стерильный водный раствор агар-агара с массовой долей 0,03 %, быстро перемешивали стерильной бактериологической петлей и равномерно распределяли по отмеченной на бумаге площади. Мазок высушивали на воздухе, фиксировали 20-30 мин 96 % спиртовым раствором и окрашивали красителем в течение определенного времени. Затем препарат осторожно промывали в кристаллизаторе водой. Подсчет клеток микроорганизмов проводили с иммерсионным объективом и рассчитывали по формуле [3]:

$$N = \frac{x \cdot 4 \cdot 10^8 \cdot K}{0,05 \cdot S}, \quad (1)$$

где x – число клеток в поле зрения; K – степень разведения суспензии; S – площадь поля зрения, $S = 0,02 \text{ мм}^2$; 0,05 – объем суспензии, см³; $4 \cdot 10^8$ – площадь мазка, мкм².

Еще одним параметром, косвенно характеризующим накопление биомассы, является активная кислотность суспензии, которую определяли по изменению pH среды через каждые 6 ч культивирования. Как известно, по изменению pH среды можно контролировать интенсивность метаболических процессов микроорганизмов, что служит показателем трансформации сахаров в органические кислоты как конечные продукты метаболизма. В частности, *Leuconostoc mesenteroides* для синтеза декстрана выделяет ферменты, расщепляющие сахарозу.

При изучении динамики роста и кислотообразования бактериальной культуры исследуемые показатели определяли в динамике через каждые 6 ч в течение 5 суток роста. Результаты эксперимента приведены графически на рисунках 1, 2.

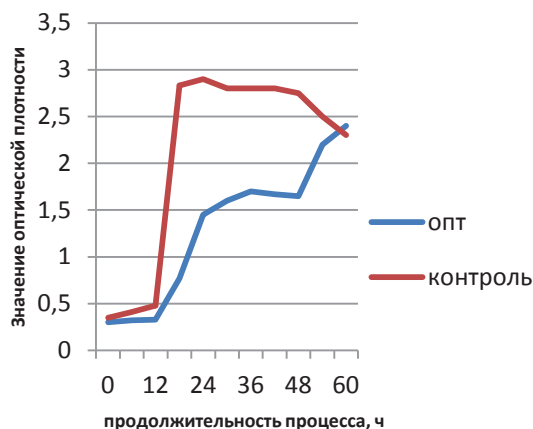


Рисунок 1. Динамика оптической плотности суспензии микроорганизмов

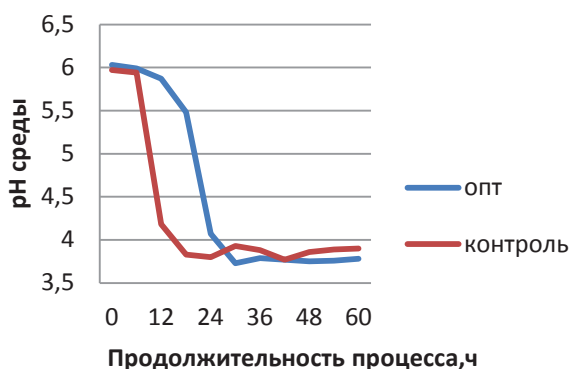
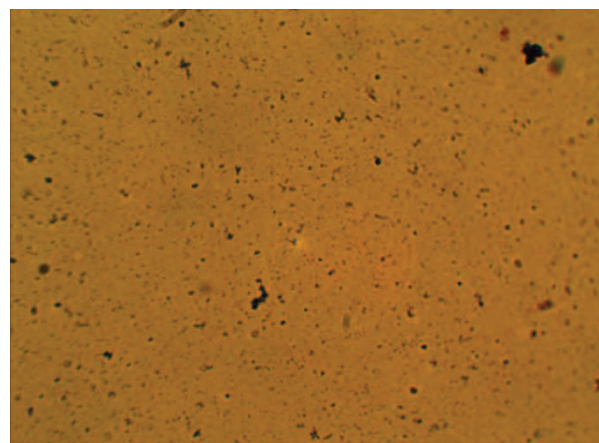


Рисунок 2. Динамика pH среды при культивировании *Leuconostoc mesenteroides*

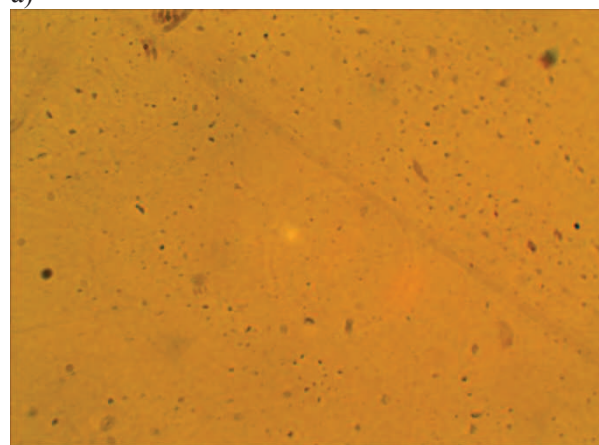
Анализ полученных результатов показал, что изменение оптической плотности в опыте с введением хлорсодержащего препарата во времени протекает с меньшей скоростью по сравнению с контролем. Так, к 24 ч культивирования бактерий уровень оптической плотности среды в контроле был в 1,8 раза выше по сравнению с опытом. Так же способность бактериальной культуры к кислотообразованию при отсутствии препарата в среде значительно выше. Это свидетельствует о снижении скорости роста и физиологических возможностей бактериальной культуры, выращенной с добавлением хлорсодержащего препарата.

Полученные данные хорошо коррелируют с численностью бактериальных клеток в опытном и контрольном вариантах. Так, в кон-

трольном образце содержание клеток составило $1,7 \cdot 10^{16}$, в опыте с введением хлорсодержащего препарата в среду культивирования это значение на два порядка ниже $5,8 \cdot 10^{14}$. На рисунке 3 (а, б) представлены фотографии контрольного и опытного образцов соответственно.



а)



б)

Рисунок 3. Интенсивность роста бактерий *Leuconostoc mesenteroides*: а – контроль, б – опыт (с введением хлорсодержащего препарата)

Исходя из результатов эксперимента можно сделать вывод, что хлорсодержащий препарат обладает бактериостатическим действием в отношении грамположительных сапрофитных кокков *Leuconostoc mesenteroides* и может быть рекомендован к использованию в условиях свеклосахарного производства.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Кульнева Н.Г., Шматова А.И., Манько Ю.И. Микрофлора свеклосахарного производства: проблемы и пути решения // Вестник ВГУИП. 2014. №1. С. 193-196.
- 2 Силин П.М., Силина Н.П. Химический контроль свеклосахарного производства. М.: Пищ. пром-ть, 1977. 56 с.
- 3 Шуваева Г. П., Корнеева О.С., Григоров В.С., Руадзе И.Д. Биология и микробиология. Воронеж: ВГТА, 2003. С.214-216.
- 4 Нетрусов А.И., Егорова М.А., Захарчук Л.М. и др. Практикум по микробиологии. М.: Академия, 2005. С.103-104.

REFERENCES

- 1 Kul'neva N.G., Shmatova A.I., Man'ko Iu.I. Microflora of sugar beet production: problems and solutions. *Vestnik VGUIT*. [Bulletin of VSUET], 2014, no.1, pp. 193-196. (In Russ.).
- 2 Silin P.M., Silina N.P. Khimicheskii kontrol' sveklosakharnogo proizvodstva [Chemical monitoring sugar beet production]. Moscow, Pishchevaia promyshlennost', 1977. 56 p. (In Russ.).
- 3 Shuvaeva G.P., Korneeva O.S., Grigorov V.S., Ruadze I.D. Biologiya i mikrobiologiya [Biology and microbiology]. Voronezh, VGTA, 2003. pp. 214-216. (In Russ.).
- 4 Netrusov A.I., Egorova M.A., Zakharchuk L.M. et al. Praktikum po mikrobiologii [Workshop on microbiology]. Moscow, Akademiya, 2005. pp. 103-104. (In Russ.).