**Министерство науки и высшего образования Российской Федерации**

**Федеральное государственное автономное образовательное учреждение**

**высшего образования**

**«СЕВЕРО-КАВКАЗСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

**Медико-биологический факультет**

**Базовая кафедра микробиологии**

**ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКАЯ РАБОТА**

**Выделение и характеристика представителей микробиологического консорциума из традиционных горских напитков**

**Выполнила:**

Магомедова Сирена Раджабовна и Горкавая Виктория Сергеевна

студены 2 курса магистратуры

направления подготовки 06.04.01 – Биология, направленность (профиль) – «Микробиология»

очной формы обучения

**Руководитель:**

Харина Елена Ивановна

кандидат биологических наук, доцент, доцент базовой кафедры микробиологии

**Ставрополь, 2022 г.**

**План**

|  |  |
| --- | --- |
| ВВЕДЕНИЕ |  |
| ГЛАВА 1. Состав и свойства национальных напитков народов Кавказа |  |
| ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ |  |
| 2.1.Объекты и материалы исследований  |  |
| 2.2. Оборудование, используемое для исследований  |  |
| 2.3. Методы и организация проведения исследования |  |
| ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ |  |
|  Изучение культуральных, морфологических и физиолого биохимических свойств выделенных представителей микробиологического консорциума из национального лезгинского напитка тач |  |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ  |  |
|  |  |
| СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ  |  |
|  |  |

**ВВЕДЕНИЕ**

**Актуальность темы**. Северный Кавказ является уникальной родиной многих национальных продуктов. Одни из них уже нашли широкое применение в пищевой промышленности, другие же остаются доступны только узкому кругу. Преимущество таких национальных напитков – это сбалансированный комплекс микроорганизмов, который формировался тысячелетиями и передавался из поколения в поколение, а так же отличные вкусовые качества.

В настоящее время микрофлора желудочно-кишечного тракта рассматривается как первичный неспецифический иммунный барьер, обладающий высокими детокционными свойствами и мощный регулятор обменных процессов в организме, формирующий вторичный пищевой поток пищевых и регуляторных веществ за счет потребления микроорганизмами пищевых волокон, не перевариваемых полостным пищеварением.

Противостоять изменениям микробного состава организма под воздействием экологических, лекарственных, хирургических и других стрессовых агентов можно, обогатив микрофлору ЖКТ полезной микрофлорой, вносимой извне. Это положение дало импульс развитию целого направления в микробиологии - учению о пробиотиках - живых микроорганизмах, которые, попадая в организм при приеме пищи в определенных количествах, оказывают благотворный эффект на здоровье человека. Сегодня это учение из области научной перешло в область практической деятельности.

Созданы и внедряются биопрепараты и молочные продукты на основе специально подобранных культур молочнокислых и бифидобактерий, несущих комплекс полезных свойств организму человека.

Научное обоснование данной задачи и пути ее достижения приводятся в работах Г. И. Гончаровой, В .В. Поспеловой, Б. А. Шендерова, С. А. Шевелевой, Н. С. Королевой, В. Ф. Семенихиной, В. И. Ганиной и многих других.

Поиск эффективных новых пробиотиков, антагонистов патогенной и гнилостной микрофлоре кишечника, и таким образом повышение пробиотической активности традиционных молочных продуктов является на сегодняшний день актуальной задачей. При этом источником такой микрофлоры смогут служить национальные продукты домашнего приготовления.

В Дагестане широко особой популярностью пользуется национальный лезгинский напиток тач, который известен в народе своими целебными свойствами. Продукт вырабатывается на основе зерновых (пшеницы и ячменя), рецепт которого передают из поколения в поколение.

Актуальность исследования связана с поиском природных, микробных симбионтов, обладающих высокими пробиотическими свойствами, что соответствует тенденции внедрения в обществе основных постулатов рационального и функционального питания.

. Основной **целью данной работы** является исследование микробного состава национального лезгинского напитка тач.

 Для достижения поставленной цели в работе решались следующие **задачи**:

- провести обзор литературы по данной тематике;

- изучить морфологические свойства микрофлоры заквасочной культуры тач.

- определить родовой микробный состав представителей национального лезгинского напитка тач;

- изучить культуральные, морфологические и физиолого биохимические свойства выделенных представителей микробного консорциума национального лезгинского напитка тач

**Объект исследования** – микробный консорциум национального лезгинского напитка тач *.*

**Предмет исследования** – свойства представителей микробного консорциума.

**Научная новизна работы.** Изучен состав микробного консорциума национального лезгинского напитка тач *.*

**Теоретическая и практическая значимость**. Результаты исследований расширяют спектр сведений о микробном составе национальных напитков. Полученные результаты позволяют считать национальный лезгинский напиток тач перспективным для лечения и профилактики некоторых заболеваний ЖКТ.

**ГЛАВА 1. СОСТАВ И СВОЙСТВА НАЦИОНАЛЬНЫХ НАПИТКОВ НАРОДОВ КАВКАЗА**

Известный для всех микробиолог И.И. Мечников, наблюдая, за жизнью горцев Балканских стран и Кавказа, в 1907 году предположил, что их долголетие обусловлено постоянным употреблением национальных напитков и разработал теорию старения людей. Особую роль он отвел национальным кисломолочным напиткам. По его предположению, гнилостные бактерии, обитающие в кишечнике, разлагают белки с образованием ядовитых продуктов – индола, скатола, фенола и др., а эти вещества, всасываясь в кровь, медленно, но постоянно отравляют организм и вызывают его преждевременное старение. Для борьбы с нежелательной микрофлорой И.И. Мечников предложил использовать молочнокислые бактерии, из традиционных национальных напитков, способные приживаться в кишечнике

Сегодня [кавказские национальные напитки](http://www.bludakchr.ru/kavkazskie_napitki.php) представляют собой огромное разнообразие. Они способны не только вызвать чувство расслабленности, но и воздействовать на организм человека, укрепляя и оздоравливая его. К таким напиткам можно отнести популярные среди жителей Кавказа кефир, кислое молоко, айран, кумыс, мацони, тан, тач и другие. Изготовление национальных напитков на молочной основе, в том числе и из молока таких животных как коз, овец, коров, лошадей и т.д. уходит в глубокую древность. Одна из особенностей – включение в состав заквасок не только молочнокислых бактерий, но и дрожжевых культур. Так как получение молока носило сезонных характер, то у кочевников возникала необходимость поиска способов его хранения, и это так же способствовало получению заквасок. Помимо молока различных животных (коров, лошадей, овец, коз и т.д.) в состав заквасок кочевники стали включать зерновые культуры (пшеницу, рожь, ячмень, овес и т.д.). Отличие национальных напитков основывается также на различных технологиях приготовления этих напитков. В современную пищевую промышленность уже внедрены многие национальные напитки. Остановимся на самых популярных.

 Среди народов Кавказа пользуется особой популярностью горский напиток «Айран». В последнее время интерес к этому напитку возрос и далеко за его пределами. Это связано с активным развитие туризма на Кавказе и оживлением торговли. Большинство этнографических исследователей сходятся на мысли, что айран является молочным продуктом карачаевского и балкарского народов, по своей популярности у этих народов с ним не может конкурировать ни один продукт питания. Каждая семья этих народов готовит и употребляет этот кисломолочный напиток. Он символизирует гостеприимство, состоятельность, дружелюбность и щедрость. Употребляют айран круглый год, однако чаще всего он пользуется спросом в летний период, как прохладительный напиток. Входящие в состав напитка аминокислоты и жирные кислоты нормализуют водно-солевой баланс и способствуют улучшению обмена веществ. Также укрепляет нервную систему, улучшает кровообращение, нормализует дыхание. Помимо всего этого айран проявляет антисептические свойства и благотворно влияет на микрофлору ротовой полости и носоглотки [13].

Считается, что регулярное употребление айрана в пищу способствует здоровью и долголетию, так как он укрепляет здоровье, повышая иммунитет и помогая не только выводить вредоносные вещества из организма, но и стимулировать усвоение полезных и нужных витаминов, минералов и микроэлементов. Айран используют для похудания, так как он способен снижать уровень холестерина в крови, способствовать нормализации веса [9].

Систематическое потребление кисломолочного напитка повышает иммунитет, мышечный тонус, улучшает работу дыхательной системы организма. Айран применяют в качестве профилактики онкологических заболеваний. В нем содержится молочный жир, который помогает усвоению кальция. Польза айрана в повседневном рационе проявляется в способности укреплять кости и зубы. Напиток помогает при дефиците кальция и остеопорозе. Употреблять напиток рекомендуют детям и подросткам для нормального развития, а также пожилым людям. Айран не рекомендуют потреблять при повышенной кислотности желудка, язвенной болезни 12-перстной кишки и желудка, остром и хроническом гастрите [3, 5, 8].

Свежий айран у карачаевцев носит название «джуурт айран». В звучании слова «джуурт» есть общее со словом «йогурт». Существует вид айрана, названный «гыпы айран», или бурдючный айран,
технология и вкус которого ближе к кефиру. Термин «ечки айран» - этоайран, приготовленный из козьего молока.

Разбавленный айран носит название «сусаб» и в летнее время широко употребляется разбавленным сырой водой или нарзаном из горных источников. Наиболее целебным горцы считают свежий айран. С незапамятных времен карачаевцы применяют продукт при расстройствах желудка, ожогах, во время лечения вывихов и переломов.
Подсоленный айран с добавлением дикого чеснока по мнению местного населения, избавляет от укусов змеи [17].

Мацони – кисломолочный напиток кавказкой кухни, производимый из ферментативного молока буйволов, коз, коров, овец. Наименование напитка происходит от глаголов «Мацуц’анел» и «Мацнул», которые в переводе с армянского языка означают «Заквашивать» и «Сворачиваться» соответственно. По внешнему виду и вкусовым качествам мацони напоминает жидкий йогурт, кефир и простоквашу. Основная микрофлора напитка представлена теплолюбивыми молочнокислыми стрептококками и болгарской палочкой, которые наделяют его целебными свойствами. Полезные бактериальные культуры способствуют превращению компонентов молока в легкоусвояемую форму, не нагружающую пищеварительный тракт. Кроме того, они создают кислую среду в кишечнике, которая подавляет патогенную и поддерживает развитие, жизнедеятельность нормальной микрофлоры.

Кефир – изначально рассматривался как национальный продукт народов Северного Кавказа. Как продукт он достаточно хорошо изучен, однако природа возникновения кефирных грибков до сих пор не выяснена. Кефир был открыт научным миром сравнительно недавно. Он был обнаружен в солочных бурдюках карачаевцев, пасущих свои стада в окрестностях г. Кисловодска. Об этом в 1867 годудоктор Джогин сделал небольшое сообщение в Кавказском медицинском обществе. Открытие
доктора Джогина заинтересовало не только научные круги России, но и за рубежом.

Мацони – кисломолочный напиток кавказкой кухни, производимый из ферментативного молока буйволов, коз, коров, овец. Широко распространен на территории Ближнего Востока и Малой Азии. Наименование напитка происходит от глаголов «Мацуц’анел» и «Мацнул», которые в переводе с армянского языка означают «Заквашивать» и «Сворачиваться» соответственно. По внешнему виду и вкусовым качествам мацони напоминает жидкий йогурт, кефир и простоквашу. Основная микрофлора напитка представлена теплолюбивыми молочнокислыми стрептококками и болгарской палочкой, которые наделяют его целебными свойствами. Полезные бактериальные культуры способствуют превращению компонентов молока в легкоусвояемую форму, не нагружающую пищеварительный тракт. Кроме того, они создают кислую среду в кишечнике, которая подавляет патогенную и поддерживает развитие, жизнедеятельность нормальной микрофлоры.

Ценится на Кавказе еще один напиток – тан. Благодаря своему составу он имеет большое влияние на организм человека. Он готовится на основе мацони – традиционного армянского кисломолочного продукта из ферментированного буйволиного или верблюжьего молока. Именно мацони, своим особенным вкусом и полезными свойствами, отличает тан от более известного айрана. Помимо всего прочего тан часто ценится своими антипохмельными качествами: он обогащает организм необходимыми солями, замечательно утоляет жажду, а молочная кислота, содержащаяся в нем, приводит в норму желудок и кишечник, заселяя их полезными микроэлементами. Кроме того, тан широко применяется в кулинарии. Он полезен и как самостоятельный продукт и как основа для других блюд. Также к полезным свойствам этого напитка можно отнести: улучшение пищеварительных процессов; профилактику кишечных болезней и запоров; наличие желчегонного и мочегонного эффекта; стабилизацию и улучшение работы сердечно-сосудистой системы; нормализацию артериального давления; снижение вредного холестерина в крови, профилактика атеросклероза; нормализацию водно-солевого баланса в организме; благотворное влияние на работу почек; повышение иммунитета и укрепление естественной защиты организма от вредных воздействий окружающей среды; благотворное влияние на органы дыхания. Также тан имеет высокие диетологические свойства, поскольку он низкокалориен и гипоаллергенен. Напиток стимулирует активность мышечной системы, что несомненно придется по душе людям, активно занимающимся спортом. А также зачастую применяется он и в области косметологии, как очищающее и увлажняющее средство. Так благотворно воздействует на кожу, улучшая и омолаживая ее.

Адыги употребляли молоко коровы, козы, буйволицы, а в лечебных целях – молоко кобылицы – кумыс. Это была повседневная пища, без которой не обходится ни один стол, а также незаменимая еда путников и людей, работавших в полевых условиях.

Для адыгов в прошлом, мало характерно употребление свежего цельного молока, его пили лишь с калмыцким чаем, гораздо чаще и в большом количестве ели «кислое молоко». Наиболее известны два вида «кислого молока» - щхыу и къундысыу. Щхыу- употребляется как в натуральном виде, так и по вкусу подслащенным – с медом, сахаром. Кроме того, готовят незаменимую острую приправу ко всем мясным блюдам «щхущыпс» (соус из кислого молока). Технология приготовления щхыу сохранилась и до настоящего времени. Цельное молоко доводят до кипения, затем дают ему немного остыть, заквашивают специально оставленным кислым молоком и ставят в теплое место. Через два-три часа молоко готово к употреблению [1, 10].

Къундысу – перебродившая сыворотка с молоком. На его приготовление уходило довольно много времени. Необходимую сыворотку собирали в кадушках с мая по октябрь. Готовили этот продукт только осенью. Для этого прокисшую сыворотку кипятили, пока она не выкипала на одну треть. Остывшую жидкость процеживали и переливали в другую посуду, чтобы она приобрела приятный вкус, в нее добавляли соль, перец, и кукурузный початок. Затем кипятили молоко и, дав ему остыть, наливали в сыворотку. Молоко свертывалось. Чтобы творожистая масса стала еще гуще, в къундысыу подливали молоко в течение нескольких дней. Всю зиму практически к нему подливали молоко, чтобы он был свежим. Напиток долго сохранялся, имел приятный специфический вкус и был весьма питателен. Он утолял жажду и регулировал пищеварение. Ели его с мамалыгой (кукурузная каша), вареной и печеной тыквой. Кундысыу служил приправой ко многим блюдам, им заправляли супы и заквашивали молоко. Из кундысыу готовили особое блюдо, сварив его с мукой и топленым маслом. Такой же рассол как кундысыу, готовили абазинцы, чеченцы и балкарцы. Чеченцы в этот напиток для придания хорошего вкуса, добавляли простоквашу, чеснок и черемшу[4,15,16]

В лезгинской кухне распространен национальный напиток тач. Готовят его из пророщенного зёрна: напиток похож на кисель и имеет слегка кислый вкус. Приготовление проходит в несколько этапов и длится до двух, а то и нескольких дней. Напиток готовят преимущественно в зимнее время. Раньше считалось, — тач наполняет тело силой и помогает организму сохранить тепло в холодные дни. А чтобы не заболели дети, их не отпускали на улицу, пока ребятня не отведает тач.

**ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

**2.1.Объекты и материалы исследований**

Экспериментальное исследование проводился в лаборатории микробиологии на базовой кафедре микробиологии медико-биологического факультета Северо-Кавказского федерального университета в период с апреля 2021 по май 2022 гг.

Материалом для исследования послужила закваска национального лезгинского напитка тач (рис.1). Объектом нашего исследования явились выделенные из закваски штаммы микроорганизмов.



Рис. 1 Закваска национального лезгинского напитка тач

Экспериментальная работа проводилась в 3 этапа.

Первый этап заключался в приготовлении реактивов, лабораторной посуды и питательной среды для проведения серии экспериментальных посевов.

Вторым этапом эксперимента было выделение чистых культур микроорганизмов представителей микробиологического консорциума.

Заключительный этап исследования включал в себя идентификацию выделенных тест-культур микроорганизмов из национального лезгинского напитка тач и анализ полученных результатов.

**2.2. Оборудование, используемое для исследований**

Для проведения эксперимента нам потребовалось:

- стакан мерный ТС 50, ГОСТ 25336-82;

- чашки биологические (Петри), ГОСТ 23932-90;

- пробирки бактериологические П2-10-90 ХС; П3-5ХС;

- стаканы стеклянные В-1-250 ТС; Н-2-100 ТХС;

- колбы К-2-250-34 ТХС; П-2-250-34;

- колбы мерные 2-100-2; 2-250-2;

- пробирки типа П1, ГОСТ 25336-82;

- воронки стеклянные В-36-80 ХС; ВФ-1-75ХС; ГОСТ 25336-82;

- микробиологическая петля;

- пинцет, ГОСТ 21241;

- шприц одноразовый стерильный 2,0,ГОСТ ISO 7886-1-2011;

- шприц одноразовый стерильный 1,0,ГОСТ ISO 7886-1-2011;

- вата медицинская гигроскопическая, ГОСТ 5556-81;

- груша резиновая;

- спички, ГОСТ 1820-2001;

- спиртовая горелка лабораторная, ГОСТ 5363-93;

- 0,9 % стерильный раствор натрия хлорида изотонического, ГОСТ 12.1.007;

- спирт этиловый 76 %,ГОСТ 5962-2013;

- проточная вода;

- агар микробиологический, ГОСТ 17206-96;

- стекла предметные для микропрепаратов, ГОСТ 6672-75;

- покровное стекло, ГОСТ 6672-75;

- бумага фильтровальная лабораторная, ГОСТ 12026-76;

- генцианвиолет карболовый, раствор в этиловом спирте, ГОСТ 21237;

- раствор йода в водном растворе йодистого калия (раствор Люголя), ГОСТ 21237;

- фуксин основной, ГОСТ 1728 - 52;

- тушь черная;

-вода дистиллированная, ГОСТ 6709-72;

- масло иммерсионное для микроскопии, ГОСТ 31739-78;

- физиологический раствор (натрия хлорид) 0,9 % (ГОСТ 12.1.007)

 - маркер по стеклу;

- электрическая плита IKAC-MAGHP 7,ГОСТ 14919-83;

- весы лабораторные ВЛТ-150-П,ГОСТ 24104-88;

- шкаф сушильный Memmert IF 75 ТУ 64-1-1382-72;

- холодильный шкаф универсальный R1400VC,ГОСТ 23833-95;

- ламинар – C – 1,2 (221.120) Класс II;

- шкаф сушильный стерилизационный Memmert UF 30 ТУ 64-1-28-70-76;

- микроскоп биологический МБИ-2,ГОСТ 8284-78;

- счётчик колоний автоматический Scan 300, 640х480, Interscience

- перчатки резиновые, ГОСТ 20010-93;

- маска медицинская, ГОСТ 50962-96

- халат медицинский, ГОСТ 24760-81;

- шапочка медицинская (Шарлотта) гофрированная, ГОСТ Р ИСО 10993.

- дистиллятор лабораторный для получения дистиллированной воды, соответствующей ГОСТ 6709–72;

**2.3. Методы и организация проведения исследования**

Для выделения чистых культур и количественного учета заквасочной микрофлоры использовали метод разведений и подсчета числа микроорганизмов. Порядок проведения работы и методика эксперимента основаны на ГОСТ 10444.11-2013 « Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных».

Для приготовления разведений 1 г закваски напитка растирали в ступке с 9 мл физиологического раствора (10-1). Из основного разведения делали дополнительные 10-кратные разведения до10-10(рис.2). Из разведений 10-3, 10-5, 10-7 и 10-9 делали посев на плотные питательные среды методом Коха. Для достоверности результата осуществляли пятикратный повтор посевов. С помощью стерильной пипетки 1 мл пробы для анализа переносили на поверхность питательной среды и равномерно распределяли шпателем Дригальского.



Рисунок 2. Приготовление разведений для посева

Для проведения эксперимента были взяты следующие питательные среды: МПА, МПЖ, МПБ, МРС, Сабуро, Эндо, ЖСА, среды Гисса. Подсчет количества микроорганизмов производили на твердых питательных средах, из чашек, где выросло от 15 до 50 колоний. Колонии подсчитывали в каждом из параллельных посевов и находили среднеарифметическое значение числа колоний. Результаты записывали в виде КОЕ/см3 (г). Морфологические особенности микрофлоры изучались с использованием методов микрокопирования окрашенных фиксированных препаратов при увеличении оптического микроскопа в 1000 р. (иммерсионный объектив).

Для исследования культуральных свойств выделенной чистой культуры микроорганизмов проведены посевы на различные питательные среды: скошенный агар - штрихом; в высокий столбик МПА — уколом бактериологической иглы до дна пробирки; в МПБ бактериологической петлей; в столбик МПЖ - уколом бактериологической иглы до дна пробирки.

На плотных средах учитывали размер колоний, цвет, прозрачность, форму, наличие пигмента, гемолиз вокруг колонии и его характер, способность разжижать желатин и т.д. На жидких средах отмечали их прозрачность, наличие осадка (придонный рост) или пленки на поверхности среды.

Общее микробное число рассчитывали по количеству выросших колоний и определяли количество КОЕ в 1 мл. по формуле:

М=а×10п/ V, где

а – количество выросших колоний;

10п – разведение;

 V –посевная доза (0,1 мл.)

Для изучения сахаролитических свойств бактерий проведены посевы чистой культуры микроорганизмов в углеводные среды Гисса с моносахаридами (глюкозой, галактозой, фруктозой, арабинозой, маннитом), дисахаридами (лактозой, сахарозой) с индикаторным красителем и стеклянными поплавками; на редуцирующие свойства - в обезжиренное молоко с метиленовой синью.

Для определения грампринадлежности выделенных культур применяли сложное окрашивание по методу Грама. Подвижность микроорганизмов определяли по характеру роста на питательной среде, а так же при микроскопировании методом висячей и раздавленной капли.

Для определения каталазной активности культуры проводили каталазный тест. Он определяет взаимодействие микробной культуры с раствором пероксида водорода и сопровождается его разложением под влиянием каталазы клеток с образованием пузырьков кислорода. Для его проведения мы на обезжиренное предметное стекло наносили каплю 3 %-го раствора пероксида водорода, затем эмульсировали в ней небольшое количество культуры, которое вносили микробиологической петлей. Каталазоположительной считается микробиологическая культура, которая образует пузырьки газа в течение первых 5 минут. В случае отсутствия пузырьков газа культура – каталазоотрицательная.

Для дифференциации стафилококков на патогенные и не патогенные проводили реакцию плазмокоагуляции. При получении положительной реакции считают, что в посевах об­наружен *Staphylococcus aureus*. Плазмокоагулазу выявляли следующим образом. В пробирку с
плазмой крови кролика вносили исследуемую суточную культуру микроорганизмов и инкубировали в течение суток при температуре 36ОС. При положительной реакции образуется плотный сгусток. Если через 24 ч плазма не свернулась, то испытуемую культуру относят к коагулазоотрицательной.

При проведении оксидазного теста мы учитывали взаимодействие бактериальной оксидазы с тетраметил-пара-фенилендиамином. В присутствии кислорода воздуха происходит окисление субстрата и образование хромогенного вещества. Стерильной петлей захватывали микробную массу и наносили ее на индикаторную бумагу (пропитанную 1 %-м раствором диамина). Далее растирали её в течение 1 минуты. Бактериальные культуры, не образующие оксидазы, оставались бесцветными. При положительном результате микробные колонии окрашивались в ярко-синий или темно-красный цвет.

После обобщения данных исследования морфологических, культуральных и биохимических свойств чистых культур микроорганизмов определяли вид по классификатору Циона (1948) и определителю бактерий Берджи (1997).

Наибольшие трудности в работе были связаны с идентификацией дрожжей. В основу классификации дрожжей положены различия характера их вегетативного размножения (деление, почкование), спорообразование, а также морфологические и физиологические признаки.

По биохимической активности, способности сбраживать лактозу и развиваться в заквасочной среде дрожжи по Королеву С.А. (1932) делятся на три группы (в тексте приведена номенклатура, использованная Королевым С.А.). В первую группу отнесены неспорообразующие, не сбраживающие лактозу и другие углеводы дрожжи. Вторую группу представляют спорообразующие дрожжи не сбраживающие лактозу. Они сбраживают мальтозу с образованием газа. Эти дрожжи называют «дикими», так как они в производстве не применяются, но хорошо развиваются с молочнокислыми бактериями. Третью группу составляют дрожжи, сбраживающие лактозу. Это спорообразующие и неспорообразующие виды. Первые сбраживают лактозу с образованием газа, мальтозу не сбраживают, лакмусовое молоко не свертывают, за исключением рода *Candida*.

**ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ**

**Изучение культуральных, морфологических и физиолого биохимических свойств выделенных представителей микробиологического консорциума из национального лезгинского напитка тач.**

Анализ результатов микробиологических посевов заквасочной культуры национального лезгинского напитка тач из разведений оценивался отдельно по каждому образцу, затем выводилось среднее значение. Подсчет общего микробного числа осуществлялся из посева со среды МПА (разведение 10-7) и составило 980 тыс. микробных клеток в 1 гр закваски. Подсчет грибов и плесневых дрожжей проводили из посевов со среды Сабуро (разведение 10-5), их количество 245 тыс. микробных клеток. Таким образом, около 80 % всех обнаруженных микроорганизмов составили бактерии и только 20 % —плесневые грибы и дрожжи.

Анализ посевов из разведений позволил выделить 12 образцов, которые в дальнейшем были выделены в чистую культуру и изучены.

Около половины микробных представителей мы смогли отнести к группе молочно­кислых бактерий. Это грамположительные, неподвижные, каталазоотрицательные палочки или кокки. Изучив их культуральные признаки, мы можем предположить принадлежность выделенных культур к четырем родам.

Представители первого выделенного рода образуют на среде МРС бесцветные мелкие гладкие или чуть-чуть шероховатые колонии с зонами просветления. Диаметр колоний составил не более 1-3 мм, форму можно определить как линзовидная или звездообразная.

Микрокопирование представителей этой группы позволяет предположить их принадлежность к грамположительным неспоровым палочковидным бактериям. Анализ характера роста в МПА говорит о неподвижности выделенного образца. Реакция с каталазой отрицательная. Все вышеописанные признаки позволяют идентифицировать выделенных представителей как молочнокислые бактерии рода *Lactobacillus sp.*

Второй выделенный нами род представлен слизеобразными колониями, выпуклыми, округлым, диаметром около 2 мм. При удалении колоний иглой или бактериологической петлей обнаруживаются волокна слизи .

Окраска по Бурри и дальнейшее микроскопирование образца позволило выявить наличие капсулы у данных бактерий. Так же мы смогли определить их принадлежность к неспорообразующим, грамположительным, неподвижным коккам. Реакция с каталазой отрицательная. Описанные признаки позволяют дать заключение о том, что обнаруженные микроорганизмы относятся к роду *Leuconostoc sp*.

Бактерии третей и четвертой выделенных нами групп образовывали на среде МПА бесцветные колонии с ровным или чуть-чуть шероховатым краем, их диаметр составил 1-2 мм. Отмечаются зоны просветления в колониях. При посеве на МПБ образуется небольшой осадок. На средах Гисса отмечена способность ферментируют глюкозу, мальтозу и сахарозу с образованием кислоты без газа. Реакция на каталалазу показала две группы: каталазоположительные и каталазоотрицательные образцы. Окраска по Граму показала грамположительные культуры. Среди каталазоотрицательных так же выделено две группы. Микроскопия мазка этих групп немного отличалась. Одни образцы представлены коками в небольших цепочках, другие располагались преимущественно тетрадами. В обеих группах бактериальные клетки не покрыты капсулой. Нами был осуществлен пересев этих образцов на кислые и щелочные среды, что позволило дифференцировать эти две группы как молочнокислые стрептококки рода *Streptococcus* и рода *Pediococcus* . Бактерий рода *Pediococcus*  способны расти на кислых и щелочных средах, а род *Streptococcus* предпочитает Рh близкую к нейтральной.

Кроме групп молочнокислых бактерий, которые составили большую половину, нами выделены еще 6 образцов.

Первый образец на МПА давал сухие, мелкие, морщинистые, бархатистые колонии с волнистым краем розовато-серого цвета. На поверхности МПБ после инкубации появилась тонкая пленка с беловатым налетом, а на дно пробирки выпал осадок. Окраска по Граму и дальнейшее микроскопирование показало грамположительные крупные палочки с закругленным концами. В некоторых клетках встречались овальные споры, не превышающие размер клетки, расположены центрально. В посеве МПЖ культура разжижает желатин, продуцирует каталазу. Все вышеописанные характеристики позволили отнести выделенную культуру к *Bacillus subtilis.*

Второй образец на мясо-пептонном агаре образовывал выпуклые колонии, круглые, гладкие, цельные, светопроницаемые. На поверхности МПБ через 24 ч инкубации образует пленку, при дальнейшем культивировании наблюдается помутнение среды. Культура разжижает желатин. Посев уколом показал рост по всей среде, что говорит о подвижности этого образца. Окраска по Граму и микроскопия показала грамотрицательные крупные палочки, капсул и спор не обнаружено. Данные признаки позволили предположить, что культура относится к роду *Pseudomonas.* Характерной особенностью этого образца явилась внешняя микроструктура колоний: при малом увеличении микроскопа поверхность колоний имеет ячеистое строение. Этот признак указывают на принадлежность этого образца к *Pseudomonas fluorescens.*

Третий выделенный нами образец с МПА, образовывал в первые сутки культивирования блестящие колонии желтого цвета, при дальнейшей инкубации колонии становились вязкие, насыщенного желтого цвета, края колонии округлой формы. Культура гидролизует желатин, на МПЖ рост сверху и по штриху, с разрывом среды и газообразованием. Посев на среду Гисса показал, что выделенный образец практически не использует: арабинозу, галактозу, глюкозу (слабый рост), дульцит, мальтозу, рамнозу, сахарозу, сорбит. Хорошо использует глицерин. Окраска по Граму и микроскопирование показали принадлежность культуры к грамположительным мелким кокам, собранным в тетрады. Все эти показатели позволяют идентифицировать образец как *Micrococcus luteus.*

Следующий образец на МПА и ЖСА давал ровные круглые колонии белого цвета, при посеве в МПБ образовывалось равномерное помутнение. НА МПЖ культура разжижала желатин в виде воронки с выделением газа. Реакция на каталазу положительная, на плазмукоагулазу отрицательная. На средах Гисса отмечена способность ферментируют глюкозу, мальтозу и сахарозу без образования газа. Окраска и микроскопия показала грамположительные кокки в виде гроздьев и тетрад. Капсул и спор не выявлено. Все эти признаки позволили идентифицировать культуру как *Staphylococcus epidermidis.*

На среде Сабурро нами были выделены два типа колоний, которые мы смогли идентифицировать как грибы рода *Candida* и дрожжи рода *Saccharomyces.*

Представителей рода *Candida* имели блестящие белые выпуклые колонии кремообразной консистенции. При микроскопии видны крупные овальные и эллипсоидные клетки. Чтобы исключить принадлежность грибов к дрожжам, нами был осуществлен посев культуры в МПБ с глюкозой. После культивирования в течении 48 ч в мазках отчетливо виден псевдомицелий, что говорит о принадлежности образца к грибам рода *Candida.*

Представители рода *Saccharomyces* на среде Сабуро имели пастообразные выпуклые кремовые колонии с волнистым валиком. При микроскопии выявлен псевдомицелий.

Анализируя результаты микроскопирования выделенных образцов можно выявить общие закономерности морфологии микробного консорциума заквасочных культур национального лезгинского напитка тач. Преобладающими являются молочнокислые микроорганизмы, на их долю приходится около половины микробного состава. Преимущественно это палочковидные формы бактерий, так же встречаются в большом количестве коковые формы (моно-, дипло- и тетракокки). Среди микотических микроорганизмов преобладают округлые и овальные морфотипы, характерно почкование.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

В ходе проведенного исследования по выделению и характеристики представителей микробиологического консорциума из традиционного дагестанского напитка тач были сделаны следующие выводы:

1. Обзор литературы по данной тематике показал, что заквасочная микрофлора национальных напитков очень разнообразна и на сегодняшний день изучена недостаточно. Актуальность исследования связана с поиском новых комбинаций микробного консорциума, обладающих спектром необходимых характеристик для внедрения в промышленное производство.
2. Выявлены общие закономерности в морфологии микрофлоры заквасочной культуры тач. Типичным для микрофлоры тача является наличие палочковидных форм бактерий, диплококков, тетракокков, коротких стрептококков, овальных дрожжей с характерным почкованием через перемычку на длинной стороне клетки.
3. Определен родовой микробный состав представителей национального лезгинского напитка тач. Выделено12 образцов тест-микроорганизмов, которые в дальнейшем были выделены в чистую культуру и изучены. Это 4 образца кисломолочных культур: *Lactobacterium sp.*, *Leuconostoc sp.*, *Pediococcus sp. и Streptococcus sp.* Так же бактериальная флора представлена  *Bacillus subtilis, Pseudomonas fluorescens*, *Micrococcus luteus* и *Staphylococcus epidermidis.* Среди микотической микрофлоры выделены представители двух родов: *Saccharomyces* *sp.*и *Candida sp.*

 Наличие пробиотических культур в закваске говорит о целебных свойствах данного напитка, однако обнаружение грибов рода кандида, *Micrococcus luteus* и *Staphylococcus epidermidis* говорит о необходимости нормированного употребления этого напитка, так как количественное превышение данных микроорганизмов может вызвать дисбиоз.

1. Установлено, что культуральные, морфологические и физиолого биохимические свойства выделенных представителей микробного консорциума национального лезгинского напитка тач характерны для идентифицированных тест-культур микроорганизмов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Донченко Л.В., Надыкта В.Д. Продукты питания в отечественной и зарубежной истории.М.: ДеЛи принт, 2006. 295с.
2. Артюхова, С. И. Основы пищевой биотехнологии и нанотехнологии / С.И. Артюхова, Ю.А. Гаврилова. - М.: ОмГТУ, 2010. - 312 с.
3. Бурыкина, Т.П. Исследование свойств заквасочных культур / Т.П. Бурыкина // Фундаментальные исследования. - 2008. - № 11. - С. 76-77.
4. Евдокимов, И.А. Биотехнологические особенности домашнего айрана: создание промышленной технологии / И.А. Евдокимов, О.И. Олешкевич, И.К. Куликова, С.Е. Виноградская // Молочная промышленность. - 2013. - № 10. - С. 52-53.
5. Еремина И.А. Микробиология молока и молочных продуктов. Учебное пособие. - Кемерово, КемТИПП, 2004. - 80 с.
6. Зобкова, 3.С. Функциональные цельномолочные продукты / З.С. Зобкова // Молочная промыпшенность. - 2006. - № 3. - С. 46-52.
7. Золоторева, М.С. Продукты переработки сыворотки в молочном производстве / М.С. Золоторева // Молочная промышленность. - 2014. - № 2 (173). - С. 24-25.
8. Рожкова И.В. Новый пробиотический штамм Lactobacillus reuteri / И.В. Рожкова, Т.А. Раскошная, С.Г. Ботина, А.В. Бегунова // Молочная промышленность. -2015. № 12. - С. 38 - 39.
9. Рябцева, С.А. Дрожжи в молочной отрасли: классификация, свойства, применение / С.А. Рябцева, С.Е. Виноградская, А.А. Панфилова // Молочная промышленность. - 2013. - № 4. - С. 64-66.
10. Садовой, B.B. Совершенствование технологических процессов и оптимизация рецептурных композиций в пищевой промышленности / В.В. Садовой. - Ставрополь, СевКавГТУ, 2006. - 174 с.
11. Смирнова, Е.А. Рынок функциональных молочных продуктов / Е.А. Смирнова, A.A. Кочеткова // Молочная промышленность. - 2011. - №2. - С. 63-67.
12. Соловьева, Е.Е. Заквасочные культуры для производства молочных продуктов / Е.Е. Соловьева // Молочная промышленность. - 2006. - № 11. - С. 50.
13. Coulston, A.M. Nutrition in the Prevention and Treatment of Disease / A.M. Coulston, C.L. Rock, E.R. Monsen. // London: Academic Pres. - 2003. - 801 p.
14. Floris, R. Hydrolysis of whey proteins: opportunities for new functionalities / R. Floris // Proceedings of the 5th International Whey Conference. - Paris, France, 2008. - P. 25-26.
15. Huth, P. Natural Dairy Council / P.Huth, G. Miller // Dairy Foods. - 2005. -№ 1 -P. 60-61.
16. Rogelj, I. Fermented milk as a functional food / I. Rogelj // Agriculture. - 2002. -P. 50-59.
17. Zulewska, J. Characteristics of selected functional properties of whey protein concentrates with different protein content / J. Zulewska, Z. Smietana // Pol. J. Natur. Sc. -2002. - № 11. - P. 89-95.