

# ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ КОМПОНЕНТОВ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА АНТИБИОТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА *LACTOCOCCUS LACTIS* K205

## THE STUDY OF INFLUENCE OF MEDIA COMPONENTS ON ANTIBIOTIC PROPERTIES OF *LACTOCOCCUS* *LACTIS* K205

*T. Sultimova*

*Summary.* Consumer demand for minimally processed food or «fresh food» without chemical preservatives stimulated researchers to search for natural antimicrobial agents. Therefore, the search for bacteriocins with improved physical and chemical properties and a broad antimicrobial spectrum is of great interest for the food industry.

One of the main aspects of this interest is the increased demand of consumers for the quality of food and their safety for health. The most studied and approved for use as a biological preservative (code E234) is bacteriocin nisin, the only antibiotic having a «GRAS» status (recognized by the European Parliament as safe), the producer of which is produced by different strains of the same species *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. The studied properties of strain K205 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and the selection of the components of the medium for its cultivation are described in this article.

*Keywords:* bacteriocin, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, nutrient medium, antibiotic activity.

*Сультимова Татьяна Доржиевна*

*К.б.н., доцент, Восточно-Сибирский государственный университет технологий и управления  
tsultimova@mail.ru*

*Аннотация.* Потребительский спрос на минимально обработанные пищевые продукты или «свежую еду» без химических консервантов стимулировал исследователей на поиск натуральных антимикробных средств. Поэтому поиск бактериоцинов с улучшенными физико-химическими свойствами и широким антимикробным спектром представляет большой интерес для пищевой промышленности.

Одним из главных аспектов этого интереса является возросший спрос потребителей к качеству продуктов питания и их безопасности для здоровья. Наиболее изученным и разрешенным для применения в качестве биологического консерванта (код E234) является бактериоцин низин, единственный из антибиотиков имеющий «GRAS» статус (признанный Европейским парламентом как безопасный), продуцентом которого является продуцентами которых являются разные штаммы одного вида *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Изученные свойства штамма K205 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* и подбор компонентов среды для его культивирования описаны в данной статье.

*Ключевые слова:* бактериоцин, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, питательная среда, антибиотическая активность.

**Б**актериоциногенность — биологический феномен, широко распространенный в природе и связанный с антагонизмом у бактерий. Исследования последних лет позволили выделить в самостоятельную категорию явлений антагонистическую активность микроорганизмов, характеризующуюся синтезом белковоподобных антибактериальных веществ с ограниченным диапазоном активности. Считают, что с практической точки зрения эти антибактериальные препараты, действующие на микрофлору избирательно, могут использоваться для нормализации микробного ценоза при некоторых патологиях у человека и животных.

Интерес по использованию бактериоцинов, образуемых лактококками, резко возрос. Одним из главных аспектов этого интереса является возросший спрос потребителей к качеству продуктов питания и их безопасности для здоровья. Широко используемые химические консерванты и антибиотики, увеличивающие срок хранения продуктов питания, вызывают опасения. Наиболее изученным и разрешенным для применения в качестве биологического консерванта (код E234), являет-

ся бактериоцин низин, единственный из антибиотиков с 1997 года имеющий «GRAS» (Generally Recognized As Safe) статус, т.е. признанный Европейским парламентом как безопасный (European Parliament and Council, 1997). Являясь низкомолекулярным белком, низин легко переваривается с пищей, не токсичен. Описаны несколько форм низинов (A, B, C, D, E, Z, R, Q) и родственных им лактицинов, отличающихся между собой по ряду физико-химических свойств, аминокислотному составу и спектру антибактериального действия, но продуцентами которых являются разные штаммы одного вида *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Поэтому интерес к получению «естественных антибиотиков», образуемых молочнокислыми бактериями в последние годы возрос.

Особый научный интерес представляют молочнокислые стрептококки серологической группы N, которые по систематическому положению недавно выделены из группы микроорганизмов рода *Streptococcus*, включающего патогенные формы, и под новым названием *Lactococcus* отнесены к категории «GRAS», куда относятся микроорганизмы, не вызывающие инфекционных

заболеваний человека и животных. Изучение влияния компонентов питательной среды для культивирования продуцентов также является важным для получения сверхсинтеза бактериоцина.

Целью работы являлось изучить влияние компонентов питательной среды на биосинтез бактериоцина.

### Объект исследования

Объектом исследования является ранее выделенный из национального кисломолочного напитка курунги штамм *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* K205. микробиологические среды: мясо-пептонный агар (МПА), молочный обрат, MRS, оптимизированная биосинтетическая среда следующего состава (%):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ –0,5,  $\text{MgSO}_4$ –0,02,  $\text{NaCl}$ –0,2, глюкоза — 2,6, дрожжевой экстракт — 35–40 мг% азота аммония.

### Методы исследования

В работе использованы классические микробиологические методы для выделения чистых культур микроорганизмов из природных источников и изучения морфологических и физиолого-биохимических свойств. Все полученные результаты оценивали в сравнении с данными Определителя бактерий Берги.

Культивирование микроорганизмов проводили при температуре 28 °С в термостате в течение 24-х часов.

*Морфологию выделенных микроорганизмов* изучали по характеру роста на твердой питательной среде МПА и микроскопирования.

*Устойчивость штамма к NaCl.* Культуру выращивали на жидкой биосинтетической среде с 4 и 6,5%  $\text{NaCl}$  при температуре 30°С в течение 24 х часов. Рост или отсутствие роста штамма отмечали визуально (после встряхивания пробирки) по наличию или отсутствию мутности и определяли оптическую плотность на фотоэлектроколориметре (ФЭК).

*Определение роста культуры при pH 9,6.* Культуру выращивали на жидкой биосинтетической среде со значением pH 9,6 при температуре 30°С в течение 24-х часов. Рост или отсутствие роста штамма отмечали визуально (после встряхивания пробирки) по наличию или отсутствию мутности и определяли оптическую плотность на ФЭКе.

*Определение роста культуры при различной температуре (10°С, 40°С, 45°С).* Культуру выращивали на жидкой биосинтетической среде при разных значениях температур: 10°С, 40°С, 45°С в течение 24-х часов. Рост

или отсутствие роста штамма отмечали визуально (после встряхивания пробирки) по наличию или отсутствию мутности и определяли оптическую плотность на ФЭКе.

Ферментативную активность в отношении потребления ряда углеводов, проводили по методу «пестрого ряда».

*Антибиотическую активность* определяли методом диффузии в агар с измерением зоны подавления роста тест-культур *Bacillus coagulans* и *Escherichia coli* в мм. В качестве эталона для перевода в МЕ использовали соответствующие разведения антибиотического препарата Низаплин (Aplin &Barrett Ltd, Великобритания).

*Чувствительность к антибиотикам* определяли диско-диффузионным методом с использованием дисков, пропитанных антибиотиком в концентрациях 2–75 мкг в диске и хранящихся во флаконах с влагоудерживателем (силикагелем).

*Микроскопирование* проводили на микроскопе Альтами БИО 8 при увеличении в 2000 раз.

### Результаты исследований

Исследован штамм K205, находящийся долгое время на хранении. Для начала проведен ряд пересевов в чашки Петри со средой мясо-пептонный агар (МПА), а также с биосинтетической средой с добавлением индикатора бромкрезолового пурпурного. Инкубировали при 30°С в течение 24 часов. Повторяли данную процедуру неоднократно, для подтверждения чистоты культуры. Затем проводили окрашивание по методу Грама и микроскопирование штамма на световом микроскопе при увеличении в 2000 раз.

В результате получили однородные колонии, которые образовывали зоны просветления вокруг себя при росте на биосинтетической среде с добавлением индикатора бромкрезолового пурпурного, что свидетельствовало об образовании кислоты и, соответственно, изменении уровня pH. В результате микроскопирования выявлено, что культура представлена грамположительными кокками, собранными в пары и короткие цепочки разной длины от 4-х до 7-ми кокков, что характерно для *L. lactis* subsp. *lactis*.

Свойство потреблять различные углеводы, включая сахара, спирты и органические кислоты лежит в основе отличительных признаков при идентификации молочнокислых бактерий.

Использован метод определения сбраживания углеводов исследуемым штаммом с использованием готовых

Таблица 1. Значение оптической плотности при определении сбраживания углеводов

Углевод	Оптическая плотность (ОП <sub>670</sub> )
	штамм К-205
1	2
Глюкоза	1,5
Арабиноза	1,1
Маннит	1,0
Ксилоза	1,0

Таблица 2. Влияние углеводного компонента питательной среды на антибиотическую активность штамма *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* К 205.

Тест культура	Диаметр зон ингибирования роста бактерий, мм							
	Конт-роль	Глюко-за	Араби-ноза	Ксило-за	маннит	Nisaplin, 10 МЕ/мл	Nisaplin, 20 МЕ/мл	Nisaplin, 40 МЕ/мл
1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>Bacillus coagulans</i>	23	12	22	15	14	10	12	14

Таблица 3. Влияние аминокислот на антибиотическую активность штамма *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* К205.

Компоненты	Диаметр зон подавления роста, мм			
	К 205-1	Nisaplin, 40 МЕ/мл	Nisaplin, 20 МЕ/мл	Nisaplin, 10 МЕ/мл
1	2	3	4	5
аспарагин	18	15	14	12
глицин	15	15	14	12
лизин	12	15	14	12
лейцин	12	15	14	12
метионин	13	15	14	12
аланин	14	16	13	12
глутаминовая кислота	13	15	14	11
глутамин	12	15	12	11
Контроль со штаммом	13	15	14	12

Таблица 4. Чувствительность штаммов *L. lactis* subsp. *lactis* К 205 к антибиотикам

Антибиотик	Концентрация в диске, мкг	Диаметр зон подавления роста, мм
		К 205-1
1	2	3
Пефлоксацин	5	12
Клиндамицин	2	15
Азтреонам	30	-
Ванкомицин	30	19
Ципрофлаксацин	5	15
Фузидин	10	25
Цефтриаксон	30	-
Амоксициллин	20	35
Гентамицин	10	-
Амикацин	30	-
Меропенем	10	12
Цефоперазон	75	30
Норфлоксацин	10	7
Карбенициллин	25	15
Бензилпенициллин	6	17
Клиндамицин	2	10

растворов углеводов и индикатора бромкрезолового пурпурного в жидкой биосинтетической среде. Культивировали в течение 24 ч при 300С, после чего по изменению окраски среды и измерению оптической плотности отмечали результат (таблица 1).

В результате исследования определили способность сбраживания углеводов данным штаммом по измерению оптической плотности. Установлено, что в присутствии в питательной среде глюкозы наиболее благоприятна для роста культуры оптическая плотность, которой составляла 1,5. В среде содержащей арабинозу оптическая плотность составляла 1,4, маннит и ксилозу — 1,3.

Изучена антибиотическая активность штамма (таблица 2). Установлено, что бактериоцинообразующий штамм *L. lactis* subsp. *lactis* K205 подавляет рост грамположительной бактерии *B. coagulans*.

Наибольшее антимикробное действие оказывал штамм на среде с арабинозой, который по сравнению с контролем, содержащим в среде сахарозу, не оказал значительного повышения антимикробного действия.

Исследована потребность выделенных штаммов *L. lactis* subsp. *lactis* K205 в факторах роста — влияние 8 аминокислот (аспарагин, глицин, лизин, лейцин, метионин, аланин, глутаминовая кислота, глутамин), способных включаться в метаболизм лактококков (таблица 3).

Наибольшее антимикробное действие оказывал штамм на среде с аспарагином и глицином.

В результате в дальнейших исследованиях использовалась питательная среда, содержащая аспарагин.

По результатам изучения чувствительности изучаемых штаммов к антибиотикам (таблица 4), выявлено,

что штаммы чувствительны к антибактериальным антибиотикам широкого спектра действия, ингибирующим синтез белка: клиндамицину, карбенициллину, в меньшей степени к аминогликозидным антибиотикам: гентамицину, амикацину. Все штаммы чувствительны к антибиотикам, ингибирующим синтез клеточной стенки: цефоперазону, бензилпенициллину, ванкомицину, ципрофлоксацину, амоксициллину.

Чувствительность к антибиотическим препаратам может быть следствием их применения в сельскохозяйственной практике. В связи с этим, контроль по данному показателю является необходимым, так как при использовании культур, резистентных к лекарственным препаратам в пищевой и медицинской практике, могут передаваться в макроорганизм плазмиды, несущие гены лекарственной устойчивости, что затрудняет лечение.

В результате проведенной работы установлена чистота культуры *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* K205, исследовано влияние углеводного компонента на рост и бактериоцинопродуцирующую активность штамма. Выявлено, что присутствие в среде арабинозы увеличивало антибиотическую активность, но по сравнению с контролем, содержащим сахарозу, активность штамма ниже. Исследовано влияние аминокислот на рост и активность штамма. Выявлено, что содержание в среде аспарагина увеличивает антибиотическую активность штамма-продуцента. Таким образом, произведен подбор основных компонентов питательной среды, что позволило повысить антибиотическую активность штамма K205 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*.

Изучено влияние антибиотиков на рост культуры. Выявлено, что штамм чувствителен к антибактериальным антибиотикам широкого спектра действия, ингибирующим синтез белка и синтез клеточной стенки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Стоянова, Л. Г. Создание банка лиофильных бактериоцинопродуцирующих молочнокислых бактерий / Т. Д. Сульимова, А. И. Нетрусов // Цитология. — 2004. — Т. 46. — № 10. — С. 865–867.
2. Стоянова, Л. Г. Микробиологическая характеристика нового штамма *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* K-205 / Т. Д. Сульимова, А. Р. Строева, А. И. Нетрусов // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. — 2008. — № 1. — С. 60–63
3. Квасников, Е. И. Молочнокислые бактерии и их использование / О. А. Нестеренко // М.: Наука. — 2003. — 348 с.
4. Стоянова, Л. Г. Молочнокислые бактерии // Практикум по микробиологии. Под ред. А. И. Нетрусова. — М. Изд. Академия. — 2005. — С. 467–486.
5. Хоулт Дж. Определитель бактерий Берджи. т. 1 // М.: Наука. — 1997. — 421 с.
6. Хоулт Дж. Определитель бактерий Берджи. т. 2 // М.: Наука. — 1997. — 325 с.

© Сульимова Татьяна Доржиевна ( tsultimova@mail.ru ).

Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»