

УДК 577.2:579(076)  
DOI 10.26897/0021-342X-2017-5-41-61

## ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ *LACTOCOCCUS LACTIS* SUBSP. *LACTIS* С АНТИМИКРОБНЫМ ДЕЙСТВИЕМ

Л.Г. СТОЯНОВА

(Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова)

Проведен скрининг молочнокислых бактерий с антимикробным действием из коровьего и кобыльего молока, национальных продуктов смешанного молочнокислого и спиртового брожения курунги, кумыса и Doogh лечебно-профилактического назначения разных территориальных зон России (Московского региона, Бурятии, Башкирии) и Ирана. Выделение лактококков с антимикробной активностью проводили поэтапно, используя селективные среды и тестовые культуры бактерий и грибов (*Bacillus coagulans*, *Escherichia coli*, *Aspergillus niger*). С использованием классических микробиологических методов и на основе анализа нуклеотидных последовательностей фрагмента гена 16S рРНК идентифицированы 20 культур лактококков, обладающих антимикробным действием, включая и фунгицидное (например, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*). Определен уровень накопления молочной кислоты и спектр их антимикробного действия. Нуклеотидные последовательности наиболее перспективных штаммов для создания биоконсервантов депонированы в GenBank.

**Ключевые слова:** *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, выделение, идентификация, коровье и кобылье молоко, курунга, кумыс, Doogh, молочная кислота, бактериоцины, низин.

### Введение

В настоящее время потребность пищевой промышленности, медицины и сельского хозяйства в бактериоцидных и фунгицидных препаратах растет с каждым годом, а используемые в настоящий момент химические препараты, антибиотики обладают токсичностью для человека и животных, накапливаются в почве и воде, к тому же среди патогенных и условно-патогенных микробов растет число полирезистентных форм. Поиск новых природных антимикробных веществ, синтезируемых непатогенными микроорганизмами, является актуальной задачей.

Молочнокислые бактерии (МКБ) широко распространены в природе: их можно обнаружить в почве, на разлагающихся остатках животного и растительного происхождения, в кишечнике позвоночных, в молоке и молочных продуктах. Вместе с растениями и пищей они попадают в желудочно-кишечные тракты человека и животных, составляя его микробиоту [8, 12, 19]. Основным свойством МКБ, по которому их объединяют в отдельную обширную группу микроорганизмов, является способность в качестве главного продукта брожения образовывать молочную кислоту. Молочнокислое брожение осуществляют бактериальные организмы,

гетерогенные по морфологии: палочковидные и шаровидные (кокки сферической или эллипсоидной формы), относящиеся к родам *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Vagococcus*, *Tetragenococcus*, *Carnobacterium*, *Bifidobacterium* [17].

На протяжении столетий человек использует МКБ при приготовлении ферментированных продуктов в качестве способа консервации молока и пищевого сырья. За счет синтеза антимикробных метаболитов, таких как молочная и уксусная кислоты, перекиси, диацетил и др., МКБ предотвращают рост патогенных и условно-патогенных микроорганизмов. Но ведущее место в объяснении явления антагонизма отводится специфическим антибиотическим веществам белковой природы – бактериоцинам, которые, в основном, являются гетерогенными антибактериальными пептидами, разнообразными по уровню активности, спектру и механизму действия, молекулярной массе и физико-химическим свойствам [6, 10].

Наиболее изученным является бактериоцин низин, единственный из антибиотиков, с 1998 г. имеющий статус GRAS (Generally Recognized As Safe) и разрешенный для использования в качестве пищевой добавки (код E234) [15]. Низин является основой препарата Nisaplin, производимого английской фирмой Aplin & Barrett Ltd. В последние годы датская фирма Christian Hansen также начала поставлять на рынок низин собственного производства под торговой маркой Krisin. Препараты обеих компаний имеют очень схожие характеристики, содержат 2,5% активного компонента с антибиотической активностью 1000 МЕ/мг (МЕ – международная единица) [6].

Однако следует отметить, что низин теряет активность при нейтральных и щелочных значениях pH. Кроме того, ненасыщенные аминокислоты, входящие в его состав, легко взаимодействуют с фосфатными группами ферментов, аминокислот, присутствующими в сырье и продуктах, что приводит к снижению или потере активности препарата. Инактивируется низин и протеолитическими ферментами, присутствующими в пищевом сырье [6, 7, 10]. Но самое важное то, что низин эффективен только против грамположительных бактерий, поэтому использование его в качестве консерванта не решает всю проблему порчи пищевых продуктов и сырья, основной причиной микробиальной порчи которых в условиях хранения составляют микробы, относящиеся к грамотрицательным бактериям и микроскопическим грибам [16, 18].

Синтез бактериоцинов – наследственная особенность микроорганизмов, проявляющаяся в том, что каждый штамм способен образовывать один или несколько определенных, строго специфичных для него антибиотических веществ. Продуцентом низина являются лактококки *L. lactis* subsp. *lactis* – стрептококки серологической группы N. По систематическому положению они выделены из группы микроорганизмов рода *Streptococcus*, включающего патогенные формы, и под новым названием *Lactococcus* отнесены к категории GRAS, куда входят микроорганизмы, не вызывающие инфекционных заболеваний человека и животных [6].

Один из первых и важных этапов в поиске и выборе штамма, перспективного для использования в пищевой промышленности, – это определение его таксономической принадлежности. Правильная идентификация штамма на видовом уровне позволяет исследователю заранее иметь представление о безопасности, происхождении, среде обитания и физиологических характеристиках выделенного микроорганизма [8, 14].

Молочнокислые бактерии являются бактериальной основой и (или) закваской разнообразных продуктов питания, постоянными обитателями желудочно-кишечного тракта и способны успешно конкурировать с гнилостными бактериями, обитающими в кишечнике, часто устойчивыми к антибиотикам. Молочнокислые бактерии

и их бактериоцины могут служить биоконсервантами и пробиотиками для использования их в медицине и пищевой промышленности [5, 7, 11]. В последние годы все большее внимания уделяется поиску новых штаммов, обладающих антимикробным потенциалом и лишенных недостатков консервантов и классических антибиотиков.

Цель данного исследования состояла в скрининге и идентификации природных штаммов *L. lactis* subsp. *lactis* с антимикробным действием, перспективных для создания биоконсервантов.

## Материалы и методы

В работе использовали сырое коровье молоко без консервантов молочных комбинатов Москвы (фермы МСХА), Клина (Московская область), Улан-Удэ (Бурятия) и Ирана, кобылье молоко Башкирии, а также национальные кисломолочные продукты смешанного молочнокислого и спиртового брожения: курунгу из Бурятии, башкирский кумыс и иранский Doogh лечебно-профилактического назначения.

### 1. Выделение молочнокислых бактерий

Выделение бактериоцинообразующих штаммов *Lactococcus lactis* проводили поэтапно, используя различные селективные среды.

С целью выделения мезофильных лактококков (предполагаемых продуцентов бактериоцина низина) пробирки с исследуемым молоком оставляли для самозаквашивания при 30°C в стационарных условиях. Затем проводили отбор пробирок, в которых плотный молочный сгусток формировался после ряда пассажей за 10–12 ч, что характерно для гомоферментативных лактококков. Затем проводили высевы на агаровую среду из гидролизованного молока.

Питательную агаровую среду готовили следующим образом. Сначала для приготовления гидролизованного молока в 1 л пастеризованного при 85°C и охлажденного до 45°C обезжиренного молока добавляли 1 г сухого порошка панкреатина, предварительно разведенного в теплой воде, тщательно перемешивали, добавляли 5 мл хлороформа, закрывали пробкой и ставили для гидролиза на 72 ч при 40°C, периодически перемешивая содержимое колбы с целью удаления паров хлороформа. Выпавший осадок отфильтровывали или центрифугировали. Кислотность надосадочной жидкости (гидролизата) доводили 40%-ным водным раствором NaOH до pH=7,0–7,2, стерилизовали при 1 атм 10 мин [3]. Для получения питательной среды свежеприготовленный гидролизат разводили в два раза стерильной водопроводной водой, добавляли 0,5% дрожжевого экстракта и 2,0% агар-агара.

Для выделения лактококков из курунги, кумыса и Dough 5% испытуемого материала высевали в стерильное обезжиренное молоко (обрат) – лучшую среду для культивирования МКБ [5]. Для получения обрат сырое коровье молоко без консервантов центрифугировали при 1740 г в течение 20 мин, снимали жировой компонент и стерилизовали при 0,5 атм 15 мин.

Ряд пробирок с обратом инкубировали при 30°C для выявления мезофильных лактобактерий в стационарных условиях. Учет количества кислотообразующих МКБ осуществляли путем добавления в среду инкубирования 2 мл 0,1%-ного раствора индикатора – бромкрезолового пурпурного (0,00016%), образующего зоны просветления вокруг колоний на агаровой среде при глубинном посеве лактобактерий за счет взаимодействия его с молочной кислотой.

После инкубирования в обрате отбирали те пробирки, в которых плотный молочный сгусток формировался за 10–12 ч. Микробиологической петлей часть сгустка перемещали в пробирку с физраствором и из серии разведений высевали на агаровую среду.

Мезофильные лактококки выращивали на агаровой среде 3–4 сут. От других молочнокислых бактерий их отделяли по виду колоний в чашке Петри и путем микроскопического исследования препаратов.

Для выделения активных низинообразующих штаммов с помощью стерильного репликатора проводили высеv кислотообразующих колоний с поверхности агаровой среды, приготовленной на основе гидролизата молока с индикатором, на газон с тест-культурой. Параллельно высевали на твердую среду без тест-культуры. Отбирали клоны, образующие наибольшую зону задержки роста.

Для засева чашек Петри тест-организмом использовали суточную культуру термофильной спорообразующей культуры *B. coagulans* 429, выращенную при 55°C на питательной среде, содержащей (г/л): глюкозу – 10,0; пептон – 5,0, NaCl – 5,0; агар-агар – 20,0 с добавлением бульона Хоттингера – 28 мг% по аминному азоту, pH – 7,0. Тест-культуру вносили в виде суспензии клеток в физиологическом растворе в количестве 110<sup>9</sup> кл./мл (по бактериальному стандарту мутности), исходя из расчета 0,1 мл суспензии в одну чашку Петри при глубинном культивировании.

Тест-культуры были получены из коллекции микроорганизмов кафедры микробиологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. Бактерии выращивали на МПА, грибы – на среде Сабуро следующего состава (г/л): глюкоза – 40,0; пептон – 10,0; агар-агар – 20,0; левомицетин – 2,5%.

Для выделения штаммов *Lactococcus lactis* с широким спектром действия из колоний, выросших на агаровых средах, отбирали наиболее активные по ингибиторной активности на разные группы микроорганизмов. Для этого при помощи репликатора методом реплик колонии выделенных чистых культур перекалывали на газон с тест-культурами, основными представителями разных таксономических групп: грамположительные – *Micrococcus flavus* NCTC 8340; грамотрицательные – *Escherichia coli* 52, *Proteus vulgaris* 206; грибы – *Aspergillus niger* 369.

*Micrococcus flavus* NCTC 8340, *Escherichia coli* 52 культивировали в термостате при 37°C, *Aspergillus niger* 369 при 28°C. Использовали суточные культуры бактерий и двухсуточные культуры грибов. По зоне задержки роста судили об ингибиторной способности МКБ по отношению к разным группам микроорганизмов.

## 2. Изучение морфологических и культуральных свойств

Для исследования морфологии МКБ, выросших в молоке или молочных продуктах, готовили фиксированные препараты. Для этого бактериологическую петлю вводили в молочный сгусток и наносили его на поверхность предметного стекла тонким слоем. Препарат сушили на воздухе, затем фиксировали смесью спирта с эфиром в соотношении 1:1, несколько раз нанося смесь на мазок. Обработка препарата эфиром обеспечивает извлечение и удаление жира из мазка. Фиксированный препарат рекомендуется окрашивать метиленовым синим в течение 2–3 мин, поскольку именно этот краситель слабо окрашивает основной фон препарата (казеин молока) и хорошо прокрашивает клетки, что обеспечивает четкость препарата [5]. Для выявления и доказательства грам-принадлежности выделенных чистых культур проводили окраску по методу Грама [3].

Морфологию микрофлоры куруги, кумыса и иранского напитка Doogh изучали с помощью микроскопа МБИ-15 с фазово-контрастным конденсором КФ-4.

Культуральные признаки оценивали, руководствуясь их перечнем для идентификации бактерий [17], а именно: длительность образования сгустка при росте в обрат, характер роста их в жидких средах на основе гидролизата молока, в мясопептонном бульоне с разным содержанием хлористого натрия – 2, 4 и 6,5%, наличие роста при рН=9,6, при разных температурных режимах – 10, 28 и 45°C, а также по форме колоний на твердых агаровых средах.

Отношение к кислороду определяли по характеру роста лактококков в агаровом столбике по длине укола [3].

Экспресс-тест на наличие каталазы был проведен с 3%-ной перекисью водорода, каплю которой наносили на бактериальную массу лактобацилл, снятых с поверхности агаризованной среды бактериологической петлей. Образование пузырьков газа через 1–5 мин говорит о положительном результате (наличие каталазы), их отсутствие – об отрицательном [3].

Тест на наличие оксидазы проводили с применением оксидазных дисков (фирма Hi Media Laboratories Pvt. Limited Mumbai; India), изготовленных из специальной фильтровальной бумаги и пропитанных оксалатом N,N-диметилпарафенилендиамина, аскорбиновой кислотой и  $\alpha$ -нафтолом. Бесцветный N,N-диметилпарафенилендиамин служит искусственным реципиентом электронов. В ходе оксидазного теста в результате окислительно-восстановительных реакций с участием микробной оксидазы образуется индофенол – вещество синего цвета.

### *3. Физиолого-биохимические свойства*

Физиолого-биохимические свойства наиболее активных по антибиотической активности выделенных штаммов оценивали по потреблению углеводов, накоплению молочной кислоты, потребности в факторах роста, уровню их ингибиторной активности, спектру действия. Отобранные колонии перевивали в обрат, а после образования плотного молочного сгустка за 10–17 ч штаммы пересеивали в посевную среду, приготовленную на водопроводной воде с глюкозой и дрожжевым экстрактом (г/л): 10 и 0,5, соответственно (рН=6,8–7,0). Посевной материал в количестве 5% вносили в ферментационную среду следующего состава (г/л): глюкоза – 10,0; NaCl – 0,2;  $\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$  – 2,0;  $\text{MgSO}_4$  – 0,2; дрожжевой экстракт – 5; рН среды – 6,8–7,0. После внесения изучали физиолого-биохимические свойства [7].

#### *3.1. Изучение ферментативной активности в отношении сбраживания углеводов*

Изучение ферментативной активности в отношении потребления углеводов проводили по методу «пестрого ряда». Был использован ряд углеводов: арабиноза, ксилоза, рибоза, глюкоза, рамноза, мальтоза, сахароза, манноза, лактоза, галактоза, рафиноза, фруктоза, сорбитол, дульцитол, маннитол, инозитол, декстрин и крахмал. В данной работе применяли основную ферментационную среду вышеуказанного состава с индикатором бромкрезоловым пурпурным, который добавляли в количестве 0,03 мг/мл из спиртового раствора непосредственно перед определением. Углеводы в количестве 1% также добавляли непосредственно перед определением. По изменению окраски среды (от фиолетового до желтого) судили о наличии роста

лактобактерий и их ферментативной активности. Контрольной служила безуглеводная среда [3].

### 3.2. Определение потребности штаммов в ростовых компонентах

Было изучено влияние 20 аминокислот, 5 витаминов, пуриновых и пиримидиновых оснований, способных включаться в метаболизм МКБ. Методом дробного исключения одного или нескольких компонентов в среде культивирования устанавливали отличительные признаки штаммов по усвоению ростовых компонентов.

Для этого штаммы сначала высевали на минимальную среду, содержащую 5–6 ростовых компонентов в различных сочетаниях. Минимальные среды готовили на основе обессоленного агара. Для этого навеску агара (из расчета 2 г на 100 мл H<sub>2</sub>O) помещали в 500 мл дистиллированной воды. Через 1 ч добавляли 500 мл хлористого кальция для осаждения белков и нагревали смесь. После растворения агара смесь охлаждали и застывший агар нарезали кусочками и в марлевом мешочке промывали водопроводной водой в течение 24–28 ч, а затем дистиллированной водой – в течение 36 ч. Промытый агар переносили в 500 мл дистиллированной воды, куда добавляли навеску солей (г/л): NaCl – 2; KН<sub>2</sub>РO<sub>4</sub> – 20; MgSO<sub>4</sub> – 0,2. Затем смесь нагревали, расплавленный агар фильтровали и автоклавировали при 1 атм 20 мин. Глюкозу добавляли к агаровой солевой (минимальной) среде непосредственно перед использованием в количестве 1%. Определяли одну или группу факторов, необходимых для роста выделенных штаммов.

Ночную (17-часовую) культуру исследуемых штаммов, предварительно выращенную на среде с глюкозой, высевали из серии разведений в стерильной воде на 12 сред в различных сочетаниях (табл. 1). Количественное соотношение ростовых компонентов показано в табл. 2. Компоненты стерилизовали автоклавированием, кроме аминокислот тирозина и цистеина, стерилизованных через бактериальные фильтры, а фенилаланин растворяли в 0,01 н HCl [6]. Засеянные чашки Петри инкубировали при 28°C.

Т а б л и ц а 1

**Комбинации ростовых веществ  
в среде инкубирования выделенных штаммов**

№ комбинации	№ комбинации				
	1	2	3	4	5
6	Аденин	Гуанозин	Цистин	Метионин	Тиамин
7	Гистидин	Лейцин	Изолейцин	Лизин	Валин
8	Фенилаланин	Тирозин	Триптофан	Треонин	Пролин
9	Глутамин	Аспарагин	Урацил	Аспарагиновая кислота	Аргинин
10	Тимин	Серин	Глутаминовая кислота	Диаминопелиновая кислота	Глицин
11	Пиридоксин	Никотиновая кислота	Биотин	Пантотенат	Аланин
12	Контроль (среда без добавления ростовых веществ)				

**Количественное содержание ростовых компонентов  
в среде инкубирования выделенных штаммов**

Добавка	Концентрация в чашке, мм	Основной раствор, %	Добавка	Концентрация в чашке, мм	Основной раствор, %
Аденозин	5,0	2,67	Метионин	0,30	0,90
Аланин	0,47	0,84	Никотиновая кислота	0,10	0,25
Аргинин	0,60	2,53	Пантотенат	0,10	0,48
Аспарагин	0,32	0,84	Пиридоксин	0,10	0,41
Биотин	0,10	0,49	Пролин	2,0	4,60
Валин	0,30	0,70	Серин	4,0	8,40
Гистидин	0,10	0,31	Тиамин	0,05	0,337
Глицин	0,13	0,20	Тимин	0,32	0,81
Глутамин	5,0	14,6	Тирозин	0,10	0,36
Гуанозин	0,30	1,70	Треонин	0,30	0,71
Диаминопимелиновая к-та	0,10	0,38	Триптофан	0,10	0,41
Изолейцин	0,30	0,79	Урацил	0,10	0,224
Лейцин	0,30	0,79	Фенилаланин	0,30	0,99
Лизин	0,30	1,10	Цистеин	0,30	0,73

### 3.3. Определение количества молочной кислоты

Принцип метода заключается в том, что из молочной кислоты в присутствии серной кислоты и солей меди образуется уксусный альдегид, который, реагируя с параоксидифенилом, дает фиолетово-окрашенные продукты.

Для определения количества молочной кислоты в культуральной жидкости лактококки выращивали в течение 17 ч на той же ферментационной среде. В пробирки отбирали по 0,5 мл соответствующей исследуемой культуральной жидкости. Во все пробы добавляли по 0,5 мл 20%-ного  $\text{CuSO}_4$  и дистиллированной водой доводили объем жидкости до 5 мл. Затем добавляли по 0,5 г гидроксида кальция, тщательно перемешивали и оставляли при комнатной температуре на 30 мин. После содержимое всех пробирок центрифугировали. Из каждой пробы отбирали по 0,5 мл прозрачного центрифугата и переносили в сухие чистые пробирки, стоящие в ледяной воде. Затем медленно, при постоянном встряхивании, добавляли в каждую пробирку по 3 мл 2 н  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Далее пробирки помещали на 5 мин в кипящую водяную баню, охлаждали до комнатной температуры (20°C) и добавляли по 2 капли (0,05 мл) щелочного раствора параоксидифенила. Содержимое пробирок осторожно перемешивали и оставляли на 30 мин на водяной бане с температурой 30°C, а затем – на 90 с на кипящей водяной бане, после чего охлаждали. Появлялось розовое окрашивание, интенсивность которого прямо пропорциональна концентрации молочной кислоты. Раствор сравнения готовили аналогично исследуемым пробам, но вместо культуральной жидкости в пробирки помещали по 0,5 мл дистиллированной воды.

Полученные растворы калориметрировали на ФЭК при  $l=0,5$  см против раствора сравнения. Для расчета молочной кислоты в культуральной жидкости строили калибровочный график, используя различные концентрации молочной кислоты (мкг/мл): 5, 10 и 15. Ход определения проводили аналогично исследуемым пробам. На основании полученных данных строили калибровочный график, откладывая на оси абсцисс концентрацию молочной кислоты, а на оси ординат – оптическую плотность. По нему определяли содержание молочной кислоты в исследуемых образцах [2].

### 3.4. Определение низинообразующей активности

Низинообразующую активность изучаемых МКБ определяли методом диффузии в агаре с измерением зоны подавления роста тест-культуры в миллиметрах. За единицу активности принимали количество низина, подавляющего рост *Streptococcus agalactiae* (стрептококка группы В, присутствующего в желудочно-кишечном тракте) в 1 мл питательного бульона за 16 ч инкубирования, учитывая, что 1 мг чистого низина содержит  $4 \times 10^4$  МЕ [6].

Для титрования антибиотика использовали суспензию 17-часовой культуры бактерий с оптической плотностью 0,7 (ОП при 540 нм, длина оптического пути  $l=1,0$  см), которой засекали среду, приготовленную на фосфатном буфере с  $\text{pH}=5,5$  и содержащую (г/л): пептон – 20; глюкозу – 10; агар-агар – 20. Экстракцию антибиотика из культуральной жидкости и стандартных растворов проводили смесью из ацетона, уксусной кислоты и воды (4:1:5) при температуре  $55^\circ\text{C}$  в течение 90 мин. Экстракты разводили фосфатным буфером в соотношении 1:10 и закапывали в лунки на агаровой среде с тест-культурой. Уровень низинообразующей активности проводили по измерению зон подавления роста *Bacillus coagulans* 429 на агаровой среде с дальнейшим пересчетом по калибровочной кривой стандартных растворов низина. В качестве стандарта использовали коммерческий препарат низина Nisaplin с активностью  $1 \times 10^6$  МЕ/г. Среду для тест-культуры готовили на бульоне Хоттингера в разведении 1:2 следующего состава (г/л): NaCl – 2; пептон – 10; глюкоза – 10; агар-агар – 20 [7].

Фосфатный буфер с  $\text{pH}=5,5$  готовили на дистиллированной воде, в 1 л которой растворили 6,64 г калия фосфорнокислого однозамещенного и 0,142 г калия фосфорнокислого двузамещенного трехводного. Буфер стерилизовали при 1 атм 20 мин.

Сравнивали с классическим низинпродуцирующим штаммом МГУ, выделенным ранее из молока с последующей селекцией на среде с низином А (100 мкг/мл среды) [6, 7].

### 3.5. Определение спектра антимикробного действия

При изучении спектра антибиотического действия отобранных штаммов лактококков в качестве тест-культур использовали четыре штамма грамположительных бактерий: *Micrococcus luteus* 128, *Bacillus mycoides* 32, *B. subtilis* 2, *B. coagulans* 429, *Staphylococcus aureus* 144; четыре штамма грамотрицательных бактерий: *Alcaligenes faecalis* 82, *Escherichia coli* 52, *Pseudomonas aeruginosa* 21, *Proteus vulgaris* 206; а также пять штаммов микроскопических грибов, включая дрожжи: *Aspergillus niger* 369, *Penicillium chrysogenum* 32, *Fusarium oxysporum* 9, *Candida guilliermondii* 217, *Rhodotorula aurantiaca* 226. Тест-культуры были получены из коллекции микроорганизмов кафедры микробиологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

Бациллы и бактерии выращивали на органической среде, приготовленной на бульоне Хоттингера, содержащей (г/л): глюкозу – 10,0; пептон – 5,0; NaCl – 5,0; агар-агар – 25,0; pH=7,0. Дрожжи выращивали на сусле 6–8Б с добавлением 2,5% агар-агара, pH=6,8; плесень – на сусле 3–4Б с агаром, pH=6,0. Бациллы, стафилококки и микрококки культивировали при 37°C, *E. coli* – при 42°C, *B. coagulans* – при 55°C, плесени и дрожжи – при 28°C.

Для засева чашек Петри тест-организмами использовали суточные культуры в виде суспензии клеток в физиологическом растворе в количестве  $110^9$  микробных тел на 1 мл (по бактериальному стандарту мутности), исходя из расчета 0,1 мл суспензии в одну чашку Петри. По зоне задержки роста судили об ингибиторной способности штаммов по отношению к разным группам микроорганизмов.

В качестве стандарта на микромицеты использовали растворы 40, 50, 100 ед./мл коммерческого препарата нистатина (фирмы Sigma) с активностью 4670 ед./мг, на грамположительные бактерии – растворы Nisaplin с активностью 10, 20, 30, 40, 50 МЕ/мл, на грамотрицательные – растворы левомицетина (HiMedia Laboratories Limited, Mumbai) 25, 50 и 100 ед./мл.

#### 4. Определение чувствительности штаммов *L. lactis subsp. Lactis* к антибиотикам

Чувствительность к антибиотикам определяли методом диффузии в агаровую среду с применением дисков, пропитанных антибиотиком (в концентрациях 10–30 мкг в диске) и хранящихся во флаконах с влагоудерживателем (силикагелем). Метод основан на элюции антибиотика из диска в среду, предварительно засеянную исследуемым штаммом лактококка. Был испытан ряд антибиотиков, ингибирующих синтез белка: тетрациклин, левомицетин, сизомицин, стрептомицин, доксициклин, олеандомицин, неомицин, ампициллин, канамицин, рифампицин; и синтез клеточной стенки: бензилпенициллин, карбенициллин, метициллин, ристомидин, цефалексин, цефалотин, низин (табл. 3) [7].

#### 5. Молекулярно-биологические методы идентификации

Идентификация молочнокислых микроорганизмов только на основании морфологических, культуральных, физиолого-биохимических признаков в настоящее время является недостаточной для подтверждения таксономического положения, поэтому применяли также генотипический метод, основанный на анализе сходства нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК.

Экстракцию и очистку ДНК из бактериальных клеток осуществляли с помощью специального набора для выделения ДНК (ООО «Лаборатория Медиген»). Качество геномной ДНК контролировали с помощью электрофореза в агарозном геле. Количество ДНК определяли с помощью спектрофотометра Nano Drop ND 1000. Фрагмент гена получали в ходе полимеразной цепной реакции, амплифицировали при помощи олигонуклеотидных пар праймеров. Определение нуклеотидных последовательностей осуществляли с помощью автоматического генетического анализатора ABI 3730xl (Applied Biosystems, США). Анализ результатов секвенирования проводили с помощью компьютерных программ Vector NTI: ContigExpress, AlignX. Множественные выравнивания последовательностей проводили, используя программу ClustalX. При построении филогенетического дерева использовали

## Чувствительность выделенных штаммов к антибиотикам

Антибиотики	Концентрация в диске, мкг	Штаммы								
		119	119x	729	229	194	K-205	IR3	IR4	МГУ
		Диаметр зон ингибирования роста, мм								
Тетрациклин	30	36,5	35,0	35,0	33,6	28,5	30,4	20,0	10	35,5
Доксициклин	10	32,0	32,5	32,0	34,0	27,5	29,8	20,0	12,0	34,0
Левомецетин	30	25,2	26,5	23,0	32,0	25,5	23,6	20,0	21,0	26,0
Сизомицин	10	19,0	17,0	18,0	16,5	10,0	14,2	12,0	15,0	17,5
Олеандомицин	15	21,0	23,5	24,5	27,0	17,5	18,3	13,0	15,0	28,5
Рифампицин	10	12,0	0	0	0	15,0	12,2	10,0	15,0	0
Неомицин	30	0	0	14,0	0	12,0	0	9,0	0	0
Стрептомицин	30	12,0	13,0	0	13,3	12,0	0	11,0	11,0	14,0
Канамицин	30	14,5	14,0	18,0	14,0	0	11,3	0	0	15,0
Ристомидин	30	19,5	18,0	16,0	17,6	13,8	14,4	18,0	15,0	19,5
Метициллин	10	22,0	10,0	25,0	28,5	0	0	0	10,0	16,0
Бензилпенициллин	10	22,6	26,6	24,5	27,0	0,0	18,5	15,0	19,0	26,5
Карбенициллин	10	32,0	30,6	32,0	29,5	12,0	21,1	14,0	18,0	30,5
Оксациллин	10	21,0	22,0	19,0	18,5	10,0	13,6	10,0	16,0	17,5
Ампициллин	10	29,0	28,0	32,0	32,6	20,0	23,4	13,0	22,0	26,5
Цефалотин	30	30,5	29,0	29,0	30,5	27,0	26,8	20,5	21,0	31,0
Цефалексин	30	18,0	24,0	20,0	28,0	13,0	15,7	14,0	12,0	28,0

последовательности близких по физиолого-биохимическим свойствам референтных штаммов: *L. lactis* subsp. *lactis* AB100798, AB118034, AJ419572, *L. lactis* subsp. *lactis* bv. *diacetylactis* AY920468, AY920469, *L. lactis* subsp. *cremoris* AB100792, AB100802, полученные из базы данных NCBI blast.

Степень гомологии, выраженная в процентном эквиваленте, была рассчитана, исходя из генетических дистанций, которые отражают различия между штаммами в числе нуклеотидных замен в расчете на 100 пар нуклеотидов (п. н.) в участке гена *16S* рРНК протяженностью в 500 п. н.

#### б. Статистическая обработка результатов исследований

Статистическую обработку результатов исследований проводили с использованием компьютерных программ Excel 200 (Microsoft Inc., Statistica for Windows, v.5.0 (StatSoft Inc)). Достоверность различий между средними величинами оценивали с использованием *t*-критерия Стьюдента ( $p \leq 0,05$ ).

## Результаты и их обсуждение

Источниками для выделения лактококков служат кисломолочные продукты (сметана, простокваша, сыры, кефир), растения и др. Бактерии *L. lactis* subsp. *lactis* – потенциальные продуценты бактериоцина низина широко распространены в природных условиях [5, 7, 12].

Многие МКБ изначально присутствуют в молоке и вызывают его спонтанное сквашивание в результате молочнокислого брожения. Основным продуктом этого брожения является молочная кислота, которая в молоке отщепляет кальций от казеина. При этом белок превращается в параказеин и выпадает в осадок, что вызывает свертывание молока и образование молочного сгустка.

Первичное молочнокислое брожение осуществляется мезофильными гомоферментативными лактококками *L. lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris*, а затем в процесс включаются другие молочнокислые бактерии, например, рода *Lactobacillus*, или микроорганизмы других таксономических групп [4].

Известен ряд национальных кисломолочных напитков, полученных в результате смешанного молочнокислого и спиртового брожения [5]. Так, широкую известность в качестве напитка для лечения туберкулеза, заболеваний желудочно-кишечного тракта и сердечно-сосудистой системы получил кумыс, изготавливаемый из кобыльего молока, близкого по составу к женскому [4, 5]. Говоря о пользе кисломолочных продуктов нельзя не отметить, что даже при современной технике и технологии их производства невозможно полностью исключить попадание в них посторонних микроорганизмов (среди которых встречаются и патогены), являющихся причиной различных пороков и снижающих качество готовой продукции. Часто микробиота заквасок, приготовленных без внесения чистых культур, засорена посторонними микроорганизмами. Поэтому изыскание биологических методов борьбы с нежелательной микробиотой, основанных на применении антибиотически активных заквасок и культур, приобретает все более актуальное значение.

В связи с намеченной целью по скринингу бактериоцинообразующих штаммов мезофильных лактококков использовали национальные кисломолочные напитки – кумыс (Башкирия), курунга (г. Улан-Уде) и Doogh (Иран), обладающие ингибиторной активностью на разные группы микроорганизмов.

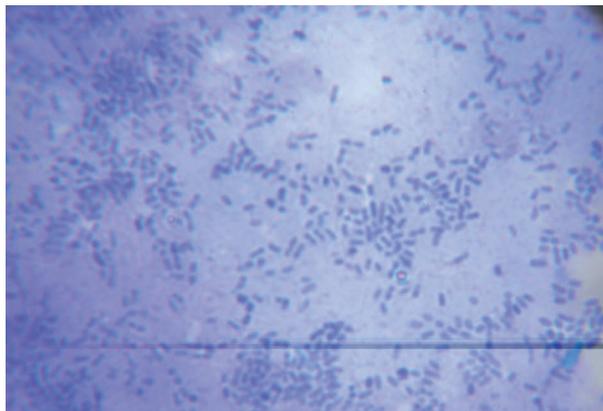


Рис. 1. Морфология лактококков в световом микроскопе (×900)

Первоначальная идентификация включает комплекс фенотипических признаков, основанных на изучении морфологических и физиолого-биохимических свойств лактококков (рис. 1). При росте в оброте штаммы образовывали плотный молочный сгусток за 8–10 ч с максимальной кислотностью pH 3,9–4,5, что характерно для *L. lactis* subsp. *lactis*. Исключение составляли штаммы 119 из простокваши (г. Клин, Московская область) и К-205 из курунги, которые образовывали за это же время сметанообразный сгусток, по консистенции характерный для лактококка *L. lactis* subsp. *cremoris* [17]. Микробиота кумыса из Башкирии состояла из молочнокислых бактерий *Lactobacillus bulgaricum* и дрожжей *Torula lactis* [5]. Лактококки не были обнаружены.

По морфологии и культуральным свойствам все выделенные бактерии близки к молочнокислым мезофильным бактериям рода *Lactococcus*. На плотных агаровых средах с гидролизатом молока или синтетической с фосфатом и дрожжевым экстрактом образовывались светло-бежевые и мелкие бесцветные колонии, круглые, блестящие с ровными краями, диаметром от 1,5 до 3,0 мм и с выпуклым профилем, имеющие однородную структуру и мягкую консистенцию.

При глубинном инкубировании лактококки образовывали колонии лодочкообразной формы. Для дифференцирования *L. lactis* subsp. *lactis* от *L. lactis* subsp. *cremoris* и от *L. lactis* subsp. *lactis diacetilactis* учитывали характер роста на плотных средах с гидролизатом молока: *L. lactis* subsp. *cremoris* образуют темные круглые колонии на поверхности среды, а *L. lactis* subsp. *lactis diacetylactis* – глубинные колонии неправильной формы в виде кусочков ваты [17].

Молочнокислые бактерии неподвижны, не образуют спор, положительно окрашиваются по Граму, не образуют пигмент, не разжижают желатин, не восстанавливают нитраты в нитриты, каталазо- и оксидазонегативны (при растирании колоний штаммов на поверхности оксидазного диска его посинения не наблюдалось. Это свидетельствует о том, что бактерии не обладают оксидазной активностью, что соответствует родовой характеристике в определителе бактерий Берджи [17].

Бактерии рода *Lactococcus* круглые или слегка овальные клетки, расположенные единично, парами или различной длины цепочками. Типичного представителя этого рода *L. lactis* subsp. *lactis* некоторые считают палочковидной формой, поскольку клетки больше в длину, чем в ширину. Но следует отметить, что лактококки отличаются полиморфностью. Они могут вытягиваться и напоминать палочковидные формы, образовывать стрептококкоподобные цепочки разной длины, что связано со снижением активности автолитических ферментов в процессе расхождения образующихся при делении клеток.

Молекулярный кислород у гомоферментативных молочнокислых бактерий не включается в процесс молочнокислого брожения, но они способны расти в его присутствии. Гомоферментативные молочнокислые бактерии являются факультативными анаэробами, но есть среди них и микроаэрофилы, когда низкие концентрации молекулярного кислорода в среде способствуют росту бактерий. В клетках этих бактерий найдены флавиновые ферменты, с помощью которых кислород постепенно восстанавливается до перекиси водорода. Накопление перекиси замедляет окисление глюкозы, ингибирует рост, поскольку у этих бактерий отсутствуют гемопротеиды, такие как цитохромы и каталаза, разлагающие перекись водорода. Как показали исследования, все выделенные штаммы являлись факультативными анаэробами (характерный воронкообразный рост в столбике агаровой среды [3].

При изучении ферментативной активности был использован ряд углеводов, включающий сахара, сахароспирты, полисахариды.

**Дифференцирующие признаки выделенных штаммов *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* разного происхождения**

Признаки	Штаммы												
	<i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> *	115	119x	729	229	805	119	K-205	194	IR1	IR2	IR3	IR4
Преимущественное расположение клеток	КЦ	ДЦ	ДЦ	КЦ	КЦ	ДК	ДЦ	ДК	КЦ	КЦ	КЦ	КЦ	КЦ
Подвижность	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Рост при 10°С	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Рост при 45°С	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Рост при рН=9,6	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Рост в 4,0% NaCl	+	–	–	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Рост в 6,5% NaCl	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Фруктоза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Лактоза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Маннитол	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–	+	–
Сахароза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–	+	–
Мальтоза	+	+	+	–	+	+	–	+	+	+	+	+	+
Раффиноза	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Отношение к кислороду	Факультативные анаэробы												

Примечание. КЦ – короткие цепочки кокков, ДК – длинные цепочки, «+» – способность к потреблению углеводного субстрата, «–» – отсутствие этой способности.

Штаммы лактококков, выделенные из молока Московского региона, слабо или вовсе не сбраживали пентозы – ксилозу, арабинозу и маннит, которых всегда мало в молоке и молочнокислых продуктах. Но штаммы K-205 из и IR-3, выделенные из курунги и напитка Doogh (соответственно), являющиеся продуктами смешанного молочнокислого и спиртового брожения и вследствие этого адаптированные к спиртовому субстрату, могли сбраживать сахароспирты, в том числе и маннит, что не характерно для *L. lactis* subsp. *lactis*, но является дифференцирующим признаком для *L. lactis* subsp. *cremoris* (табл. 4). Штамм 119 не сбраживал мальтозу, как и *L. lactis* subsp. *cremoris*.

Отличительным признаком молочнокислых бактерий является высокая потребность в сложных питательных веществах, пуринах, пиримидинах, аминокислотах, витаминах: тиамине, рибофлавине, биотине, никотиновой и пантотеновой кислотах. Этим и объясняется в значительной мере влияние на их рост добавок к средам различных растительных экстрактов (дрожжей, картофеля, моркови, кукурузы). Штамм 119 отличался весьма ограниченной потребностью в ростовых компонентах,

Потребность в ростовых компонентах выделенных штаммов

Компонент	Штаммы										
	119	119х	729	229	194	К-205	115	IR-1	IR-2	IR-3	IR-4
Аланин	–	–	–	+	+	+	–	+	+	+	+
Аспарагин	–	–	–	+	+	+	+	+	+	+	+
Аспарагино- вая кислота	–	–	–	+	+	+	+	+	+	+	+
Валин	–	–	+	+	+	+	–	–	–	–	–
Глицин	–	–	+	–	+	–	–	–	–	–	–
Глутамин	–	+	+	–	–	+	–	+	+	+	+
Пролин	+	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–
Тиамин	–	–	+	+	+	–	–	+	+	+	+
Урацил	+	+	+	+	–	+	+	–	–	–	–

Примечания: «+» – потребность в ростовом компоненте, «–» – отсутствие потребности.

но пролин и урацил стимулировали его рост. Бурятские штаммы 194 и К-205, штамм 229, выделенный из клинского молока, и иранские штаммы нуждались в аланине, что не характерно для *L. lactis* subsp. *lactis* (табл. 5).

#### Накопление молочной кислоты молочнокислыми бактериями разного происхождения

Среди представителей рода *Lactococcus* встречаются лишь гомоферментативные бактерии, образующие в процессе брожения до 98% молочной кислоты – одного из основных конечных метаболитов. Выделение и быстрое накопление лактата ведет к резкому подкислению среды, вызванному снижением рН, что ингибирует рост бактерий, вызывающих порчу продуктов питания [16]. Следует отметить, что различные микроорганизмы по-разному реагируют на кислотность среды обитания. Например, при рН ниже 5,0 молочная кислота ингибирует рост спорообразующих бактерий, не влияя на развитие микроскопических грибов и дрожжей [9, 16].

В результате эксперимента по определению молочной кислоты было выявлено, что ее наибольшее количество выделяет *L. lactis* subsp. *lactis* штамм 729, что подтверждает его свойство как сильного кислотообразователя. Так, ранее было выявлено, что за 24 ч инкубирования в среде с глюкозой он синтезировал до 0,82% молочной кислоты (16,5 ммоль/л), в то время как другие штаммы накапливали 0,45–0,62% лактата при тех же условиях (ммоль/л): штамм МГУ – 8,87; штамм 119 – 8,09; штамм 194 – 14,47.

Длительное время большинство исследователей связывали антагонистическое действие молочнокислых бактерий с их способностью продуцировать молочную кислоту. В дальнейшем сведения о природе этого явления были значительно расши-

рены. Наряду с молочной кислотой установлена роль других метаболитов, ингибирующих развитие бактерий. Физиологической особенностью ряда штаммов гомоферментативных лактококков *L. lactis* subsp. *lactis* является синтез низкомолекулярных ингибиторных веществ белковой природы – бактериоцинов [13].

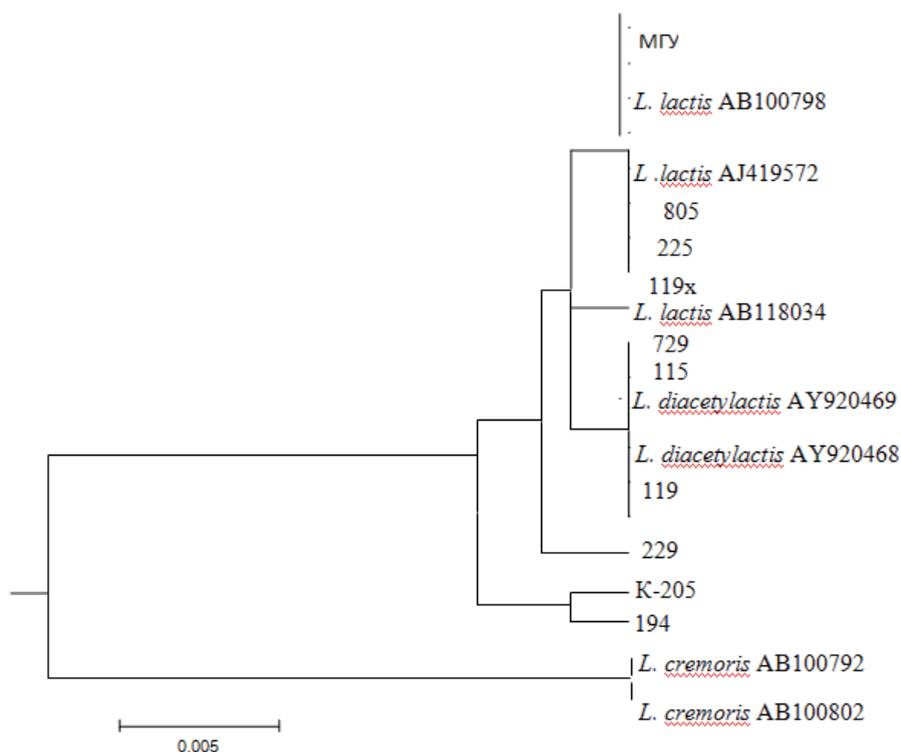
Таксономическое положение выделенных культур классическими микробиологическими методами идентификации бактериоцинообразующих штаммов лактококков была подтверждена генотипическим методом, основанным на анализе сходства нуклеотидных последовательностей гена *16S* рРНК, как *L. lactis* subsp. *lactis*. При компьютерной обработке результатов секвенирования генов *16S* рРНК и сравнительном анализе полученных последовательностей изучаемых штаммов с последовательностями тех же генов вышеуказанных типовых штаммов между ними наблюдалось высокое сходство. Все штаммы обнаруживают высокую степень гомологии ДНК (на уровне 98,9–100%) по отношению к референтным штаммам *L. lactis* subsp. *lactis*. Высокий уровень гомологии выявлен между бурятскими штаммами (99,6%), а сходство их со штаммами, выделенными из молока московского региона, было меньше – 98,9%.

Уровень генетического родства всех изучаемых штаммов по отношению к близкородственному штамму *L. lactis* subsp. *cremoris* составил всего 95,4–96,6%, хотя по ряду физиолого-биохимических признаков штамм 119 был близок к лактококкам этого подвида, и в то же время фингерпринты всех штаммов различаются, что свидетельствует о генетических различиях между ними. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей генов *16S* рРНК, характерных для *L. lactis* subsp. *lactis* (AJ419572, AB118034, AB100798), *L. lactis* subsp. *cremoris* (AB100792, AB100802) и *L. lactis* subsp. *lactis* bv. *diaceylactis* (AY920469; AY9204684), взятых из базы данных NCBI, и изучаемых штаммов лактококков представлен на филогенетическом дереве (рис. 2) и подтверждает принадлежность изучаемых бактерий к виду *L. lactis* subsp. *lactis*.

Перспективные новые штаммы были генотипированы по *16S* рРНК и депонированы в GenBank под следующими номерами: штамм МГУ – DQ255952; штамм 729 – EF102814; штамм 115 – DQ255951; штамм 119х – EF114305; штамм 119 – EF114306; штамм 194 – DQ255954; штамм 229 – DQ255953; штамм 805 – EF114309; штамм К-205 – EF1143308.

Нуклеотидные последовательности гена *16S* рРНК служат хорошим инструментом для выявления внутривидовых связей лактококков.

Из коровьего и кобыльего молока, из лечебно-профилактических национальных продуктов смешанного молочнокислого и спиртового брожений курунги и Doogh разных территориальных зон выделены и отобраны наиболее перспективные бактериоцинообразующие природные штаммы мезофильных лактококков. Так, из коровьего молока Московской области на среде с бромкрезолпурпурным было выделено 69 кислотообразующих клонов, наиболее активный по кислотообразованию был штамм 729 (из молока фермы МСХА), но активность его на тест-культуру для определения низинсинтезирующей активности *Vac. coagulans* была низкой (300 МЕ/мл по низину), уровень активности штамма 119х составил 3700 МЕ/мл. Из коровьего молока, привезенного из Ирана, выделено 35 кистообразующих мезофильных лактобактерий, из которых выделены три штамма с высокой антимикробной активностью (2900–3100 МЕ/мл), а из напитка Doogh (из 25 кислотообразующих клонов) и бурятского напитка курунги (из 36 клонов) выделены активные штаммы IR 3 и К-205 (3400–2500 МЕ/мл соответственно). Из бурятского коровьего молока из 19 кислотообразующих мезофилов, выросших на агаровой среде, вы-



**Рис. 2.** Дендрограмма родственных взаимоотношений штаммов лактококков, основанная на сходстве нуклеотидных последовательностей в участке гена 16S рРНК протяженностью в 500 нуклеотидов (масштаб в нижней части рисунка (0,005) соответствует генетическому расстоянию 0,5%)

делен штамм 194 с активностью 3600 МЕ/мл, в то время как из башкирского кобыльего молока из 25 кислотообразующих колоний выделен штамм 805 с активностью 2500 МЕ/мл.

В ходе исследования методом «реплик» были выделены колонии молочнокислых бактерий с наиболее широким спектром антимикробной активности, которую рассматривали в отношении грамотрицательных, грамположительных бактерий и грибов.

При изучении спектров антибиотического действия было установлено, что штаммы из молока Москвы и Клина подавляли рост грамположительных бактерий, включая спорообразующие бациллы *B. subtilis*, *B. coagulans*, *B. mycoides*, микрококки *Micrococcus luteus*, *Micrococcus flavum*, патоген золотистый стафилококк *Staphylococcus aureus*, что характерно для бактериоцина низина А-основного компонента препарата Nisaplin и низинпродуцирующего лактококка штамма МГУ. Штамм 729, выделенный из коровьего молока фермы МСХА, синтезирующий максимальное количество молочной кислоты, незначительно подавлял рост грамположительных бактерий: микрококков, бацилл и не подавлял *S. aureus*, незначительно подавлял грамотрицательные бактерии. Следовательно, молочная кислота не является основным антимикробным агентом.

**Антимикробный спектр действия штаммов лактококков  
Lactococcus lactis subsp. lactis разного происхождения**

Тест-культура	Штаммы									
	119	119х	729	229	194	К-205	IR3	IR4	МГУ	Низин, 3000 МЕ/ мл
	Диаметр зон ингибирования роста, мм									
Bacillus subtilis	12,0	18,0	10,0	15,0	22,0	20,0	11,0	24,0	16,0	18,0
Bacillus coagulans	17,0	23,0	8,0	15,0	23,0	18,0	20,0	17,0	14,0	21,0
Bacillus cereus	18,5	16,0	10,0	14,0	21,0	19,0	15,0	12,0	16,0	18,0
Micrococcus luteus	21,5	20,0	13,0	20,0	22,5	16,5	21,5	19,0	19,0	25,0
Staphylococcus aureus	16,0	12,0	0	16,0	20,0	17,0	17,0	16,0	12,0	15,0
Alcaligenes faecalis	9,0	12,0	9,0	10,0	12,5	12,5	15,0	12,0	0	0
Escherichia coli	12,0	12,5	11,0	0	15,0	14,0	19,0	12,0	0	0
Proteus vulgaris	9,0	0	9,0	0	16,5	16,0	14,0	16,0	0	0
Pseudomonas aeruginosa	10,0	0	0	0	16,5	15,5	12,	12,0	0	0
Pseudomonas fluorescens	9,0	0	0	0	18,0	16,0	11,0	12,0	0	0
Fusarium oxysporum	0	0	0	0	16,5	10,0	12,0	10,0	0	0
Penicillium chrysogenum	0	0	0	0	17,5	10,5	12,0	16,0	0	0
Aspergillus niger	0	0	0	0	21,0	10,0	14,0	15,0	0	0
Rhodotorula aurantiaca	0	0	0	0	19,5	10,0	13,0	14,0	0	0
Candida guilliermondii	0	0	0	0	18,0	12,0	12,0	10,0	0	0

Следует отметить, что лактококки, выделенные из молока бурятских и иранских национальных молочнокислых напитков смешанного молочнокислого и спиртового брожения (штаммы 194, К-205, IR3, IR4), отличались высоким уровнем ингибиторной активности, обладали более широким спектром антибактериального действия: эффективно подавляли рост как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий: *Alcaligenes faecalis*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* (табл. 6).

Эти штаммы проявляли и фунгицидное действие – подавляли рост мицелиальных грибов и дрожжей: *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Fusarium oxysporum*, *Candida guilliermondii*, *Rhodotorula aurantiaca*, которые являются сапрофитной микробиотой местообитаний с влажным, жарким климатом Бурятии и Ирана и причиной порчи пищевого сырья и продуктов в условиях длительного хранения

[16]. Ингибиторная активность по отношению к плесеням и дрожжам является малоизвестным биологическим свойством молочнокислых бактерий рода *Lactococcus*.

### Заключение

Проведен скрининг бактериоцинообразующих штаммов мезофильных лактококков из молока, молочных продуктов и национальных кисломолочных напитков разных территориальных зон. Разработан метод выделения и дифференциации штаммов мезофильных лактококков с антимикробным действием из вышеуказанных продуктов. Важным критерием оценки эффективности штаммов является спектр его антимикробного действия, то есть активность по отношению к разным группам микроорганизмов. Полученные данные можно рассматривать не только как пример реакции биологической системы на неблагоприятные факторы внешней среды, но и как системы взаимоотношений дрожжей и лактококков в природных экосистемах.

Используя основной прием селекции микроорганизмов, основанный на естественном отборе активных продуцентов, были выделены новые оригинальные бактериоцинообразующие штаммы *L. lactis* subsp. *lactis*, проведена сравнительная оценка продуцентов и выбор наиболее перспективных из них.

Разнообразие штаммов, имеющих различное географическое происхождение и обладающих сходными функциональными возможностями, является следствием специфических условий, которые формируются в экологической среде их обитания [14]. Полученные результаты вносят существенный вклад в представление о механизмах адаптации лактококков к стрессовым условиям среды обитания и роли этих микроорганизмов в эволюционных процессах. Следует отметить, что данные штаммы МКБ пополнили коллекцию ценных культур и представляют научный и практический интерес в плане расширения биологического разнообразия, возможного применения их в качестве биоконсервантов, а также для составления бактериальных заквасок, применяемых при изготовлении молочнокислых продуктов.

*Работа выполнена по гранту РФФИ 14–50–00029.*

### Библиографический список

1. Зигангирова Н.А., Токарская Е.А., Народницкий Б.С. и др. Роль молочнокислых бактерий в распространении генов лекарственной устойчивости среди здоровых людей // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2006. № 2. С. 106–109.
2. Кондрахин И.П. Методы ветеринарной клинической лабораторной диагностики. М.: Колос, 2004. 520 с.
3. Практикум по микробиологии: учеб. пособие для студентов высших учебных заведений / под ред. А.И. Нетрусова. М.: Академия, 2005. 608 с.
4. Степаненко П.П. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии молока и молочных продуктов. М.: Лира, 2006. 653 с.
5. Стоянова Л.Г. Молочнокислые бактерии // Практикум по микробиологии. М.: Академия, 2005. С. 467–486.
6. Стоянова Л.Г., Устюгова Е.А., Нетрусов А.И. Антимикробные метаболиты молочнокислых бактерий: разнообразие и свойства (обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. 2012. Т. 48. № 3. С. 259–275.

7. Стоянова Л.Г., Семенова Е.В. Слияние протопластов молочнокислых бактерий *LACTOCOCCUS LACTIS*. М.: МАКС ПРЕСС, 2015. 68 с.

8. Шендеров Б.А. Функциональное питание и его роль в профилактике метаболического синдрома. М.: ДеЛи принт, 2008. 319 с.

9. Abdel-Rahmana M.A., Tashiroc Y., Sonomoto K. Lactic acid production from lignocellulose-derived sugars using lactic acid bacteria: Overview and limits // *Journal of Biotechnology*. 2011. Vol. 156. P. 286–301.

10. Ammor S., Tauveron G., Dufour E., Chevallier I. Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility: 1 – Screening and characterization of the antibacterial compounds // *Food Control*. 2006. Vol. 17. P. 454–461.

11. Bernhom N., Licht T.R., Brogren C.H. et al. Effects of *Lactococcus lactis* on Composition of Intestinal Microbiota: Role of Nisin // *Applied and Environmental Microbiology*. 2006. Vol. 72. P. 1239–1244.

12. Broberg A., Jacobsson K., Ström K., Schnürer J. Metabolite Profiles of Lactic Acid Bacteria in Grass Silage // *Applied and Environmental Microbiology*. 2007. Vol. 73. P. 5547–5552.

13. Chikindas M.L. Probiotics and Antimicrobial Peptides: The Creatures and Substances' Future in the Twenty-First Century: An Opinion Letter // *Probiotics & Antimicrobial Proteins*. 2014. Vol. 6. P. 69–72.

14. Daba H., Saidi S. Detection of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from milk in various farms in north-east Algeria by a new procedure // *Agronomy Research*. 2015. Vol. 13. No. 4. P. 907–918.

15. European Parliament. EC 248/97. Regulation of the European Parliament and of the Council concerning novel foods and novel food ingredients Official Journal. 1997. Vol. 14. P. 1–7.

16. Gerez C.L., Torres M.J., Font de Valdez G., Rollán G. Control of spoilage fungi by lactic acid bacteria // *Biological Control*. 2013. Vol. 64. P. 31–237.

17. Ludwig W., Schleifer K.H., Whitman W.B. Revised road map to the phylum Firmicutes // *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. The Firmicutes. New York, Springer-Verlag, USA, 2009. Vol. 3. P. 1–17.

18. Comi G., Orlic S., Redzepovic S. et al. Moulds isolated from Istrian dried ham at the pre-ripening and ripening level // *International Journal of Food Microbiology*. 2004. P. 29–34.

19. Quinto E.J., Jiménez P., Caro I. et al. Probiotic Lactic Acid Bacteria: A Review // *Food and Nutrition Sciences*. 2014. Vol. 5. P. 1765–1775.

## ISOLATION AND IDENTIFICATION OF LACTIC ACID BACTERIA *LACTOCOCCUS LACTIS* SUBSP. *LACTIS* WITH ANTIMICROBIAL PROPERTIES

L.G. STOYANOVA

(Lomonosov Moscow State University)

*The paper presents the results of screening of lactic acid bacteria with antimicrobial effects contained in cow and mare milk by an example of national products of mixed lactic and*

*alcoholic fermentation Kurunga, Kumiss and Doogh of therapeutic and prophylactic purposes from different territorial zones of Russia (Moscow region, Buryatia, Bashkortostan), and Iran. The separation of Lactococcus with antimicrobial effects has been performed in stages using selective media and test cultures of bacteria and fungi (Bacillus coagulans, Escherichia coli, Aspergillus niger). Twenty Lactococcus cultures having antimicrobial effects on pathogenic microorganisms including the fungicidal ones such as Lactococcus subsp. lactis. have been identified using classical microbiological methods and basing on the analysis of a 16S rRNA gene fragment.*

*The research has also determined the level of lactic acid accumulation and the range of antimicrobial action of the cultures. Nucleotide sequences of the most promising strains for the development of new biopreservatives have been deposited in the GenBank.*

**Key words:** *Lactococcus lactis subsp. lactis, separation, identification, cow and mare milk, Kurunga, Kumiss, Doogh, lactic acid, bacteriocin, nisin.*

## References

1. *Zigangirova N.A., Tokarskaya Ye.A., Narodnitskiy B.S.* i dr. Rol molochnokislykh bakteriy v rasprostraneni genov lekarstvennoy ustoychivosti sredi zdorovykh lyudey [The role of lactic acid bacteria in the spread of drug resistance genes among healthy people] // Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunology. 2006. No. 2. P. 106–109.

2. *Kondrakhin I.P.* Metody veterinarnoy klinicheskoy laboratornoy diagnostiki [Methods of veterinary clinical laboratory diagnostics]. M: Kolos. 2004. 520 p.

3. Praktikum po mikrobiologii: Ucheb. pos. dlya studentov vysshikh uchebnykh zavedeniy [Workshop on Microbiology: Practical training manual for students of higher educational institutions / Ed. by A. Netrusov. M.: Academiya, 2005. 608 p.

4. *Stepanenko P.P.* Rukovodstvo k laboratornym zanyatiyam po mikrobiologii moloka i molochnykh produktov [Manual for laboratory studies on the microbiology of milk and dairy products]. M.: Lira, 2006. 653 p.

5. *Stoyanova L.G.* Molochnokislyye bakterii [Lactic acid bacteria] // Praktikum po mikrobiologii. M.: Academy. P. 467–486.

6. *Stoyanova L.G., Ustyugova Ye.A., Netrusov A.I.* Antimikrobnnyye metabolity molochnokislykh bakteriy: raznoobraziye i svoystva (obzor) [Antimicrobial metabolites of lactic acid bacteria: diversity and properties (review)] // Applied Biochemistry and Microbiology. 2012. Vol. 48. No. 3. P. 259–275.

7. *Stoyanova L.G., Semenova Ye.V.* Sliyaniye protoplastov molochnokislykh bakteriy LACTOCOCCUS LACTIS [The interaction of protoplasts of lactic acid bacteria LACTOCOCCUS LACTIS]. M.: MAX PRESS, 2015. 68 p.

8. *Shenderov B.A.* Funktsionalnoye pitaniye i yego rol v profilaktike metabolicheskogo sindroma [Functional nutrition and its role in the prevention of metabolic syndrome]. M.: DeLiprint, 2008. 319 p.

9. *Abdel-Rahmana M.A., Tashiroc Y., Sonomoto K.* Lactic acid production from lignocellulose-derived sugars using lactic acid bacteria: Overview and limits // Journal of Biotechnology. 2011. Vol. 156. P. 286–301.

10. *Ammor S., Tauveron G., Dufour E., Chevallier I.* Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility: 1 – Screening and characterization of the antibacterial compounds // Food Control. 2006. Vol. 17. P. 454–461.

11. *Bernhom N., Licht T.R., Brogren C.H.* et al. Effects of *Lactococcus lactis* on Composition of Intestinal Microbiota: Role of Nisin // *Applied and Environmental Microbiology*. 2006. Vol. 72. P. 1239–1244.
12. *Broberg A., Jacobsson K., Ström K., Schnürer J.* Metabolite Profiles of Lactic Acid Bacteria in Grass Silage // *Applied and Environmental Microbiology*. 2007. Vol. 73. P. 5547–5552.
13. *Chikindas M.L.* Probiotics and Antimicrobial Peptides: The Creatures and Substances' Future in the Twenty-First Century: An Opinion Letter // *Probiotics & Antimicrobial Proteins*. 2014. Vol. 6. P. 69–72.
14. *Daba H., Saidi S.* Detection of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from milk in various farms in north-east Algeria by a new procedure // *Agronomy Research*. 2015. Vol. 13. No. 4. P. 907–918.
15. European Parliament. EC 248/97. Regulation of the European Parliament and of the Council concerning novel foods and novel food ingredients Official Journal. 1997. Vol. 14. P. 1–7.
16. *Gerez C.L., Torres M.J., Font de Valdez G., Rollán G.* Control of spoilage fungi by lactic acid bacteria // *Biological Control*. 2013. Vol. 64. P. 31–237.
17. *Ludwig W., Schleifer K.H., Whitman W.B.* Revised road map to the phylum Firmicutes // *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The Firmicutes*. New York, Springer-Verlag, USA, 2009. Vol. 3. P. 1–17.
18. *Comi G., Orlic S., Redzepovic S.* et al. Moulds isolated from Istrian dried ham at the pre-ripening and ripening level // *International Journal of Food Microbiology*. 2004. P. 29–34.
19. *Quinto E.J., Jiménez P., Caro I.* et al. Probiotic Lactic Acid Bacteria: A Review // *Food and Nutrition Sciences*. 2014. Vol. 5. P. 1765–1775.

**Стоянова Лидия Григорьевна** – д. б. н., вед. науч. сотр. кафедры микробиологии Биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова (119991, г. Москва, ул. Ленинские горы, 1/12; e-mail: [stoyanovamsu@mail.ru](mailto:stoyanovamsu@mail.ru)).

**Lidia G. Stoyanova** – DSc (Bio), Key Researcher of Microbiology Department of Biology Faculty, Lomonosov Moscow State University (119991, Moscow, Leninskiye Gory str., 1-12; e-mail: [stoyanovamsu@mail.ru](mailto:stoyanovamsu@mail.ru)).