

УДК 631.95:579.864.1.663.12

АНТИБИОТИКОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ОТДЕЛЬНЫХ ШТАММОВ ЛАКТОБАКТЕРИЙ И ДРОЖЖЕЙ КИСЛОМОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ РАЗЛИЧНЫХ ГЕОГРАФИЧЕСКИХ ЗОН

О.Д. СИДОРЕНКО, А.П. ХАРЬКОВА

(РГАУ-МСХА имени КА. Тимирязева)

Закол географической зональности взаимоотношения определяет зависимость экологических и биохимических процессов в природе и местообитание определенных физиологических групп бактерий. Устойчивость к антибиотикам природных штаммов лактобактерий и дрожжей является видовым свойством. Антибиотикорезистентность молочнокислых бактерий может быть положена в основу использования таких штаммов для производства новых продуктов питания и лечебных препаратов, которые станут главными средствами борьбы с патогенами желудочно-кишечного тракта.

Ключевые слова: антибиотикорезистентность, географическая зональность, филлосфера, ризосфера, метаболические взаимодействия, полиморфизм, экониша.

Таксономический состав бактериальных сообществ в эволюционном аспекте циано- и альгобактериальных матов до современных наземных фитоценозов приурочен к определенным эконишам или субстратам. Он является подтверждением принципа аддитивности, проявляющегося в процессе эволюции микробных сообществ, и формируется на основе прежде всего метабиотических и синтрофных взаимодействий [2, 9]. Однако для объяснения функционирования бактериальных сообществ следует учитывать специфику почвы как среды обитания микроорганизмов и растительности. Эта мысль была высказана еще в 1899 г. основателем отечественного почвоведения В.В. Докучаевым [3, 4].

Классики почвоведения В.В. Докучаев, П.А. Костычев, Н.М. Симбирцев и др. указывали, что физико-географические условия, и прежде всего климат, являются той средой, в которой протекает почвообразовательный процесс. Почвенное плодородие обусловлено развитием растений, которые оказывают основное влияние на почвенную микрофлору. Элементы питания растений сосредоточены в почве в основном в форме органических соединений почвенного органического вещества (перегноя), в котором сконцентрирована и связана в доступной для живых существ потенциальной форме кинетическая энергия солнечных лучей.

Роль и значение почвы в природе как условия жизни не ограничиваются обеспечением потребности растительных организмов в воде и элементах зольной и азотной пищи, с почвой связан также состав атмосферы и гидросферы. Распределение элементов климата, радиационного баланса, растительности подчинено закону географической зональности, а в основе функционирования почвенных микробных

сообществ лежат принципы взаимодействия разных эколого-трофических групп микроорганизмов [7]. Южные расы микробов, имеющие повышенный температурный оптимум развития, биохимически более активны и обладают более приспособительной реакцией к климату. Однако Н.А. Красильников отрицает роль географического фактора в формировании микробных ассоциаций почвы и отдает предпочтение в распределении микроорганизмов экологическим факторам [6].

Известно, что географическая среда вызывает к жизни совершенно различные ассоциации микроорганизмов филлосферы, ризосферы и педосферы. Академик Г.А. Заварзин предложил не выделять микроорганизмы «почвенные» и «непочвенные» [5]. Такое подразделение микроорганизмов весьма условно, и разные исследователи могут использовать разные критерии для такой дифференциации микробного разнообразия в природе. «Почвенными» можно считать все бактерии, которые способны размножаться и функционировать в почве или сопряженных с ней субстратах и эконишах в наземном и надземном ярусах. Это филлосфера и ризосфера.

На растениях формируются многообразные специфические микробные ценозы, распределяющиеся на стеблях и листьях. Связь эпифитов с растениями осуществляется через продукты их экзосмоса. Растения определяют специфику ценоза и динамику численности микроорганизмов. Последнее наиболее резко проявляется в южной зоне, где летние высокие температуры и изменение влажности четко отражаются на состоянии и численности эпифитных микроорганизмов. Взаимосвязь в данной экосистеме поглощения лучистой энергии и биохимической активности микрофлоры филлосферы происходит на поверхности растительного организма либо с обязательным ее участием, пассивным или активным. Граница раздела внешней среды, с которой поверхность взаимодействует, проявляет необычные свойства как разделяемых сред, так и самих границ и определяет формирование специфических групп микроорганизмов со своеобразными физиологическими функциями (биохимическая активность, пигментация и т.п.).

Многие бактерии филлопланы содержат каротиноидные пигменты в качестве защитного приспособления к летальному действию света высокой интенсивности и появлению резистентных форм микроорганизмов. Они в жизни растения выполняют функцию средообразователя и частично общего питания. Растения, в свою очередь, осуществляют физическую защиту микроорганизмов и участвуют в их распространении. При поедании растений животными микроорганизмы попадают в желудочно-кишечный тракт (ЖКТ). При этом часть микроорганизмов погибает, подвергаясь физико-химическим и ферментативным воздействиям, а другая часть размножается в пищеварительном тракте.

Судьба бактерий на поверхности листьев растений в большей степени, чем у грибов, определяется влажностью. Однако основное действие на микробное сообщество филлосферы оказывает экскреция летучих и нелетучих органических веществ вегетирующих органов растения. Географические и экологические факторы изменяют количество и состав микроорганизмов, их биохимическую активность и местообитание.

Следовательно, ценные для биотехнологии расы микроорганизмов, в том числе и лактобактерии, можно выделять из различных естественных источников: воды, растений, почвы.

Национальные кисломолочные продукты народов Европы, Азии и Кавказа помимо вкусовой и пищевой ценности обладают лечебно-профилактическими свойствами за счет антибактериальных комплексов, синтез которых является наслед-

ственной особенностью лактобактерий [12]. В настоящее время многие биотехнологи в поиске лактобактерий с ценными биохимическими свойствами. Поэтому большой интерес представляют работы по изучению нераскрытых потенциальных возможностей выделенных из природных источников штаммов, способных к синтезу антибиотиков и других биологически активных веществ. Изучение этих вопросов позволит получать молочные продукты с высокими вкусовыми качествами. Отобранные штаммы могут быть использованы для конструирования новых продуктов и препаратов, которые в перспективе окажутся главными средствами в борьбе с возбудителями болезней желудочно-кишечного тракта [8].

Основной целью нашей работы было исследование антибиотикоустойчивости лактобактерий и дрожжей кисломолочных национальных продуктов.

В задачи исследования входило выделение лактобактерий и дрожжей из заквасок и молочных продуктов разных географических зон, оценка устойчивости к антибактериальным препаратам разных классов природно-чувствительных штаммов лактобактерий и обоснование эмпирической резистентности микроорганизмов, циркулирующих в конкретных регионах.

Методика исследования

В работе использовали молочные лечебно-профилактические национальные продукты и закваски разных географических зон (Адыгея, Башкирия, Белоруссия, Болгария, Дагестан, Карачаево-Черкесия, Московская область).

Для выделения мезофильных и термофильных лактобактерий испытуемый материал высевали на среды: гидролизованный обрат Богданова, молочная сыворотка по Кохенди, гидролизованное молоко с мелом, также использовали среду Сабуро для выращивания дрожжей [10]. Мезофильные лактококки выращивали на агаризованных средах в течение 2-3 сут. Выделяли молочнокислые бактерии по морфологическому признаку колоний. Выделенные штаммы и микробиоту молочных продуктов и напитков (айран, кефир, сыр, закваски и т.д.) изучали традиционными методами; морфологию и строение клеток изучали в световом микроскопе.

Идентификацию бактерий проводили, руководствуясь перечнем культуральных признаков [1, 11]. Количество молочной кислоты определяли методом титрования, а качественную реакцию на молочную кислоту устанавливали по реакции «себряного зеркала» [12].

Устойчивость к антибиотикам молочнокислых бактерий определяли методом диффузии антибиотика в агаризованную среду и измерением зоны подавления роста тест-культур. Дискдиффузный метод до сих пор не претерпел принципиальных изменений. Испытывали антибактериальные препараты разных классов и механизмов действия: аминогликозидные антибиотики (стрептомицин, неомицин), β -лактамы (пенициллин, ампициллин, оксациллин), макролиды (эритромицин, олеандомицин).

Результаты и их обсуждение

Айран (Республика Карачаево-Черкесия) представлен кокками и палочками молочнокислых бактерий (единичные и собранные в цепочки разной длины), дрожжами. В куруте, полученном из Башкирии, обнаружены кокки, обладающие ярко выраженной протеолитической активностью. Микробиота сыра Анжи и закваски (Республика Дагестан) состоит из лактококков, мезофильных дрожжей, палочек.

В кефире (Волоколамск, Московская область) были обнаружены кокки и дрожжи. Микрофлора айрана (Адыгея) представлена лактококками и дрожжами. Белорусская и болгарская закваски отличались присутствием в большом количестве дрожжей.

Выделено 25 штаммов мезофильных кислотообразующих молочнокислых бактерий, 13 штаммов из их числа обладали высокой резистентностью. Всего из молочных продуктов и заквасок разных географических зон выделено 7 штаммов мезофильных, 15 — термофильных и 3 — психрофильных лактобактерий. Первоначальная идентификация включала комплекс фенотипических признаков, основанных на изучении морфологических и физиолого-биохимических свойств лактококков [12].

При изучении чувствительности лактобактерий к антибиотикам выявлено, что многие из них чувствительны к антибиотикам, ингибирующим синтез белка. Причем все штаммы оказались чувствительными к антибиотикам, ингибирующим синтез клеточной стенки (рис. 1).

Устойчивость к пеницилину может быть природной, т.е. является видовым признаком для лактококков. Штамм *Lactococcus* sp., выделенный из дагестанских продуктов, также устойчив к нему, что может быть использовано для составления лечебных препаратов и заквасок. В свое время М. Г. Гибшман, Г.М. Паткуль и др. предлагали отбирать штаммы мезофильных молочнокислых стрептококков по признакам устойчивости к пенициллину для получения стойких заквасок для творога [13]. Эти штаммы антибиотически активны по отношению к посторонней микрофлоре пастеризованного молока.

Практически все дрожжи родов *Saccharomyces* и *Candida*, выделенные из продуктов южной зоны, устойчивы к пенициллину (рис. 2). Резистентность к антибиотикам дрожжей более выражена у штаммов дагестанских продуктов (сыра и закваски); они устойчивы к семи испытываемым антибиотикам разных групп (макролидам, β -лактамам, аминогликозидным).

Факторами резистентности лактобактерий и дрожжей, по-ви-

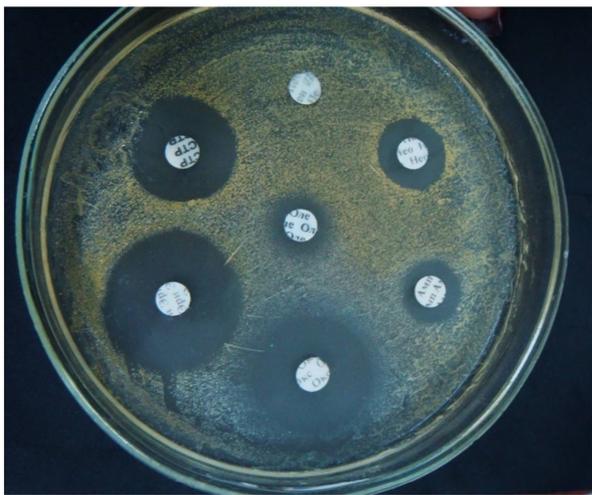


Рис. 1. Чувствительность *Lactococcus* sp.

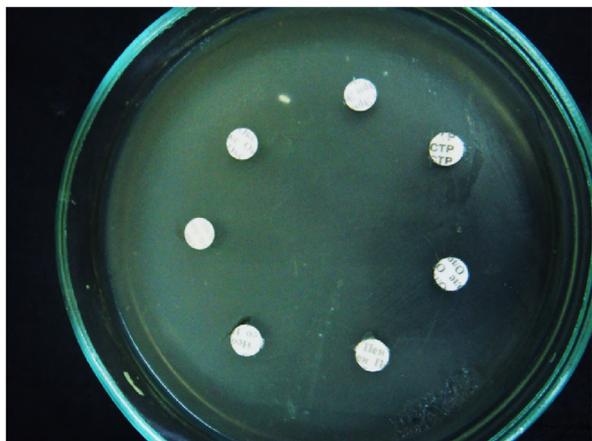


Рис. 2. Резистентность *Saccharomyces* sp.

димому, выступают непроницаемость клеточной стенки, либо снижение концентрации антибиотика внутри клетки в результате активной трансформации антибиотика конститутивными или индуцибельными ферментами клетки, либо модификация его активных центров.

Представленные данные можно рассматривать не только как пример реакции биологической системы на присутствие антимикробных препаратов определенной химической структуры, но и как системы взаимоотношений дрожжей и лактобактерий в природных экосистемах.

Количество устойчивых к испытываемым антибиотикам разных групп в целом встречается больше среди южных изолятов.

Увеличивается количество резистентных штаммов в ряду лактококков. Некоторые штаммы дагестанской группы устойчивы к пенициллину, неомицину, ампициллину, оксациллину. Несколько снижена антибиотикочувствительность у адыгейских штаммов лактококков. Лактобактерии адыгейской группы молочных продуктов довольно чувствительны к эритромицину, стрептомицину, олеандомицину.

Кислотоустойчивые дагестанские штаммы *L. bulgaricus* и *L. acidophilus* резистентны к оксациллину, олеандомицину и ампициллину.

Они, по-видимому, способны оказывать не только антагонистическое действие на остаточную термостойкую микрофлору незаквасочного происхождения (возможно, и анаэробов), но и быть резистентными к бактериофагу.

Лактобактерии белорусских молочных продуктов в среднем слабо устойчивы к испытываемым антибиотикам. Максимальная чувствительность к антибиотикам отмечалась у штаммов, выделенных из молочных продуктов Московской области.

Заключение

Таким образом, разнообразие географических условий определяет антибиотикочувствительность лактобактерий. Выделенные штаммы из различных зон их распространения необходимы для разработки критериев видовой их специфичности, изменчивости и индикации. Особый интерес представляют штаммы, обладающие активностью образования различных метаболитов и устойчивостью данных признаков.

Полученные результаты позволяют предположить, что выделенные штаммы лактобактерий и дрожжей из кисломолочных продуктов разных географических зон могут служить источником биологических препаратов или лечебно-профилактических продуктов нового поколения.

Библиографический список

1. Бабьева П.П., Чернов И.Ю. Биология дрожжей. М.: Изд-во КМК, 2004. 221 с.
2. Добровольская Т.Г. Структура бактериальных сообществ почв. М.: ИКЦ «Академкнига», 2002. 281 с.
3. Докучаев В.В. Дороже золота русский чернозем // М.: Изд-во МГУ 1994. 542 с.
4. Докучаев В.В. Сочинения. М.: Изд-во АН СССР, 1955. Т. VII. 277 с.
5. Заварзин Г.А. Бактерии и состав атмосферы. М.: Наука, 1984. 191 с.
6. Красильников Н.А. Микроорганизмы почвы и высшие растения. М.: Изд-во АН СССР, 1958. 464 с.
7. Мишустин Е.Н. Ценозы почвенных микроорганизмов // Почвенные микроорганизмы как компонент биогеоценоза. М.: Наука, 1984. С. 5-20.

8. Родионов Г.В., Белопухов С.Л., Матапова Р.Т., Дряхлых О.Т. Регулирование численности микроорганизмов в молоке-сырье // М.: Известия ТСХА, 2013. № 1. С. 111-119.
9. Розанов А.Ю. Бактериальная палеонтология. М.: ПИН РАН, 2002. 188 с.
10. Сидоренко О.Д. Лабораторный практикум по микробиологии. М.: Изд-во РГАУ-МСХА, 1999. 119 с.
11. Степаненко П.П. Микробиология молока и молочных продуктов: Учебник для ВУЗов. — Сергиев Посад: ООО «Все для Вас — Подмосковье», 1999. 415 с.
12. Стоянова Л.Г. Новые бактериоцины лактококков и их практическое использование. М.: МГУ, дис. д.б.н., 2008. 45 с.
13. Цареградская И.В. Подбор заквасок для творога. Материал симпозиума по селекции молочнокислых бактерий. М, 1970. С. 51-55.

ANTIBIOTIC SUSCEPTIBILITY OF INDIVIDUAL STRAINS
OF LACTOBACILLI AND YEASTS OF FERMENTED MILK PRODUCTS
IN DIFFERENT GEOGRAPHICAL ZONES

O.D. SIDORENKO, A.P. KHARKOVA

(RSAU-MAA named after K.A. Timiryazev)

Geographical zoning law determines the interrelation between environmental and biochemical processes in nature and habitat of certain physiological groups of bacteria.

Antibiotic resistance of natural strains of lactobacilli and yeast is a specific property. Antibiotic resistance of lactic acid bacteria can be the basis for the use of such strains for the producing of both new foodstuff and medicinal products, which would become the main means of control of gastrointestinal tract pathogens.

Key words: antibiotic resistance, geographical zoning, phyllosphere, rhizosphere, metabolic interaction, polymorphism, econiche.

Сидоренко Олег Дмитриевич — д. с.-х. н., проф. кафедры микробиологии и иммунологии РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (127550, Москва, ул. Тимирязевская, д. 50; тел. 8 (499) 976-09-66).

Харькова Анна Петровна — асп. кафедры микробиологии и иммунологии РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (127550, Москва, ул. Тимирязевская, д. 50; тел. 8 (965) 430-04-43; e-mail: annakharkova@rambler.ru).

Sidorenko Oleg Dmitrievich—Doctor of Agricultural Sciences, professor of the department of microbiology and immunology, RSAU-MAA named after K.A. Timiryazev (127550, Moscow, Timiryazevskaya street, 50; tel. 8-499-976-09-66).

Kharkova Anna Petrovna — Ph.D. student of the department of microbiology and immunology, RSAU-MAA named after K.A. Timiryazev (127550, Moscow, Timiryazevskaya street, 50; tel. 8-965-430-04-43; e-mail: annakharkova@rambler.ru).