

## ИЗУЧЕНИЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ СВОЙСТВ КОНСОРЦИУМА МИКРООРГАНИЗМОВ

### Аннотация.

*Актуальность и цели.* Изучены свойства консорциума микроорганизмов, в том числе антибиотические свойства по отношению к ряду бактерий.

*Материалы и методы.* В работе использованы ранее выделенный штамм K205 *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* и новая выделенная культура из свежего молока. Используются классические микробиологические методы выделения и изучения морфологических, физиолого-биохимических и антибиотических свойств микроорганизмов. Каждый эксперимент был проведен в трех повторностях, результаты экспериментов были статистически обработаны.

*Результаты.* Проведены скрининг, выделение и идентификация культуры *Lactococcus lactis* 276, изучены морфологические, физиолого-биохимические и антибиотические свойства. Выявлено, что выделенная культура обладает антибиотической активностью по отношению к *Bacillus coagulans* – 2800 МЕ/мл, *Escherichia coli* – 3000 МЕ/мл. Исследованы физиолого-биохимические свойства соотношений молочнокислых бактерий (1:1, 1:2, 2:1). По всем изученным свойствам соотношение культур 276 и K-205 1:1 показало наилучшие результаты. Данный вариант соотношений показал активное антибиотическое действие по отношению к грамположительным и грамотрицательным бактериям: *Bacillus coagulans* – 3500 МЕ/мл, *Escherichia coli* – 3200 МЕ/мл.

*Выводы.* В результате работы выделена активная культура *Lactococcus lactis* 276. Изучены морфологические, физиолого-биохимические свойства и исследованы антибактериальные свойства соотношений культур с известным штаммом *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* K-205.

**Ключевые слова:** бактериоцин, антибактериальное действие, молочнокислые бактерии, *Lactococcus lactis*, биотехнология, консорциум.

T. D. Sul'timova, L. G. Stoyanova

## STUDYING THE ANTIBACTERIAL PROPERTIES OF THE MICROORGANISM CONSORTIUM

### Abstract.

*Background.* The properties of consortia of microorganisms including antibiotic properties on a number of bacteria are studied.

*Materials and methods.* The previously isolated strain K205 of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* was used in the work and a new isolated culture from fresh milk from the Republic of Buryatia. Classical microbiological methods of isolating and studying morphological, physiological-biochemical and antibiotic properties of microorganisms were used. Each experiment was performed in triplicate and statistically processed.

---

© 2018 Сульtimiова Т. Д., Стоянова Л. Г. Данная статья доступна по условиям всемирной лицензии Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), которая дает разрешение на неограниченное использование, копирование на любые носители при условии указания авторства, источника и ссылки на лицензию Creative Commons, а также изменений, если таковые имеют место.

**Results.** Screening, isolation and identification of the culture of *Lactococcus lactis* 276 were carried out, morphological, physiological-biochemical and antibiotic properties were studied. It was revealed that the isolated culture has antibiotic activity in relation to *Bacillus coagulans* – 2800 ME/ml, *Escherichia coli* – 3000 ME/ml. The physiological-biochemical properties of the ratios of lactic acid bacteria (1:1, 1:2, 2:1) are investigated. For all the properties studied, the ratio of cultures 276 and K-205 1:1 showed the best results. This variant of the ratio showed an active antibiotic action against Gram-positive and Gram-negative bacteria: *Bacillus coagulans* – 3500 IU/ml, *Escherichia coli* – 3200 IU/ml.

**Conclusions.** As a result of the work, active culture of *Lactococcus lactis* 276 was isolated. Morphological, physiological and biochemical properties were studied and the antibacterial properties of the culture relationships with the known strain *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* K-205.

**Key words:** bacteriocin, antibacterial action, lactic acid bacteria, *Lactococcus lactis*, biotechnology, consortium of microorganisms.

Микроорганизмы существуют в природе как в виде популяций организмов одного типа, образуя микроколонии, растущие в локализованном сайте, так и в виде сообществ, где различные популяции взаимодействуют между собой, в том числе подавляя рост и развитие соседних культур.

Антагонистическое действие штаммов может иметь несколько причин: образование антибиотиков, продуктов обмена, оказывающих ингибирующее действие; разная скорость адаптации штаммов к конкретной питательной среде; темп размножения (продолжительность генерации) и др.

Многие бактерии, в том числе молочнокислые, синтезируют антибиотические вещества белковой природы – бактериоцины, действующие губительно на родственные виды и штаммы микроорганизмов и тормозящие их рост или имеющие более широкий спектр антибактериального действия, таким образом проявляя свои антагонистические свойства для получения конкурентного преимущества в естественных условиях существования.

Резистентность бактерий к действию бактериоцинов определяется наличием специальных структур – рецепторов на поверхности клетки. По-видимому, этим определяется избирательная активность бактериоцинов в отношении бактерий того же или близко родственных видов.

В данной статье рассмотрено совместное культивирование близкородственных молочнокислых бактерий, выделенных из разных природных источников, в различных соотношениях, и изучение их свойств, в том числе изменение антибактериальной активности культур в процессе роста.

### Материалы и методы исследования

Материал исследования: штамм K205 *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, выделенный ранее из национального кисломолочного напитка «Курунга» и обладающий широким спектром антибактериальной активности на грамположительные и грамотрицательные группы бактерий, а также на плесневые грибы и дрожжи. *Lactococcus lactis* 276, выделенный из свежего коровьего молока. Были использованы следующие микробиологические среды: мясопептонный 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. Культивирование микроорганизмов проводили при температуре 28 °С в термостате в течение 24 ч.

*Морфологию выделенных микроорганизмов* изучали по характеру роста на твердой питательной среде МПА и в результате микроскопирования. Микроскопирование проводили на микроскопе Альтами БИО 8 при увеличении в 2000 раз.

*Устойчивость штамма к NaCl* отмечали визуально (после встряхивания пробирки) по наличию или отсутствию мутности и определяли оптическую плотность на фотоэлектроколориметре (ФЭК). Предварительно культуру выращивали на жидкой биосинтетической среде с 4 и 6,5 % NaCl при температуре 30 °С в течение 24 ч.

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

*Определение роста культуры при различной температуре (10, 40, 45 °С)* отмечали визуально (после встряхивания пробирки) по наличию или отсутствию мутности и определяли оптическую плотность на ФЭКе. Культуру выращивали на жидкой биосинтетической среде при разных значениях температур: 10, 40, 45 °С в течение 24 ч.

*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 (Arlin & Barrett Ltd, Великобритания). *Определение белка* проводили по методу А. Дуденкова.

*Количество молочной кислоты (кислотность)* определяли методом титрования и по разности между объемами 0,1 н раствора NaOH, пошедшего на титрование среды культивирования до и после роста бактерий.

Каждый эксперимент был проведен в трех повторностях. Результаты экспериментов были статистически обработаны.

### Результаты исследований

Выделение культуры *Lactococcus lactis* проводили из свежего коровьего молока методом посева на чашки со средами МПА и MRS. В результате было отобрано пять колоний молочнокислых микроорганизмов, по морфологическим признакам соответствующих молочнокислым лактококкам. Чистоту выделенной культуры проверяли микроскопическим контролем и высевом на среду МПА и биосинтетическую среду. Идентификацию молочнокислых микроорганизмов осуществляли на основании морфологических, культуральных, физиолого-биохимических признаков в соответствии с определителем бактерий Берги.

Изученные морфологические свойства, способность роста при различных температурах и значениях pH выделенных пяти штаммов сравнивали со свойствами бактерий *L. lactis* subsp. *lactis*, описанных в определителе бактерий Берги (табл. 1).

Таблица 1  
Дифференцирующие признаки штаммов *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*

Признаки	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	1	2	3	4	5
Преимущественное расположение клеток наиболее типичное указано первым	короткие цепочки	короткие цепочки	короткие цепочки	короткие цепочки	короткие цепочки	короткие цепочки
Рост при 10 °С	+	+	+	+	+	+
Рост при 40 °С	+	+	+	+	+	+
Рост при 45 °С	–	–	–	–	–	–
pH 9,6	–	–	–	–	–	–
Рост в присутствии 4 % NaCl	+	+	+	+	+	+
Рост в присутствии 6,5 % NaCl	–	–	–	–	–	–

**Примечание.** Знак «+» – 90 % или более штаммов положительные, «–» – 90 % или более отрицательные.

Показано, что оптимальной температурой роста культуры *L. lactis* является 30 °С. Выявлено, что бактерии также растут при 39–40 °С и при наличии в среде 4 % NaCl; не развиваются в среде, в которой содержится 6,5 % NaCl и при высокой кислотности среды (pH 9,5).

Кроме того, был использован метод определения сбраживания углеводов исследуемыми штаммами с использованием готовых растворов углеводов (1 %) и индикатора бромкрезолового пурпурного в жидкой биосинтетической среде (табл. 2).

Таблица 2  
Способность к потреблению углеводов выделенных штаммов

Способность к потреблению углеводов	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	1	2	3	4	5
Сахароза	+	+	+	+	+	+
Лактоза	+	+	+	+	+	+
Маннит	+	+	+	+	+	+
Глюкоза	+	+	+	+	+	+
Мальтоза	+	+	+	+	+	+
Сорбит	–	–	–	–	–	–

**Примечание.** Знак «+» – обозначает способность к потреблению углеводного субстрата, «–» – отсутствие способности к потреблению.

Культивировали в течение 24 ч при 30 °С, после чего по изменению окраски среды и измерению оптической плотности отмечали результат.

Из табл. 2 видно, что образцы 1–5 сбраживают сахарозу, лактозу, манит, глюкозу, мальтозу и не сбраживают сорбит, что характерно для *L. lactis* subsp. *lactis* согласно Определителю бактерий Берги.

Далее методом диффузии в агар определяли антибиотическую активность выделенных вариантов по отношению к ряду микроорганизмов: *Escherichia coli*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus subtilis*, и в результате отобран вариант *Lactococcus lactis* № 1, обладающий наибольшей антибиотической активностью по отношению ко всем трем тест-организмам (табл. 3).

Таблица 3

Определение антибиотической активности

Культура микроорганизмов	Средний диаметр зон подавления, мм				
	1	2	3	4	5
<i>Escherichia coli</i>	15 ± 0,5	13 ± 0,5	12,5 ± 0,5	11 ± 0,5	10 ± 0,5
<i>Bacillus coagulans</i>	13 ± 0,5	13 ± 0,5	13 ± 0,5	12 ± 0,5	11 ± 0,5
<i>Bacillus subtilis</i>	14 ± 0,5	12,5 ± 0,5	12,5 ± 0,5	12 ± 0,5	12 ± 0,5

В дальнейших исследованиях использован вариант № 1 – *Lactococcus lactis* 276.

Изучена динамика роста культуры 276, представленная на рис. 1.

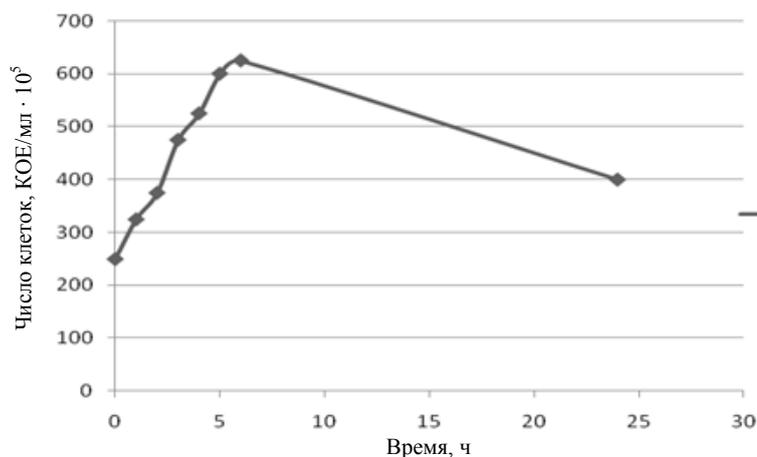
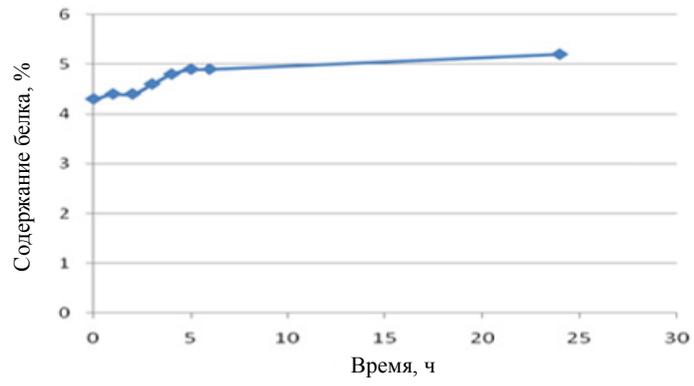


Рис. 1. Динамика роста *Lactococcus lactis* subsp *lactis* 276

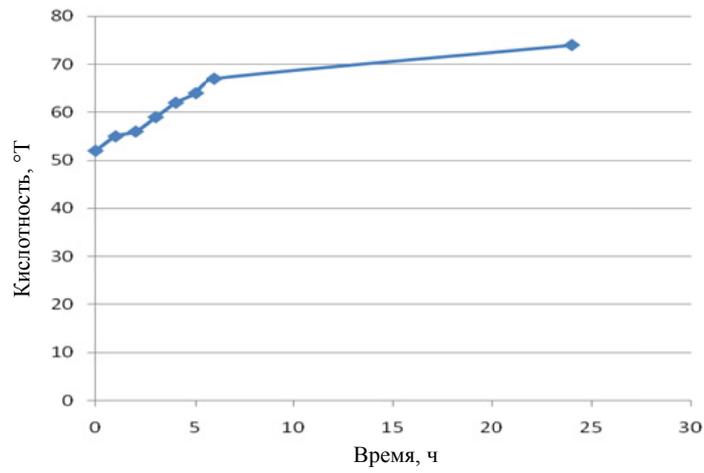
Показано, что максимальное накопление биомассы происходит за 6 ч культивирования, что является характерным признаком для молочнокислых лактококков.

На рис. 2 показана динамика накопления белка. Максимальное накопление белка происходит на 6 ч культивирования.

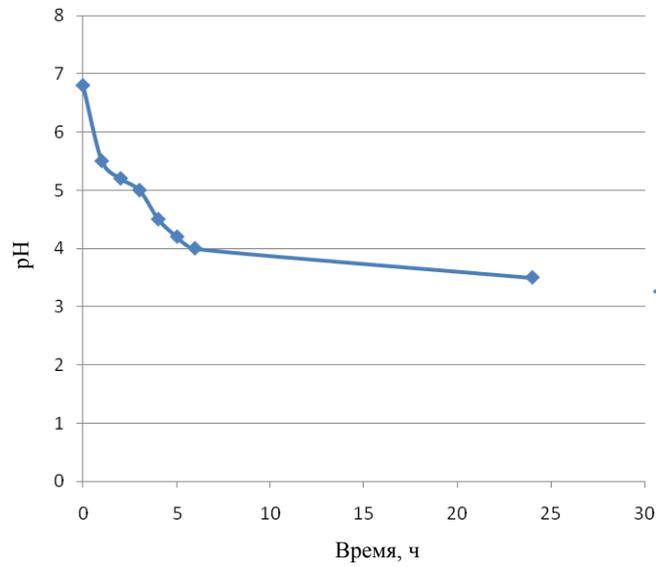
За счет образования молочной кислоты максимальный уровень кислотности достигает 74 °Т за 25 ч культивирования, показатель рН уменьшается с 6,8 до 3,5.



а)



б)



в)

Рис. 2. Динамика изменения уровня:  
 а – белка, %; б – кислотности, °Т; в – рН *Lactococcus lactis* 276

Результаты определения бактериоцинтсезирующей активности *Lactococcus lactis* 276 в процессе культивирования с измерением зоны подавления роста тест-культуры *Bacillus coagulans* и *Escherichia coli* в мм представлены в табл. 4.

Таблица 4

Антибиотическая активность штамма *Lactococcus lactis* 276

Время, ч	Диаметр подавления зон, мм	
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus coagulans</i>
0	13 ± 0,5	12 ± 0,5
1	15 ± 0,5	12 ± 0,5
2	15 ± 0,5	13 ± 0,5
3	15 ± 0,5	12 ± 0,5
4	15 ± 0,5	13 ± 0,5
5	15 ± 0,5	13 ± 0,5
6	16 ± 0,5	12 ± 0,5
24	13 ± 0,5	12 ± 0,5

Культура проявляла антибиотические свойства с момента начала культивирования, однако после 6 ч замечена наибольшая зона подавления роста тест-культуры *Escherichia coli*, диаметр которой составил 16 мм.

Далее проведены исследования свойств соотношений молочнокислых бактерий *Lactococcus lactis* К-205 и 276 при совместном культивировании.

Изучен спектр антибиотического действия ранее выделенного штамма *Lactococcus lactis* subsp *lactis* К-205 и выделенного из свежего коровьего молока *Lactococcus lactis* 276 в соотношениях 2:1, 1:2, 1:1 (табл. 5).

Таблица 5

Антибиотическая активность *Lactococcus lactis* subsp *lactis* К-205 и 276 в соотношении 2:1, 1:2, 1:1

Время, ч	Диаметр подавления зон, мм					
	2:1		1:2		1:1	
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus coagulans</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus coagulans</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus coagulans</i>
0	13 ± 0,5	13 ± 0,5	13 ± 0,5	14 ± 0,5	11 ± 0,5	10 ± 0,5
1	12 ± 0,5	12 ± 0,5	12 ± 0,5	13 ± 0,5	12 ± 0,5	12 ± 0,5
2	12,5 ± 0,5	13 ± 0,5	13 ± 0,5	12 ± 0,5	12 ± 0,5	12 ± 0,5
3	12 ± 0,5	12 ± 0,5	13 ± 0,5	13 ± 0,5	13 ± 0,5	12 ± 0,5
4	13 ± 0,5	12 ± 0,5	14 ± 0,5	14 ± 0,5	14 ± 0,5	12 ± 0,5
5	13 ± 0,5	13 ± 0,5	14 ± 0,5	14 ± 0,5	15 ± 0,5	13 ± 0,5
6	12 ± 0,5	12 ± 0,5	14 ± 0,5	12 ± 0,5	15 ± 0,5	13 ± 0,5
24	12 ± 0,5	12 ± 0,5	14 ± 0,5	12 ± 0,5	11 ± 0,5	11 ± 0,5

Установлено, что выделенные активные бактериоцинообразующие штаммы подавляли рост *Escherichia coli*, *B. coagulans*. Штаммы 276 и К-205 в соотношениях 2:1, 1:2 проявляли антибиотическую активность по отношению к *Escherichia coli*, *B. coagulans*, но незначительно. Культуры в соотношении 1:1 обладали антибактериальным действием: эффективно подавляли рост тест-культур и к 6 ч культивирования зона подавления роста *Escherichia coli* составляла 15 мм, а *Bacillus coagulans* – 13 мм, что выше, чем результаты в других соотношениях.

Предполагаем, что в соотношении 1:1 имеет место быть выраженное антагонистическое действие культур в борьбе за субстрат и, соответственно, антибиотическое действие наиболее выражено (рис. 3). Тогда как в соотношениях 2:1, 1:2 происходит подавление культуры, находящейся в меньшем количестве.

Изучена динамика роста соотношений штаммов 276 и К-205 (1:1, 1:2, 2:1).

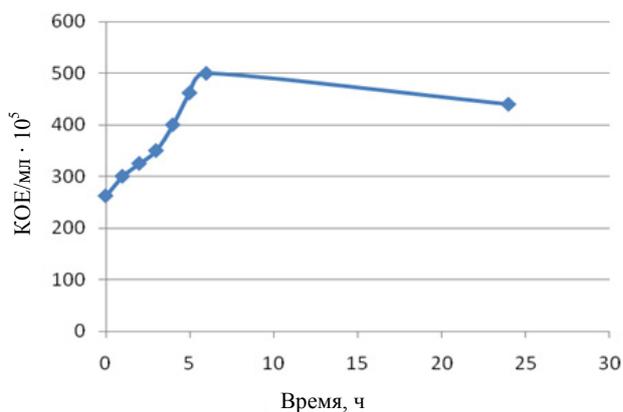


Рис. 3. Динамика роста соотношения культур 1:1

В результате выявлено, что при соотношении 1:1 наблюдается наибольший рост культур ( $500 \cdot 10^5$  КОЕ/мл) на 6 ч культивирования.

Проводили измерение накопления белка, динамику изменения кислотности (рис. 4).

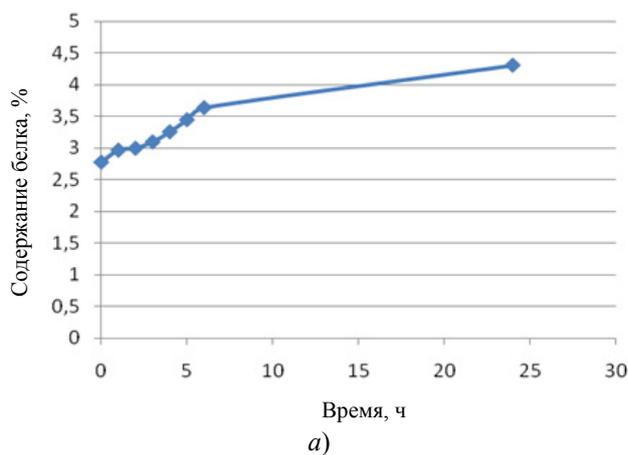


Рис. 4. Динамика накопления белка (а) и изменение уровня кислотности (б) соотношения культур 1:1 (начало)

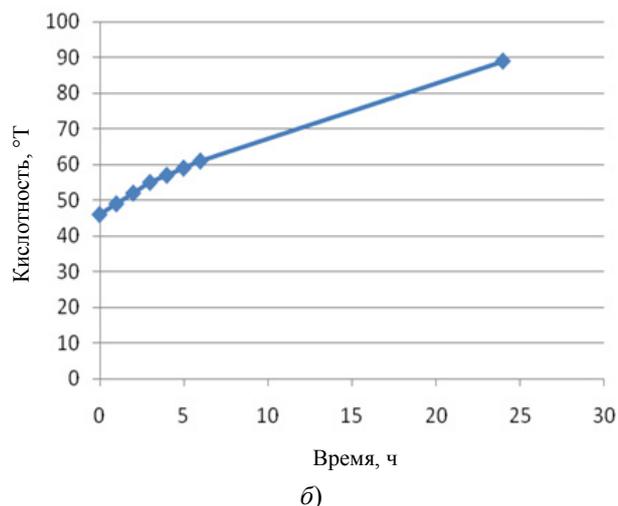


Рис. 4. Динамика накопления белка (а) и изменение уровня кислотности (б) соотношения культур 1:1 (окончание)

Изменение динамики накопления белка происходило равномерно во всех соотношениях. На рис. 4,а представлена динамика соотношения 1:1, из которой видно, что максимальное накопление белка (3,6 %) происходит на 6 ч культивирования. Максимальный уровень кислотности достигается на 24 ч культивирования и составляет 90 °Т.

#### Заключение

В результате проделанной работы проведены скрининг, выделение и идентификация штамма *Lactococcus lactis* 276, изучены морфологические и физиолого-биохимические свойства выделенной культуры, изучена антибиотическая активность штамма 276. Выявлено, что выделенный штамм обладал антибиотической активностью по отношению к *Bacillus coagulans* – 2800 МЕ/мл, *Escherichia coli* – 3000 МЕ/мл. Исследованы физиолого-биохимические свойства соотношений молочнокислых бактерий (1:1, 1:2, 2:1). По характеру роста, накоплению белка, кислотности соотношение штаммов 276 и К205 молока и из лечебно-профилактического продукта курунга, в соотношении 1:1, показало наилучшие результаты. Изучено антибактериальное действие соотношений. Наиболее активным по отношению к грамположительным и грамотрицательным бактериям являлось соотношение культур 1:1: *Bacillus coagulans* – 3500 МЕ/мл, *Escherichia coli* – 3200 МЕ/мл, что является весьма перспективным для дальнейшего использования консорциума в биотехнологических целях.

#### Библиографический список

1. **Стоянова, Л. Г.** Создание банка лиофильных бактериоцинопродуцирующих молочнокислых бактерий / Л. Г. Стоянова, 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* К-205 / Л. Г. Стоянова, 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 / Е. И. Квасников, О. А. Нестеренко. – М. : Наука, 2003. – 348 с.
4. **Стоянова, Л. Г.** Молочнокислые бактерии / Л. Г. Стоянова // Практикум по микробиологии / под ред. А. И. Нетрусова. – М. : Академия, 2005. – С. 467–486.

### References

1. Stoyanova L. G., Sul'timova T. D., Netrusov A. I. *Tsitologiya* [Cytology]. 2004, vol. 46, no. 10, pp. 865–867.
2. Stoyanova L. G., Sul'timova T. D., Stroeva A. R., Netrusov A. I. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii* [Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology]. 2008, no. 1, pp. 60–63.
3. Kvasnikov E. I., Nesterenko O. A. *Molochnokislye bakterii i ikh ispol'zovanie* [Lactic acid bacteria and their use]. Moscow: Nauka, 2003, 348 p.
4. Stoyanova L. G. *Praktikum po mikrobiologii* [Practical work on microbiology]. Moscow: Akademiya, 2005, pp. 467–486.

---

#### **Сультимова Татьяна Доржиевна**

кандидат биологических наук, доцент,  
кафедра биотехнологии, Восточно-  
Сибирский государственный  
университет технологий и управления  
(Россия, г. Улан-Удэ, ул. Ключевская, 40в)

E-mail: tsultimova@mail.ru

#### **Sul'timova Tat'yana Dorzhievna**

Candidate of biological sciences, associate  
professor, sub-department of biotechnology,  
East Siberia State University of Technology  
and Management (40v Klyuchevskaya  
street, Ulan-Ude, Russia)

#### **Стоянова Лидия Григорьевна**

доктор биологических наук, профессор,  
кафедра микробиологии, Московский  
государственный университет  
имени М. В. Ломоносова (Россия,  
г. Москва, Ленинские горы, 1)

E-mail: stoyanovamsu@mail.ru

#### **Stoyanova Lidiya Grigor'evna**

Doctor of biological sciences, professor,  
sub-department of microbiology,  
Lomonosov Moscow State University  
(1 Leninskie Gory, Moscow, Russia)

---

УДК 579.63: 579.66

#### **Сультимова, Т. Д.**

**Изучение антибактериальных свойств консорциума микроорганизмов / Т. Д. Сультимова, Л. Г. Стоянова // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Естественные науки. – 2018. – № 2 (22). – С. 42–51. – DOI 10.21685/2307-9150-2018-2-4.**