

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ СЕЛЕКЦИЯ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ ДЛЯ ОТБОРА АНТИБИОТИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ШТАММОВ

К. В. МАКАРЯН, Р. С. КУРДЖИ, А. Т. СУЛТАНЯН, К. В. ВЕГАПЕТАН

Ереванский зоотехническо-ветеринарный институт

*Ключевые слова:* бактерии молочнокислые, бактериальный концентрат, мутация.

Изучение антибиотических свойств у молочнокислых бактерий и создание из наиболее активных штаммов бактериальных заквасок и бактериальных концентратов представляется актуальной задачей как в плане получения лечебно-диетических кисломолочных продуктов для людей, так и высокоэффективных бактериальных препаратов-концентратов для лечения и предупреждения желудочно-кишечных расстройств молодняка с.-х. животных. Однако выявление в природных объектах высокоценных в терапевтическом отношении молочнокислых микроорганизмов представляет большую сложность. В связи с этим проводимая нами экспериментальная селекция молочнокислых бактерий при помощи мутагенных факторов (ионизирующая радиация и др.) представляется вполне обоснованной. Так, в результате работ с использованием ионизирующей радиации удалось выделить протеолитические и активные рентгеномутантные штаммы некоторых видов молочнокислых культур [1], которые с успехом были использованы в сыроделии для улучшения качества и ускорения процесса созревания некоторых сыров [2].

Что касается работ по селекции молочнокислых микроорганизмов для отбора антибиотически активных штаммов с использованием рентгеновского облучения [3], то полученные таким способом пять мутантных штаммов *L. lactis* и *L. plantarum* не только обладали повышенной антибиотической активностью по отношению к некоторым представителям гнилостной и патогенной микрофлоры и хорошей приживаемостью в кишечнике (благодаря высокой феноло-, желче- и солеустойчивости), но и соответствующими технологическими свойствами (кислотообразующей активностью, способностью образовывать плотный кисломолочный стусток с хорошим вкусом и др.), необходимыми при изготовлении кисломолочного продукта мацуна.

В дальнейшем, желая усилить антибиотический эффект, мы вместо обычной закваски из наиболее активных штаммов стали вырабатывать бактериальный концентрат. В связи с этим был предпринят дополнительный поиск с целью подбора оптимальной питательной среды, высокоурожайных штаммов, которые не только обладали бы ценными антибиотическими свойствами и хорошей приживаемостью в кишечнике, но и накапливали в жидкой питательной среде максимальное количество активных клеток. Определялись наиболее оптимальные режимы выработки и хранения бактериального концентрата. В результате этих исследований на большом количестве различных видов молочнокислых

культур, взятых из музея проблемной лаборатории молочного дела ЕрЗВН, а также полученных из ВНИИМ (автором некоторых из этих штаммов—*L. acidophilus*—3с; 5с; 317/402—является Л. А. Ерзинкян), был не только получен соответствующий бактериальный концентрат (500 млрд клеток в 1 мл), но и выделены мутантные штаммы со значительно измененными свойствами после выработки из исходных культур бактериального концентрата и дальнейшего хранения его при низких температурах (–12–15°) в течение 4–6-ти месяцев.

Таким образом, была достигнута и вторая цель работы—экспериментальным путем получить и отсеlectionировать наиболее активные мутантные штаммы по некоторым полезным свойствам.

**Материал и методика.** При выработке бактериальных концентратов использовались культуры *Str. lactis*, *Str. bouvis*, *Leuc. paramesenteroides*, *Str. faecalis*, *Str. cremoris*, *L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. lactis*, *L. salivarius*, *B. bifidum*.

Получение бактериальных концентратов из этих молочнокислых культур включало следующие этапы: приготовление питательной среды (состоящей из смеси подсырной сыворотки, гидролизованного молока с добавлением буферных солей и стимуляторов роста) и накоплением в ней бактериальных клеток [2]; получение бактериальной массы путем отделения бактерий из культуральной среды центрифугированием (суперцентрифугой С-44); получение суспензии бактерий смешиванием выделенной бактериальной массы с охлажденной до 2–5° защитной средой (концентрированный раствор сахарозы) в соотношении 1:2; хранение полученного концентрата (суспензии) от 2-х до 6-ти месяцев при –12–15°.

Отбор и исследование изучаемых свойств у выделенных из бакконцентрата молочнокислых бактерий проводили следующим образом: культура из бактериальной суспензии после соответствующего разведения высевалась на специальную плотную избирательную среду. Затем с этой среды отбирались по определенным признакам соответствующие колонии и откивались и обрат. После нескольких переосево в обрат у них вновь определялись необходимые свойства: антибиотическая активность—методом диффузии в агар по величине зоны задержки роста тест-культур; фенолустойчивость, солеустойчивость и желчеустойчивость молочнокислых культур—по интенсивности нарастания кислотности при их посеве в жидкую питательную среду с определенной концентрацией в ней этих ингибирующих веществ. Количество бактерий—посевом на агар с гидролизованным молоком на чашках Петри и подсчетом общего количества клеток по Бриду.

**Результаты и обсуждение.** Так, из 16-ти штаммов, использованных в этом процессе и подвергшихся хранению, у двух штаммов *L. acidophilus* (3с и 100 АШ) резко повысилась фенолустойчивость. За 24 ч инкубации в молоке с 0,5%-ной концентрацией фенола они доводили кислотность молока соответственно до 162 и 132°Т. У двух других штаммов (*L. lactis*—2955 и *B. bifidum*—6в) также повысилась фенолустойчивость, но в значительно меньшей степени: за тот же период инкубации кислотность фенольного молока повысилась соответственно до 82 и 62°Т. У остальных штаммов кислотообразующая функция либо снизилась, либо усилилась незначительно. Все они не сворачивали молока с 0,5%-ной концентрацией фенола, что обычно наступает по достижении кислотности молока до 60°Т.

Наилучшие же результаты были получены при исследовании желче- и солеустойчивости. У большинства выделенных штаммов отмечалось значительное усиление желчеустойчивости, а у двух наиболее ак-

тивных (*L. acidophilus*—3е и *B. bifidum*—4в), судя по повышению их кислотообразующей активности в гидролизованном молоке с 20%-ной концентрацией желчи, этот показатель возрос более четырех раз.

Что же касается изменений солеустойчивости, то наряду со значительным усилением ее у отдельных штаммов (наибольшее повышение было отмечено у штамма—3е, более пяти раз), в большинстве случаев отмечалась пониженная или незначительно усиленная солеустойчивость.

Однако сам по себе отбор молочнокислых культур только по степени их устойчивости к неблагоприятным условиям кишечника недостаточно целесообразен для селекции их в лечебных целях. Поэтому мы провели также исследования по выявлению их антибиотической активности в отношении некоторых представителей гнилостной и патогенной микрофлоры кишечника. Все изученные нами молочнокислые культуры и их мутантные штаммы задерживали рост исследуемых тест-культур. Наибольшей антибиотической активностью по отношению к *E. coli* и *Stap. aureus* обладал мутантный штамм *Str. faecalis*—3191, однако использование *Str. faecalis* в качестве бактериального концентрата-препарата является проблематичным, ибо некоторые штаммы этого вида считаются условно патогенными. Поэтому работа по селекции антибиотически наиболее активных штаммов продолжается.

Что касается причин мутагенного эффекта у молочнокислых культур при выработке из них бактериального концентрата с дальнейшим хранением при низких температурах, то судить о них пока воздерживаемся. Скорее всего выявленный мутагенный эффект обусловлен не только и не столько низкими температурами хранения бакконцентратов, а всем комплексом условий выработки и хранения (температура, рН среды, наличие кислорода в среде, природа самого штамма, признак, который подвергся изменению, и целый ряд других условий эксперимента, некоторые из которых, возможно, даже не учтены).

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Дилинни Э. Х., Арутюнян Р. К., Макарян К. В., Акопян А. А. Биолог. ж. Армении, 22, 9, 29—33, 1969.
2. Макарян К. В. Гр. Ер. зоовет. ин-та, 50, 54—63, 1981.
3. Мосарян К. В., Комарян Н. А., Султаниян А. Т. Арм. ИНИИТИ, Информационный листок, 1981.
4. Авторское свидетельство (СССР) 1118672, Бюлл. изобретений и открытий, 38, 1981.

Поступило 19.XII 1981 г.