

Биолог. ж. Армении, № 11. (42) 1989

УДК 637.1:576.851 2/852 24:575.27

СЕЛЕКЦИЯ АНТИБИОТИКУСТОЙЧИВЫХ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ

В. А. ЛИВШИЦ*, К. В. МАКАРЯН*, Н. А. КОЧАРЯН**, Е. В. СЕМЕНОВА*

*Всесоюзный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов, **Ереванский зооветеринарный институт

Бактерии молочнокислые—антибиотики—конъюгативная плазмида.

Молоко коров, которых при мастите лечат антибиотиками, содержит большое количество соответствующих антибактериальных препаратов. Попадая в сборное молоко, антибиотики даже в незначительных концентрациях ингибируют развитие микрофлоры заквасок, используемых в молочной промышленности. Поэтому составление бактериальных заквасок из резистентных к антибиотикам штаммов представляется необходимостью. Однако выделение из природных объектов высокорезистентных к различным антибиотикам штаммов молочнокислых бактерий, которые сохраняли бы свою исходную активность в отношении кислотообразования, протеолитической способности и другим необходимыми признакам, представляет значительные трудности. В связи с этим нами, наряду с традиционной селекцией штаммов по этим признакам, начаты исследования по применению генетических и генноинженерных методов для создания высокорезистентных к антибиотикам штаммов молочнокислых бактерий.

Материал и методика. Чувствительность 100 штаммов различных видов молочнокислых бактерий к пенициллину и стрептомицину определяли по кислотообразующей активности штаммов при различных концентрациях этих антибиотиков.

Опыты проводили в стерильном обезжиренном молоке. Контрольное молоко без антибиотиков всегда брали из той же партии стерильного обезжиренного молока. Количество вносимой культуры составляло 5%. Время термостатирования—6 ч при оптимальной температуре для исследуемой культуры. В качестве антибиотиков использовали натриевую соль пенициллина и сульфат стрептомицина. Растворителем служил фосфатный буфер (2 г H_2PO_4 + 8 г KH_2PO_4 в 1 л дистиллированной воды) при pH 6,0. В контрольные пробы с молоком добавляли эквивалентное количество растворителя, чтобы иметь одинаковый сравнимый состав молока.

Конъюгационные скрещивания на фильтрах осуществляли по Франке и Клевеллу [1].

Результаты и обсуждение. Исследования показали, что культуры молочнокислых бактерий чувствительны к пенициллину и стрептомицину. Так, в среднем по молочнокислым палочкам разница за 6 ч инку-

бацил при концентрации пенициллина 0,05 ед/мл по сравнению с контролем составила 17°Т (70—53°Т), а стрептомицин подавлял кислотообразующую активность с той же силой лишь при концентрации 0,5 мкг/мл. Разница в кислотности между контрольными и опытными пробирками с молоком в опытах со стрептококками при тех же концентрациях антибиотиков была не столь значительна — в среднем 9°Т (55—46°Т), что вполне естественно, ибо кокковые формы молочнокислых бактерий менее активны в отношении кислотообразования. Отдельные штаммы как среди палочковидных форм, так и среди стрептококковых обладали сравнительно высокой естественной резистентностью к испытываемым антибиотикам. К ним в первую очередь можно отнести штаммы *L. helveticum* 6в (78—66°Т), *L. salivarius*—1588 (70—66°Т), *Str. lactis* 4096 (60—58°Т). Однако они не только не обладали 100%-ной резистентностью, т. е. не образовывали такое же количество кислоты, которое наблюдалось в молоке без антибиотика, но и не обладали одновременно и другими признаками, необходимыми для их включения в закваски.

Результаты этих исследований показали, что отбор устойчивых к антибиотикам штаммов, хотя и возможен в принципе, однако этого трудно добиться, и нам кажется, что более эффективно решение этой задачи возможно лишь путем целенаправленного изменения полезных свойств у молочнокислых культур при помощи генетических и генно-инженерных методов.

В связи с этим были проведены исследования с целью выяснения возможности введения генетического материала в клетки молочнокислых бактерий с помощью конъюгации. Была использована конъюгативная плазмида рАМβ1, которая определяет устойчивость к антибиотикам MLS группы (эритромицин, линкомицин и др.) [2].

При скрещиваниях на мембранных фильтрах нам удалось перенести рАМβ1 из *Str. faecalis* в клетки *Str. lactis*, *L. plantarum* ВКМ 578, *L. casei* ВКМ 535, *L. brevis* ВКМ 1309, а также в штаммы некоторых видов бацилл. Частота передачи варьировала от $2 \cdot 10^{-5}$ до $2 \cdot 10^{-8}$. Полученные трансконъюганты использовали в качестве доноров в межродовых скрещиваниях с молочнокислыми бактериями. При этом удалось перенести рАМβ1 из *Bacillus sphaericus*, *B. megaterium*, *B. coagulans* и *B. licheformis* и различные штаммы молочнокислых стрептококков и лактобацилл с частотой 10^{-1} — 10^{-6} на клетку реципиента. Осуществлен также внутриродовой перенос указанной плазмиды среди штаммов *L. plantarum* с частотой 10^{-6} на реципиентную клетку. Все трансконъюганты стабильно наследовали рАМβ1.

Известно, что плазмида рАМβ1 способна мобилизовать на перенос неконъюгативные плазмиды и бактериальную хромосому [3—5]. Такое сочетание широких конъюгативных возможностей со способностью к мобилизации может оказаться полезным для введения плазмид в клетки молочнокислых бактерий из различных промежуточных реципиентных штаммов (например, хорошо трансформируемых бацилл). Нам обнаружено, что рАМβ1 осуществляет мобилизацию неконъюгатив-

ной плазмиды рАМ^{al} и приблизительно в 100 раз повышает частоту переноса конъюгативного транспозонта Тn916, детерминирующего устойчивость к тетрациклину [1].

В результате проведенных исследований созданы предпосылки для дальнейшей генетической и генно-инженерной работы с молочнокислыми бактериями и, в частности, для введения в них различных детерминантов устойчивости к антибиотикам.

ЛИТЕРАТУРА

1. Franke A., Clewell D. B. J. Bact., 145, 491—502, 1981.
2. Clewell D. B., Yagi Y., Dunny J. M., Schultz S. K. J. Bact., 117, 283—289, 1974.
3. Lundman O. E., Bodkin D. F., Finn C. W., Pepin R. A. Transformation—Oxford 219—228, 1981.
4. Oultram F. D., Young M. FEMS Microbiol. Lett., 27, 129—134, 1985.
5. Schaberg D., Clewell D. B., Glatzer L. Antimicrob. Agents Chemother., 22, 204—207, 1982.

Поступило 24.VI 1989 г.

Бюлог. ж. Армении, № 11, (42), 1989

УДК 576.8:663.14.664.642

АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ ШТАММОВ ХЛЕБОПЕКАРНЫХ ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

В. А. БАГИЯН, Л. А. ЕРЗНИКЯН, М. Л. СТЕПАНИН

Институт микробиологии АН АрмССР, г. Абовян

Дрожжи хлебопекарные—картофельная болезнь—микробный антагонизм.

Одной из причин порчи хлеба является картофельная болезнь, которая за 20—30 ч превращает мякиш хлеба в липкую, тянущуюся, со специфическим гнилостным запахом массу, непригодную к употреблению.

Возбудителем картофельной болезни хлеба являются бактерии группы *Bacillus subtilis*, споры которых попадают в муку при размолоте зерна. Борьба с возбудителем болезни хлеба затруднена вследствие стойкости спор указанных бактерий к различным химическим и термическим воздействиям. В то же время применять в тестоведении различные консерванты для подавления роста возбудителей порчи хлеба не рекомендуется. Поэтому целесообразно применение биологических методов воздействия на рост *B. subtilis* [1, 4].

Скородумова [3], изучая антибиотические свойства дрожжей, в том числе и *B. subtilis*, пришла к выводу, что метаболиты дрожжевых клеток угнетают рост вредных для хлебопекарного производства бактерий. Эти вещества как продукты брожения диффундируют в агар и не подвергаются дальнейшим изменениям. Правомочность такого предположения подтверждается существованием зависимости между бродительной активностью штаммов дрожжей и величиной зоны подавления