



**ДОСТИЖЕНИЯ  
ВЕТЕРИНАРНОЙ НАУКИ  
И ПРАКТИКИ  
PROGRESS VETERINARY SCIENCE  
AND PRACTICES**

УДК 579.67:378.147

DOI:10.31677/2311-0651-2019-25-3-58-63

**МЕТОДИЧЕСКИЕ ПРИЕМЫ ДЛЯ ОБУЧЕНИЯ РАБОТЕ  
С АНТАГОНИСТИЧЕСКИМИ БАКТЕРИОЦИНПРОДУЦИРУЮЩИМИ  
МИКРООРГАНИЗМАМИ**

<sup>1</sup>**А.М. Абдуллаева**, кандидат биологических наук, доцент

<sup>2</sup>**Л.П. Блинкова**, доктор биологических наук, профессор

<sup>1</sup>**Д.И. Удавлиев**, доктор ветеринарных наук, профессор

<sup>1</sup>**Ч.К. Авылов**, доктор ветеринарных наук, профессор

<sup>2</sup>**Ю.Д. Пахомов**, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник

<sup>1</sup>Московский государственный университет пищевых производств

<sup>2</sup>НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова

E-mail: labpitsred@yandex.ru

**Ключевые слова:** бактериоцины, индикаторные культуры, продуценты, микроорганизмы.

Реферат. Изложены обучающие методические приемы при работе с микробами – продуцентами бактериоцинов и с этими субстанциями. Методология таких исследований предполагает наличие не только потенциального продуцента, но и индикаторных культур гомологичного и гетерологичного таксономического положения с продуцентом, т.к. бактериоцины действуют прежде всего на близкородственные микроорганизмы. Эти индикаторные культуры могут быть использованы также для определения уровня антибактериальной активности. Количественную оценку синтезирующей активности штамма-продуцента можно выполнить по предлагаемой авторской методике. С этой целью необходимо провести измерение диаметров колонии продуцента и зоны торможения роста индикаторной культуры после выращивания изучаемого микроба на плотной среде. Активность синтезированного бактериоцина, содержащегося в культуральной жидкости после культивирования потенциального штамма-продуцента, рекомендуется изучать, выполнив разведения в жидкой среде или внося их в цилиндры или лунки, которые сделаны в плотной питательной среде. Для титрования вещества вносится аликвота индикаторной культуры в жидкую среду или она предварительно вносится на поверхность плотной диффузионной среды.

## METHODOLOGICAL TECHNIQUES FOR TEACHING THE WORK WITH ANTAGONISTIC BACTERIOCIINPRODUCING MICROORGANISMS

<sup>1</sup> A.M. Abdullayeva, <sup>2</sup> L.P. Blinkova, <sup>1</sup> D.I. Udavliyev, <sup>1</sup> Ch.K. Avylov, <sup>2</sup> Yu.D. Pakhomov

<sup>1</sup>Moscow State University of Food Production

<sup>2</sup>I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera

**Key words:** bacteriocins, indicator cultures, producers, microorganisms.

**Abstract.** *The article sets out teaching methods for working with microbes - bacteriocin producers and with these substances. The Introduction of the article provides brief information about bacteriocins, which gives an idea of what are bacteriocins, that they are synthesized on ribosomes and why they can be an alternative to antibiotics. Such bacteriocin properties as antagonistic activity, non-toxicity and a sparing effect on the body, low frequency of resistant cell formation in microorganisms, the possibility of practical use of the substance for the treatment of infection or against bacterial contamination of food as preservatives are the motivation to study the secreted microorganisms for the ability to synthesize bacteriocin.*

В связи с широким распространением антагонистических взаимоотношений между микроорганизмами при анализе микробиоты, высеваемой из обсемененных пищевых продуктов, воды, объектов окружающей среды, медицинских и ветеринарных образцов, целесообразно проводить изучение микробов на продукцию ингибиторных веществ.

К наиболее мощным антагонистическим субстанциям относятся бактериоцины (BC) [1–16]. В группу бактериоцинов входят антибактериальные субстанции, активность которых связана с полипептидами или с белками, имеющими более значительную молекулярную массу [1, 5]. Бактериоцины имеют отличия в спектре действия на чувствительные близкородственные микроорганизмы, в генетическом контроле продукции вещества, биохимических свойствах, механизме действия. Для BC-грамположительных микробов характерным является более широкий диапазон поражающего действия, чем для BC -грамотрицательных.

Полипептидные бактериоцины считают во многом сходными с антибиотиками. Так, низин, синтезируемый штаммами *Lactococcus lactis*, многие годы считали антибиотиком, но затем на основании молекулярной массы менее 3000 Da и по другим присущим бактериоцинам характеристикам вещество квалифицировали как бактериоцин. Одно из главных отличий бактериоцинов от антибиотиков состоит в том, что синтез первых осуществляется на рибосомах, а вторых – вне рибосом при участии специфических ферментов [1, 5]. Вследствие недостатков, выявленных при использовании антибиотиков (быстрое образование резистентных микробов и, следовательно, снижение лечебного действия, аллергизация и другие побочные эффекты) вновь появился интерес к выявлению бактериоцинсинтезирующих микроорганизмов и изучению этих веществ [8–10, 12]. Скрининг культур – продуцентов бактериоцинов проводят с целью получения новых антибактериальных препаратов, применяемых в разных областях. В связи с тем, что в некоторых случаях вместе с бактериоцинами могут синтезироваться токсические субстанции, имеющие общую детерминанту генетического контроля их синтеза, целесообразно проводить изучение образцов пищевых продуктов, клинического и ветеринарного материала, проб из объектов окружающей среды и выделенных из них микроорганизмов на токсичность. Это обеспечит биобезопасность людей и животных.

Следует указать, что для детекции бактериоцинпродуцирующей активности у микробов необходимо иметь индикаторные штаммы с широкой чувствительностью к бактериоцинам разных классов. Целесообразно создать набор бактериальных штаммов-индикаторов, чувствительных к синтезируемым веществам, от грамположительных и от грамотрицательных продуцентов. В первую очередь, для тестирования следует использовать культуры-индикаторы

из таксономически близкородственных бактерий (для *E. coli* нужны индикаторы *E. coli*, для *Streptococcus* spp. – стрептококковые, для *Staphylococcus* spp. – стафилококковые штаммы).

При выявлении бактериоцинопродуцирующих микроорганизмов большое значение имеют оптимально подобранные питательные среды, которые должны не только обеспечивать рост микроба-продуцента и индикаторного штамма, но и способствовать диффузии выделяемого бактериоцина в плотную или жидкую среду. К таким средам для неприхотливых бактерий относятся агаризованные отечественные среды АГВ и Гаузе, а также интернациональная среда Мюллера-Хинтона. В некоторых случаях можно использовать питательный агар, но с низким уровнем плотности (не более 1,1 % агар-агара в среде). Жидкими средами для получения антагонистических субстанций могут быть аналогичные среды, в которые для усиления продукции целевого продукта можно вносить стимулирующие вещества (аминокислоты, углеводы, витамины и т.д.).

Необходимо отметить, что должна быть правильно выбрана температура инкубации посевов продуцентов. Следует учесть, что для роста культур – потенциальных продуцентов бактериоцинов и синтеза этих веществ могут требоваться разные температуры. Например, если для роста *E. coli* оптимальный температурный режим будет 37 °С, то для синтеза вещества предпочтительнее выбрать 28 °С. Методически эти условия создают, варьируя температурные показатели. Можно выбирать более медленный рост культуры, если синтез бактериоцина идет одновременно с ростом. Если биосинтез бактериоцина, например, у стрептококка, идет в постлогарифмической фазе роста продуцента, то температуру рекомендуется снизить с 37 °С до 28 °С [3].

Значительную роль в успешном выявлении продукции бактериоцинов играет время выращивания потенциального продуцента до момента тестирования. Наиболее предпочтительный вариант – метод отсроченного антагонизма. В этом случае вначале выращивают испытуемую культуру (48–72 ч), а затем ставят тест на наличие бактериоцина с использованием индикаторного штамма. Если культивирование потенциального продуцента проводили в жидкой среде, то для испытаний на наличие антагонистического вещества используют освобожденную от бактериальных клеток и стерилизованную (например, фильтрацией, хлороформом или кипячением) культуральную жидкость (КЖ). Однако некоторые бактериоцины являются термолabile, и, следовательно, наиболее адекватным методом является стерилизующая фильтрация. Концентрацию бактериоцина в КЖ можно определить, добавляя штамм-индикатор с определенной численностью клеток ( $10^{-4}$ – $10^{-5}$  клеток/мл) в емкости с 2–10-кратными разведениями КЖ. В качестве разводящей субстанции может использоваться среда выращивания или физиологический раствор с нейтральной величиной pH (7,0–7,2), т.к. щелочные или кислые значения pH могут действовать на бактериоцин разрушающе. Титром (показателем активности) бактериоцина будет считаться последняя прозрачная пробирка разведений без роста индикаторного штамма.

При тестировании выделенных потенциальных продуцентов на агаризованной среде положительный результат на синтез ВС выглядит в виде зоны задержки роста штамма-индикатора вокруг колонии продуцента. Интенсивность продукции ВС можно оценить, рассчитав показатель ингибиции (K) по авторской формуле

$$K = \frac{d_3}{d_k},$$

где  $d_3$  – диаметр зоны ингибиции роста индикатора, мм;

$d_k$  – диаметр колонии штамма-продуцента, мм [4, 6].

Чем больше коэффициент ингибиции, тем более мощным продуцентом бактериоцина является изучаемая культура.

Использование среднего коэффициента ингибиции, вычисленного для 6–10 колоний, позволяет объективно оценить активность продукции бактериоцина тестируемого штамма вне

зависимости от диффузных характеристик среды, влияющих на размер зоны торможения роста индикатора.

Один штамм микроба может синтезировать разные классы бактериоцинов, которые выявляют на разных индикаторах или по характерному виду зоны ингибиции. В КЖ кроме выявленных бактериоцинов могут присутствовать токсические субстанции. Поэтому КЖ проверяют дополнительно на токсичность. Для этого можно использовать тест на безвредность для животных. КЖ вводят внутривбрюшинно белым мышам в дозе 0,5–1 мл. Более простым является испытание КЖ в тесте с инфузориями или различными микроракообразными. В обоих случаях вещество будет безвредным, если гибели мышей или рачков не наблюдается.

Приведем методический пример проведения анализа на продукцию бактериоцинов у микроорганизмов, выделенных из санитарных, клинических и других образцов [3, 4, 6–8].

Тестируемая на наличие ВС культура в течение 18–24 ч культивируется на оптимальных питательных средах: на скошенном в виде «косяка» питательном агаре или в жидкой питательной среде, пригодной для выращивания предполагаемого продуцента ВС. В чашки Петри (диаметром 60 мм) «уколом» высеваются испытуемые штаммы для получения через 24 или 48–72 ч макроколоний. При необходимости получения 2–3 макроколоний «укол» производят на чашки с равноудаленными друг от друга посевами. По истечении указанного срока выросшие макроколонии инактивируются залитым сверху хлороформом, который должен испариться до проведения следующего этапа испытаний. На подготовленную таким способом чашку заливают 0,3–0,5 мл 18–24-часовой бульонной культуры индикаторного штамма (концентрация клеток  $10^4$ – $10^5$ /мл), так, чтобы покрыть макроколонии. Индикаторные культуры можно также наслаивать на выросшие колонии продуцента, добавив бактерии в расплавленный и охлажденный до 48–50 °С 0,7%-й питательный агар, создавая 2–3-миллиметровый поверхностный слой. Подготовленных чашек с макроколониями может быть несколько для нанесения разных индикаторов. Посевы инкубируют не более 18–24 ч при оптимальной для роста индикаторного микроба температуре. При положительном результате измеряют зону торможения роста чувствительного к синтезируемому бактериоцину штамма-индикатора и вычисляют коэффициент ингибиции.

Экспресс-тестирование на продукцию бактериоцинов можно проводить с выросшими на адекватных средах единичными колониями после засева разведений взятых для анализа образцов. Поскольку в этом случае идентификация выделенного микроорганизма не проведена, посев образца с целью получения единичных колоний должен производиться на несколько чашек Петри, чтобы залить на них разные индикаторы. При детекции бактериоцина в КЖ делают несколько рядов однотипных разведений, чтобы залить в каждый из рядов соответствующий индикаторный штамм.

Активность бактериоцина в чистом виде или в стерильной КЖ можно оценить с использованием цилиндров или лунок на плотном агаре, в которые закапывают разведенную субстанцию. Предварительно на поверхность агара вносят штамм-индикатор. Размер зоны вокруг цилиндров или лунок указывает на активность ВС [3, 4].

Известно, что вследствие мембранопоражающего действия ВС на чувствительную бактерию получить устойчивые к этому веществу микробы в отличие от антибиотиков не всегда удается. Поэтому, а также учитывая, что бактериоцины являются нетоксичными субстанциями, следует заключить, что они имеют перед антибиотиками преимущество при их использовании в виде консервантов для хранения продуктов или для терапии инфекций (например, низин, томицид, стафилококцин и др.) [1–2]. Вследствие этого анализ на продукцию бактериоцинов выделенными культурами очень важен.

## БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Абдуллаева Н. Ф. Общее представление о механизмах гетерологичного продуцирования бактериоцинов молочнокислых бактерий (обзор) // Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук. 2016. – № 1–1. – С. 29–32.
2. Блинкова Л. П. Перспективы использования бактериоцинов для профилактики и терапии инфекций // Журн. микробиологии. – 1984. – № 5. – С. 10–14.
3. Блинкова Л. П. Получение томицида – нового бактериального препарата и изучение его биологической активности: дис. ... д-ра биол. наук. – М., 1986. – 400 с.
4. Блинкова Л. П. Бактериоцины: критерии, классификация, свойства, методы выявления // Журн. микробиологии. – 2003. – № 3. – С. 109–113.
5. Молекулярные основы продукции и действия бактериоцинов / Л. П. Блинкова, М. Л. Альтшулер, Е. С. Дорофеева, О. Б. Горобец // Журн. микробиологии. – 2007. – № 2. – С. 97–104.
6. Биотехнологические условия синтеза бактериоцинов / Л. П. Блинкова, О. Б. Горобец, Е. С. Дорофеева, [и др.] // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 2006. – № 2. – С. 83–89.
7. Выявление бактериоциногенности среди возбудителей оппортунистических инфекций / Л. П. Блинкова, Е. С. Дорофеева, А. П. Батуро [и др.] // Вестн. РАМН. – 2008. – № 4. – С. 14–18.
8. The bacteriocin AS-48 requires dimer dissociation followed by hydrophobic interactions with the membrane for antibacterial activity / R. Cebrián, M. Martínez-Buepo, E. Valdivia [et al.] // J. Struct. Biol. – 2015. – Vol. 190. – P. 162–172. – DOI:10.1016/j.jsb.2015.03.006
9. Cotter P. D., Ross R. P., Hill C. Bacteriocins – a viable alternative to antibiotics? // Nat. Rev. Microbiol. – 2013. – Vol. 11. – P. 95–105. – DOI:10.1038/nrmicro2937.
10. Bacteriocin production: a probiotic trait? / A. Dobson, P. D. Cotter, R. P. Ross, C. Hill // Appl. Environ. Microbiol. – 2012. – Vol. 78. – P. 1–6. – DOI:10.1128/AEM.05576–11.
11. FAO/WHO. Report on joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. – 2001.
12. Bacteriocin production augments niche competition by enterococci in the mammalian gastrointestinal tract / S. Kommineni, D. J. Bretl, V. Lam. [et al.] // Nature. – 2015. – Vol. 526. – P. 719–722. – DOI:10.1038/nature15524.
13. Luc De Vuyst, Frédéric Leroy. Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Production, Purification and Food Applications // J. Mol. Microbiol. Biotechnol. – 2007. – Vol. 13. – P. 194–199.
14. Paul D., Cotter R., Paul Ross, Colin Hill. Bacteriocins – a viable alternative to antibiotics? // Nat. Rev. Micro. – 2012. – Vol. 11. – P. 95–105.
15. Membrane permeabilization, orientation, and antimicrobial mechanism of subtilisin A / Sathiah Thennarasu, Dong-Kuk Lee, Alan Poon [et al.] // Chemistry and Physics of Lipids. – 2005. – Vol. 137. – P. 38–51.
16. Antibacterial activity and genotypic–phenotypic characteristics of bacteriocin-producing *Bacillus subtilis* KCU213: Potential as a probiotic strain / Nalisa Khochamit, Surasak Siripornadulsil, Peerapol Sukon, Wilailak Siripornadulsil // Microbiological Research. – 2015. – Vol. 170. – P. 36–50.

## REFERENCES

1. Abdullaeva N. F. Obshchee predstavlenie o mekhanizmah geterologichnogo producirovaniya bakteriocinov molochnokislykh bakterij (obzor) // Aktual'nye problemy gumanitarnykh i estestvennykh nauk. 2016. – № 1–1. S. 29–32.
2. Blinkova L. P. Perspektivy ispol'zovaniya bakteriocinov dlya profilaktiki i terapii infekcij // Zhurn. mikrobiologii, 1984. – N 5. – S. 10–14.
3. Blinkova L. P. Poluchenie tomicida – novogo bakterijnogo preparata i izuchenie ego biologicheskoy aktivnosti: dis... d-ra. biol. nauk. – M., 1986. – 400 s.
4. Blinkova L. P. Bakteriocyiny: kriterii, klassifikaciya, svoystva, metody vyyavleniya. Zhurn // mikrobiologii. – 2003. – N 3. S. 109–113.
5. Blinkova L. P., Al'tshuler M. L., Dorofeeva E. S., Gorobec O. B. Molekulyarnye osnovy produkcii i dejstviya bakteriocinov. Zhurn. mikrobiologii. – 2007. – N 2. – S. 97–104.

6. Biotekhnologicheskie usloviya sinteza bakteriocinov. L. P Blinkova., O.B Gorobec., E.S Dorofeeva., [i dr.] // ZHurn. mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii. – 2006. – N 2. – S. 83–89.
7. Vyyavlenie bakteriocinogennosti sredi vozбудitelej opportunisticheskikh infekcij. L.P Blinkova., E.S. Dorofeeva., A.P Baturo. [i dr.] // Vest. R.A.M.N., 2008 – N 4, S. 14–18.
8. Albert A, The bacteriocin AS-48 requires dimer dissociation followed by hydrophobic interactions with the membrane for antibacterial activity R. Cebrián, M. Martínez-Buepo, E. Valdivia. [et al] // J Struct Biol. – 2015. – vol. 190 – p 162–172. – DOI:10.1016/j.jsb.2015.03.006
9. Cotter P. D., Ross R. P., Hill C. Bacteriocins – a viable alternative to antibiotics? // Nat. Rev. Microbiol. – 2013. Vol. 11- p.95–105. – DOI:10.1038/nrmicro2937.
10. Bacteriocin production: a probiotic trait? //A. Dobson., P.D. Cotter., R.P. Ross., C. Hill. Appl. Environ. – Microbiol, 2012. Vol. 78. – p.1–6. doi:10.1128/AEM.05576–11.
11. FAO/WHO. Report on joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. – 2001.
12. Bacteriocin production augments niche competition by enterococci in the mam-malian gastrointestinal tract, S. Kommineni., D.J. Bretl DJ., V. Lam. [et al.] // Nature, 2015. – vol. 526. – p. 719–722. – DOI:10.1038/nature15524.
13. Luc De Vuyst, Frédéric Leroy. // J. Mol. Microbiol. Biotechnol. – 2007. – vol 13 – p. 194–199.
14. D. Paul D., R. Cotter., Paul Ross., Colin Hill. Bacteriocins – a viable alternative to antibiotics? // Nat. Rev. Micro. – 2012. – vol. 11. – p. 95–105.
15. Membrane permeabilization, orientation, and antimicrobial mechanism of subtilisin A. Sathiah Thennarasu, Dong-Kuk Lee, Alan Poon, [et al.] // Chemistry and Physics of Lipids. – 2005. – vol. 137. 38–51.
16. Antibacterial activity and genotypic–phenotypic characteristics of bacteriocin-producing *Bacillus subtilis* KKU213: Potential as a probiotic strain. Nalisa Khochamit, Surasak Siripornadulsil, Peerapol Sukon, Wilailak Siripornadulsil. // Microbiological Research. – 2015. – vol. 170. – p. 36–50.