

МИКРОБИОЛОГИЯ

УДК 577.12.9+579.842.24.013

**ЗАВИСИМОСТЬ РОСТОВЫХ ХАРАКТЕРИСТИК
ПРИРОДНЫХ ШТАММОВ *LACTOCOCCUS LACTIS* SUBSP. *LACTIS*
ОТ СОСТАВА АГАРИЗОВАННЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД,
ИСПОЛЪЗУЕМЫХ ДЛЯ НАРАЩИВАНИЯ БИОМАССЫ****М.А. Тренина¹, А.С. Епремян², Л.Г. Стоянова***(кафедра микробиологии; e-mail: stoyanovamsu@mail.ru)*

Представлены результаты зависимости ростовых характеристик штаммов 729 и ТВ2 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, выделенных из молока и самоквасного творога, от содержания в агаризованной среде пептона из казеина (ПК) в качестве основного источника азота. Сравнивали количество колониеобразующих единиц (КОЕ), темп деления клеток (ТДК) и среднее почасовое время удвоения (СЧВУ) на двух временных отрезках культивирования: от 1 до 2,5 и от 2,5 до 3,5 ч. Жидкие питательные среды поддерживали логарифмический рост штамма 729 во всех вариантах культивирования до 3,5 ч при максимальном снижении pH до 6,5. Максимальный уровень накопления биомассы ($2,5 \times 10^8$ кл/мл) наблюдали при культивировании в средах, содержащих мясной экстракт, а наименьшее СЧВУ (37,5 мин) — при переносе биомассы с минимальной среды МА4 в обогащенную жидкую среду М7. Штамм 729 в отличие от штамма ТВ2 не способен образовывать колонии при содержании ПК в агаризованной среде ниже 0,4%. Снижение количества ПК от 1,0% до 0,4% обуславливает увеличение размера колоний штамма ТВ2 от 2,85 мм² до 5 мм². Стимулирующее действие дрожжевого экстракта в жидких средах при данных концентрационных соотношениях позволяет увеличить эффективность деления клеток при сниженном уровне накопления молочной кислоты до достижения pH 5,5, блокирующего транспорт олигопептидов в клетку. Мясной экстракт способствует адаптации бактерий к условиям повышенной кислотности и оказывает положительное действие на деление клеток штамма 729 на поздней стадии развития бактериальных популяций. Небольшой размер колоний может являться признаком штамма как активного кислотообразователя.

Ключевые слова: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, питательные среды, ростовые характеристики.

Основным свойством молочнокислых бактерий является способность образовывать в качестве главного продукта брожения молочную кислоту. По характеру продуктов сбраживания углеводов молочнокислые бактерии подразделяются на гомоферментативные и гетероферментативные. При гомоферментативном молочнокислом брожении до 98% углеводов превращается в молочную кислоту. Динамика развития популяций *L. lactis* subsp. *lactis* и их генетическая стабильность сильно зависят от эффективности накопления молочной кислоты в питательной среде [1–4]. У лактококков наблюдали различие фенотипа изолятов медленно (slow) и быстро (fast) коагулирующих молоко [5]. Разницу фенотипов объясняли возникновением мутаций, нарушающих либо процесс усвоения пептидов β-казеина, либо процесс ферментации лактозы. “Быстрые” изоляты отличались по активности кислотообразования, “медленные” изо-

ляты в большей степени нуждались в стимулирующем действии дрожжевого экстракта. Проведенное нами ранее сравнительное исследование по фенотипу колоний и зависимости его от наличия в среде дрожжевого экстракта двух штаммов *L. lactis* subsp. *lactis* ТВ2 и 837 [6], являющихся активными кислотообразователями, позволило количественно оценить размер колоний на агаризованных средах, содержащих высокую концентрацию пептона из казеина (1%). Средняя площадь колоний штамма 837 была на 34% меньше по сравнению с колониями штамма ТВ2 в присутствии дрожжевого экстракта и на 74% меньше без него, что свидетельствовало о большей зависимости бактерий штамма 837 от стимулирующего действия дрожжевого экстракта на фоне избытка пептона из казеина.

Экологической нишей бактерий вида *L. lactis* subsp. *lactis* являются растения, а свойство колони-

¹Лаборатория иммунологии ФГБУ НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского.

²Научно-производственный центр “Армбиотехнология” НАН РА государственная некоммерческая организация (НПЦ “Армбиотехнология” НАН РА, ГНКО).

зировать молоко, возможно, приобретено лактококками в результате макроэволюционного отбора. Штаммовая специфичность лактококков, используемых при переработке молока, в большей степени определяется технологическим процессом культивирования, а не географическим положением ферм [7]. Предполагается, что плазмидная ДНК, содержащая гены, необходимые для утилизации казеина молока и лактозы, получена лактококками от других бактерий, поскольку ее Г + Ц состав (30—40%) несколько отличается от Г + Ц состава хромосомной ДНК лактококков (36—38%) [8]. Направленное выделение лактококков с поверхности растений и их последующая идентификация показали, что “дикий” тип лактококков представлен фенотипом *L. lactis* subsp. *lactis*, тогда как фенотипы подвидов *L. lactis* subsp. *cremoris* и *L. lactis* subsp. *lactis* bv. *diacetilactis* характерны для штаммов, полученных из молочных продуктов [9].

Цель настоящей работы — определение питательных потребностей и временных диапазонов в развитии популяций лактококков, в которых не происходит нежелательное накопление молочной кислоты в продуктах.

Объекты и методы исследования

В работе использовали два природных штамма *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Штамм 729 — активный кислотообразователь, выделен из коровьего молока [10], генотипирован по гену 16S рПНК (GenBank EF-100778) [11]. Штамм ТВ2 получен из самоквашеного творога и предложен для разработки закваски с целью получения творога [6], его геном охарактеризован с помощью метода пульс-электрофореза [2]. Состав питательных сред, в которых пептон из казеина является основным источником азота, представлен в таблице. Питательные компоненты — пептон из казеина (ПК), дрожжевой и мясной экстракты — являются продукцией компании “HiMedia” (Индия). Приготовление сред проводили в два этапа. Сначала

Компонентный состав питательных сред
для культивирования бактерий *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*

Компоненты, %	Название питательных сред							
	МА3	МА4	МА5	МА7	МА6	М4	М7	М6
Пептон из казеина	0,3	0,4	0,4	0,8	0,4	0,4	0,8	0,4
Дрожжевой экстракт	—	—	0,2	0,4	0,4	—	0,4	0,4
Мясной экстракт	—	—	—	—	0,4	—	—	0,4
Лактоза	0,3	0,4	0,4	0,5	0,5	0,4	0,5	0,5
Агар	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	—	—	—
Na ₂ HPO ₄	0,85	0,85	0,85	0,85	0,85	—	—	—
KN ₂ PO ₄	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	—	—	—
Вода	Остальное							

ла готовили голодный солевой агар и концентрированные растворы питательных компонентов. Затем композиционные составы питательных концентратов разводили расплавленным голодным агаром, содержащим фосфатный буфер, в чашках Петри. Выращивание биомассы на агаризованной питательной среде и “отмывку” бактерий в физиологическом растворе перед переносом их в жидкие среды проводили так же, как описано ранее в работах [2, 13, 14]. Рассев разведенных бактериальных суспензий производили шпателем на 1/4 поверхности агаризованной среды в чашке Петри (диаметр 10 см). Бактериальные суспензии для подсчета КОЕ высевали на среду МА5. В жидких средах бактерии культивировали в 5 мл без аэрации при температуре 30°C. Измерение значений pH среды проводили при помощи pH-метра (pH-meter Mettler Toledo MP220). Экспериментальные данные получены на основании четырех независимых измерений и статистически обработаны.

Результаты и обсуждение

В настоящей работе мы исходили из наблюдения, что эффективность деления *L. lactis* subsp. *lactis* на поверхности агаризованных сред, обуславливающая скорость накопления биомассы в колониях, является штаммоспецифичным свойством. Длительность и скорость деления лактококков в жидких средах во многом обусловлены энергетическим запасом, полученным и сохраненным клетками на агаризованной поверхности. В связи с этим подбор питательных компонентов проводили в соответствии как с морфологическими и культуральными особенностями штаммов, так и с учетом перехода бактериальных популяций с агаризованной среды в жидкую.

Определение минимального количества пептона из казеина и лактозы, необходимых для образования колоний штаммами *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 729 и ТВ2. Сравнительная оценка колониеобразующей способности бактерий *L. lactis* subsp. *lactis*: 729 и ТВ2 на агаризованных средах МА3 и МА4 представлена в таблице.

В качестве минимальной среды для штамма 729 использовали среду МА4 с повышенным на 0,1% содержанием пептона и лактозы, так как на среде МА3 его колонии плохо различимы. Видимая разница в размерах колоний между штаммами 729 и ТВ2 после 24 ч (рис. 1, А, Б) культивирования больше, чем через 96 ч (рис. 1, В, Г). Следовательно, преимущество в скорости роста у штамма ТВ2 сильнее выражено на ранних этапах развития бактериальных популяций. Размер колоний штамма 729 (диаметр ~0,5 мм, площадь ~0,2 мм²) после 24 ч культивирования на среде МА4 (рис. 1, А) совпадает с размером колоний “медленных” изолятов лактококков (0,5 мм), которые культивировали при 21°C в течение 2—3 сут на среде GMA с глицерофосфатом [5]. Диаметр колоний “быстрых” изолятов на молочной среде с глицерофосфатом составлял 1—2,5 мм, что в условиях

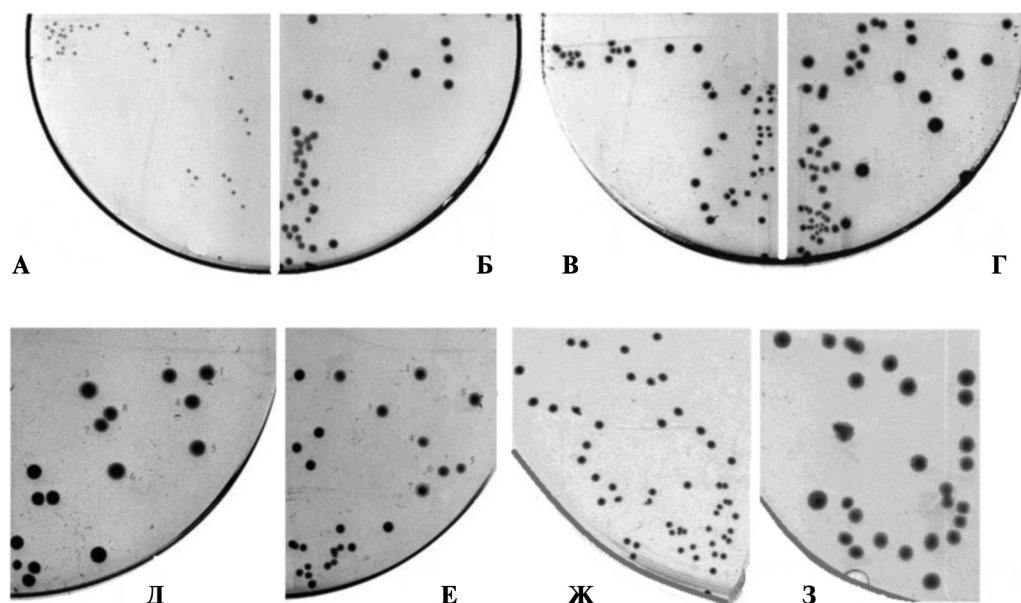


Рис. 1. Внешний вид колоний *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* штаммов 729 и TB2 на агаризованных минимальных по пептону из казеина средах: МА3 (пептон из казеина 0,3%), МА4 и МА5 (пептон из казеина 0,4%):

А и Б — среда МА4, штаммы: 729 (слева; диаметр колоний ~0,5 мм), TB2 (справа; диаметр колоний ~1,5 мм), время культивирования при 30°C 24 ч; В и Г — среда МА4, штаммы: 729 (слева; диаметр колоний ~1,5 мм); TB2 (справа; диаметр колоний ~2,5 мм), время культивирования при 30°C 96 ч; Д и Е — штамм TB2, среды МА5 (слева; диаметр колоний ~ от 2 до 2,5 мм), МА3 (справа; диаметр колоний ~1,5 мм), время культивирования при 30°C 48 ч; Ж и З — среда МА5, штаммы 729 (слева; диаметр колоний ~1 мм); TB2 (справа; диаметр колоний ~2,5 мм), время культивирования при 30°C 24 ч, при комнатной температуре около 48 ч

наших опытов было сходно с диаметрами колоний штамма TB2 на средах МА3, МА4 и МА5 (1,5—2,5 мм). На средах с пониженным (до 0,4%) содержанием ПК (МА4 и МА5) наблюдалось увеличение размера колоний штамма TB2 до 3—5 мм² относительно сред, содержащих 1% (М02 и М03), 2,85—2,9 мм² [6], что может свидетельствовать об ингибирующем действии избытка азота на рост колоний. В то же время на среде МА3 (ПК 0,3%) площадь колоний этого штамма меньше (1,8 мм²), чем на средах М02 и М03.

Количественную оценку увеличения размера колоний штамма TB2 при обогащении состава среды проводили на среде МА5, т.е. при добавлении дрожжевого экстракта (0,2%) к минимальной среде МА4 (0,4% ПК) и на среде МА3, содержащей по 0,3% ПК и лактозы (таблица). Среднее значение площади колоний на среде МА3 составляло 1953 пикселя при стандартном отклонении 292, а на среде МА5 — 3752 пикселя при стандартном отклонении 518 (рис. 1, Д, Е), т.е. средний размер колоний увеличился в 1,9 раза. Таким образом, ограничение в размере колоний штамма TB2 на минимальной среде МА3 определяется исчерпанием питательного ресурса.

Внешний вид колоний штамма 729 на поверхности среды МА5 (рис. 1, В, Ж) свидетельствует о том, что обогащение среды МА4 дрожжевым экстрактом не приводит к увеличению размера колоний. Можно предположить, что основным источником азота для роста является пептон из казеина.

Среднее почасовое время удвоения *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 729 в жидких питательных средах МА4, М7 и М6 на двух последовательных временных отрезках общей длительностью 3,5 ч. С целью подбора состава агаризованной питательной среды, обеспечивающей наиболее эффективное деление клеток в незабуференных жидких средах, были использованы следующие пары сред с идентичным питательным составом: МА4/М4; МА7/М7; МА6/М6 и композиционная пара МА4/М7 (таблица). Результаты определения ТДК и СЧВУ, значения pH и КОЕ представлены на рис. 2, А—Г, соответственно. Величину СЧВУ на первом временном отрезке общей длительностью 90 мин определяли путем пересчета значений ТДК на длительность

временного отрезка в 60 мин. Так, при увеличении количества КОЕ в паре сред МА4/М4 приблизительно в 1,9 раза (рис. 2, А) на первом временном отрезке СЧВУ составляло 92 мин (рис. 2, Б). В парах сред МА4/М4 и МА4/М7, где исходную биомассу наращивали на минимальной среде МА4, СЧВУ составляло 92 и 80 мин, а в обогащенных парах сред МА7/М7 и МА6/М6 — 60 и 66,7 мин соответственно. Поскольку в парах сред только агаризованные среды МА4 и МА7 отличались по концентрации питательных компонентов, можно предположить, что увеличение скорости роста в жидкой среде М7 на 20 мин является следствием влияния обогащения агаризованной среды МА7 дрожжевым экстрактом либо результатом более длительного периода адаптации бактерий после их переноса в жидкую среду другого состава. Однако сам факт существенного изменения СЧВУ бактерий в жидкой среде в зависимости от состава агаризованной среды, на поверхности которой наращивали биомассу, позволяет в перспективе моделировать физиологическую активность биомассы лактококков перед переносом их в среду иного химического состава. СЧВУ на втором временном отрезке (от 2,5 до 3,5 ч) культивирования в парах сред: МА4/М4; МА4/М7; МА7/М7 и МА6/М6 составляло 46,2, 37,5, 40 и 42,9 мин соответственно. Близкие значения СЧВУ для всех четырех пар сред на втором временном отрезке культивирования (от 2,5 до 3,5 ч) характеризуют рост бактерий штамма 729 как логарифмический.

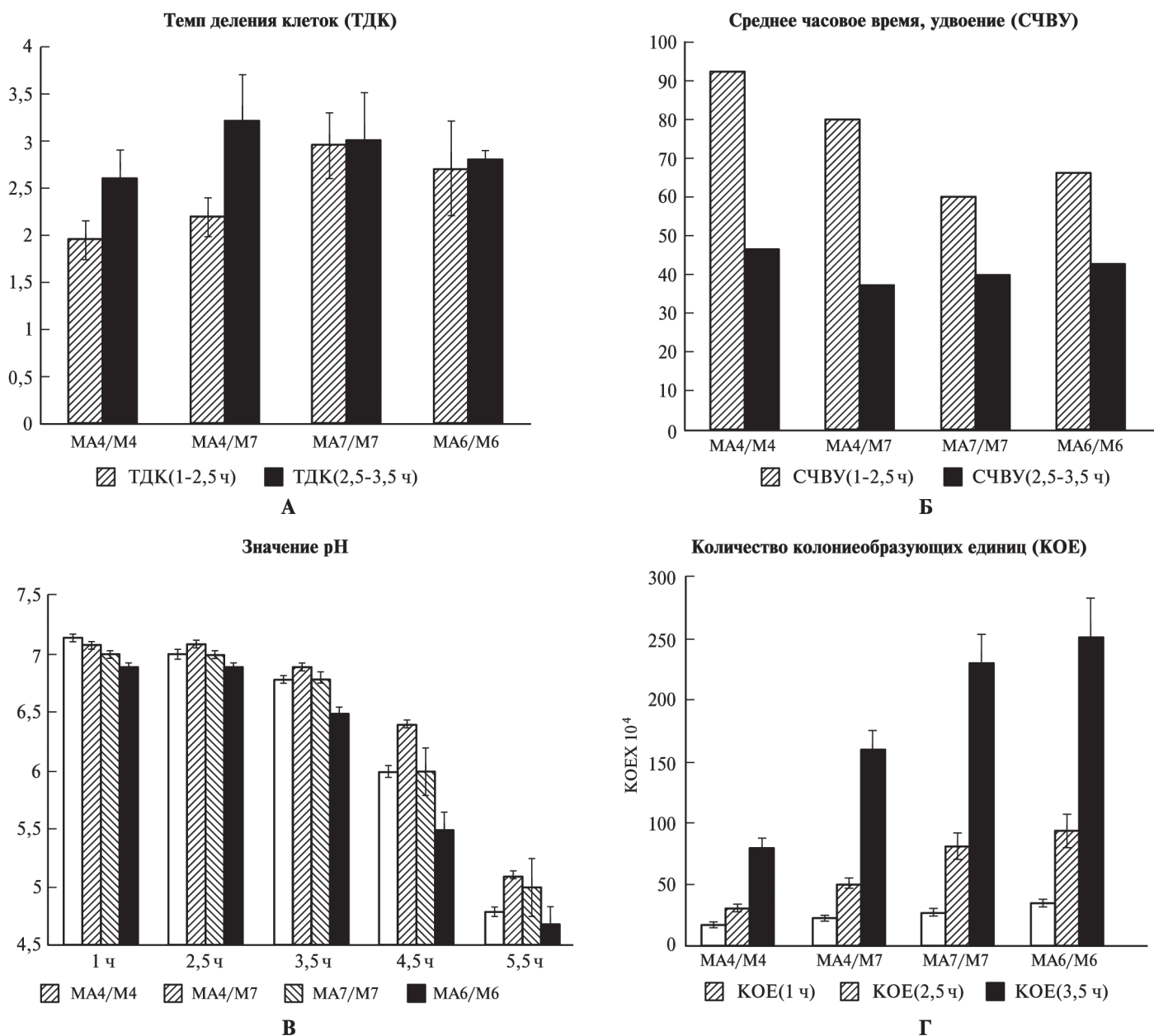


Рис. 2. Ростové характеристики бактерий *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 729 на двух временных интервалах культивирования: от 1 до 2,5 и от 2,5 до 3,5 ч в жидких средах: M4, M7 и M6 после переноса биомассы с агаризованных сред: MA4, MA7 и MA6, а также в композиционной паре сред MA4/M7.

А — темп деления клеток (ТДК); **Б** — среднее часовое время удвоения (СЧВУ), **В** — значения pH в жидких питательных средах M4, M7 и M6, полученные за 1; 2,5; 3,5; 4,5 и 5,5 ч культивирования после переноса биомассы с соответствующих агаризованных сред: MA4, MA7 и MA6, а также в композиционной паре сред MA4/M7; **Г** — количество колониеобразующих единиц (КОЕ) в жидких питательных средах M4, M7 и M6 на 1; 2,5 и 3,5 ч культивирования после переноса биомассы с соответствующих агаризованных сред: MA4, MA7 и MA6, а также в композиционной паре сред MA4/M7.

Сравнительная характеристика уровня закисления жидких сред M4, M7 и M6 в процессе роста *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 729 при наращивании биомассы на агаризованных средах. Характеристики деления клеток, ТДК и СЧВУ (рис. 2, А, Б) свидетельствовали об эффективном клеточном делении на данном временном отрезке, при этом изменений pH жидких сред во всех парах сред MA4/M4, MA4/M7, MA7/M7 и MA6/M6 между 1 и 2,5 ч культивирования практически не наблюдалось, что соответствует результатам, опубликованным нами ранее [12]. Определен вре-

менной диапазон культивирования бактерий (от 2,5 до 3,5 ч), в котором различные по уровню обогащения среды поддерживали логарифмический рост при незначительном уровне закисления жидких сред. Максимальное (до 6,5 после 3,5 ч) закисление жидкой среды наблюдалось при культивировании в паре сред MA6/M6, содержащих мясной экстракт, что, однако, не выходит за пределы значений, принятых за оптимальные для лактококков [13—15]. Максимальная разница в значениях pH между парой сред MA4/M7 и другими парами зафиксирована после

4,5 ч культивирования: МА4/М7 — 6,4; МА4/М4 — 6,0; МА7/М7 — 6,0; МА6/М6 — 5,5. С учетом эффективного клеточного деления на временном отрезке до 4,5 ч значение рН среды в композиционной паре МА4/М7 было еще близко к оптимальному (до 6,5), тогда как в паре сред МА6/М6 за это же время рН снизился до критического значения 5,5, блокирующего олигопептидный транспорт [16, 17]. При развитии молочнокислых бактерий *L. lactis* и *Streptococcus thermophilus* в молоке наблюдаются две фазы логарифмического роста [17, 18]. Ранее [12] при независимом рассмотрении изменения ТДК отдельных популяций штамма 729 в жидких средах М4 и М7, исходная биомасса которых была получена на минимальной агаризованной среде МА4, мы выделили два периода интенсификации деления клеток. Поскольку основным источником азота в используемых нами средах и в молоке является ПК, мы предполагаем, что временной диапазон культивирования, предшествующий уменьшению ТДК, обусловлен питанием лактококков за счет олигопептидов необходимого состава и размера [16–18], т.е. до активизации у них протеолитической активности.

Уровень накопления биомассы *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 729 в жидких питательных средах М4, М7 и М6 за первые 3,5 ч культивирования бактерий. Исходные титры бактериальных суспензий в парах сред: МА4/М4 и МА4/М7 составляли $7,3 \times 10^6$ кл/мл; МА7/М7 — $1,3 \times 10^7$ и МА6/М6 — $1,9 \times 10^7$ кл/мл (рис. 2, Г). Максимальный уровень накопления биомассы за 3,5 ч был достигнут в паре сред МА6/М6 ($2,5 \times 10^8$ кл/мл), содержащей мясной экстракт. Даже с учетом повышенного исходного титра бактерий результаты по сравнительному увеличению КОЕ свидетельствуют о положительном влиянии мясного экстракта на уровень накопления биомассы, что позволяет считать состав питательных веществ в жидкой среде М6 комплексным. Минимальный уровень накопления биомассы (8×10^7 кл/мл) зафиксирован в “минимальной” паре сред МА4/М4, ограничительным фактором является лимитация по питательному ресурсу. В обогащенных жидких средах деление ограничено накоплением молочной кислоты до рН ниже 5,5 [2, 15], что блокирует транспорт олигопептидов в клетки [16]. Низкий уровень накопления био-

массы *L. lactis* subsp. *lactis* TB2 до $2,5 \times 10^8$ кл/мл в среде МВ (ПК 0,6%, дрожжевой экстракт 0,175%) соответствовал оптической плотности 0,3 (длина волны 600 нм) при культивировании в течение 3 ч и при снижении рН до 5,4 [2]. Аналогичные результаты получены при выращивании *L. lactis* в комплексной среде М17 [1], содержащей 1% глюкозы. Авторы объясняют раннюю остановку логарифмического роста *L. lactis* при достижении оптической плотности 0,3 повышением стрессоустойчивости лактококков.

Выводы

Использование агаризованных сред, различных по уровню обогащения минимального состава среды МА4, позволило определить временной диапазон логарифмического роста *L. lactis* subsp. *lactis* 729 (2,5–3,5 ч) в идентичных и композиционных составах жидких сред при незначительном снижении рН до 6,5. Сравнительно небольшой размер колонии может являться признаком штамма, обладающего свойством активного кислотообразователя.

Показана эффективная колониеобразующая активность штамма TB2 для характеристики развития его колоний в условиях минимального количества пептона из казеина (0,4%). Установлено, что площадь колоний штамма TB2 на минимальной среде МА4, достигающая 5 мм², больше чем на богатой среде М03 [6].

Сравнительная характеристика развития бактериальных популяций на агаризованных и в жидких средах может быть использована при моделировании популяционных свойств *L. lactis* subsp. *lactis* различного происхождения.

Штаммоспецифичные характеристики роста лактококков представляют интерес для определения таких отклонений от условий культивирования, которые воспринимаются данным штаммом как стрессовые. Самыми распространенными из них являются: недостаток питательного ресурса, высокий уровень кислотности, повышенный или пониженный температурный фон и др. Изменение физиологии лактококков в процессе развития популяций в молоке при активизации протеолитической активности на второй фазе логарифмического роста является примером запрограммированного преодоления условий голода по источнику азота.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Duwat P., Cesselin B., Sourice S., Gruss A. *Lactococcus lactis*, a bacterial model for stress responses and survival // Int. J. Food Microbiol. 2000. Vol. 55. N 1–3. P. 83–86.
2. Тренина М.А., Лысенко А.М., Ахвердян В.З., Мчедlishvili Е.Б. Изучение внутривидовой вариативности бактерий *Lactococcus lactis* по признаку адаптации к высокой кислотности среды // Микробиология. 2006. Т. 75. № 1. С. 1–9.
3. Стоянова Л.Г., Сульимова Т.Д., Непрусов А.И. Влияние фосфата и углеводов на синтез низина *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* штамм 194 // Вестн. Моск. ун-та. Сер. Биология. 2003. № 4. С. 17–22.
4. Стоянова Л.Г., Левина Н.А. Регуляция синтеза бактерицина рекомбинантного штамма *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* F-116 компонентным составом среды // Микробиология. 2006. Т. 75. № 3. С. 342–348.
5. Huggins A.R., Sandine W.E. Differentiation of fast and slow milk-coagulating isolates in strains of lactic streptococci // J. Dairy Sci. 1984. Vol. 67. N 8. P. 1674–1679.
6. Суходолец В.В., Лысенко А.М., Тренина М.А. Штамм бактерий *Lactococcus lactis* для получения творога из молока. 2003. RU 2244002.

7. Corroler D., Mangin I., Desmasures N., Gueguen M. An ecological study of lactococci isolated from raw milk in the Camembert cheese registered designation of origin area // Appl. Environ. Microbiol. 1998. Vol. 64. N 12. P. 4729—4735.
8. Mills S., McAuliffe O.E., Coffey A., Fitzgerald G.F., Ross R.P. Plasmids of lactococci — genetic accessories or genetic necessities? // FEMS Microbiol. Rev. 2006. Vol. 30. P. 243—273.
9. Kelly W., Ward L. Genotypic vs. phenotypic biodiversity in *Lactococcus lactis* // Microbiology. 2002. Vol. 148. N 11. P. 3332—3333.
10. Стоянова Л.Г., Егоров Н.С. Получение низинпродуцирующих бактерий методом слияния протопластов двух родственных штаммов *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, низкоактивных по синтезу низина // Микробиология. 1998. Т. 67. № 1. С. 47—54.
11. Stoyanova L.G., Sul'timova T.L., Netrusov A.I. Establishment of toxonomic status of new perspective bacteriocin-syntesizing *Lactococcus* strains of various origins // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2008. Vol. 63. N 4. P. 156—162.
12. Тренина М.А., Ганина В.И., Стоянова Л.Г., Рыбаков Ю.А., Складнев Д.А. Особенности развития молочнокислых бактерий *Lactococcus lactis* subs. *lactis* штамма 729 // Переработка сельхозсырья. 2008. № 8. С. 55—57.
13. Тренина М.А., Складнев Д.А., Бронников С.В., Устюгова Е.А., Стоянова Л.Г. Развитие популяций бактерий *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* на агаризованных питательных средах, моделирующих естественный субстрат // Экология и промышленность России. 2009. № 5. С. 42—46.
14. Hutkins R.W., Nannen N.L. pH homeostasis in lactic acid bacteria // J. Dairy Sci. 1993. Vol. 76. N 8. P. 2354—2365.
15. Frees D., Vogensen F.K., Ingmer H. Identification of proteins induced at low pH in *Lactococcus lactis* // Int. J. Food Microbiol. 2003. Vol. 87. N 3. P. 293—300.
16. Foucaud C., Juillard V. Accumulation of casein-derived peptides during growth of proteinase-positive strains of *Lactococcus lactis* in milk: their contribution to subsequent bacterial growth is impaired by their internal transport // J. Dairy Research. 2000. Vol. 67. N 2. P. 233—240.
17. Juillard V., Le Bars D., Kunji E.R.S., Konings W.N., Gripon J.-C., Richard J. Oligopeptides are the main source of nitrogen for *Lactococcus lactis* during growth in milk // Appl. Environ. Microbiol. 1995. Vol. 61. N 8. P. 3024—3030.
18. Letort C., Nardi M., Garault P., Monnet V., Juillard V. Casein utilization by *Streptococcus thermophilus* results in a diauxic growth in milk // Appl. Environ. Microbiol. 2002. Vol. 68. N 6. P. 3162—3165.

Поступила в редакцию
22.12.13

DEPENDENCE OF GROWTH CHARACTERISTICS OF NATURAL STRAINS OF *LACTOCOCCUS LACTIS* SUBSP. *LACTIS* ON THE COMPOSITION OF THE NUTRIENT AGAR MEDIA USED FOR BIOMASS GROWTH

M.A. Trenina., H.S. Epremyan, L.G. Stoyanova

The results of dependence of growth characteristics of strains *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 729 and TV2 isolated from milk and homemade curd the content in the agar medium peptone from casein as a main nitrogen source. Different composition on the level of enrichment of the agar medium was used for biomass growth strains in the study of growth characteristics in liquid media with the same composition. Compared the number of colony forming units (CFU), the rate of cell division (TDC) and the average hourly doubling time (AHDT) at two time points of cultivation: from 1,0 to 2,5 and from 2,5 to 3,5 hours. Liquid culture medium was maintained logarithmic growth of strain 729 in all variations on a time interval of cultivation to 3,5 hours with a maximum decrease in pH to 6,5.

Maximum accumulation level of biomass ($2,5 \times 10^8$ cells/ml) was observed when cultured in a pair of media containing meat extract, and the smallest AHDT (37,5 min) when moving biomass MA4 minimal medium (peptone from casein, and 0,4% lactose 0,4%) and rich in containing yeast extract liquid medium M7. Strain 729 in contrast to a strain incapable TB2 form colonies when the content of casein peptone agar medium is less than 0,4%. Reducing the amount of nitrogen source (peptone from casein from 1,0% to 0,4%) resulted in an increase in colony size strain TV2 from 2,85 mm² to 5 mm². The stimulatory effect of yeast extract in liquid media under these concentration ratios allowing cell division to increase the effectiveness while reducing the accumulation of lactic acid to achieve critical acidification (pH 5,5) blocks the transport of oligopeptides into a cell. Meat extract contributed bacteria adapt to the conditions of acidity and has a positive effect on cell division of strain 729 at a late stage of development of bacterial populations. Comparative small size of the colonies (area ~0,5 mm², diameter ~0,8 mm) can be a sign of strain as active acidifier.

Key words: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, culture media, growth characteristics.

Сведения об авторах

Тренина Марина Анатольевна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории иммунологии ФГБУ НИИ вирусологии им. Д.И. Иванова. E-mail: trenina58@gmail.com

Епремян Асмик Суменовна — канд. хим. наук., ст. науч. сотр. Научно-производственного центра “Арм-биотехнология” НАН РА государственная некоммерческая организация (НПЦ “Армбиотехнология” НАН РА, ГНКО). E-mail: stoyanovamsu@mail.ru

Стоянова Лидия Григорьевна — докт. биол. наук, вед. науч. сотр. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-45-45; e-mail: stoyanovamsu@mail.ru