

С. А. Жакслыкова, Р. Э. Хабибуллин, Г. Ю. Яковлева,
О. А. Решетник

АНТАГОНИСТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ БАКТЕРИАЛЬНЫХ МОЛОЧНОКИСЛЫХ ЗАКВАСОК

Ключевые слова: антагонистическая активность, молочнокислые бактериальные закваски, патогенные и условно-патогенные микроорганизмы, индекс ингибирования.

Показатель антагонистической активности молочнокислых бактериальных заквасок был оценен двумя методами in vitro: диффузионным, в частности методом блоков, и методом, основанным на принципе тестирования в жидких питательных средах. Результаты исследования показали, что все анализируемые бактериальные препараты обладали антагонистической активностью в отношении условно-патогенных и патогенных микроорганизмов. Препараты, содержащие в своем составе бактерии рода Lactobacillus, имели больший индекс ингибирования.

Key words: antagonistic activity, lactic acid bacterial cultures, pathogenic and conditionally pathogenic microorganisms, index of inhibition.

Antagonistic activity of lactic acid bacterial cultures was researched by two methods in vitro: diffusion, in particular by the method of blocks, and the method based on the principle of testing in liquid nutrient mediums. The results of the study showed that all the analyzed bacterial preparations had antagonistic activity to conditionally pathogenic and pathogenic microorganisms. Lactic acid bacterial cultures that contain bacteria of the Lactobacillus had more in-code of inhibition.

Введение

Неуклонный научно-практический интерес к изучению молочнокислых бактерий обусловлен теми эффектами, которые они оказывают на организм человека, а также способностями клеток и их метаболитов оказывать иммуномодулирующее, регулирующее, антагонистическое и ряд других положительных действий [1].

Полезное действие молочнокислых микроорганизмов объясняется их способностью образовывать и экскретировать биологически активные вещества и за счет этого оказывать бактерицидное и бактериостатическое действие на нежелательную микрофлору. Антагонистическая активность микроорганизмов обусловлена действием неспецифических и специфических факторов. К неспецифическим относятся: образование молочной, уксусной и других кислот; создание низкого окислительно-восстановительного потенциала за счет утилизации кислорода; конкуренция за питательные вещества. Специфическими факторами являются: образование антибиотиков полипептидной или не идентифицированной природы, бактериоцинов, жирных кислот с короткой цепью [2].

Высокая биологическая и функциональная активность данной группы микроорганизмов [3] определяет их практическое применение в качестве пробиотиков для коррекции дисбаланса резидентной микрофлоры, а также в производстве продуктов функционального питания в различных отраслях пищевой промышленности.

Коллективом авторов ведутся исследования по изучению влияния молочнокислой экзогенной ферментации на свойства говяжьих субпродуктов второй категории. Полученные ранее положительные результаты с точки зрения высоких функционально-технологических и изменений микроструктурных свойств ферментированного сырья [4-6] свидетельствуют о перспективности проведения дальнейших исследований.

Субпродукты второй категории характеризуются высокой степенью обсемененности нежелательной микрофлорой, в связи с чем представлял особый интерес механизм действия исследуемых бактериальных заквасок на представителей патогенной и условно патогенной микрофлоры.

Цель данного исследования заключается в сравнительной оценке антагонистической активности ряда промышленных бактериальных препаратов, используемых авторами в качестве агента биотехнологической модификации мясного сырья, в отношении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов.

Экспериментальная часть

Объектом исследования служили лиофильно высушенные молочнокислые закваски, используемые в качестве стартовых культур в технологическом процессе производства сыровяленых и сырокопченых колбас, а также лиофилизированный медицинский препарат Лактобактерин:

- 1) CHR Hansen Safe Pro B-LL-20 (содержат в составе *Pediococcus acidilactici*);
- 2) CHR Bactoferm F-SC-111 (*Staphylococcus carnosus*; *Lactobacillus sakei*);
- 3) Schaller Старт Стар (*Lactobacillus curvatus*, *Pediococcus pentosaceus*, *Staphylococcus carnosus*);
- 4) Danisco Texel DCM-1 (*Staphylococcus carnosus*, *Staphylococcus xylosum*);
- 5) Лактобактерин (заявленный состав: *Lactobacillus plantarum* 8P-A3, или *L. plantarum* 38, или *L. fermentum* 90T-C4 или *L. fermentum* 39).

Все описанные закваски предварительно ресуспендировали и поддерживали на питательной среде Мана – Рогоза – Шарпа (МРС).

В качестве тест-культур в работе использовались условно-патогенные и патогенные микроорганизмы, предоставленные ФБУН «Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии»

Роспотребнадзора РФ: *Serratia marcescens* chas 26, *Escherichia coli* L1, *Klebsiella* L1, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* 88B-K, *Bacillus cereus*, *Salmonella*.

Патогенные микроорганизмы культивировались в аэробных условиях на мясо-пептонном бульоне (МПБ).

Оценку показателя антагонистической активности проводили двумя методами *in vitro*: диффузионным методом (модификация блоков), и методом тестирования в жидкой питательных средах [7].

При диффузионном методе блоков исследуемые молочнокислые закваски высевали в чашки Петри глубинным способом в агаризованную среду МРС и инкубировали при температуре 30°C в течение 24 ч для образования и накопления в агаре ингибиторных соединений.

Затем стерильным пробочным сверлом вырезали агаровый блок с выросшей культурой молочнокислых заквасок и устанавливали его в другой чашке Петри на поверхности агаровой среды, засеянной сплошной культурой тест-штамма. Чашку выдерживали в течение 1 часа в холодильнике для диффузии ингибиторных соединений из блока в толщу агара и предотвращения преждевременного роста тест-культуры. Дальнейшее инкубирование проводили при температуре 37°C в течение 24 ч. О степени антагонистической активности испытуемых молочнокислых заквасок судили по величине зоны ингибирования роста тест-культуры вокруг агарового блока [7].

При суспензионном методе исследования все бактериальные закваски культивировали в 3 мл жидкой среды МРС при температуре 37°C в течение 24 ч.

Выросшие культуры обрабатывали хлороформом (0,1 мл на пробу) в течение 40 мин. Супернатант отделяли от клеток центрифугированием 15 мин при 3000 g. Полученные супернатанты исследуемых молочнокислых заквасок вносили в пробирки в количестве 0,4 мл к 0,1 мл взвесей суточных культур микроорганизмов с их содержанием 10^9 кл/мл. В качестве контроля использовали взвесь патогенных микроорганизмов (0,1 мл) со средой МРС (0,4 мл), предварительно обработанной хлороформом. Опытные и контрольные пробы инкубировали в течение 1 ч при 37°C. После инкубирования в каждую пробу добавляют по 2,5 мл МПБ и инкубировали при температуре 37°C в течение 24 ч. Оптические плотности выросших культур опытных и контрольных образцов измеряли при длине волны 540 нм на спектрофотометре (толщина кюветы 10 мм). О степени антагонистической активности испытуемых молочнокислых заквасок судили по изменению плотности культуры патогенных микроорганизмов в опытных пробах по сравнению с контрольными.

Математическую обработку данных проводили в стандартной компьютерной программе "Excel 7.0.". В работе все эксперименты были проведены не менее чем в трех повторностях. Группу данных считали однородной, если среднее квадратическое отклонение σ в ней не

превышало 13%. Различие между группами считали достоверным при критерии вероятности $P < 0.05$.

Результаты и их обсуждение

Максимальное накопление биологически активных веществ (ферментов, антибиотических веществ, бактериоцинов) происходит в конце экспоненциальной фазы роста [2]. Для выявления данной фазы были построены кривые роста бактериальных препаратов на жидкой накопительной среде МРС (рис. 1).

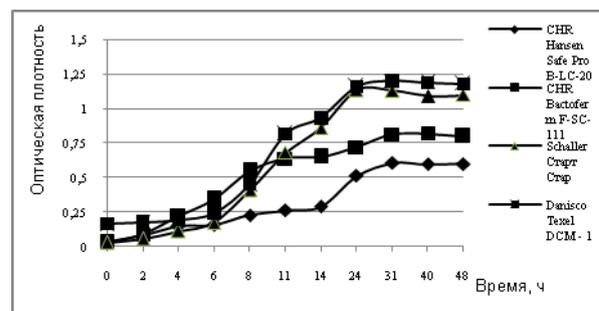


Рис. 1 – Динамика роста бактериальных заквасок на селективной среде МРС

Как видно из рис.1, при культивировании исследованных заквасок экспоненциальные фазы роста находятся в промежутке времени с 4 до 31 ч. Поэтому для исследования использовались активизированные культуры, находящиеся в экспоненциальной фазе роста, т.е. после 24 ч инкубирования.

Результаты по определению показателя антагонистической активности диффузионным методом представлены в табл. 1 и на рис. 2, 3.

Таблица 1 – Зона подавления роста тест-культур

№ закваски	Диаметр зоны подавления роста тест-культур, см							
	<i>Klebsiella</i> L1	<i>L. monocytogenes</i>	<i>St. epidermidis</i>	<i>B. cereus</i>	<i>Salmonella</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. marcescens</i>	<i>St. aureus</i>
1	-	3.0±0.1	3.2±0.3	2.6±0.2	3.7±0.2	-	3.2±0.3	-
2	2.0±0.1	2.9±0.2	3.1±0.2	3.2±0.1	3.4±0.1	-	3.0±0.1	3.4±0.3
3	-	3.4±0.1	2.7±0.1	3.7±0.3	4.1±0.3	3.1±0.3	3.1±0.2	3.2±0.2
4	-	-	-	-	3.4±0.2	-	3.2±0.1	-
5	2.6±0.2	3.2±0.3	3.1±0.2	3.8±0.3	3.7±0.3	2.9±0.1	3.7±0.3	3.0±0.2

Данные табл.1 свидетельствуют, что все исследуемые нами молочнокислые закваски обладали антагонистической активностью в отношении тестерных микроорганизмов. Максимальная активность отмечалась у штаммов, входящих в состав медицинского препарата Лактобактерина. Они проявляли антагонистическую активность в отношении всех выбранных нами патогенных микроорганизмов. Также хороший активностью обладали закваски CHR Bactoferm F-SC-111 (№2) и Schaller Старт Стар (№3). Они также

подавляли рост тест-культур. Минимальной антагонистической активностью обладали бактерии закваски Danisco Texel DCM-1 (№4). Наблюдалось подавление роста лишь у *Salmonella* и *S. marcescens*.

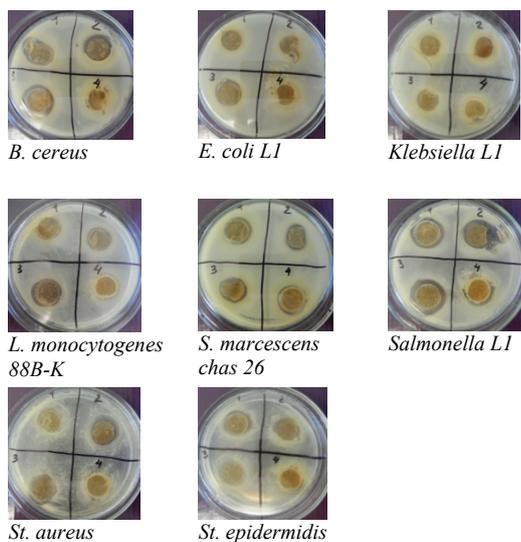


Рис. 2 - Антагонистическая активность бактериальных заквасок блочным методом (нумерация заквасок как в разделе «Экспериментальная часть»)

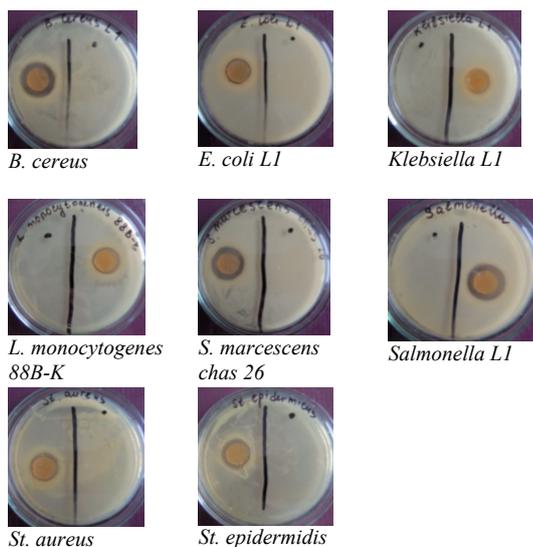


Рис. 3 - Антагонистическая активность Лактобактерина в отношении тест-культур блочным методом

Аналогичные результаты по антагонистической активности были получены с использованием суспензионного метода (рис.4).

Как видно из рис. 4, все исследуемые нами молочнокислые закваски обладали антагонистической активностью в отношении описанных условно-патогенных и патогенных микроорганизмов. Максимальная активность отмечалась у штаммов, входящих в состав закваски №1 и Лактобактерина (№5). Они в среднем на 98% подавляли рост всех изучаемых нами патогенов. Также хорошие показатели угнетения роста

патогенных микроорганизмов показали представители закваски №3. Они также активно ингибировали патогенные микроорганизмы, и индекс ингибирования был незначительно меньше, в среднем на 10%. Закваска №2 не подавляла рост *Klebsiella L1* и лишь на 30% угнетала *St. aureus*. Минимальное подавление патогенных штаммов наблюдалось у закваски №4. Она лишь примерно на 35% угнетала *B. cereus* и *E. coli L1*, на 9% *S. marcescens*. В отношении же остальных патогенных микроорганизмов она практически не проявляла антагонистической активности.

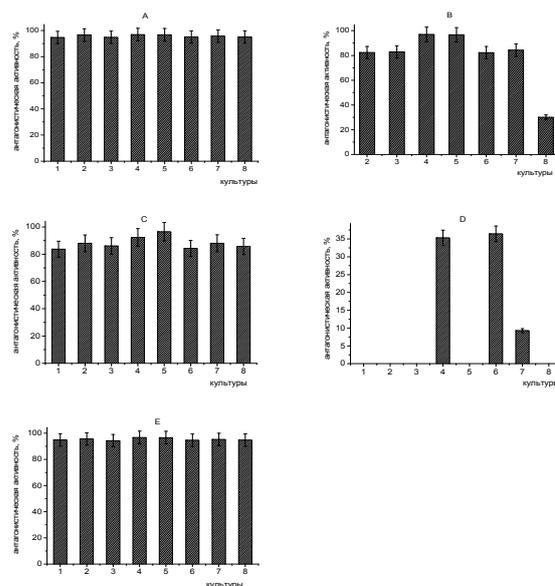


Рис. 4 – Антагонистическая активность бактериальных заквасок суспензионным методом А - CHR Hansen Safe Pro B-LL-20; В - CHR Bactoferm F-SC-111; С - SC Halle Старт Стар; D - Danisco Texel DCM-1; Е – Лактобактерин; 1 – *S. marcescens chas 26*; 2 – *E. coli L1*; 3- *Klebsiella L1*; 4- *St. epidermidis*; 5- *St. aureus*; 6- *Listeria monocytogenes 88B-K*; 7- *B. cereus*; 8- *Salmonella*

Следовательно, все исследованные нами бактериальные закваски в той или иной степени обладали антагонистической активностью в отношении тестовых штаммов патогенных микроорганизмов. Величина антагонистической активности, очевидно, в первую очередь определяется родовой и видовой принадлежностью микроорганизмов, входящих в их состав. Так, в состав закваски Danisco Texel DCM-1 (№ 4), обладающей наименьшей антагонистической активностью, входят только *Staphylococcus carnosus* и *Staphylococcus xylosus*, в то время как в состав всех остальных заквасок (кроме CHR Hansen Safe Pro B-LL-20) входят *Lactobacillus*. А наиболее активный препарат Лактобактерин содержит только представителей лактобацилл. Следует отметить и высокую антагонистическую активность *Pediococcus acidilactici*, входящего в состав закваски CHR Hansen Safe Pro B-LL-20. Однако данная закваска не полностью проявила себя при анализе антагонистической активности диффузион-

ным методом. Так, *Klebsiella L1* оказалась не чувствительна к микроорганизмам этой закваски. Это дает нам основание предположить, что именно представители рода *Lactobacillus* играют решающую роль в подавлении роста патогенных микроорганизмов.

Заключение

Все исследуемые бактериальные закваски обладали антагонистической активностью в отношении условно-патогенных и патогенных микроорганизмов. Показатель антагонистической активности у различных бактериальных препаратов варьирует, причем наибольший индекс ингибирования отмечается у препаратов, содержащих в своем составе представителей рода *Lactobacillus*. Наименьшей активностью обладает молочнокислая закваска Danisco Texel DCM-1, состоящая из бактерий рода *Staphylococcus*.

Из двух исследованных методов каждый имеет свои преимущества, определяющие выбор метода в тех или иных обстоятельствах. К преимуществам блочного метода можно отнести: наглядность, возможность одновременной оценки активностей набора штаммов-антагонистов; к

преимуществам суспензионного – более высокую дифференцированность.

Литература

1. Квасников Е. И., Нестеренко О. А. Молочнокислые бактерии и их использование в народном хозяйстве // М.: Издательство «Наука», 1975. – 395 с.
2. Рогов И. А., Титов Е. И., Ганина В. И. Синбиотики в технологии продуктов питания // М.: МГУПБ, 2006. 218 с.
3. Н.А.Глушанова. Биологические свойства лактобацилл // Бюллетень сибирской медицины. Научно-практический журнал. - 2003. – Т. 2, №4. - С. 50-58.
4. Хабибуллин Р.Э., Хусаинова Х.Р., Минивалеева Э.И., Решетник О.А. Вестник Казанского технологического университета, 14, 187-194 (2011).
5. Хабибуллин Р.Э., Хусаинова Х.Р., Минивалеева Э.И., Решетник О.А. Вестник Казанского технологического университета, 14, 203-209 (2011).
6. Хабибуллин Р.Э., Жакслыкова С.А., Яковлева Г.Ю., Решетник О.А. Вестник Казанского технологического университета, 16, 202-206 (2013).
7. Иркитова А.Н. Методы определения антагонистической активности молочнокислых бактерий [Текст] / А.Н.Иркитова, Я.Р.Каган – Барнаул: ГНУ Сибирский научно-исследовательский институт сыроделия Россельхозакадемии, 2011 – 10 с.

© С. А. Жакслыкова – асп. каф. ТПП КНИТУ, saniyushka@inbox.ru; Р. Э. Хабибуллин – к.т.н., доцент каф. ТММП КНИТУ, hrustik@yandex.ru; Г. Ю. Яковлева – к.б.н., доцент каф. микробиологии К(П)ФУ, yakovleva_galina@mail.ru; О. А. Решетник – д-р техн. наук, проф., зав. каф. ТПП КНИТУ, reshetnik@kstu.ru.