

УДК 637.1

И.А. Функ¹, А.Н. Иркитова²**ОЦЕНКА АНТАГОНИСТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ КОЛЛЕКЦИОННЫХ ШТАММОВ *LACTOBACILLUS PLANTARUM***¹Алтайский государственный университет, ФГБНУ СибНИИС (Барнаул, Россия)²Алтайский государственный университет, ФГБНУ СибНИИС (Барнаул, Россия)funk.irishka@mail.ru; elen171987@mail.ru

Одним из проявлений взаимоотношений микроорганизмов в природе являются антагонистические взаимоотношения, заключающиеся в том, что при совместном развитии бактерии одного вида угнетают жизнедеятельность другого вида. Существуют различные формы специфического и неспецифического антагонизма, связанные с конкуренцией за питательные вещества, выделением продуктов конструктивного и энергетического метаболизма, бактериоцинов, антибиотиков и т.д., что нашло широкое применение в лечебной практике, сельском хозяйстве и пищевой промышленности. Пищевая промышленность, и особенно сыроделие, постоянно подвергается рискам со стороны патогенной, условно-патогенной и технически-вредной микрофлоры. Значительно снизить эти риски позволит тщательный подбор промышленных штаммов микроорганизмов в состав бактериальных заквасок и препаратов. Известно, что выраженной антагонистической активностью к посторонней микрофлоре обладают заквасочные молочнокислые бактерии, в том числе мезофильные молочнокислые палочки *Lactobacillus plantarum*.

В статье представлены результаты по исследованию антагонистической активности мезофильных молочнокислых палочек *Lactobacillus plantarum* для выявления штаммов с максимальной антагонистической активностью относительно штаммов бактерий группы кишечных палочек, с целью их дальнейшего использования в бактериальных концентратах специального назначения.

Ключевые слова: антагонистическая активность, *Lactobacillus plantarum*, тест-культура, *Escherichia coli*.

I.A. Funk¹, A.N. Irkitova²**EVALUATION OF THE ANTAGONISTIC ACTIVITY OF COLLECTION STRAINS *LACTOBACILLUS PLANTARUM***¹Altai State University, FSBSI SibSRI (Barnaul, Russia).²Altai State University, FSBSI SibSRI (Barnaul, Russia).

One of core relationships between microorganisms in nature are antagonistic relationships, i.e. one type of bacteria inhibit the living ability of another species. There are various forms of specific and nonspecific antagonism associated with competition for nutrients, release of constructive and energy metabolism substances, bacteriocins, antibiotics, etc., which is widely used in medical practice, agriculture, and food industry. The food industry and especially the cheese-making, is constantly exposed by risks from pathogenic, opportunistic, and harmful microorganisms. The careful selection of industrial strains of microorganisms which can be used in bacterial starter cultures and drugs will significantly reduce these risks. It is well known that lactic acid bacteria have pronounced antagonistic

activity to extraneous microflora. These bacteria include the mesophilic lactic acid bacillus called *Lactobacillus plantarum*.

The article presents our results on the research of antagonistic activity of mesophilic lactic acid bacilli *Lactobacillus plantarum* to identify strains with maximum antagonizing activity towards strains of colibacillus bacteria, for their further use in bacterial concentrates for special purposes.

Key words: Antagonistic activities, Lactobacillus plantarum, Culture test, Escherichia coli.

ВВЕДЕНИЕ

Способность молочнокислых бактерий образовывать антибиотические вещества и за счёт этого оказывать бактерицидное и бактериостатическое действие на вредную микрофлору широко используется в пищевой промышленности, медицине, ветеринарии и сельском хозяйстве (Иркитова, Каган, 2012). В настоящее время исследователи уделяют большое внимание молочнокислым бактериям *Lactobacillus plantarum* (растительная палочка). Эта культура постоянно присутствует в твердых и полутвердых сырах в качестве микрофлоры заквасочного и незаквасочного происхождения. Этот вид чрезвычайно пластичен и достаточно легко приспосабливается к различным условиям обитания. Многие штаммы *Lactobacillus plantarum* продуцируют специфические антибиотические вещества различного спектра действия. Примером их может служить лактолин, угнетающий развитие бактерий группы кишечных палочек и маслянокислых бактерий или плантарицин, ингибирующий рост плесеней. Наличие этих свойств объясняет использование штаммов *Lactobacillus plantarum* в различных пищевых ферментациях: в сыроделии, при производстве пробиотических кисломолочных продуктов, в хлебопечении, ферментировании овощей, растительных соков, в виноделии и силосовании кормов (Банникова, 1975; Квасников, Нестеренко, 1975; Банникова, Королева и др., 1987).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В качестве объектов исследования, в работе были использованы 12 штаммов *Lactobacillus plantarum* из отраслевой коллекции лаборатории микробиологии ФГБНУ НИИ Сыроделия (табл. 1).

L. plantarum – растительная палочка, грамположительные анаэробные неспорообразующие молочнокислые бактерии, принадлежащие к гомоферментативным видам из подгруппы стрептобактерий. Клетки имеют вид толстых палочек средних размеров, однако длина их может изменяться в зависимости от условий среды. При неблагоприятных условиях наблюдаются более вытянутые формы. Клетки расположены одиночно или короткими цепочками. Зерен волютина в основном не образуют. Колонии средней величины, куполообразные, беловатые.

Вид *L. plantarum* сбраживает многие сахара, в том числе мальтозу и сахарозу. Он требует для своего развития богатые среды, содержащие разнообразные углеводы, витамины, аминокислоты. Оптимальная температура для их развития 30°C, однако может расти в довольно широких пределах

температуры (15-38°C). Данный вид отличается спиртоустойчивостью, выдерживая концентрацию спирта до 20% (Квасников, Нестеренко, 1975).

Таблица 1. Перечень коллекционных штаммов *Lactobacillus plantarum* ФГБНУ НИИ Сыроделия

№	Индекс штамма	Источник и дата поступления штамма в коллекцию
1	СКМ-651 (28 исходный)	НПО «Углич»
2	СКМ-656 (28 СУ)	Экспериментальная селекция (Сергеева И.Я.)
3	СКМ-671 (ПФ-5)	Экспериментальная селекция (Сергеева И.Я.)
4	СКМ-646 (8 РА-3)	Фармацевтический препарат «Лактобактерин» (Сергеева И.Я.)
5	СКМ-694 (S ₄₂ (СУ 8 РА-3))	Экспериментальная селекция (Сергеева И.Я.)
6	СКМ-669 (ВКМ В-578 (АТСС 8014))	АТСС(США) – ИБФМ(Москва) – ИГУ(Иркутск) – СибНИИС(Барнаул)
7	СКМ-667 (Биота 1-2)	Кисломолочный напиток «Биота», Краснодар (Сергеева И. Я., 2007 г.)
8	СКМ-668 (Биосиб 4-1)	Коммерческий препарат «Биосиб», Бердск (Сергеева И. Я., 2010 г.)
9	СКМ-673 (С 8-01)	Эпифитная микрофлора люцерны (Сергеева И. Я., 2001 г.)
10	СКМ-681 (С 35-01)	Эпифитная микрофлора донника (Сергеева И. Я., 2001 г.)
11	СКМ-683 (С 38-03)	Эпифитная микрофлора донника (Сергеева И. Я., 2003 г.)
12	СКМ-690 (С 79-03)	Эпифитная микрофлора чины (Сергеева И. Я., 2003)

Морфология клеток представлена на рис. 1.



Рис. 1. Микроскопический препарат *Lactobacillus plantarum* (штамм S₄₂, увел ×1600)

В экспериментах по выявлению антагонистической активности указанных штаммов *L. plantarum* в качестве тест-культур использовали 4 штамма *E. coli* из коллекции ФГБНУ СибНИИ сыроделия (табл. 2).

Таблица 2. Перечень коллекционных штаммов *E.colli* ФГБНУ НИИ Сыроделия

№	Индекс штамма	Источник и дата поступления штамма в коллекцию
1	СКМ-829 (ПБ-6)	ВНИИ генетика, 1985 г.
2	СКМ-830 (А-1)	Творог производства ООО ЭСЗ (Иркитова А. Н., 2011 г.)
3	СКМ-833 (<i>Enterobakter cloacae</i>)	Лаборатория генетики ИЭВ, 2011 г.
4	СКМ-832 (ГС)	ОАО «Модест», 2011 г.

Морфология клеток представлена на рис. 2.

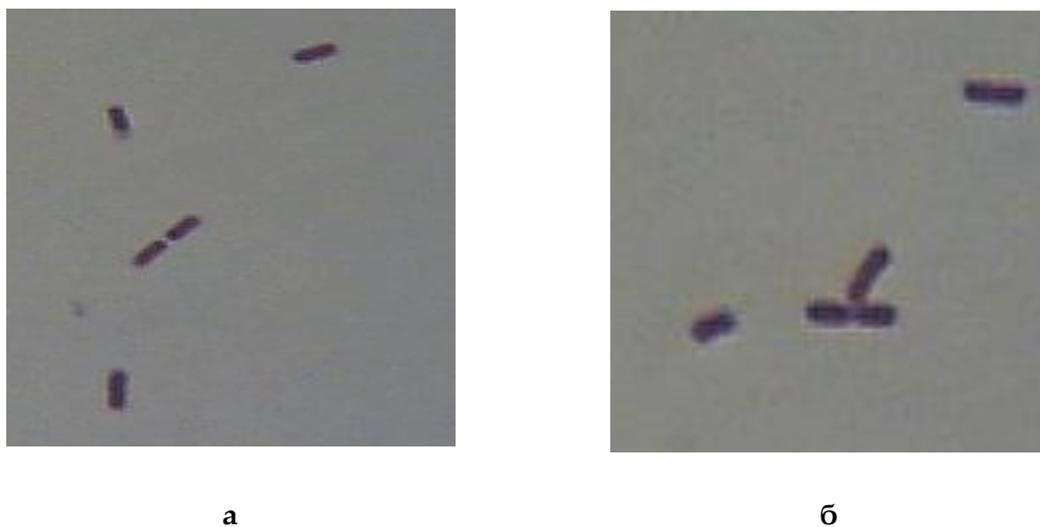


Рис. 2. Внешний вид клеток тест-штаммов *E. coli*, выращенных в жидкой среде Кесслера (увеличение $\times 1350$):

а) – штамм СКМ-829; б) – штамм СКМ-830

Антагонистическую активность *L. plantarum* по отношению к *E.colli* определяли в несколько этапов. На первом этапе все 12 коллекционных штаммов проверяли на активность кислотообразования и предельное кислотообразование. Для этого в питательную среду ЗЛА и обезжиренное молоко вносили по 1% 18-часовой культуры каждого из исследуемых штаммов *L. plantarum*, культивировали при 30°C и измеряли активную кислотность (рН) каждый день в течение 10 суток (ГОСТ 3624 – 92, 2009).

На втором этапе, отобрав наилучших кислотообразователей *L. plantarum*, исследовали их антагонистическую активность к тест-штаммам *E.colli* с

помощью диффузионного метода перпендикулярных штрихов на твёрдой питательной среде КМАФАнМ – см. рис. 3 (Ирkitова, Каган, 2012).

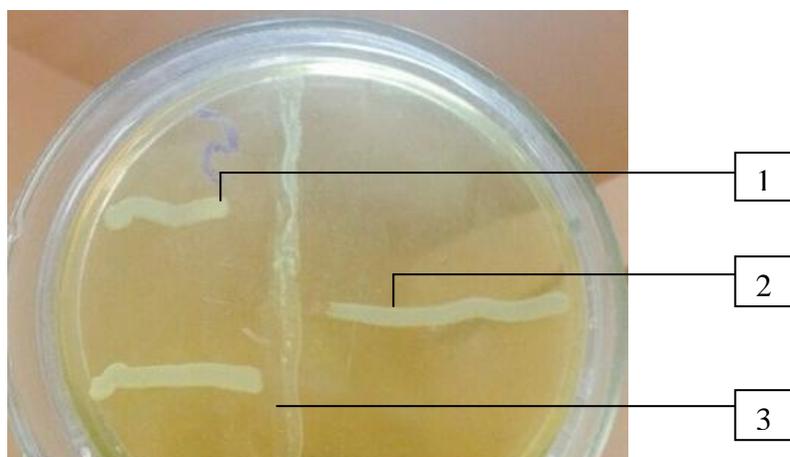


Рис. 3. Проявление антагонистической активности
(метод перпендикулярных штрихов):

1 – зона ингибирования; 2 – тест-культура (*E. Coli*); 3 – антагонист (*L. plantarum*).

На третьем этапе использовали модифицированный метод определения антагонистической активности *L. plantarum* в жидкой среде. Для этого в пробирки с жидкой средой Кесслера с поплавками вносили 1 см³ 18-часовой культуры испытуемого штамма-антагониста (около 10⁸ КОЕ/мл) и одновременно 1 см³ того или иного из серии 10-кратных разведений тест-штамма кишечной палочки (использованный диапазон 10-кратных разведений – от 0 до 8). Засеянные пробирки инкубировали в течение 24 часов при 37°C. По окончании инкубации учитывали рост тест-культуры по помутнению селективной среды и по наличию газа в поплавках. О степени антагонистической активности испытуемых штаммов растительной палочки судили по минимальному соотношению антагонист/тест-культура, при котором происходило полное подавление роста тест-культуры. Контролем служили пробирки со средой Кесслера, засеянные 10-кратными разведениями только тест-культуры кишечной палочки (Ирkitова, Каган, 2012).

Подсчёт минимального соотношения клеток (МСК) производили по следующей формуле (Ирkitова, 2012):

$$\text{МСК} = \text{КОЕ штамма антагониста} / \text{КОЕ штамма тест-культуры} (1).$$

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Кислотообразующая активность – важное свойство заквасочных микроорганизмов, позволяющее прогнозировать протекание молочнокислого процесса. Кроме того, высокое кислотообразование является одним из наиболее распространенных механизмов проявления антагонистической

активности многих микроорганизмов (Ирkitова, 2012). В связи с этим, важным критерием отбора *L. plantarum* для включения в состав заквасок является интенсивность кислотообразования. По результатам исследования среди коллекционных штаммов *L. plantarum* наиболее сильными кислотообразователями оказались 5 штаммов (СКМ-656, СКМ-671, СКМ-694, СКМ-669, СКМ-681). Результаты представлены в табл. 3.

Через 8 часов культивирования ступок на обезжиренном молоке, помутнение на питательной среде ЗЛА образовывали все штаммы, но рН варьировала от $5,74 \pm 0,05$ до $5,00 \pm 0,42$ на обезжиренном молоке и от $4,73 \pm 0,24$ до $4,09 \pm 0,11$ на ЗЛА. Изменение рН наблюдалась до 4 суток включительно, в дальнейшем динамика активной кислотности изменялась незначительно. Предельное кислотообразование варьировало в пределах от $3,77 \pm 0,11$ до $3,12 \pm 0,16$ на обезжиренном молоке и от $3,60 \pm 0,19$ до $3,25 \pm 0,03$ на ЗЛА.

Таким образом, на ЗЛА штаммы проявили себя более активно и показали наибольшее кислотообразование по сравнению с показателями на обезжиренном молоке, поэтому дальнейшие эксперименты проводили на питательной среде ЗЛА.

Для следующего этапа эксперимента было отобрано 5 штаммов (СКМ-656, СКМ-671, СКМ-694, СКМ-669, СКМ-681). С помощью метода перпендикулярных штрихов у 3 из 5 штаммов (СКМ-671, СКМ-694, СКМ-669) выявлена прямая зависимость между кислотообразующей активностью и зоной ингибирования тест-культур (чем ниже рН, тем сильнее подавление роста тест-культуры). Результаты анализа определения антагонистической активности коллекционных штаммов *L. plantarum* представлены в табл. 4.

Таблица 4. Корреляция между кислотообразующей активностью и зоной ингибирования тест-культур

№	Индекс штамма	Активная кислотность (2 сут), ед $\mu\text{pH} \pm \Delta\text{pH}$	Зона ингибирования, мм
1	СКМ-671 (ПФ-5)	$3,44 \pm 0,03$	0,2 – 0,8
2	СКМ-694 (S42 (СУ 8 РА-3))	$3,48 \pm 0,02$	0,5 – 0,9
3	СКМ-669 (ВКМ В-578 (АТСС 8014))	$3,36 \pm 0,02$	0,3 – 0,9

Однако, у штаммов СКМ-656 и СКМ-681 зависимости между активной кислотностью и антагонистической активностью не выявлено. Эти штаммы, не смотря на высокую кислотообразующую активность, не проявили антагонистические свойства по отношению к бактериям группы кишечной палочки при использовании данного метода, поэтому для тестирования антагонистической активности на жидкой питательной среде испытывали только 3 штамма антагониста (СКМ-671, СКМ-694, СКМ-669). Результаты этого

эксперимента представлены в табл. 5. Остальные семь коллекционных штаммов также не проявили антагонистическую активность.

Таблица 3. Активная кислотность (рН) исследуемых штаммов *L. Plantarum*

№	Индекс штамма	Показатели активной кислотности (рН) в течении 10 суток, ед									
		Δ рН± рН									
		4 ч	8 ч	1 сут	2 сут	3 сут	4 сут	5 сут	7 сут	10 сут	
1	СКМ-656 (28 CV)	5,51±0,03	4,46±0,03	3,49±0,05	3,33±0,05	3,30±0,05	3,29±0,12	3,28±0,05	3,27±0,05	3,27±0,03	
2	СКМ-671 (ПФ-5)	5,07±0,55	4,43±0,82	3,71±0,55	3,44±0,03	3,44±0,03	3,45±0	3,46±0,02	3,44±0,05	3,45±0	
3	СКМ-694 (Su2 (CV 8 PA-3))	4,84±0,30	4,14±0,13	3,54±0,03	3,48±0,02	3,47±0,03	3,48±0,05	3,49±0,03	3,47±0,05	3,49±0,06	
4	СКМ-669 (ВКМ В-78 (ATCC8014))	4,86±0,03	4,09±0,11	3,47±0,03	3,36±0,02	3,31±0,02	3,31±0,03	3,31±0,03	3,30±0,12	3,32±0,02	
5	СКМ-681 (С.35-01)	5,26±0,12	4,22±0,11	3,43±0,05	3,3±0,02	3,26±0,12	3,25±0,12	3,26±0,12	3,25±0,03	3,25±0,05	

Таблица 5. Ингибирование роста штаммов тест-культуры *E.coli* коллекционными штаммами *L. plantarum* при культивировании в жидкой среде Кесслера

№	Индекс штамма <i>L. plantarum</i>	Минимальное соотношение клеток (МСК) антагонист/тест-культура, вызывающее полное подавление роста штаммов тест-культуры			
		СКМ-829 (ПБ-6)	СКМ-830 (А-1)	СКМ-833 (<i>Enterobakter</i> <i>cloacae</i>)	СКМ-832 (ГС)
1	СКМ-671 (ПФ-5)	10 ³	10 ³	1	10 ⁵
2	СКМ-694 (S ₄ 2 (СУ 8 РА-3))	1	10 ⁷	1	1
3	СКМ-669 (ВКМ В-578 (АТСС 8014))	1	10 ⁴	10 ⁷	1

Все 3 штамма на жидкой питательной среде проявили антагонистическую активность, что подтверждает предыдущие результаты, но в разной степени. Самый сильный штамм СКМ-694 подавляет 3 из 4 штамма тест-культур уже при соотношении 1:1.

ВЫВОДЫ

1. Из 12 коллекционных штаммов только 5 являются сильными кислотообразователями (СКМ-656, СКМ-671, СКМ-694, СКМ-669, СКМ-681).
2. На твёрдой питательной среде антагонистическую активность проявили 3 штамма (СКМ-671, СКМ-694, СКМ-669), среди которых СКМ-694 является наиболее сильным антагонистом к тест-штаммам кишечных палочек.
3. На жидкой питательной среде самым сильным антагонистом является штамм СКМ-694.
4. Таким образом, 3 из 12 коллекционных штамма *L. plantarum* можно рекомендовать для включения в состав бактериальных заквасок и препаратов специального назначения.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

- Банникова Л.А. Селекция молочнокислых бактерий и их применение в молочной промышленности. – М.: Пищевая промышленность, 1975. – 255 с.
- Банникова Л.А., Королёва Н.С., Семенихина В.Ф. Микробиологические основы молочного производства. – М.: Агропромиздат, 1987. – 400 с.
- ГОСТ 3624-92 (Россия) Молоко и молочные продукты. Титриметрические методы определения кислотности. – Москва, 2009. – 10 с.
- Ирkitова А.Н. Эколого-биологическая оценка штаммов *Lactobacillus acidophilus*, используемых в производстве пробиотических продуктов: автореферат дис. на соискание уч. степ. к. б. н. / Ирkitова А.Н. 2012. – 22 с.

Ирkitова А.Н., Каган Я.Р. Методы определения антагонистической активности молочнокислых бактерий / Актуальные проблемы техники и технологии переработки молока, 2012. – № 9. – С. 226–236.

Квасников Е.И., Нестеренко О.А. Молочнокислые бактерии и пути их использования. – М.: Наука, 1975. – 384 с.

REFERENCES

Bannikova, A.L. (1975). Selection of lactobacillus and their use and dairy industry.

Moscow: Food Industry.

Bannikova, A.L., Koroleva, N.S., Semenikhina, V.F. (1987). Microbiological basis of dairy industry. Moscow: Agropromizdat.

State Standard. GOST 3624-92 Russia. (2009). Milk and dairy products. Titrimetric methods of acid test. Moscow.

Irkitova, A.N. (2012). Ecological and biological evaluation of *Lactobacillus acidophilus* used in probiotic industry. Thesis of Doctoral Dissertation.

Irkitova, A.N., Kagan, A.N. (2012). Test methods of LAB antagonistic activity. Current problems of milk processing equipment and technology. 9, 226–236.

Kvasnikov, E.I., Nesterenko, O.A. (1975). Lactobacillus and their use. Moscow: Nauka.

Поступила в редакцию 10.08.2015

Как цитировать:

Функ, И.А., Ирkitова, А.Н. (2015). Оценка антагонистической активности коллекционных штаммов *Lactobacillus plantarum*. *Acta Biologica Sibirica*, 1 (1-2), 85-93. **crossref** <http://dx.doi.org/10.14258/abs.v1i1-2.844>

© Функ, Ирkitова, 2015

Users are permitted to copy, use, distribute, transmit, and display the work publicly and to make and distribute derivative works, in any digital medium for any responsible purpose, subject to proper attribution of authorship.



This work is licensed under a [Creative Commons Attribution 3.0 License](https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/)