

УДК 579.864.1:615.331

## ВПЛИВ СЕРЕДОВИЩА КУЛЬТИВУВАННЯ НА АНТАГОНІСТИЧНУ АКТИВНІСТЬ МОЛОЧНОКИСЛИХ БАКТЕРІЙ

Ю. М. Похилько, Н. О. Кравченко

Інститут сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН  
вул. Шевченка, 97; м. Чернігів, 14027, Україна; e-mail: pohilko.yura@gmail.com

*Досліджено антагоністичну активність молочнокислих бактерій, виділених зі шлунково-кишкового тракту кролів, та її залежність від середовища культивування. Встановлено, що антагоністична активність молочнокислих бактерій залежить не тільки від штамової належності, джерела виділення, але й від середовища їх культивування.*

Ключові слова: антагонізм, молочнокислі бактерії, живильне середовище.

Антагоністичні властивості молочнокислих бактерій давно привертають увагу дослідників і на сьогодні описані в літературі досить широко. Механізми їх антагоністичної дії різні. У деяких випадках антимікробний ефект цих мікроорганізмів обумовлюється дією основного продукту метаболізму — молочної кислоти, яка знижує рН середовища та відіграє роль бактерицидного чинника в процесі ферментативного зброджування при отриманні продуктів харчування та кормів [1; 2]. В інших випадках антагоністичну дію пробіотичних бактерій обумовлюють нейтральні продукти, які виділяють бактерії в навколишнє середовище [3]. Окремі речовини, які продукують молочнокислі бактерії, характеризуються високою антагоністичною активністю навіть за їх низьких концентрацій у середовищі. До цієї категорії належать антибіотичні речовини (лактоцил, лактобrevін, низин, лактобацилін тощо) [4; 5]. Згідно з літературними даними молочнокислі бактерії здатні продукувати перекис водню, що інгібує *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas* та інші патогенні та умовно-патогенні мікроорганізми. Антимікробний ефект перекису водню обумовлений денатурацією деяких ферментів, підвищенням проникності мембран та руйнуванням ДНК мікроорганізмів за дії вільних радикалів [6]. Крім того, перекис водню активує лактопе-

роксидазну систему, що утворює продукти окислення — інгібітори для широкого спектру грам-позитивних і грам-негативних бактерій [7]. Встановлено ще один механізм антибактеріальної активності молочнокислих бактерій — здатність продукувати лізоцим, який руйнує стінку бактеріальних клітин, створюючи неспецифічний антибактеріальний бар'єр [3]. Антагоністична дія деяких молочнокислих бактерій характеризується бактерицидними властивостями речовин білкової природи (бактеріоцини) [8]. Здатність молочнокислих бактерій пригнічувати ріст широкого спектру мікроорганізмів (особливо грам-негативних) відіграє велику роль у формуванні мікробіоценозу шлунково-кишкового тракту людини та тварин.

Молочнокислі бактерії — основа багатьох пробіотичних препаратів як у гуманній, так і у ветеринарній медицині. Вони широко використовуються у заквасках моно- та полікомпонентного складу для приготування кисломолочних продуктів, у кормовиробництві — для консервування та підвищення поживності кормів [9].

Незважаючи на велику кількість публікацій, присвячених молочнокислим бактеріям та їх антагоністичним властивостям, пошук нових штамів-антагоністів є актуальним. Також залишається не вирішеним питання вибору живильного середовища куль-

тивування молочнокислих бактерій для дослідження антагоністичної активності.

**Матеріали й методи.** Дослідження проводили в лабораторії пробіотиків Інституту сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН.

Вивчали антагоністичну активність штамів бактерій роду *Lactobacillus*, виділених із шлунково-кишкового тракту кролів: *L. lactis* 4/1, *L. casei* 5/4, *L. helveticus* 13/2, *L. plantarum* 16/1, *L. plantarum* 16/3, *L. plantarum* 17/2, *L. plantarum* 17/3, *L. acidophilus* 31/2, *L. delbrueckii* 39/2, *L. acidophilus* 49/1.

Як типовий представник молочнокислих бактерій (МКБ) використовували штам *L. acidophilus* ССМ 4833, отриманий з депозитарію Інституту мікробіології та вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України. Тест-культурами слугували 8 штамів патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів: *Proteus mirabilis* № 3177, *Proteus vulgaris* № 13, *Staphylococcus aureus* № 906, *Salmonella typhimurium* № 89, *Shigella flexneri* 2a № 160, *Klebsiella pneumoniae* № 67, *Escherichia coli* 055K59 № 3912, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC-27853. Штами умовно-патогенних та патогенних мікроорганізмів отримано з Чернігівської обласної санітарно-епідеміологічної станції. Використаний у роботі штам *Salmonella enteritidis* Ч1 var. *Issatschenko* отримано з колекції штамів мікроорганізмів лабораторії пробіотиків.

Патогенні мікроорганізми культивували на м'ясо-пептонному агарі (МПА) при температурі 37 °С. Досліджувані штами молочнокислих бактерій культивували при температурі 37 °С упродовж 48 годин на таких живильних середовищах: агаризоване стерильне знежирене молоко, агаризоване гідролізоване молоко, MRS [10]. Дослідження антагоністичної активності (АА) проводили *in vitro* дифузним методом блоків [11].

Контролем слугували варіанти живильних середовищ без блоків штамів-антагоністів, на яких зони затримки росту патогенних та умовно патогенних мікроорганізмів були відсутні.

**Результати й обговорення.** При дослідженні антагоністичної активності молочнокислих бактерій, виділених із шлунково-кишкового тракту кролів, встановлено, що вони виявляють різну ступінь пригнічувальної дії на тест культури (рис. 1). Антагоніс-

тичну активність досліджувані штами проявляли до *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *E. coli*, *S. typhimurium* (рис. 1).

Встановлено, що найбільші зони затримки росту *P. mirabilis* утворювали штами: *L. lactis* 4/1, *L. helveticus* 13/2, *L. plantarum* 17/2, *L. acidophilus* 49/1.

Виявлено, що антагоністична активність молочнокислих бактерій до *P. mirabilis* змінювалася залежно від живильного середовища, на якому культивували досліджувані штами (рис. 2). При культивуванні *L. lactis* 4/1 на агаризованому гідролізованому молоці зони затримки росту *P. mirabilis* збільшувалися на 17 % порівняно із зонами на агаризованому знежиреному молоці. Проте при вирощуванні цього ж штаму на живильному середовищі MRS зони пригнічення росту тест-штаму збільшились ще на 7 % проти цього ж показника за культивування штаму *L. lactis* 4/1 на агаризованому гідролізованому молоці.

Досліджуваний штам *L. casei* 5/4 також збільшував зони затримки росту на 8 % при культивуванні на агаризованому гідролізованому молоці порівняно із зонами, які він утворював за вирощування на стерильному знежиреному молоці. Ще на 4 % збільшились зони пригнічення росту *P. mirabilis* при культивуванні даного штаму на середовищі MRS порівняно із зонами затримки росту цього тест-штаму за вирощування антагоніста на агаризованому гідролізованому молоці.

Подібну тенденцію спостерігали при дослідженні антагоністичної активності штаму *L. helveticus* 13/2: збільшення зон пригнічення росту *P. mirabilis* на 20 % та 33 % за вирощування на щільному гідролізованому молоці та середовищі MRS, відповідно, проти зон затримки росту тест-мікроорганізму за культивування штаму-антагоніста на агаризованому знежиреному молоці.

Аналогічну залежність спостерігали також у штаму *L. plantarum* 16/1, який утворював більші на 23 % та 27 % зони затримки росту *P. mirabilis* при культивуванні на гідролізованому молоці та середовищі MRS, відповідно, у порівнянні із зонами, утвореними при культивуванні цього штаму на знежиреному молоці.

У той же час, штам *L. plantarum* 16/3 утворював найбільші зони затримки росту *P. mirabilis* при культивуванні на щільному



Рис. 1. Антагоністична активність (АА) молочнокислих бактерій до патогенних та умовно патогенних мікроорганізмів:  
 а) АА при культивуванні молочнокислих бактерій на середовищі MRS;  
 б) АА за їх культивування на агаризованому гідролізованому молоці;  
 в) АА за культивування на агаризованому знежиреному молоці.

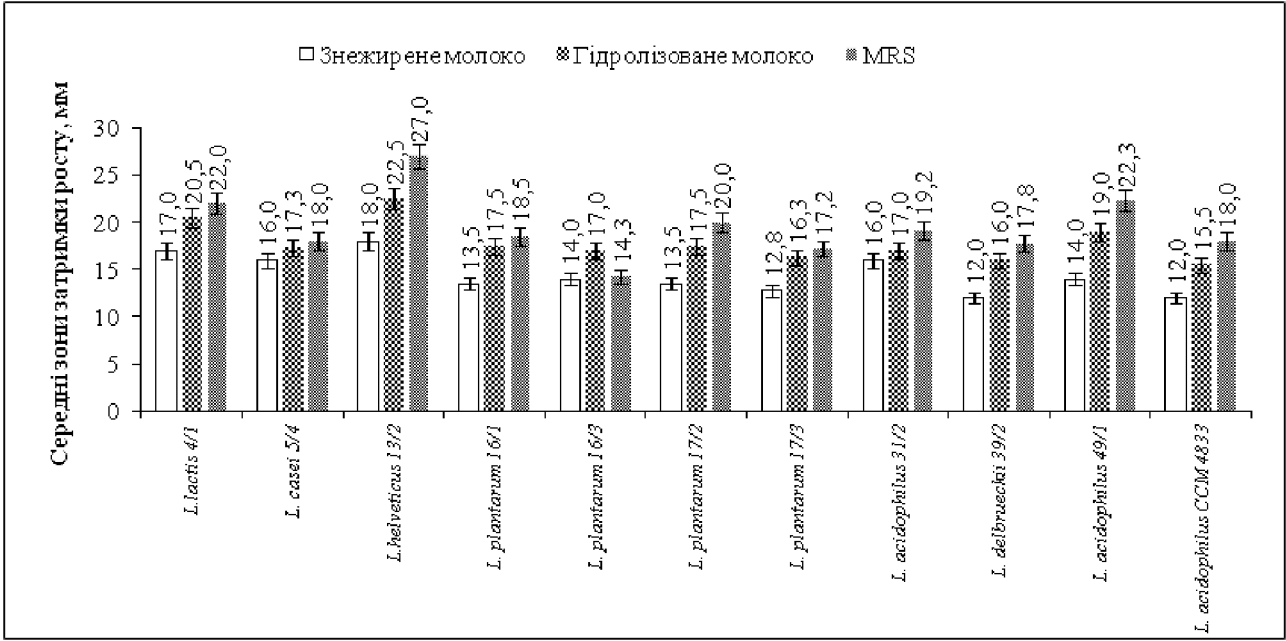


Рис. 2. Антагоністична активність молочнокислих бактерій до *Proteus mirabilis* (n = 3).

гідролізованому молоці, а не середовищі MRS, як інші досліджувані бактерії.

Штам *L. plantarum* 17/2 збільшував зони затримки росту тест-культури на 23 % при культивуванні на агаризованому гідролізованому молоці та на 32 % — на середовищі MRS проти зон, що утворювались за вирощування штаму-атагоніста на знежиреному молоці.

Схожу тенденцію відмічено для *L. plantarum* 17/3 — встановлено збільшення зон затримки росту тест-мікроба на 22 % та 26 % за культивування штаму на гідролізованому молоці та MRS відповідно, у порівнянні із зонами, що утворювались за його культивування на знежиреному молоці.

Досліджуваний штам *L. acidophilus* 31/2 збільшував зони пригнічення росту *P. mirabilis* на 6 % за культивування на гідролізованому молоці та 17 % — на середовищі MRS проти зон, які встановлені за культивування цього штаму на стерильному знежиреному молоці.

Збільшення зон затримки росту *P. mirabilis* на 25 % та 32 % відповідно встановлено за культивування штаму *L. delbrueckii* 39/2 на агаризованому гідролізованому молоці та середовищі MRS у порівнянні із зонами за його культивування на стерильному знежиреному молоці.

Штам *L. acidophilus* 49/1 збільшував зони затримки росту тест-культури на 27 % та 38 % при культивуванні на агаризованому гідролізованому молоці та середовищі MRS відповідно проти зон, які утворювались за

культивування МКБ на агаризованому знежиреному молоці.

За культивування типового представника молочнокислих бактерій *L. acidophilus* CCM 4833 також відмічено збільшення зони пригнічення росту *P. mirabilis* на 22 % та 33 % при культивуванні на гідролізованому молоці та MRS відповідно у порівнянні із зонами, які він утворював за культивування на стерильному знежиреному молоці.

Загалом, за культивування молочнокислих бактерій на гідролізованому молоці та середовищі MRS зони затримки росту *P. mirabilis* збільшувалися до 30 % та 40 % відповідно проти зон затримки росту тест-культур за культивування бактерій-антагоністів на знежиреному молоці.

Аналогічну залежність спостерігали при утворенні зон затримки росту й інших патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів. За культивування досліджуваних штамів молочнокислих бактерій на гідролізованому молоці та середовищі MRS зони пригнічення росту *Proteus vulgaris* збільшувалися до 21 % та 32 % відповідно проти зон пригнічення росту тест-культури, що встановлені за культивування досліджуваних бактерій на знежиреному молоці (рис. 3).

У 73 % досліджуваних штамів молочнокислих бактерій за культивування на гідролізованому молоці та середовищі MRS встановлено збільшення зон пригнічення росту *Staphylococcus aureus* до 27 % та 55 % відповідно у порівнянні з цими ж показниками за вирощування бактерій-антагоністів на знежи-

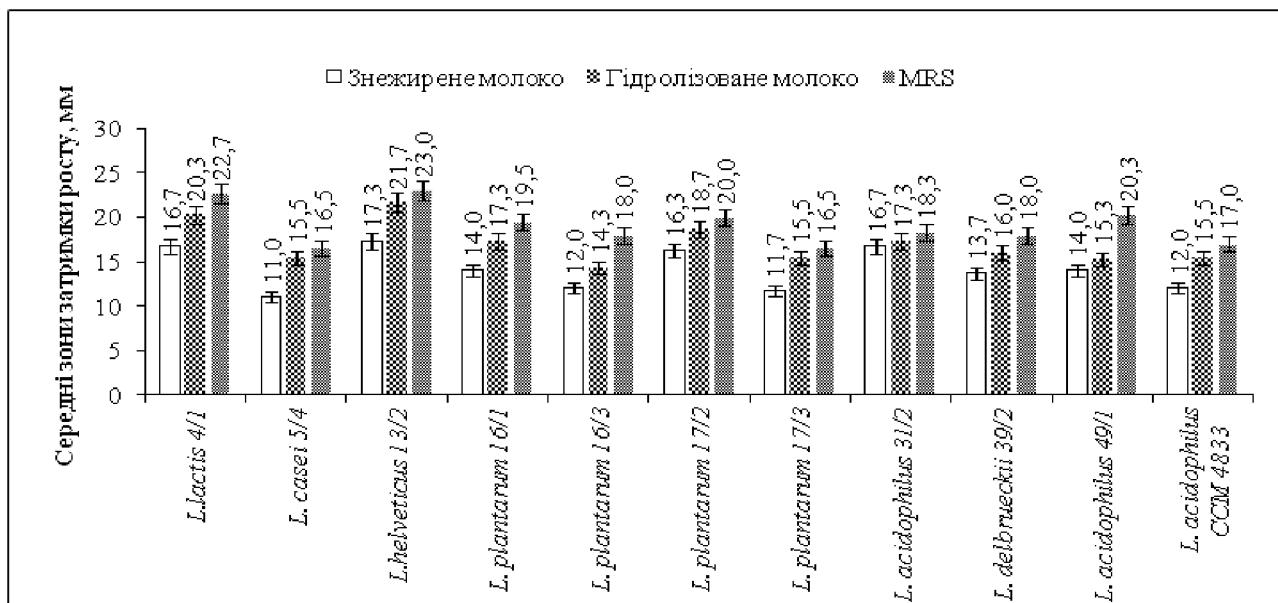


Рис. 3. Антагоністична активність молочнокислих бактерій до *Proteus vulgaris* ( $n = 3$ ).

реному молоці (рис. 4). Разом із тим, у штамів *L. plantarum* 17/2, *L. plantarum* 17/3, *L. acidophilus* 31/2 не виявлено суттєвої різниці ( $\leq 5\%$ ) зон затримки росту тест-культур за зміни середовища культивування.

Встановлено збільшення до 50% та 58% зон пригнічення росту бактерій роду *Salmonella* у 73% штамів молочнокислих бактерій за їх культивування на гідролізованому молоці та середовищі MRS відповідно (рис. 5 і 6). У штамів *L. plantarum* 16/1, *L. plantarum* 16/3, *L. plantarum* 17/2 залежності показників зон

затримки росту *Salmonella enteritidis* від середовища культивування не відмічено.

Проте зони пригнічення росту *Shigella flexneri* за культивування молочнокислих бактерій на гідролізованому молоці та середовищі MRS, збільшувалися лише у 30% досліджуваних штамів (рис. 7). Більшість штамів (70%) молочнокислих бактерій утворювали ширші зони затримки росту *Shigella flexneri* за культивування на знежиреному молоці.

У 90% досліджуваних штамів молочнокислих бактерій за культивування на гідролі-

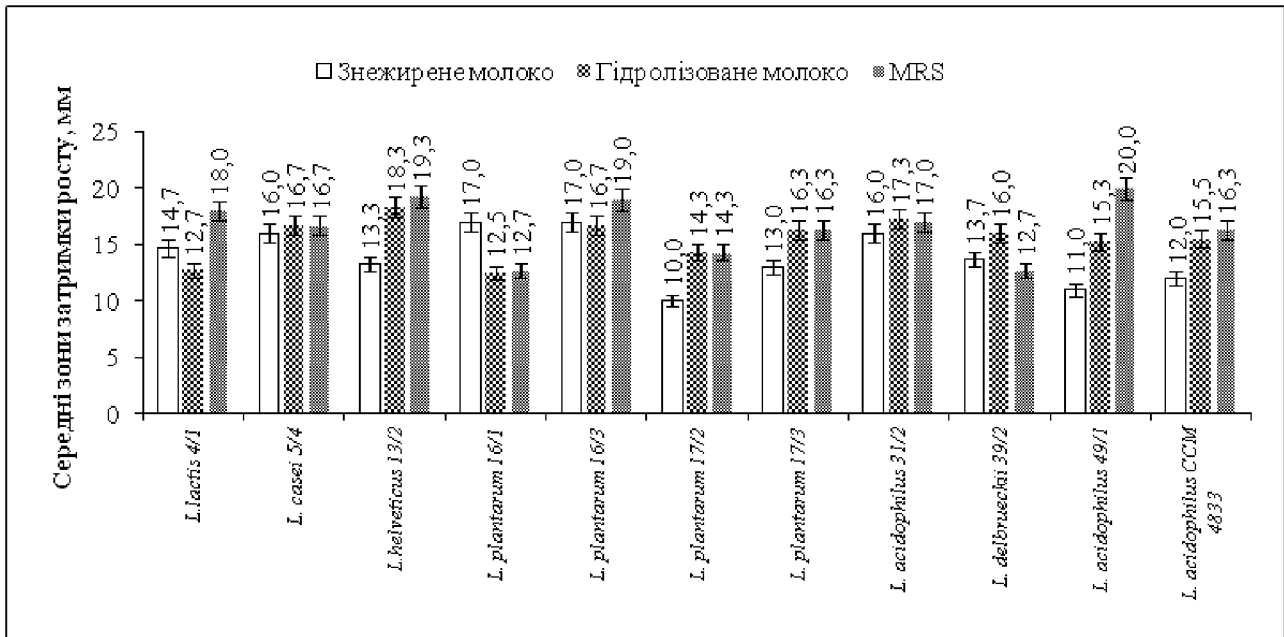


Рис. 4. Антагоністична активність молочнокислих бактерій до *Staphylococcus aureus* ( $n = 3$ ).

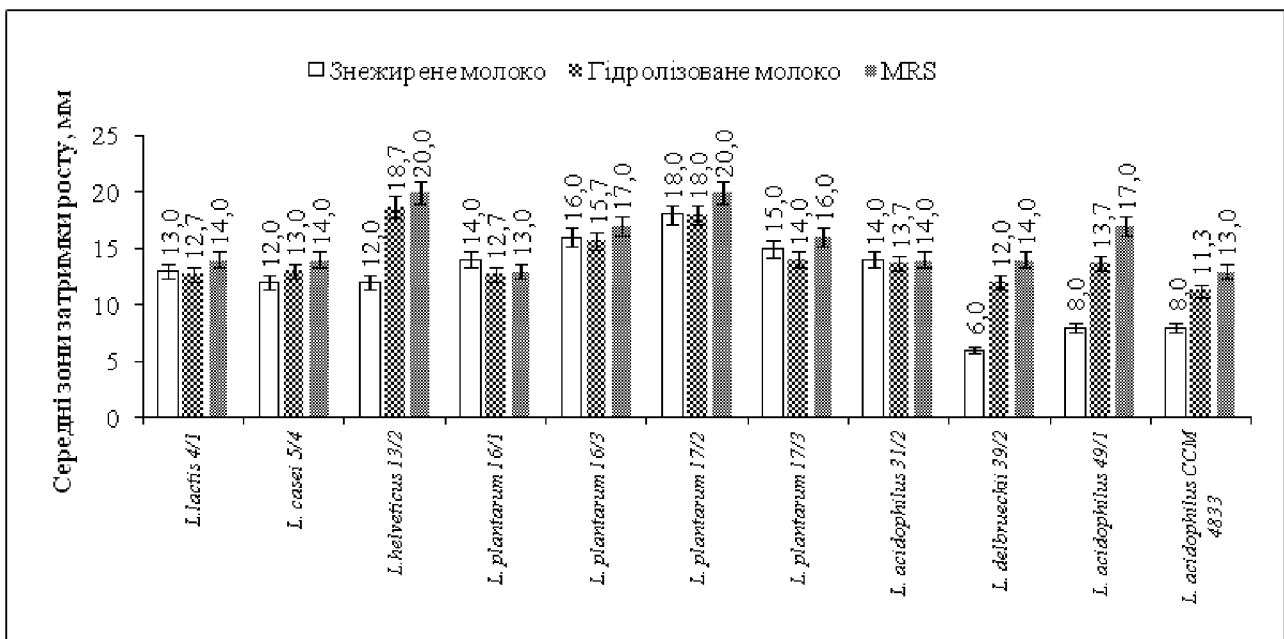


Рис. 5. Антагоністична активність молочнокислих бактерій до *Salmonella enteritidis* ( $n = 3$ ).

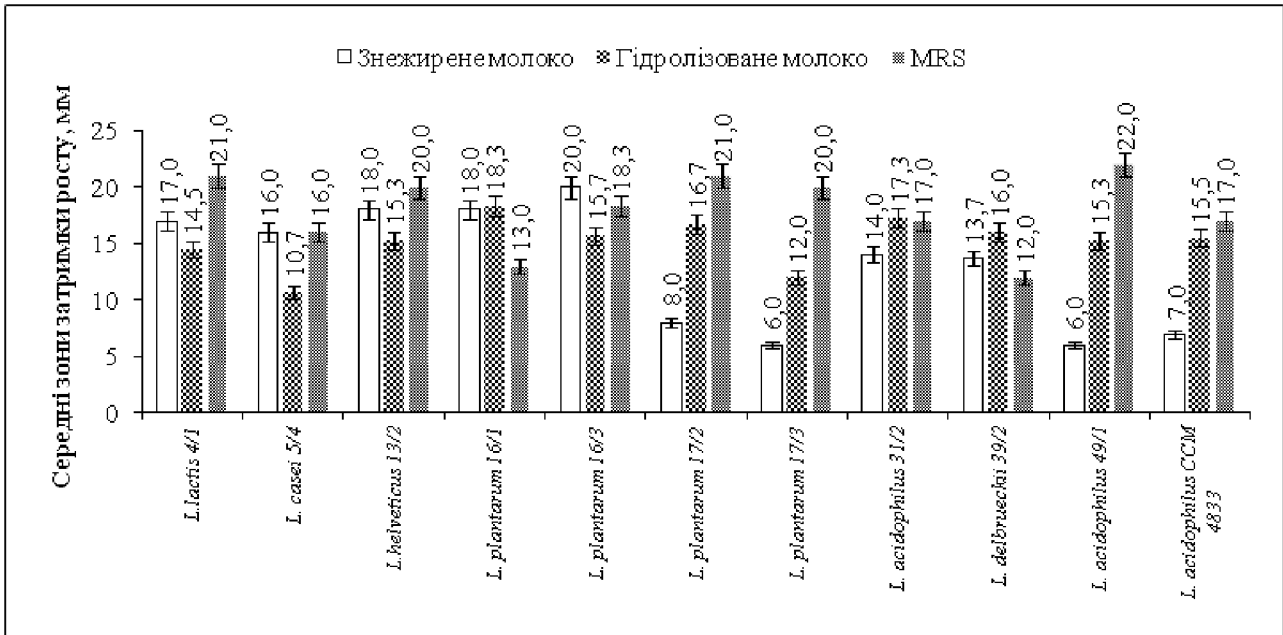


Рис. 6. Антагоністична активність молочнокислих бактерій до *Salmonella typhimurium* (n = 3).

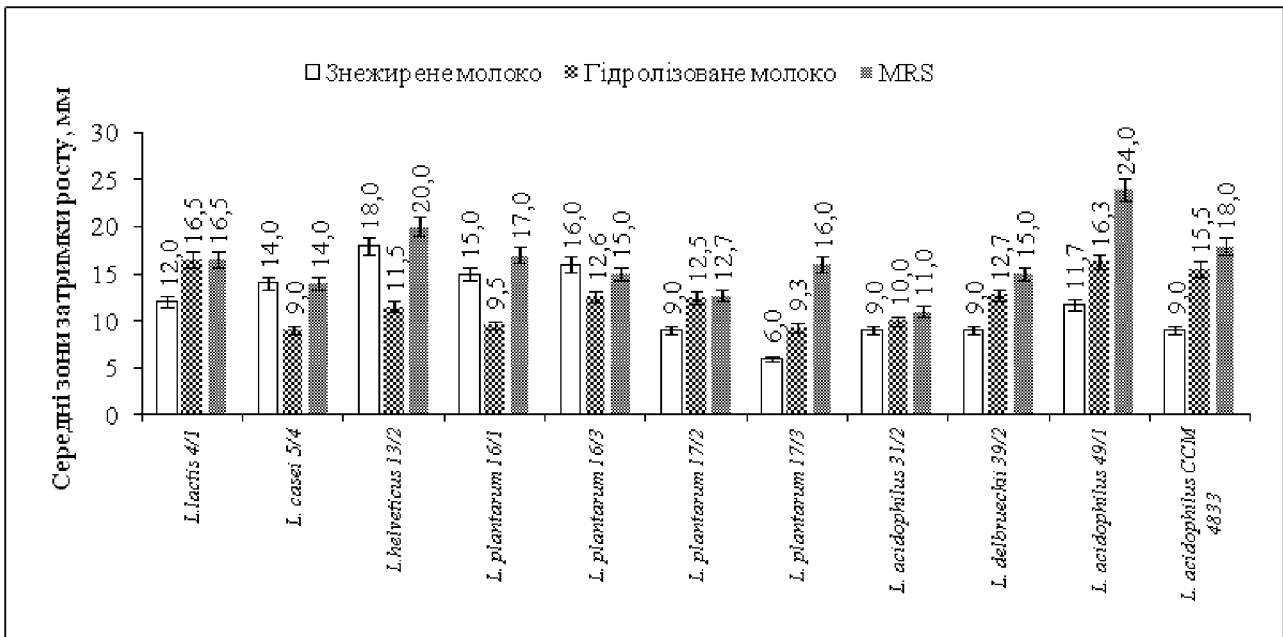


Рис. 7. Антагоністична активність молочнокислих бактерій до *Shigella flexneri* (n = 3).

зованому молоці та середовищі MRS зони пригнічення росту *Klebsiella pneumoniae* збільшувалися до 51 % та 60 % відповідно проти зон пригнічення росту тест-культури, які утворювалися за вирощування бактерій-антагоністів на знежиреному молоці (рис. 8).

У 82 % досліджуваних штамів молочнокислих бактерій при культивуванні на агаризованому гідролізованому молоці та середовищі MRS встановлено збільшення зон пригнічення росту *Escherichia coli* до 45 % та 52 % відповідно проти варіанту культиву-

вання молочнокислих бактерій на агаризованому знежиреному молоці (рис. 9).

Така особливість частково спостерігалась у досліді з використанням умовно-патогенних бактерій *Pseudomonas aeruginosa* (рис. 10). За впливу 30 % досліджуваних штамів молочнокислих бактерій встановлено утворення найбільших зон затримки росту тест-штаму за культивування на агаризованому стерильному молоці, а *L. acidophilus* 31/2 — за вирощування на агаризованому гідролізованому молоці.

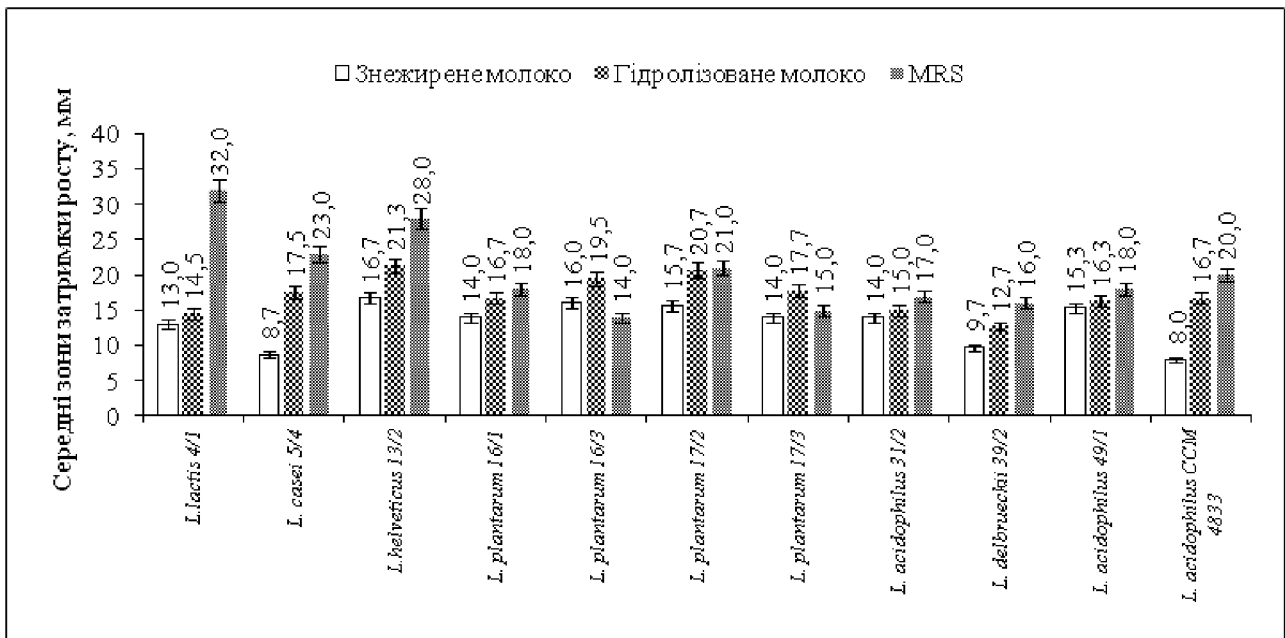


Рис. 8. Антагоністична активність молочнокислих бактерій до *Klebsiella pneumoniae* (n = 3).

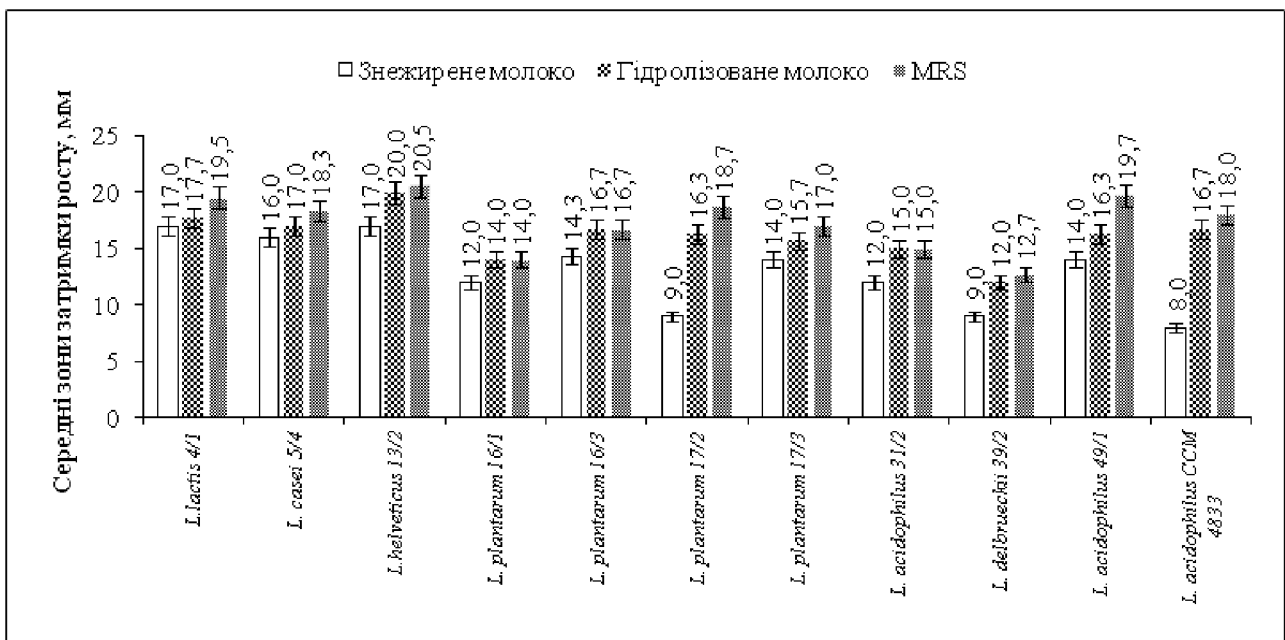


Рис. 9. Антагоністична активність молочнокислих бактерій до *Escherichia coli* (n = 3).

Бактерії роду *Lactobacillus* є ауксотрофними організмами і тому надзвичайно вибагливі до живильних середовищ [12]. Тому збільшення зон затримки росту патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів за їх культивування на середовищі MRS пояснюється тим, що це середовище має основні ростові фактори для МКБ, а отже є оптимальним для накопичення достатньої кількості лактобактерій [13; 14].

Отже, у результаті проведених досліджень встановлено антагоністичну активність 11 штамів молочнокислих бактерій, з яких

10 ізолювано зі шлунково-кишкового тракту кролів. Серед досліджуваних бактерій найактивнішими були штами: *L. lactis* 4/1, *L. helveticus* 13/2, *L. plantarum* 17/2, *L. acidophilus* 49/1, які утворювали найбільші зони затримки росту патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів за культивування на всіх досліджуваних середовищах.

Отримані дані свідчать, що ізолювані з травної системи кролів молочнокислі бактерії мають високий бактеріостатичний потенціал щодо патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів, а тому застосування найбільш

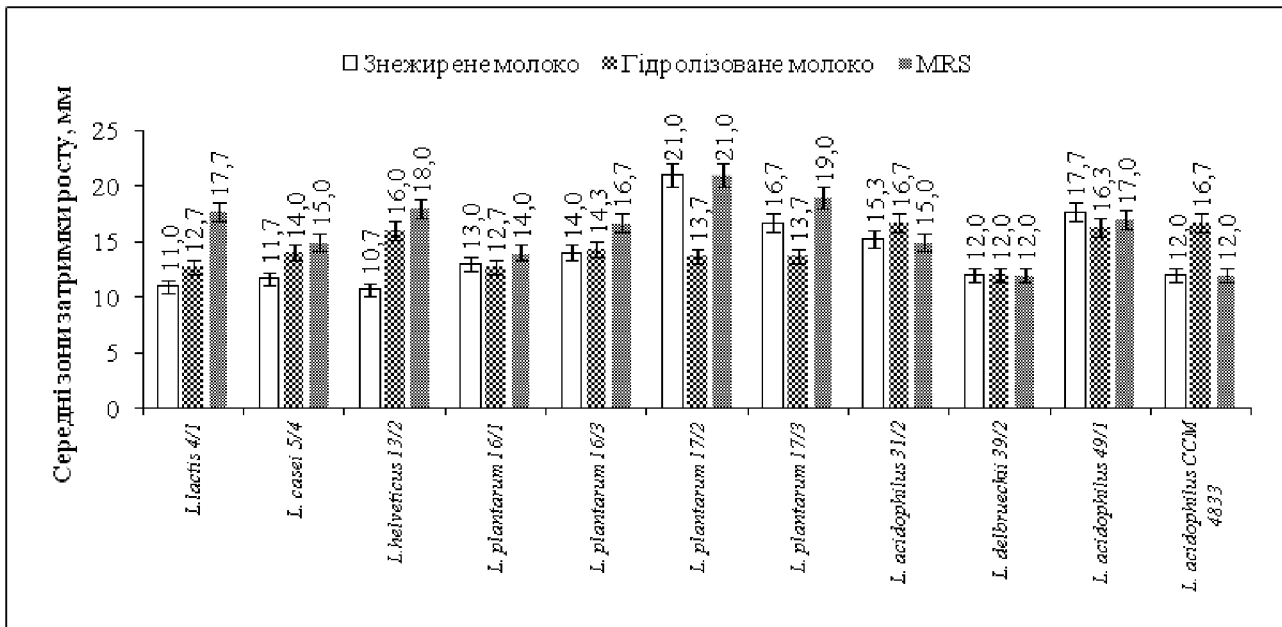


Рис. 10. Антагоністична активність молочнокислих бактерій до *Pseudomonas aeruginosa* (n = 3).

перспективних з них у тваринництві може істотно вплинути на зниження рівня шлунково-кишкових захворювань тварин.

1. Банникова Л. А. Селекція молочнокислих бактерій і їх застосування в молочній промисловості / Л. А. Банникова. — М. : Пищевая промышленность, 1975. — 255 с.

2. Егоров М. С. Основи учения об антибиотиках / М. С. Егоров. — М. : Высшая школа, 1986. — 446 с.

3. Lingren S. E. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and freed fermentations / S. E. Lingren, W. J. Dobrogos // FEMS Microbiol. Rev. — 1990. — Vol. 87. — P. 149–164.

4. Санация стафилококкового бактерионосительства с учетом внутриклеточного паразитирования возбудителя / [О. В. Бухарин, Б. Я. Усвятцов и др.] // Актуальные проблемы химиотерапии бактериальных инфекций : тез. докл. — М., 1991. — Ч. 1. — С. 89–90.

5. Eklund T. The effect of carbon dioxide on bacterial growth and on uptake processes in the bacterial membrane vesicles / T. Eklund // Int. J. Food Microbiol. — 1984. — Vol. 1, № 4. — P. 179–185.

6. Characterisation and application of Lacticin 3147, a novel broad-spectrum bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* / M. P. Ryan, M. C. Rea, C. Hill, R. P. Ross // Irish Journal of Agricultural and Food Research. — 1995. — Vol. 34. — P. 217.

7. Reiter B. Lactoperoxidase antibacterial systems: natural occurrence, biological functions and practical applications / B. Reiter, B. G.Harnulv // J. Food Prot. — 1984. — Vol. 47. — P. 724–732.

8. Процагина В. С. Применение лактобакте-

рина, обогащенного лизоцимом, в лечении больных хроническим колитом / В. С. Процагина, Н. Е. Богданович // Материалы III Всесоюз. съезда гастроэнтерологов. — М.–Л., 1984. — Т. 2. — С. 135–136.

9. Кобжасаров Т. Ж. Консервирование сенажа молочнокислыми бактериями / Т. Ж. Кобжасаров, С. А. Дордочкина, Л. А. Селеулова // Многопрофильный научный журнал «3J». — Костанай, 2015. — № 1. — С. 198–202.

10. de Mann J. C. A medium for the cultivation of lactobacilli / J. C. de Mann, M. Rogosa, M. Elisabeth Sharpe // Journal of applied bacteriology. — 1960. — Vol. 23, № 1. — P. 130–135.

11. Егоров Н. С. Основи учения об антибиотиках : учеб. для студ. биол. спец. ун-тов / Н. С. Егоров. — 4-е изд., перераб. и доп. — М. : Высш. шк., 1986. — 448 с. (С. 143–145)

12. Ростовые и морфологические характеристики производственных штаммов *Bifidobacterium* и *Lactobacillus* при использовании гидролизатно-молочной и гидролизатно-соевой сред / [М. Б. Цинберг, Д. Г. Дерябин, И. В. Денисова и др.] // Антибиотики и химиотерапия. — 2003. — Т. 48, № 12. — С. 9–13.

13. Тимченко Л. Д. Сравнительный анализ традиционных питательных сред и новая капустная среда для культивирования лактобактерий / Тимченко Л. Д., Пенькова Н. И., Катутина Л. С. // Вестник МГОУ. Сер. Естественные науки. — 2010. — № 2. — 152 с.

14. Polac-Berecka M. Optimization of medium composition for enhancing growth of *Lactobacillus rhamnosus* PEN using response surface methodology / [Magdalena Polac-Berecka, Adam Waśko, Monika Kordowska-wiater et al.] // Polish J. Microbiol. — 2010. — Vol. 59, № 2. — P. 113–118.



## **ВЛИЯНИЕ СРЕДЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА АНТАГОНИСТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ**

**Ю. Н. Похилько, Н. А. Кравченко**

Институт сельскохозяйственной микробиологии и агропромышленного производства НААН, г. Чернигов

*Исследовано антагонистическую активность молочнокислых бактерий, выделенных из желудочно-кишечного тракта кролей, и её зависимость от среды культивирования. Установлено, что антагонистическая активность молочнокислых бактерий зависит не только от штаммовой принадлежности, источника выделения, но и от среды их культивирования.*

Ключевые слова: антагонизм, молочнокислые бактерии, питательная среда.

## **INFLUENCE OF CULTURE MEDIUM ON THE ANTAGONISTIC ACTIVITY OF LACTIC ACID BACTERIA**

**Yu. M. Pohilko, N. O. Kravchenko**

Institute of Agricultural Microbiology and Agroindustrial Manufacture, NAAS, Chernihiv

*The antagonistic activity of lactic acid bacteria isolated from the gastrointestinal tract of rabbits, and its dependence on the culture medium have been investigated. It was found that the antagonistic activity of lactic acid bacteria depends not only on strains, source of isolation, but also on their culture medium.*

Key words: antagonism, lactic acid bacteria, culture medium.