

Chornogor N. P., Bol'shakova V. L., Vinnikov A. I.  
Antagonistic activity of the lactic bacteria

УДК 579.864.1:615.331

Н. П. Черногор, В. Л. Большакова, А. І. Вінніков

*Дніпропетровський національний університет*

## АНТАГОНІСТИЧНА АКТИВНІСТЬ МОЛОЧНОКИСЛИХ БАКТЕРІЙ

Показано, що молочнокислі бактерії, виділені з різних природних джерел і молочнокислих продуктів, поряд із молочною кислотою продукують речовини з вираженою антагоністичною активністю відносно широкого спектра патогенних і умовно патогенних мікроорганізмів. Поява антагоністичних властивостей частіше спостерігалася в лактобактерій, рідше – у кокових видів молочнокислих бактерій. У той же час антагоністична активність залежить від штамової належності та умов культивування.

It was found out that in addition to lactic acid the lactic bacteria, isolated from different natural sources and sour-milk products, produce some substances having antagonistic activity towards a wide range of pathogenic and opportunistic pathogenic microorganisms. The gain of antagonistic properties was often noticed for the lactobacilli but seldom for coccal lactic bacteria. At the same time the antagonistic activity depended on the strain and cultivation conditions.

### Вступ

Проблема антагонізму – одна з найактуальніших проблем сучасності. Антагоністичні властивості молочнокислих бактерій описані в літературі досить повно. Механізми антагоністичної дії різні. У деяких випадках антимікробний ефект цих мікроорганізмів обумовлюється дією основного продукту метаболізму – молочної кислоти, яка знижує *pH* середовища та відіграє роль бактерицидного фактора в процесі ферментативного зброджування при отриманні продуктів харчування та кормів [1; 2]. В інших випадках антагоністичну дію обумовлюють нейтральні продукти, іноді пігменти, які виділяє клітина в навколишнє середовище.

Деякі речовини, які продукують молочнокислі бактерії, характеризуються високою антагоністичною активністю навіть при їх низьких концентраціях у середовищі. До цієї категорії належать антибіотичні речовини (лактоцил, лактобrevін, низин, лактобацилін тощо) [7; 9]. Згідно з літературними даними, молочнокислі бактерії

---

© Н. П. Черногор, В. Л. Большакова, А. І. Вінніков, 2006

187

здатні як антагоністичні речовини виробляти в присутності кисню перекис водню, що інгібує *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas* та ін.

Антимікробний ефект перекису водню обумовлений денатурацією деяких ферментів, підвищенням проникливості мембран і руйнуванням ДНК під дією вільних радикалів [8]. Крім того, перекис водню активує лактопероксидазну систему, що утворює продукти окислення – інгібітори для широкого спектра грам позитивних і грам негативних бактерій [12].

Установлено ще один механізм антибактеріальної активності молочнокислих бактерій – здатність продукувати лізоцим, який руйнує стінку бактеріальних клітин, створюючи неспецифічний антибактеріальний бар'єр [11].

Антагоністична дія деяких молочнокислих бактерій характеризується бактерицидними властивостями речовин білкової природи (бактеріоцини), що володіють високою специфічністю відносно близькоспоріднених або різних штамів одного виду [6].

Здатність молочнокислих бактерій пригнічувати ріст широкого спектра мікроорганізмів (особливо грам негативних) відіграє велику роль у формуванні мікробіоценозу шлунково-кишкового тракту людини та тварин. У наш час велика увага приділяється вивченню окремих видів і штамів лактобактерій, які продукують антимікробні речовини. Культури молочнокислих бактерій – основа багатьох пробіотичних препаратів для бактеріальної терапії. Вони широко використовуються в заквасках моно- та комплексного складу для приготування десертних і дієтичних кисломолочних продуктів, у силосуванні – для консервування та підвищення харчової цінності кормів. Питання виділення, селекції та вдосконалення нових штамів молочнокислих бактерій залишаються актуальними у теперішній час. Незважаючи на велику кількість публікацій, присвячених молочнокислим бактеріям та їх антагоністичним властивостям, пошук нових штамів-антагоністів залишається перспективним.

### Матеріал і методи досліджень

На кафедрі мікробіології та вірусології ДНУ проводиться робота зі створення колекції молочнокислих бактерій, які можуть бути використані в різних галузях господарства. Із цією метою з різних зразків сирого молока, ринкових кисломолочних продуктів, епіфітної мікрофлори та силосу різних строків зберігання знайдені, відібрані та виділені штами молочнокислих бактерій, які належали до роду *Streptococcus*, *Lactobacillus* та ін. Серед культур молочнокислих бактерій, які виділено з природних субстратів, проведено скринінг штамів-продуцентів антагоністично активних речовин. При відборі перевагу віддавали бактеріям, які активно згортали молоко, утворювали згустки підвищеної в'язкості, були сильними кислотоутворювачами та мали добрі органолептичні властивості.

Характерна ознака відібраних штамів – їх антагоністична дія та здатність гальмувати ріст умовно-патогенної мікрофлори. Антагоністичну активність визначали методом відстроченого антагонізму [10], методом дифузії в агар [4]. Крім того, штами-антагоністи виявляли за Романовичем [5]. Антибіотичну активність визначали методом послідовних розведень за Красильниковим, модифікованим для молочнокислих бактерій Полянською [3]. Антагоністичну активність вивчали стосовно умовно-патогенних мікроорганізмів: *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus lysodeikticus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella thyphimurim*, *S. gallinarum*, *Escherichia coli*, *Shigella sonnei*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida tropicalis*, *C. albicans*, *C. guilliermondii*. Тест-культури вирощували на живильному агарі, а при вирощуванні дріжджів у живильний агар додавали 2 % глюкози.

### Результати та їх обговорення

У результаті проведеного експерименту відібрано 100 штамів молочнокислих бактерій, з яких ідентифіковано 28. Видову належність виділених чистих культур молочнокислих бактерій визначали на підставі детального вивчення морфологічних, культуральних і фізіолого-біохімічних властивостей. Серед виділених та ідентифікованих мікроорганізмів виявлено два морфологічних типи: стрептококи та палички. Серед останніх виявлено 10 штамів мезофільних стрептококів, які були грам-позитивні, не мали каталазної активності, росли при +10...+15°C, але не при +45°C, характеризувалися високою активністю кислотоутворення, синтезували аміак з аргініну, відновлювали молоко з лакмусом, росли при *pH* 9,2 але не при *pH* 9,6, витримували тридцятихвилинний прогрів при +45°C, але не при +60°C. Ці штами викликали бродіння глюкози, мальтози, лактози, галактози й, у той же час, утилізація ксилози, рамнози, сахарози, арабінози та ін. була відсутня. На основі вивчення біологічних властивостей дану групу молочнокислих бактерій віднесено до *Streptococcus lactis*.

Серед мезофільних стрептококів виявлено чотири штами, які відрізнялися за розташуванням клітин, мали температурний оптимум росту +25°C, але не росли при +40°C, не утворювали аміак з аргініну і не утилізували лактозу, що свідчить про їх належність до групи *Streptococcus cremoris*.

Виявлено 8 штамів молочнокислих бактерій, які мали більші за розміром клітини, розташовані у вигляді ланцюжків різної довжини, чим різко відрізнялися від інших молочнокислих стрептококів. Вони характеризувалися високою активністю кислотоутворення, не відновлювали лакмусове молоко, володіли низькою резистентністю до *NaCl*, жовчі, метиленового синього, не утворювали аміак з аргініну, мали температурний оптимум росту +45°C. На підставі вищевказаних ознак ці штами молочнокислих стрептококів віднесено до групи *Streptococcus thermophilus*.

Крім того, виділено та ідентифіковано культури молочнокислих бактерій, що мали вигляд паличок, розташованих окремими клітинами або ланцюжками, які погано росли на гідролізованому молоці, мали високу активність кислотоутворення при температурному оптимумі +37...+45°C, що дозволило віднести їх до групи *Lactobacillus bulgaricus*. Виявлено декілька паличок, які мали здатність розвиватися в молоці при *pH* 8,3 з 0,4 % фенолу, 0,3 % метиленового синього, а також у присутності жовчі (їх віднесено до групи *Lactobacillus acidophilus*).

Відібрані штами характеризувались різними спектрами антагоністичної дії. У результаті проведеного скринінгу встановлено, що ступінь антагоністичної активності мезофільних стрептококів значною мірою залежить від біологічних особливостей тест-культури. Більшість виділених штамів (50–80 %) *Streptococcus lactis*, *S. cremoris* виявляли антагоністичну активність відносно до  $G^-$  бактерій: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella sonnei*, *Proteus vulgaris*, але не впливали на ріст дріжджів. Найактивніші антагоністи виявлено серед лактобацил. Кількість антагоністично активних штамів серед виділених культур *Lactobacillus bulgaricus* і *L. acidophilus* відносно  $G^-$  та  $G^+$  тест-культур значно вища, ніж серед мезофільних і термофільних стрептококів і дріжджів (90, 70 та 25 % відповідно).

Виходячи з літературних даних про швидкість нагромадження антимікробних речовин, антагоністичну активність штамів молочнокислих стрептококів визначали у культуральній рідині на першу та п'яту добу, а молочнокислих паличок – на другу та сьому добу інкубації.

Після першої доби культивування, зважаючи на те, що накопичується достатня кількість молочної кислоти, антагоністична дія молочнокислих бактерій значно нижча, ніж після більш тривалого культивування (5–7 діб). Це може свідчити про нако-

пичення в культуральній рідині, крім молочної кислоти, й інших біологічно активних речовин, які мають антагоністичні властивості.

Порівняльне дослідження антагоністичної дії сироватки молочнокислих бактерій проводили при вирощуванні тест-культур на м'ясо-пептонному середовищі з  $pH$  7,0 та 5,5. Встановлено, що прояв дії антагоністично активних речовин залежить від  $pH$  середовища, на якому росли тест-культури. Максимальна антагоністична активність спостерігалась практично у всіх штамів роду *Lactobacillus* при вирощуванні умовно-патогенної мікрофлори на МПА з  $pH$  5,5. Можливо, це пов'язано з антимікробними речовинами, які утворюються молочнокислими бактеріями та слабо дифундують у агарі при нейтральній реакції середовища, набагато краще – при кислій. Дослідження виділених молочнокислих бактерій показало, що у більшості випадків антагоністична активність сильніша у штамів із високою енергією кислотоутворення.

Встановлено бактерицидні та бактериостатичні концентрації даних штамів. Найвищою антибіотичною активністю відносно грамнегативних і грампозитивних бактерій характеризуються культури *Lactobacillus acidophilus* та *L. bulgaricus*, які пригнічували ріст умовно-патогенної мікрофлори у розведеннях 1 : 8 – 1 : 16, порівняно з молочнокислими стрептококами, що інгібували ріст у розведенні 1 : 2 та мали бактериостатичну дію.

### Висновок

Антимікробна активність виділених штамів молочнокислих бактерій у сукупності являє собою явище, обумовлене декількома факторами: продукуванням молочної кислоти, тривалістю культивування молочнокислих бактерій, умовами дослідів і концентрацією антимікробної речовини. Отримання нових штамів відкриває перспективи вивчення прикладних аспектів їх використання.

### Бібліографічні посилання

1. Банникова Л. А. Селекция молочнокислых бактерий и их применение в молочной промышленности. – М.: Пищевая промышленность, 1975. – 255 с.
2. Егоров М. С. Основы учения об антибиотиках. – М.: Высшая школа, 1986. – 446 с.
3. Квасников Е. А. Молочнокислые бактерии в природе и народном хозяйстве / Е. А. Квасников, Н. К. Коваленко, О. А. Нестеренко // Прикл. биохимия и микробиология. – 1982. – Т. 18, № 6. – С. 821–833.
4. Коваленко Н. К. Антагоністична дія молочнокислих бактерій, ізольованих від комах, на ентомопатогенні мікроорганізми / Н. К. Коваленко, О. О. Нестеренко // Мікробіол. журн. – 1974. – Т. 36, № 3. – С. 350–354.
5. Полищук Т. К. Микробиология молока и молочных продуктов / Т. К. Полищук, Э. С. Дербинова, Н. М. Казанцева. – М.: Пищ. пром., 1978. – С. 239.
6. Процагина В. С. Применение лактобактерина, обогащенного лизоцимом, в лечении больных хроническим колитом / В. С. Процагина, Н. Е. Богданович // Материалы III Все-союз. съезда гастроэнтерологов. – М.–Л., 1984. – Т. 2. – С. 135–136.
7. Санация стафилококкового бактерионосительства с учетом внутриклеточного паразитирования возбудителя / О. В. Бухарин, Б. Я. Усвяцов и др. // Актуальные проблемы химиотерапии бактериальных инфекций. Тез. докл. – М., 1991. – Ч. 1. – С. 89–90.
8. 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.
9. Eklund T. The effect of carbon dioxide on bacterial growth and on uptake processes in the bacterial membrane vesicles // Int. J. Food Microbiol. – 1984. – P. 185.
10. Gould G. W. Antimicrobial compound // Biotechnology and Food Ingredients / Eds. I. Goldberg, R. Williams. – New York: Van Nostrand Reinhold, 1991. – P. 461–483.

11. **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.