

ИЗУЧЕНИЕ АНТИМИКРОБНЫХ СВОЙСТВ ЭКЗОПОЛИСАХАРИДОВ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ

Урядова Г.Т.¹, Фокина Н.А.¹, Карпунина Л.В.¹

¹ФГБОУ ВО «Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова», Саратов, e-mail: eni_galina@mail.ru

Были исследованы бактерицидные и фунгицидные свойства экзополисахаридов (ЭПС) *Streptococcus thermophilus* и *Lactococcus lactis* В-1662. Показано, что ЭПС *S. thermophilus* и *L. lactis* В-1662 в зависимости от концентраций (0,06-0,6%) проявляли в разной степени бактерицидное действие в отношении условно-патогенных микроорганизмов: *Escherichia coli* 113-13 и ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* 209-Р, *Pseudomonas aeruginosa* АТ-31 и АТСС 27853, *Xanthomonas campestris* 610 и 611. Кроме того, ЭПС *S. thermophilus* угнетал рост *Klebsiella pneumoniae* К2, а ЭПС *L. lactis* В-1662 – *B. subtilis* 262. Фунгицидная активность ЭПС *S. thermophilus* и *L. lactis* В-1662 в отношении *Candida albicans* 223 и 13108 не была обнаружена. Полученные данные позволяют предположить участие данных экзополисахаридов в антибактериальной активности молочнокислых бактерий.

Ключевые слова: экзополисахариды, антимикробная активность, молочнокислые бактерии, *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis*.

STUDY OF ANTIMICROBIAL AND FUNGICIDAL PROPERTIES OF EXOPOLYSACCHARIDES OF LACTIC ACID BACTERIA

Uryadova G.T.¹, Fokina N.A.¹, Karpunina L.V.¹

¹Saratov State Agrarian University n.a. N.I. Vavilov, Saratov, e-mail: eni_galina@mail.ru

Were studied bactericidal and fungicidal properties of exopolysaccharides (EPS) *Streptococcus thermophilus* and *Lactococcus lactis* B-1662. It was shown that the EPS *S. thermophilus* and *L. lactis* B 1662 depending on concentrations (0.06 - 0.6%) showed varying degrees of bactericidal activity against opportunistic pathogens: *Escherichia coli* 113-13 and ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* 209-P, *Pseudomonas aeruginosa* AT-31 and ATCC 27853, of *Xanthomonas campestris* 610 and 611. Also exopolysaccharide of *S. thermophilus* inhibited the growth of *Klebsiella pneumoniae* K2, EPS of *L. lactis* B-1662 - *B. subtilis* 262. The fungicidal activity of EPS *S. thermophilus* and *L. lactis* B-1662 against *Candida albicans* 223 and 13108 was not detected. These data suggest the participation data exopolysaccharides in the antibacterial activity of lactic acid bacteria.

Keywords: bactericidal and fungicidal properties; lactic acid bacteria; *Streptococcus thermophilus*; *Lactococcus lactis*.

Молочнокислые бактерии, согласно литературным данным [1; 3; 6-8; 10; 11], способны подавлять рост патогенных и условно-патогенных микроорганизмов. Антимикробная активность молочнокислых бактерий определяется наличием различных веществ. Так, бактерицидные свойства *Lactobacillus acidophilus* обусловлены наличием специфических антибиотических веществ, действие которых усиливает совместное присутствие молочной, уксусной и пропионовой кислот [8], *Lactococcus lactis* ВКПМ-В-7699, согласно данным [1], – продуцированием бактерицина (низина). А подавление роста *Salmonella enterica serovar Enteritidis* молочнокислой бактерией *Lactobacillus kefir* достигается за счет большого содержания белков S-слоя [10]. В работах S. Resta-Lenert и К. E. Barrett [11] было показано, что *Lactobacillus acidophilus* и *Lactobacillus rhamnosus* GG обладают антиоксидантным и антимикробным эффектом в отношении *Clostridium difficile* и

Escherichia coli, а *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus plantarum* в отношении *Escherichia coli* за счет продуцирования молочной кислоты.

Имеются сведения, что антимикробной активностью обладают экзополисахариды различных микроорганизмов: ксантан (полисахарид бактерии *Xanthomonas campestris*) [3], среди которых в отношении молочнокислых экзополисахаридов есть единичные сведения: ЭПС-содержащая закваска (сочетающая *Bifidobacterium longum* В379М и *Propionibacterium shermanii* КМ 186 и их полисахариды) [6], лаксаран (экзополисахарид молочнокислой бактерии *Lactobacillus delbrueckii* spp. *buigaricus*) [3].

В связи с этим представлялось интересным изучить антимикробные свойства экзополисахаридов (ЭПС) молочнокислых бактерий *Streptococcus thermophilus* и *Lactococcus lactis* В-1662.

Материалы и методы исследования

Объектами исследования служили ЭПС, выделенные нами ранее [4] из *Streptococcus thermophilus* и *Lactococcus lactis* В-1662. Культура *Streptococcus thermophilus* была получена из ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности» (г. Москва), *Lactococcus lactis* В-1662 – из Всероссийской коллекции микроорганизмов (г. Пущино-на-Оке).

Выделение ЭПС осуществляли по методу J. Cerning с соавт. [9] в нашей модификации.

Антимикробную активность культур ЭПС *S. thermophilus* и *L. lactis* В-1662 определяли, используя метод диффузии в агар [5]. Для этого питательную среду (МПА) в количестве 20 мл разливали в чашки Петри, затем наслаивали 2 мл 0,8%-ного агара, содержащего 0,2 мл соответствующей микробной взвеси (10^6 кл/мл). После застывания агара в лунки вносили по 0,1 мл водного раствора изучаемого ЭПС в концентрации 0,06% и 0,6% [2].

Пробы инкубировали в термостате при температуре, соответствующей температуре выращивания взятых в эксперимент микроорганизмов.

В качестве тест-микробов использовали микроорганизмы, относящиеся к различным таксономическим группам (табл. 1).

Таблица 1

Микроорганизмы, используемые в работе

Микроорганизмы	Место получения
<i>Escherichia coli</i> 113-13	Коллекция кафедры микробиологии и физиологии растений СГУ им. Н.Г. Чернышевского
<i>E. coli</i> ATCC 25922	Музей кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии СГМУ им. В.И. Разумовского
<i>Staphylococcus aureus</i> 209-Р	Музей кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии СГМУ им.

	В.И. Разумовского
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Музей кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии СГМУ им. В.И. Разумовского
<i>Klebsiella pneumoniae</i> K2	Музей кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии СГМУ им. В.И. Разумовского
<i>Xanthomonas campestris</i> 610	Коллекция ризосферных бактерий ИБФРМ РАН
<i>Xanthomonas campestris</i> 611	Коллекция ризосферных бактерий ИБФРМ РАН
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> AT-31	Коллекция ризосферных бактерий ИБФРМ РАН
<i>Bacillus subtilis</i> 262	Коллекция ризосферных бактерий ИБФРМ РАН
<i>Candida albicans</i> 223	Музей кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии СГМУ им. В.И. Разумовского
<i>Candida albicans</i> 13108	Музей культур Саратовский НИВИ Россельхозакадемии

Результаты исследования и их обсуждение

В настоящей работе изучали антимикробные свойства ЭПС *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis* В-1662, которые были выделены нами ранее [4]. Экзополисахариды *S. thermophilus* и *L. lactis* В-1662 представляли собой порошки светло-коричневого цвета, без запаха, не имеющие в своем составе белок и другие примеси, с молекулярной массой 10 кДа и 20 кДа соответственно [4].

В качестве тест-микробов использовали культуры, относящиеся к различным таксономическим группам: *E. coli* 113-13 и ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 и AT-31, *S. aureus* 209-Р, *K. pneumoniae* K2, *B. subtilis* 262, *X. campestris* 610 и 611, *C. albicans* 223 и 13108.

При изучении антибактериального действия ЭПС *S. thermophilus* в концентрациях 0,06% и 0,6% было обнаружено угнетение роста таких бактерий, как *E. coli* 113-13 и ATCC 25922, *S. aureus* 209-Р, *K. pneumoniae* K2 (рис. 1), *P. aeruginosa* AT-31 и ATCC 27853, *X. campestris* 610 и 611. Однако ЭПС, взятый в концентрации 0,6%, оказывал большее бактерицидное действие. Диаметр стерильных зон составлял 21–40 мм (табл. 2).

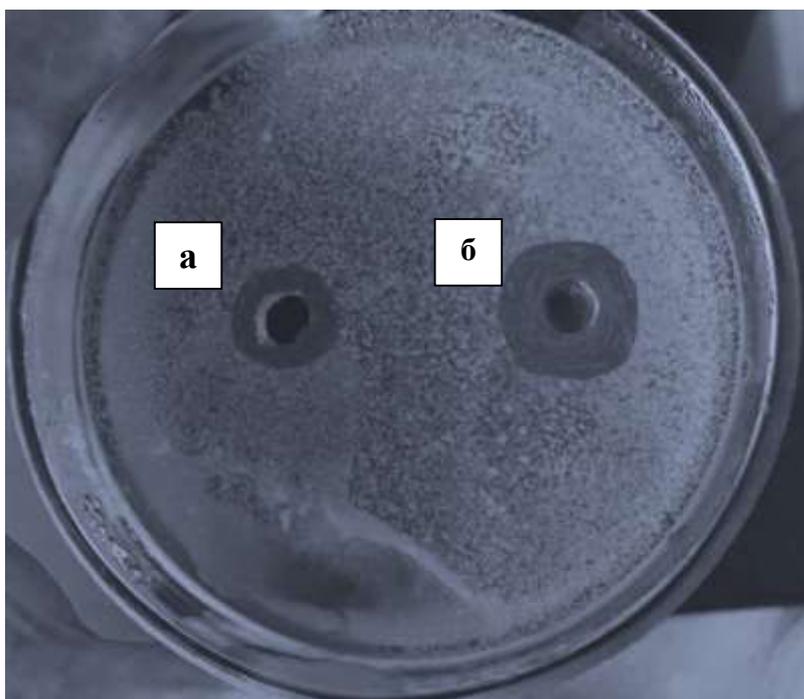


Рис. 1. Влияние ЭПС *Streptococcus thermophilus* (а – 0,06%, б – 0,6%)
на рост *Klebsiella pneumoniae* K2

Таблица 2

Влияние экзополисахарида *Streptococcus thermophilus* на рост некоторых микроорганизмов

Культуры микроорганизмов	Наличие зон подавления роста, мм	
	Концентрация ЭПС	
	0,06%	0,6%
<i>Lactobacillus delbruekii</i> spp. <i>buigaricus</i>	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> B-1662	-	-
<i>Streptococcus thermophilus</i>	-	-
<i>Escherichia coli</i> 113-13	12,2±0,5	23,7±0,5
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	12,0±0,5	21,0±0,5
<i>Staphylococcus aureus</i> 209-P	12,7±0,5	20,5±0,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	13,0±0,5	23,5±0,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> AT-31	13,5±0,5	22,7±0,5
<i>Klebsiella pneumoniae</i> K2	24,0±0,5	40,2±0,5
<i>Bacillus subtilis</i> 262	-	-
<i>Xanthomonas campestris</i> 610	14,7±0,5	22,0±0,5
<i>Xanthomonas campestris</i> 611	15,0±0,5	21,5±0,5
<i>Candida albicans</i> 223	-	-
<i>Candida albicans</i> 13108	-	-

* Примечание: отсутствие угнетения роста (-).

Предварительными исследованиями, проводимыми нами ранее с клетками *S. thermophilus*, из которых был выделен ЭПС [7], было показано, что стрептококки обладали бактерицидными свойствами. Клетки проявляли угнетающее действие в отношении этих же тест-культур, что и ЭПС. Исходя из этого, вполне очевидно предположить, что угнетающее действие на рост бактерий мог оказывать ЭПС *S. thermophilus*.

Изучение влияния ЭПС *L. lactis* В-1662 на рост тест-культур показало, что данный биополимер при концентрации 0,6% оказывал антимикробное воздействие на *S. aureus* 209-Р, *P. aeruginosa* АТ-31 и АТСС 27853, *B. subtilis* 262, *X. campestris* 610 и 611 (рис. 2), а при концентрации 0,06% еще и на *E. coli* 113-13 и АТСС 25922 (табл. 3).

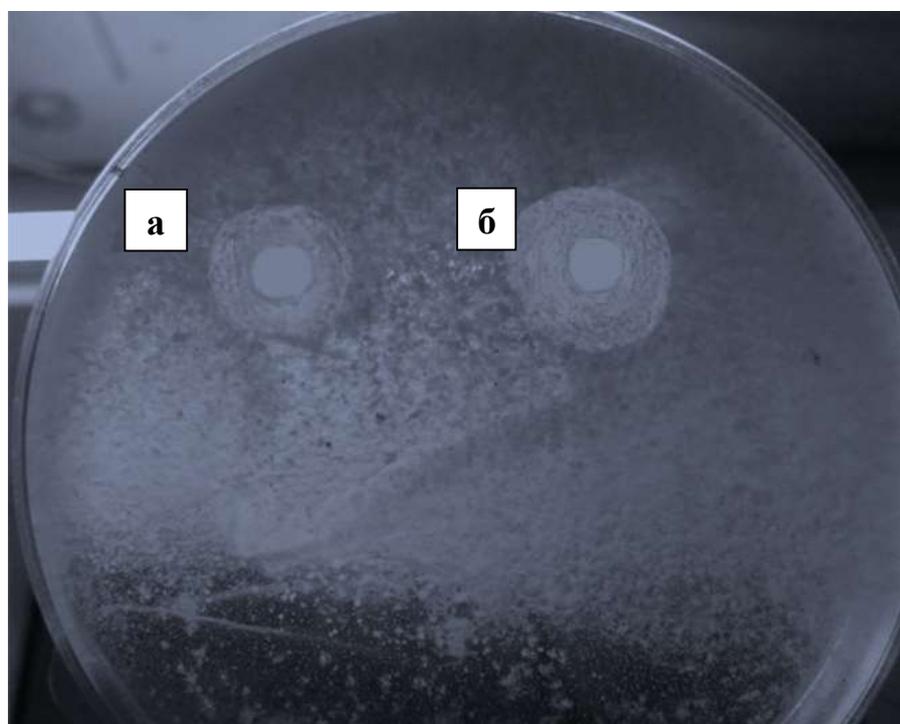


Рис. 2. Влияние ЭПС *Lactococcus lactis* В-1662 (а – 0,06%, б – 0,6%) на рост *Xanthomonas campestris* 611

Таблица 3

Влияние экзополисахарида *Lactococcus lactis* В-1662 на рост некоторых микроорганизмов

Культуры микроорганизмов	Наличие зон подавления роста, мм	
	Концентрация ЭПС	
	0,06%	0,6%
<i>Lactobacillus delbruekii</i> spp. <i>buigaricus</i>	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> В-1662	-	-

<i>Streptococcus thermophilus</i>	-	-
<i>Escherichia coli</i> 113-13	-	18,5±0,5
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	18,0±0,5
<i>Staphylococcus aureus</i> 209-P	12,0±0,5	21,0±0,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	11,7±0,5	18,5±0,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> AT-31	12,0±0,5	18,2±0,5
<i>Klebsiella pneumoniae</i> K2	-	-
<i>Bacillus subtilis</i> 262	11,8±0,5	19,0±0,5
<i>Xanthomonas campestris</i> 610	12,0±0,5	18,0±0,5
<i>Xanthomonas campestris</i> 611	11,7±0,5	18,5±0,5
<i>Candida albicans</i> 223	-	-
<i>Candida albicans</i> 13108	-	-

* Примечание: отсутствие угнетения роста (-).

Так же как и ЭПС *S. thermophilus*, ЭПС лактококка, взятый в концентрации 0,6%, оказывал большее бактерицидное действие, чем в концентрации 0,06%. Диаметр стерильных зон составлял 12-21 мм (табл. 3). Однако диаметр стерильных зон при влиянии ЭПС лактококка был меньше, чем при влиянии ЭПС стрептококка. Ранее нами было показано [7], что клетки *L. lactis* В-1662 проявляли бактерицидные свойства в отношении этих же тест-микробов. Вполне возможно предположить, что угнетающее действие на рост бактерий мог оказывать, как и в случае ЭПС *S. thermophilus*, ЭПС *L. lactis* В-1662.

Для изучения возможной фунгицидной активности ЭПС *S. thermophiles* были взяты грибы *Candida albicans* 223 и 13108. Как показали результаты экспериментов, ЭПС стрептококка не оказывал угнетающего действия на рост этих грибов.

При исследовании влияния ЭПС *L. lactis* В-1662 на рост *C. albicans* 223 и 13108 также не было обнаружено угнетения роста этих штаммов.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что ЭПС молочнокислых бактерий *Streptococcus thermophilus* и *Lactococcus lactis* В-1662 обладают в разной степени способностью угнетать рост некоторых бактерий, в том числе и условно-патогенных, однако на изучаемых грибах это свойство не обнаруживалось.

Основываясь на полученных результатах, мы предполагаем, что антибактериальное действие молочнокислых бактерий, наряду с другими веществами (молочная кислота, антибиотики и др.), может обуславливаться и такими биополимерами, как полисахариды.

Список литературы

1. Биттеева М.Б., Бирюков В.В., Щерблыкин И.Н., Шушеначева Е.В., Осипова В.Г., Минаева Л.П., Стехновская Л.Д., Коваленко Н.В., Милов М.С., Плессер Л.М., Макеев П.П., Барбот В.С. Штамм *Lactococcus lactis* ВКПМ-В-7699 продуцент бактериоцина низина: Патент РФ № 2151796. 2000.
2. Булдаков А.С. Пищевые добавки : справочник. – СПб.: Ut, 1996. – 240 с.
3. Влияние ЭПС бактерий на бактерицидные свойства молочнокислых комплексов / И.В. Фомина, Л.В. Карпунина, Е.Н. Бухарова, Е.В. Полукаров // Вестник Российской военно-медицинской академии. – 2008. – Приложение 2; 3 (23). – С. 338–339.
4. Выделение экзополисахарида *Streptococcus thermophilus* / Г.Т. Урядова, А.Ю. Тяпкин, Н.А. Фокина, Л.В. Карпунина // Актуальные проблемы ветеринарной медицины, пищевых и биотехнологий: материалы Всероссийской научно-практической конференции. – Саратов: Издательский центр «Наука», 2015. – С. 109–113.
5. Лабинская А.С. Микробиология с техникой микробиологических исследований. - М.: Медицина, 1978. – 394 с.
6. Митьпова Н.В. Разработка технологии концентрированной закваски на основе симбиоза пробиотических бактерий: дис. ... канд. тех. наук. – Улан-Удэ, 2007. – 166 с.
7. Урядова Г.Т. Изучение бактерицидных и фунгицидных свойств молочнокислых бактерий / Г.Т. Урядова, Н.А. Фокина, Л.В. Карпунина // Аграрный научный журнал. – 2016. – № 11. – С. 39–41.
8. Antibacterial effect of the adhering human *Lactobacillus acidophilus* strain LB / M.H. Coconnier, V. Lievin, M.F. Bernet-Camard, S. Hudault, A.L. Servin // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 1997. – Vol. 41, № 5. – P. 1046–1052.
9. Cerning J. Isolation and characterization of exocellular polysaccharide produced by *Lactobacillus bulgaricus* / J. Cerning, C. Bouillanne, M.J. Desmazeaud // Biotechnology Letters. – 1986. – Vol. 8. – P. 625–628.
10. Protective action of *Lactobacillus kefir* carrying S-layer protein against *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis* / M.A. Golowcycz, P. Mobili, G.L. Garrote, A.G. Abraham, G.L. De Antoni // International Journal of Food Microbiology. – 2007. – Vol. 118, № 3. – P. 264–273.
11. Resta-Lenert S. Live probiotics protect intestinal epithelial cells from the effects of infection / S. Resta-Lenert, K.E. Barren // Gut. – 2003. – Vol. 52, № 7. – P. 988–997.