

УДК 543.472.3

А.Н. Иркитова, Я.Р. Каган, Г.Г. Соколова

**Антагонистическая активность молочных культур
Lactobacillus acidophilus по отношению
к тест-штаммам *Escherichia coli***

A.N. Irkitova, Ja.R. Kagan, G.G. Sokolova

**Antagonistic Activity of Dairy Cultures
Lactobacillus Acidophilus in Relation
to Test-strains *Escherichia Coli***

Установлено, что все исследованные штаммы *L.acidophilus* проявляют антагонистический эффект к тест-штаммам *E. coli*. Нейтрализация молочной кислоты ослабляет антагонистический эффект. Тест-штамм *E. coli* А-1, выделенный из творога, значительно более устойчив к угнетающему действию *L.acidophilus* по сравнению с коллекционным штаммом Pb-6.

Ключевые слова: *Lactobacillus acidophilus*, *Escherichia coli*, антагонизм, молочная кислота.

It is established that all investigated strains *L.acidophilus* show antagonistic effect to test-strains *E. coli*. Neutralization of dairy acid weakens antagonistic effect. Test-strain *E. coli* A-1 allocated from cottage cheese is more stable against oppressing action of *L.acidophilus* in comparison with collection strain Pb-6.

Key words: *Lactobacillus acidophilus*, *Escherichia coli*, antagonism, lactic acid.

Селектированные штаммы *Lactobacillus acidophilus* используют для приготовления пробиотических продуктов. Одним из обязательных условий отбора таких штаммов является наличие у них выраженной антагонистической активности по отношению к вредной микрофлоре кишечника. Антагонизм обусловлен продуцированием молочной кислоты, которая сама по себе обладает определенным бактерицидным действием и, кроме того, вызывает снижение pH среды до значений, неблагоприятных для многих видов микроорганизмов. Помимо молочной кислоты, некоторые штаммы *L.acidophilus* продуцируют перекись водорода (известную как сильный антисептик) и другие перекисные соединения [1, с. 37], а также специфические полипептиды (бактериоцины), различающиеся по силе и спектру антибиотического действия [2, с. 20]. Для пробиотических целей представляют интерес штаммы ацидофильной палочки, обладающие специфическим антагонизмом.

Цель данного исследования – сравнить антагонистическое действие коллекционных штаммов *L.acidophilus* на тест-штаммы *Escherichia coli* в условиях нейтрализации молочной кислоты, продуцируемой лактобациллами, и без нее.

Материалы и методы исследования. В работе использовали 11 штаммов *L.acidophilus* из коллекции лаборатории микробиологии СибНИИ сыроделия, в том числе 3 дубликата промышленного штамма Ер 317/402 («Нарине»), поступившие в коллекцию

из разных источников. Тест-штаммами кишечной палочки служили коллекционный штамм Pb-6 и дикий штамм А-1, выделенный нами из образца коммерческого творога.

Культуры ацидофильных палочек поддерживали периодическими перевивками (1 раз в 14 суток) в стерильное обезжиренное молоко с инкубацией при температуре 37 °С до образования сгустка (18–20 час.), а культуры тест-штаммов *E.coli* – перевивками с такой же периодичностью в модифицированный бульон Богданова [3, с. 213] с инкубацией в течение 17 часов при температуре 37 °С. Между перевивками все выросшие культуры хранили в холодильнике при температуре 4–6 °С.

Для учета численности клеток в культурах ацидофильных палочек использовали чашечный метод (модифицированный агар Богданова, глубинный посев серийных 10-кратных разведений проб, инкубация в течение 24 часов при температуре 37 °С, подсчет колоний, выросших на чашке с подходящим разведением).

Численность клеток *E. coli* в пробах устанавливали путем посева серийных 10-кратных разведений проб в пробирки с жидкой селективной средой Кесслера с поплавками, инкубации посевов в течение 24 час. при температуре 37 °С, учета бактериального роста в пробирках по наличию газа в поплавках и определения наиболее вероятного числа клеток (НВЧ) в пробах по таблице МакКреди [4, с. 73].

Антагонистическую активность исследуемых штаммов *L. acidophilus* оценивали по степени подавления роста тест-штаммов *E. coli* в жидкой селективной среде Кесслера в присутствии обычных или нейтрализованных молочных культур ацидофильных палочек с учетом соотношения клеток *L. acidophilus*/*E. coli*. Анализ проводили следующим образом: в пробирки с жидкой селективной средой Кесслера, засеянные серийными 10-кратными разведениями того или иного тест-штамма *E. coli*, одновременно с засевом тест-штаммов вносили по 1 мл индивидуальной 24-часовой обычной или нейтрализованной молочной культуры исследуемого штамма ацидофильной палочки. Инкубацию и определение НВЧ тест-штаммов *E. coli* осуществляли, как описано выше. О степени антагонистической активности *L. acidophilus* судили по минимальному соотношению антагонист/тест-культура, при котором происходило полное подавление роста тест-культуры.

Контролем служил посев серийных 10-кратных разведений тест-культуры *E. coli* в пробирки с жидкой селективной средой Кесслера с поплавками, инкубация посева в течение 24 час. при температуре 37 °С.

Нейтрализацию кислых продуктов метаболизма (молочной кислоты) в молочных культурах исследуемых штаммов *L. acidophilus* проводили, смешивая 20 мл 24-часовой молочной культуры с 1 мл стерильного 10% раствора NaOH.

Активную кислотность проб измеряли с помощью рН-метра-милливольтметра рН-410 производства НПКФ «АКВИЛОН», титруемую кислотность, выражаемую в градусах Тернера (°Т), методом титрования по ГОСТ3624-67.

Результаты исследований

1. Исходная численность клеток антагониста и тест-штамма

Предварительно установлено, что в суточных молочных культурах исследуемых штаммов *L. acidophilus* содержалось от $8,6 \cdot 10^7$ (штамм 630) до $1,3 \cdot 10^9$ (штамм В-842) КОЕ/мл. Таким образом, при постановке опыта по определению антагонистической активности в пробирки со средой Кесслера, засеянные различными разведениями тест-штаммов *E. coli*, в среднем попадало 10^8 КОЕ того или иного штамма-антагониста (плюс продукты их метаболизма, содержащиеся в 1 мл культуральной жидкости). В свою очередь, определение численности клеток (НВЧ) в 24-часовых бульонных культурах использованных в работе двух тест-штаммов *E. coli* показало, что они близки по этому показателю и содержат около 10^8 клеток/мл. Следовательно, при посеве в среду Кесслера в пробирки попадало в зависимости от разведения от 10^8 до 10^1 клеток кишечной палочки. Эти данные использовались для расчета минимального соотношения клеток (далее МСК) антагониста/тест-культуры,

при котором наблюдалось полное подавление роста тест-штамма *E. coli*.

2. Активная и титруемая кислотности 24-часовых молочных культур ацидофильных палочек до и после нейтрализации

Результаты определения активной и титруемой кислотности 24-часовых молочных культур исследуемых штаммов *L. acidophilus* до и после их нейтрализации раствором NaOH показали, что штаммы *L. acidophilus* существенно различаются по кислотообразующей способности. Добавление к 24-часовым молочным культурам заданного количества щелочи (1 мл 10% раствора NaOH/20 мл культуры) привело к более или менее полной нейтрализации молочной кислоты только у 3 штаммов ацидофильной палочки (Угличский, Ер 317/402-1 и Омский), тогда как у остальных штаммов отмечено изменение рН культуральной жидкости в щелочную сторону (табл. 1).

3. Антагонистическая активность ацидофильных палочек до нейтрализации

Все исследованные штаммы *L. acidophilus* проявляли антагонистический эффект по отношению к тест-штаммам *E. coli* в разной степени (табл. 2). В варианте с тест-штаммом *E. coli* Pb-6 большинство штаммов ацидофильной палочки (7 из 11) были наиболее активны: они полностью подавляли тест-штамм уже при соотношении 1:1 (МСК=1). В варианте с тест-штаммом *E. coli* А-1 4 из 11 штаммов ацидофильной палочки подавляли тест-штамм при соотношении 1:1 (МСК=1).

Следует отметить, что 2 из 3-х дубликатов штамма Ер 317/402 проявили одинаковую антагонистическую активность и полностью подавляли оба тест-штамма *E. coli* при соотношении 1:1 (МСК=1). Третий дубликат Ер 317/402-3 проявил себя слабее, несмотря на самую высокую титруемую кислотность среди дубликатов этого штамма.

4. Антагонистическая активность ацидофильных палочек после нейтрализации

Нейтрализация культур привела к заметному ослаблению ингибирования тест-штаммов кишечной палочки у всех исследованных штаммов *L. acidophilus* за исключением штаммов Угличский и Омский, однако в целом не изменила порядок распределения исследуемых штаммов по степени проявления ими антагонистической активности (табл. 3).

Штамм Угличский сохраняет 100% антагонистический эффект к обоим тест-штаммам *E. coli* как при нейтрализации молочной кислоты, так и без ее нейтрализации.

В целом следует отметить, что в обоих экспериментах тест-штамм *E. coli* А-1, выделенный из творога, значительно более устойчив к угнетающему действию *L. acidophilus* по сравнению с коллекционным штаммом Pb-6. Это может быть связано с тем, что

Антагонистическая активность молочных культур *Lactobacillus acidophilus*...

штамм А-1 выделен из естественной среды обитания, к которой он хорошо адаптирован, и обладает высокой

степенью устойчивости к заквасочным пробиотическим культурам, в том числе к *L. acidophilus*.

Таблица 1

Активная и титруемая кислотности 24-часовых молочных культур ацидофильных палочек до и после нейтрализации раствором NaOH

№	Штамм <i>L. acidophilus</i>	Активная кислотность, ед. pH		Титруемая кислотность, °Т	
		до нейтрализации	после нейтрализации	до нейтрализации	после нейтрализации
1	97	3,75	4,85	230	70
2	630	4,25	4,90	130	70
3	Угличский	3,90	6,60	180	50
4	Омский	3,60	6,00	190	52
5	Ер 317/402-1	3,60	6,30	200	40
6	Ер 317/402-2	3,79	5,59	190	68
7	Ер 317/402-3	3,60	5,70	210	50
8	ВМ-2	3,65	4,80	230	70
9	НВМ-3	3,75	5,10	210	60
10	В-842	3,90	5,70	190	69
11	В-845	3,55	5,70	220	70

Таблица 2

Антагонистическая активность *L. acidophilus* в отношении *E. coli* без нейтрализации молочной кислоты

№	Штамм <i>L. acidophilus</i>	Минимальное соотношение клеток антагонист/тест-культура <i>E. coli</i> , вызывающее полное подавление роста тест-культуры	
		Pb-6	A-1
1	97	<10 ¹	10 ²
2	Угличский	<10 ¹	<10 ¹
3	630	10 ³	10 ⁴
4	В-842	<10 ¹	10 ³
5	В-845	<10 ¹	10 ²
6	ВМ-2	10 ²	10 ⁴
7	НВМ-3	10 ²	10 ³
8	Омский	<10 ¹	<10 ¹
9	Ер 317/402 - 1	<10 ¹	<10 ¹
10	Ер 317/402 - 2	<10 ¹	<10 ¹
11	Ер 317/402 - 3	10 ²	10 ⁴

Таблица 3

Антагонистическая активность *L. acidophilus* в отношении *E. coli* при нейтрализации молочной кислоты

№	Штамм <i>L. acidophilus</i>	Минимальное соотношение клеток антагонист/тест-культура <i>E. coli</i> , вызывающее полное подавление роста тест-культуры	
		Pb-6	A-1
1	97	10 ²	10 ⁴
2	Угличский	<10 ¹	<10 ¹
3	630	10 ⁴	10 ⁷
4	В-842	10 ⁶	10 ⁸
5	В-845	10 ⁶	10 ⁷
6	ВМ-2	10 ³	10 ⁵
7	НВМ-3	10 ³	10 ⁶
8	Омский	<10 ¹	10 ¹
9	Ер 317/402 - 1	10 ²	10 ³
10	Ер 317/402 - 2	10 ⁶	10 ⁷
11	Ер 317/402 - 3	10 ⁶	10 ⁷

Таким образом, антагонистический эффект ацидофильной палочки во многом обусловлен выделением ею молочной кислоты, создающей неблагоприятные

условия для кишечной палочки. Антагонистический эффект сохраняется при нейтрализации молочной кислоты, но степень этого эффекта значительно понижается.

Библиографический список

1. Jack M., Wood B.J.B., Berry D.R. Evidence for the involvement of thiocyanate in the inhibition of *Candida albicans* by *Lactobacillus acidophilus* // *Microbios.* – 1990. – №250.
2. Машенцева Н.Г. Скрининг молочнокислых микроорганизмов – продуцентов бактериоцинов, перспективных для использования в мясной промышленности // *Биотехнология.* – 2006. – №6.
3. Иркитова А.Н., Каган Я.Р., Сергеева И.Я. Свойства, экологические аспекты и практическое значение ацидофильной палочки. Систематика и культивирование // *Актуальные проблемы техники и технологии переработки молока.* – Вып. 8. – Барнаул, 2001.
4. Методические рекомендации по организации производственного микробиологического контроля на предприятиях молочной промышленности (с атласом значимых микроорганизмов). МР 2.3.2.2327-08. 2008. ГНУ ВНИИМС. 184 с.