

УДК 577.124.23

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

Сравнительный анализ методов определения антагонистической активности молочнокислых бактерий

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

Comparative Analysis of the Methods to Define Antagonistic Activity of Lactic Bacteria

Существующие методы определения антагонистической активности молочнокислых бактерий можно разделить на две группы: методы *in vitro* и *in vivo*. В первой группе штамм-антагонист и тест-культура взаимодействуют в искусственных условиях внешней среды, а во второй – непосредственно в тех естественных условиях, в которых планируется эксплуатировать предполагаемый штамм-антагонист. В обзоре рассмотрены преимущества и ограничения этих методов.

Ключевые слова: антагонизм, молочнокислые бактерии, методы *in vitro* и *in vivo*.

Способность молочнокислых бактерий образовывать антибиотические вещества и за счет этого оказывать бактерицидное и бактериостатическое действие на вредную микрофлору широко используется в пищевой промышленности, медицине, ветеринарии и в сельском хозяйстве. Известно, что антагонистическая активность бактерий осуществляется с помощью разных молекулярных механизмов, а ее проявление зависит от ряда факторов, среди которых прежде всего следует назвать разнообразие взаимодействий антагониста и его жертвы в конкретных условиях внешней среды [1, с. 216–222]. Все разработанные к настоящему времени методы определения антагонистической активности микроорганизмов традиционно принято делить на две группы: методы *in vitro* и *in vivo*.

Так как термин *in vivo* касается только тех случаев, когда средой обитания микроорганизмов является организм хозяина (человека или животного), а примеры практического использования явления микробного антагонизма значительно шире, то, на наш взгляд, более справедливо делить эти методы на методы *in vitro* и *in situ*. Термин *in situ* означает, что явление изучается там, где оно происходит (например, в сыре или в ферментере), без перемещения его в искусственную среду. Таким образом, методы *in vivo* можно рассматривать как частный случай методов *in situ* (см. рисунок).

На первых этапах исследования применяют в основном методы *in vitro*. Они позволяют отсеять не представляющие интереса неактивные или малоактивные штаммы. Дальнейшее исследование проводят

Existing methods to define antagonistic activity of lactic bacteria can be divided into two groups: methods *in vitro* and methods *in vivo*. In the first group the shtamm-antagonist and test culture cooperate in artificial environmental conditions, and in the second – directly in those natural conditions in which the prospective shtamm-antagonist is supposed to use. Advantages and restrictions of these methods are considered in the review

Key words: antagonism, lactic bacteria, methods *in vitro* and *in vivo*.

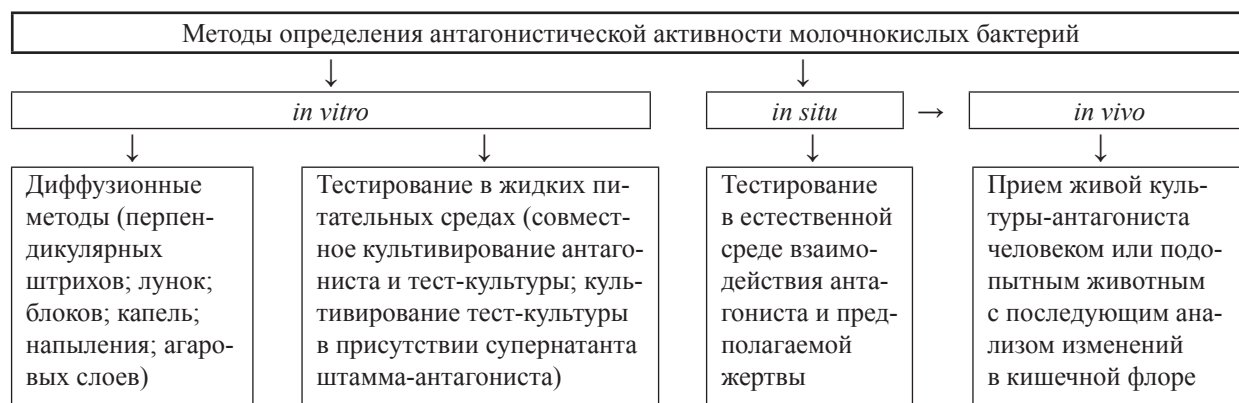
с помощью методов *in situ* (*in vivo*), используя наиболее перспективные штаммы и препараты на их основе.

Методы *in vitro* позволяют быстро проверить большой массив штаммов молочнокислых бактерий и тест-культур нежелательных микроорганизмов (санитарно-показательных, патогенных или технически вредных). К данной группе относятся диффузионные методы и методы тестирования в жидких питательных средах. Диффузионные методы (методы лунок, блоков, перпендикулярных штрихов, капель и т.п.) основаны на диффузии антибиотиков, образуемых испытуемыми штаммами лактобактерий, в толщу агаровой среды, содержащей тест-культуру, и подавлении роста последней.

Согласно методу перпендикулярных штрихов [2, с. 2–43; 3, с. 44; 4, с. 118] на поверхности агаровой среды в чашке Петри высевают штрихом экспоненциальную культуру исследуемого штамма лактобактерий и инкубируют при оптимальной для него температуре в течение определенного времени для образования и диффузии в агар ингибиторных соединений. Затем перпендикулярно от края чашки к штриху выросшей культуры лактобактерий подсевают штрихом экспоненциальную культуру тест-штамма (например *E. coli*). Чашку вновь инкубируют, но теперь при условиях, благоприятных для роста тест-культуры. О наличии и степени антагонистической активности у испытуемой лактобактерии судят по величине зоны ингибирования тест-штамма на границе со штрихом роста лактобактерии. На одной чашке к лактобактерии можно

подсеять несколько тест-культур и таким образом выявить спектр антагонистического действия данной лактобактерии. Используемая агаровая среда должна обеспечивать хороший рост как испытуемого штамма лактобактерий, так и тест-штаммов. Для объективной оценки антагонистического действия лактобактерий, выявляемого этим методом, необходимо учитывать, что он дает преимущество штаммам, которые продуцируют ингибиторные соединения небольшой

молекулярной массы, быстрее диффундирующие в толщу агарового слоя и, следовательно, дающие более обширные зоны ингибирования роста тест-культуры. Этот метод имеет, однако, существенный недостаток: продуцент антибиотического вещества и тест-организм выращивают на одной среде, но не всегда одна и та же среда одинаково благоприятна как для продуцента и образования им антибиотика, так и для роста тест-организма.



Согласно методу лунок [3, с. 114; 5, с. 68; 6, с. 44; 7, с. 78–82] в слое агара, содержащего тест-штамм, пробочным сверлом вырезается лунка диаметром 5–7 мм и в нее помещают определенное количество жидкой или полужидкой среды с выросшей культурой исследуемого штамма лактобактерий. Чашку Петри выдерживают в холодильнике, затем в термостате и измеряют зону ингибирования тест-штамма вокруг лунки. Методом лунок можно определять антагонистическую активность чистых и смешанных молочных культур лактобактерий, например, сравнить по этому показателю различные коммерческие кисломолочные продукты. К недостаткам метода можно отнести опасность подтекания жидкости с культурой лактобактерий из лунки в щель между агаром и дном чашки, что ведет к искажению результата. Избежать подтекания можно путем формирования лунки, не доходящей до дна чашки, используя при заливке чашки агаровой средой соответствующие шаблоны. Альтернативный вариант – применение двухслойного агара (нижний слой – плотный агар, верхний – полужидкий агар, каждый слой по 10 см³/чашку), при этом лунка вырезается только в верхнем слое.

При использовании метода блоков [3, с. 112] испытуемую культуру лактобактерий высевают глубинным способом в питательный агар в чашке Петри и инкубируют в оптимальных условиях для образования и накопления в агаре ингибиторных соединений. Затем стерильным пробочным сверлом вырезают агаровый блок с выросшей культурой лактобактерии и устанавливают его в другой чашке Петри на поверхности агаровой среды, только что засеянной культурой тест-штамма. Чашку выдерживают

в течение определенного времени в холодильнике (во избежание преждевременного роста тест-штамма) для диффузии ингибиторных соединений из блока в толщу агара с тест-штаммом, а затем инкубируют в условиях, оптимальных для тест-штамма. О степени антагонистической активности испытуемой лактобактерии судят по величине зоны ингибирования роста тест-штамма вокруг агарового блока. В отличие от метода перпендикулярных штрихов, метод блоков дает возможность сравнить на одной чашке несколько (4–8) штаммов лактобактерий к данной тест-культуре. Кроме того, метод позволяет использовать разные по составу питательные среды: одну (блок) – для испытуемой лактобактерии, другую – для данного тест-штамма. Кроме того, он удобен для изучения влияния состава питательной среды на продукцию ингибиторных соединений исследуемым штаммом лактобактерий.

При использовании метода агаровых слоев [8, с. 37–39] применяют модификации, позволяющие дифференцировать продукцию бактериоцинов (высокая молекулярная масса) и микроцинов (низкая молекулярная масса). В первом случае на поверхность плотной питательной среды МРС-4 наносят бляшками (4–8) лактобациллы и культивируют при температуре 37 °С в течение 48 ч. Далее на крышку чашки наносят 5 мл хлороформа, оставляя чашки перевернутыми в течение 5 мин. Убитые в парах хлороформа бактерии помещают в термостат на 30 мин для испарения хлороформа. Затем на чашки наслаивают 0,7% полужидкий мясо-пептонный агар с равномерно распределенной в нем тест-культурой и вновь культивируют при 37 °С в течение ночи. Положительный результат

учитывают по появлению вокруг бляшки зоны отсутствия роста. Во втором случае с целью индикации микроцинов на поверхность плотной среды МРС-4 с нанесенными, выросшими и обработанными в парах хлороформа бляшками накладывают стерильный целлофан. Сверху на целлофан наносят 3 мл 0,7% агара, содержащего 10^7 клеток тест-культуры, взятой в экспоненциальной фазе роста. Культуры инкубируют 18–20 ч при 37 °С. Вокруг колоний, продуцирующих микроцины, появляются зоны задержки роста индикаторных штаммов. Несомненное преимущество данного метода – возможность дифференцировать продукцию бактериоцинов, а недостаток – высокая трудоемкость процесса.

Согласно методу капель [9, с. 54] на поверхность подсушенной агаровой среды наносят капли культур лактобактерий и после инкубации чашек Петри (для роста лактобактерий и продуцирования ими ингибиторных веществ) сверху агара наливают слой полужидкой агаровой среды, содержащей тест-штамм, и вновь инкубируют (до появления зон ингибирования роста тест-штамма).

Н.А. Глушанова и др. [9, с. 114–117] модифицировали метод капель следующим образом: суточную культуру пробиотика, выращенную на жидкой питательной среде, наносят на поверхность плотной среды в чашки Петри бактериологической петлей диаметром 2–3 мм и оставляют при комнатной температуре до полного впитывания капли. После этого, отступив 1–2 мм от края первого пятна, наносят каплю суточной испытуемой культуры, выращенной на той же питательной среде. Растекаясь, вторая капля заходит на пятно культуры пробиотика примерно на половину диаметра. В наложенной части культуры развиваются при взаимном присутствии (совместное культивирование), конкурируя друг с другом. Свободные части пятен каждой культуры служат контролем жизнеспособности каждой из культур и всхожести питательной среды. После подсыхания капли второй культуры чашки с посевами инкубируют крышкой вниз при оптимальной температуре. Предварительный учет результатов проводят через 18–20 ч инкубации, окончательный учет – через 48 ч. Результат опыта учитывают визуально по наличию признаков подавления одной культуры другой. Антагонистическую активность бактерий оценивают по числу подавляемых ими штаммов тестируемых микроорганизмов (в процентах). Этот метод представляет интерес, поскольку в данном случае, в отличие от диффузионных методов (методов «отсроченного антагонизма»), происходит непосредственное взаимодействие исследуемых партнеров.

Оригинальный вариант диффузионного чашечного метода предложен Е.И. Заборских для выявления антагонистически активных клонов, образующихся после мутагенной обработки лактобактерий [10,

с. 318–321]. По этому методу серийные разведения мутагенизированных клеточных суспензий высевают на поверхность агаровой среды и после инкубации при условиях, оптимальных для данного штамма лактобактерий, отбирают чашки, в которых количество выросших изолированных колоний не превышает 30. Методом реплик Ледерберга [11, с. 245–247] колонии с этих чашек переносят в чашки с плотной агаровой средой (количество чашек-реплик соответствует числу используемых тест-штаммов). Чашки-реплики инкубируют при оптимальных условиях для образования и диффузии в агар ингибиторных веществ, а затем опрыскивают взвешями клеток соответствующих тест-штаммов. После дополнительной инкубации чашек-реплик при условиях, оптимальных для тест-штаммов, с исходных чашек отбирают клоны, давшие на чашках-репликах наибольшие зоны ингибирования роста тест-штаммов. Этот метод по производительности многократно превосходит описанные выше диффузионные методы, однако его использование грозит опасностью загрязнения лаборатории взвешями тест-культур, что весьма ограничивает возможность его применения.

Согласно второй группе методов *in vitro* (методы тестирования в жидких питательных средах) тест-культуру выращивают в оптимальной для нее жидкой питательной среде, к которой добавлено то или иное количество бесклеточной культуральной жидкости исследуемого штамма-антагониста, или тест-штамм совместно выращивают со штаммом-антагонистом. О наличии и степени антагонистического действия судят по угнетению роста [11, с. 245–247] или метаболической активности [12, с. 97] тест-штамма в сравнении с контролем (параллельная культура тест-штамма без добавления бесклеточной культуральной жидкости исследуемой лактобактерии). О росте тест-штамма судят по численности клеток (определяют турбидиметрическим методом или высевом разведений на плотную среду с последующим подсчетом КОЕ), а о его метаболической активности – по какому-либо характерному для тест-штамма наглядному признаку, например по скорости восстановления трифенилтетразолия [10, с. 318–321].

Наибольший интерес, с нашей точки зрения, представляет метод совместного культивирования молочнокислых бактерий с тест-организмами, поскольку он позволяет в естественной для молочнокислых бактерий среде (например в молоке) определить их антагонистические свойства. Из инновационных методов выявления антагонистической активности бактерий в жидкой среде следует обратить внимание на экспресс-тест, основанный на ингибировании биолюминисценции у специально сконструированного индикаторного штамма *Escherichia coli lum+C-50* [13, с. 97]. Авторы с помощью этого метода сравнивают антагонистическую активность зарубежных препаратов

и новых отечественных комплексных пробиотиков. Анализ заключается в совместном 24-часовом культивировании испытуемого пробиотика с индикаторным штаммом при температуре 20 °С с периодическим измерением интенсивности люминисценции с помощью люминометра «Биотокс-10М». Индекс антагонистической активности препарата выражается в виде цифрового показателя, соответствующего проценту снижения интенсивности свечения индикаторного штамма. Признавая несомненную оригинальность этого метода, укажем, что температура совместного инкубирования пробиотика и индикаторной культуры, используемая в данном методе, далека от оптимальной как для кишечной палочки, так и для лактобактерий. А также остается открытым вопрос, не оказало ли влияние включение чужеродного гена, ответственного за люминисценцию индикаторной культуры, на ее чувствительность к антагонистическому действию испытуемых пробиотических препаратов.

Методы *in situ (in vivo)*. Методы изучения антагонистической активности микроорганизмов *in situ* являются наиболее трудоемкими, но и признаются наиболее объективными. К этим методам переходят после того, как опытным путем доказана антагонистическая активность того или иного штамма молочнокислых бактерий в условиях *in vitro*.

Методы *in situ* могут быть осуществлены путем проведения опытных выработок, например, сыров или кисломолочных продуктов с точным соблюдением всех параметров соответствующего технологического процесса, с использованием в закваске испытуемого штамма-антагониста при заданном исходном уровне

заражения тест-микробом и учетом последующей численности этого тест-микроба в полуфабрикатах и готовом продукте. Они могут также заключаться в постановке опытных выработок продукта с использованием штамма-антагониста и статистическом учете численности естественной санитарно-показательной микрофлоры этого продукта в сравнении с контрольными выработками.

В свою очередь, методы *in vivo* предусматривают скармливание подопытным животным, инфицированным тест-микробом, штамма-антагониста с последующим выявлением тест-микроба в кале или прием пробиотических препаратов людьми при различных дисбиотических состояниях с последующим анализом качественных и количественных изменений в микрофлоре кишечника.

Данные методы используют при клинических испытаниях уже готовых пробиотических препаратов, бакконцентратов, заквасок и т.п. Применение этих методов позволяет не только выявить степень влияния штамма-антагониста и тест-штамма друг на друга, но и проследить их взаимодействие как с естественной кишечной микрофлорой, так и с организмом хозяина в целом. Организм животного или человека в данном случае – среда, в которой молочнокислые бактерии будут проявлять антагонистический эффект к тест-штамму. Здесь имеют место совокупность действий, многофакторность, комплексность условий, в которых происходит этот процесс, поэтому полученные результаты наиболее значимы для промышленного и медицинского применения антагонистически активных штаммов молочнокислых бактерий.

Библиографический список

1. Иркитова А.Н., Каган Я.Р., Сергеева И.Я. Свойства, экологические аспекты и практическое значение ацидофильной палочки // Актуальные проблемы техники и технологии переработки молока : сб. науч. тр. СибНИИС СО РАСХН. – Барнаул, 2011. – Вып. 8.
2. Практикум по микробиологии / под ред. А.И. Нетрусова. – М., 2005.
3. Аникиев В.В., Лукомская К.А. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. – М., 1977.
4. Глушанова Н.А. и др. Исследование ауто-, изо- и гомоантагонизма пробиотических штаммов лактобацилл // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2005. – №6(44).
5. Синюшина М.Н., Самсонова М.Н. Руководство к практическим занятиям по медицинской микробиологии. – М., 1974.
6. Методические указания по селекции мезофильных молочнокислых бактерий в состав бактериальных заквасок и препаратов для мелких сычужных сыров. МУ ВНИИМС 01.86.02.89.
7. Червинец Ю.В., Бондаренко В.М., Шабанова Н.А., Самоукина А.М., Червинец В.М. Бактериоциногенные

высокоантагонистические штаммы лактобацилл // Микробиология. – 2006. – №7.

8. Глушанова Н.А., Блинов А.И., Бахаев В.В. Об антагонизме пробиотических лактобацилл // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2004. – №6.

9. Заборских Е.И. Антагонистическая активность мезофильных молочнокислых стрептококков и их экспериментальная селекция : дис. ... канд. биол. наук. – Иркутск, 1976.

10. Lederber I., Lederber E. Replica plating and indirect selection of bacterial mutante // J. Bacteriol. – 1952. – V. 63.

11. Банникова Л.А. Селекция молочнокислых бактерий и их применение в молочной промышленности. – М., 1975.

12. Долгих Я.В., Несчислаев В.А., Белова И.В. Сравнительная характеристика поликомпонентных пробиотиков // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2011. – №4/1.

13. Попова-Барзашка С., Коршунов В.М., Тарабрина Н.П., Боссарт Б. Определение антагонистической активности лактобактерий Солко при использовании гнотобиологической технологии // Микробиология. – 1990. – №9.