

АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ МЕТАБОЛИТНЫХ КОМПЛЕКСОВ ЛАКТОБАЦИЛЛ В ОТНОШЕНИИ *Pseudomonas aeruginosa*

© 2024 г. С.А. Кишилова*,#, А.Ю. Колоколова*, И.В. Рожкова*

*Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности,
Люсиновская ул., 35/7, Москва, 115093, Россия

#E-mail: s_kishilova@vnimi.org

Поступила в редакцию 28.02.2024 г.

После доработки 07.03.2024 г.

Принята к публикации 13.03.2024 г.

Целью работы была сравнительная оценка антагонистической активности коллекционных штаммов *Lactobacillus helveticus* NK1, *Lacticaseibacillus rhamnosus* F, грибковой кефирной закваски и их метаболитных комплексов по отношению к представителям штаммов *Pseudomonas aeruginosa*. В результате проведенных исследований подтверждена высокая антагонистическая активность коллекционных лактобацилл, грибковой кефирной закваски и их метаболитных комплексов относительно условно-патогенных бактерий *P. aeruginosa*, как коллекционного типового штамма, так и изолятов дикого типа. Штамм *L. helveticus* NK1 зарекомендовал себя как более активный антагонист *P. aeruginosa* по сравнению с *L. rhamnosus* F, что, возможно, связано с его способностью к образованию пептидов с антимикробным действием. Полученные данные подтверждают перспективность использования штамма *L. helveticus* NK1 и грибковой кефирной закваски для разработки кисломолочного продукта, обогащенного метаболитами пробиотических культур. Полученные результаты обосновали дальнейшие исследования по определению механизмов их антимикробного действия.

Ключевые слова: *Pseudomonas aeruginosa*, коллекционные лактобациллы, штаммы-антагонисты, метаболитные комплексы.

DOI: 10.31857/S0006302924020141, EDN: OTWPBZ

Поиск безопасных и эффективных антипатогенных агентов является в настоящее время актуальным направлением исследований. Перспективным объектом изучения могут являться представители пробиотических молочнокислых микроорганизмов и вырабатываемые ими метаболитные комплексы [1]. Особенностью лактобацилл является способность сбрасывать сахара с образованием ряда антимикробных комплексов: органических кислот — молочной, уксусной, пропионовой, масляной; бактериоцинов; перекиси водорода; антимикробных бактериоциноподобных ингибирующих субстанций [2–4]. Их использование можно рассматривать как метод естественной защиты от патогенов, а также для разработки инновационных технологий с применением метаболитных комплексов для различных областей промышленности [5–8]. Отмечено, что *Lactobacillus plantarum* и его метаболиты оказывали сильное ингибирующее действие на продукцию молекул, определяющих кворум у *Pseudomonas aeruginosa* [9]. Исследование 57 штаммов лактобацилл позволило выделить два штамма,

идентифицированных как *Lactobacillus fermentum*, с мощным ингибирующим действием на рост штаммов *Pseudomonas aeruginosa* с множественной лекарственной устойчивостью [10]. Таким образом, действие *Lactobacillus* может включать в себя, кроме выработки антимикробных метаболитов, способность конкурировать с патогеном, не допуская первичной адгезии нежелательного микроорганизма на поверхности. [11].

Исследования штаммов лактобацилл из коллекции пробиотических и молочнокислых микроорганизмов ФГАНУ «ВНИМИ» проводятся сотрудниками института в течение ряда лет. Подтверждены их антимикробные свойства в отношении условно патогенных представителей энтеробактерий [2, 3].

Подтверждены выраженные антимикробные свойства штамма *L. rhamnosus* F по отношению к госпитальному штамму *Klebsiella pneumoniae* 10898 с множественной антибиотикорезистентностью. С использованием штамма *L. rhamnosus* F разработана ассоциация заквасочных микроорга-

низмов, обладающих пробиотическими свойствами. В настоящий момент ведутся исследования разработки обогащенного кисломолочного продукта на основе данной ассоциации и метаболитных комплексов *Lactobacillus helveticus* H9 [5].

Грибковая кефирная закваска представляет собой симбиоз молочнокислых микроорганизмов, дрожжей и уксуснокислых бактерий и включает в себя представителей рода *Lactobacillus*. В результате работ, проводимых нами ранее, было установлено, что кефир, выработанный на кефирных грибах, обладает выраженной антагонистической активностью по отношению к патогенной и условно-патогенной микрофлоре [12]. По данным ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии», кефир оказывал угнетающее действие на рост грибов рода *Candida*, протей и стафилококка у детей, принимавших продукт [13]. Известно, что кефир обладает значительным антимикробным действием, так как содержит метаболитный комплекс, включающий в себя сильнейший антисептик — молочную кислоту, перекись водорода, лизоцим и вещества с антибиотической активностью — реутерин, плантарицин [14]. Согласно результатам исследований антипатогенных свойств национальных продуктов, кефир и айран проявляли выраженную способность замедлять рост и подавлять жизнедеятельность ряда патогенных бактерий. Наиболее сильный антимикробный эффект наблюдался относительно *Salmonella typhimurium* и *Staphylococcus aureus* — 60.0% и 55.7% соответственно. При этом ингибирующее действие кефира на кишечную палочку было на 21.2% выше, чем у айрана [13]. Доказательства того, что кефир может предотвратить диарейный энтероколит, спровоцированный *Clostridium difficile*, приведены в работах по исследованию защитных свойств смеси молочнокислых бактерий и дрожжей, выделенных из кефирного грибка в экспериментальной модели острой кишечной инфекции [12, 13]. В работе [14] авторы показали, что бесклеточный супернатант метаболитов, полученный в результате культивирования кефирных грибов, обладал выраженными бактериостатическими свойствами по отношению к *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* и *E. coli*.

Целью данного исследования являлось определение антимикробной активности *Lactobacillus helveticus* NK1 и *Lacticaseibacillus rhamnosus* F (старое название *Lactobacillus rhamnosus*), эффективных антагонистов энтеробактерий, а также кефирной закваски относительно типового коллекционного штамма *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25668 и двух «диких» штаммов *Pseudomonas aeruginosa*, выделенных с доильных аппаратов молочной фермы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования являлись *Lactobacillus helveticus* NK1 и *Lacticaseibacillus rhamnosus* F, выделенные из желудочно-кишечного тракта здоровых людей, находящиеся в коллекции микроорганизмов Всероссийского научно-исследовательского института молочной промышленности, и грибковая кефирная закваска. Штаммы *P. aeruginosa* 42 и *P. aeruginosa* 47 были выделены с цехового оборудования (доильных аппаратов) частной молочной фермы. Предположительным источником контаминации являлась вода из скважины, используемая для мытья помещений и оборудования. Идентификацию выделенных штаммов проводили согласно ГОСТ ISO 16266-2018 «Качество воды. Обнаружение и подсчет *Pseudomonas aeruginosa*. Метод мембранной фильтрации» и МР «Обнаружение и идентификация *Pseudomonas aeruginosa* в объектах окружающей среды (пищевых продуктах, воде, сточных жидкостях)» от 24 мая 1984 года. В качестве контрольного использовали типовой штамм *Pseudomonas aeruginosa* 25668, полученный из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболensk». Коллекционные штаммы лактобактерий хранили в лиофилизированном состоянии. Восстановление культур лактобацилл проводили в стерильном обезжиренном коммерческом молоке марки «Стандарт» («Комплимилк», Слуцкий сыродельный комбинат, Слуцк, Беларусь) путем инкубации при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 24 ч. Для исследования использовали 24-часовые культуры, вторую генерацию. Грибковую кефирную закваску получали согласно «Инструкции по приготовлению и применению заквасок для кисломолочных продуктов на предприятиях молочной промышленности» ФГАНУ «ВНИМИ, утверждена 27.09.2022 г. Штаммы *Pseudomonas aeruginosa* культивировали на среде СПА («Агар сухой питательный») производства Научно-производственного Центра ООО «Биокомпас-С» (Углич Ярославской обл., Россия). Для исследования использовали 24-часовые культуры. Для определения способности пробиотических штаммов *L. helveticus* NK1 и *L. rhamnosus* F, грибковой кефирной закваски и их метаболитных комплексов подавлять рост штаммов *Pseudomonas aeruginosa* использовали метод совместного культивирования согласно МУ 2.3.2.2789-10 [15]. При совместном культивировании в 20 см³ стерильного обезжиренного молока вносили по 1 см³ инокулятов лактобацилл, грибковой кефирной закваски и суспензий штаммов *Pseudomonas aeruginosa* и инкубировали в течение 24 и 48 ч при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ при сокультивирова-

Таблица 1. Сравнение чувствительности к антибиотикам штаммов *P. aeruginosa* 42, *P. aeruginosa* 47 (дикого типа) и коллекционного штамма *P. aeruginosa* 25668

Штамм <i>P. aeruginosa</i>	Зона подавления роста, мм					
	ампициллин	азитромицин	гентамицин	тетрациклин	левомицетин	линкомицин
25668	R	22	20	11	12	R
42	R	22	22	12	12	R
47	R	20	20	7	10	R

Примечание. R – резистентный.

нии с лактобациллами и температуре $22 \pm 1^\circ\text{C}$ – при сокультивировании с грибковой кефирной закваской. Контролем являлись монокультуры *Pseudomonas aeruginosa*, выращенные в тех же условиях. По окончании инкубирования проводили подсчет клеток *Pseudomonas aeruginosa*, выросших в монокультуре и при совместном культивировании с лактобациллами и грибковой кефирной закваской на среде СПА.

Для исследования антибиотикорезистентности штаммов *Pseudomonas aeruginosa* использовали диско-диффузионный метод согласно МУК 4.2.1890–04 [16].

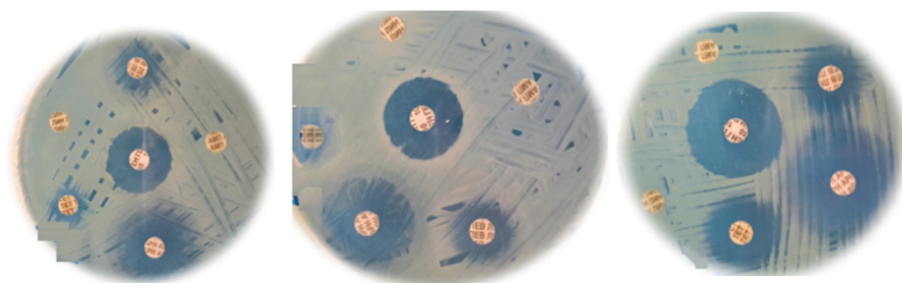
Результаты учитывали через 24 и 48 ч инкубирования при $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Все результаты представлены по данным трех независимых экспериментов. Построение таблиц и графиков проводили с использованием программ Microsoft Office. Результаты исследования обработаны с применением программ Statistica 10 и MS Excel 2003. Поиск литературы осуществляли по научным базам данных eLIBRARY.ru и Google Scholar.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При культивировании наблюдались фенотипические отличия выделенных штаммов от типового *P. aeruginosa* ATCC 25668. Так, *P. aeruginosa* 42 и *P. aeruginosa* 47 демонстрировали существенно более выраженное пигментообразование на агаре для псевдомонад и на СПА. Исходя из того, что пигментообразование коррелирует с вирулентностью [17], сравнили чувствительность выделенных штаммов и коллекционного *P. aeruginosa* 25668 к ряду антибиотиков на предмет обнаружения возможной резистентности и разницы в чувствительности к антибиотикам у выделенных штаммов.

Данные по чувствительности штаммов *P. aeruginosa* к антибиотикам представлены в табл. 1.

Из табл. 1 видно, что у всех трех штаммов наблюдалась устойчивость к линкомицину и ампициллину. Чувствительность к гентамицину, левомицетину и азитромицину была примерно одинакова. У *P. aeruginosa* 42 зона подавления роста гентамицином и тетрациклином была даже несколько больше по сравнению с контролем. Штамм *P. aeruginosa* 47 показал большую устойчивость к тетрациклину (примерно в два раза) по от-

**Рис. 1.** Зоны подавления антибиотиками роста штаммов *P. aeruginosa*.

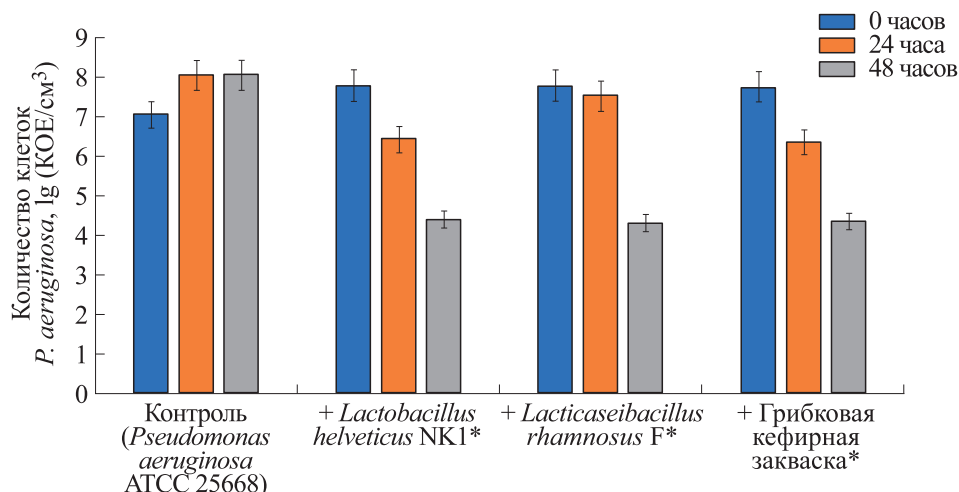


Рис. 2. Изменение количества клеток *P. aeruginosa* ATCC 25668 в монокультуре и при сокультивировании с лактобациллами и грибковой кефирной закваской.

ношению к *P. aeruginosa* 42 и контрольному штамму. Зоны подавления роста штаммов антибиотиками на плотной среде показаны на рис. 1.

Для определения способности пробиотических штаммов *Lactobacillus helveticus* NK 1, *Lacticaseibacillus rhamnosus* F и грибковой кефирной закваски подавлять рост штаммов *P. aeruginosa* определяли их антагонистическую активность методом совместного культивирования. Результаты, полученные с помощью электронной микроскопии, продемонстрировали, что реакция патогенов на ингибирующее действие лактобацилл при совместном культивировании проявляется в возрастании доли лизированных и покоящихся клеток, разрушении клеточных органелл. У самих лактобацилл наблюдалось увеличение толщины клеточной стенки и образование на ее поверхности дополнительных слоев [18].

Данные по антагонистической активности при совместном культивировании типового штамма *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25668, коллекционных лактобацилл и грибковой кефирной закваски представлены на рис. 2.

Анализ полученных данных показал, что динамика подавления роста *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25668 при сокультивировании с штаммом *Lactobacillus helveticus* NK 1 и грибковой кефирной закваской на вторые сутки была примерно одинакова и снижалась на один порядок — до $2.7 \cdot 10^6$ КОЕ/см³ и до $2.2 \cdot 10^6$ КОЕ/см³ соответственно по сравнению с контролем. В монокультуре в то же время наблюдался рост — с $5.1 \cdot 10^7$ до $1.1 \cdot 10^8$ КОЕ/см³. Антагонистическое действие

Lacticaseibacillus rhamnosus F через 24 ч сокультивирования было минимально и составило $3.4 \cdot 10^7$ КОЕ/см³. Ингибирующее действие на *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25668 через 48 ч сокультивирования во всех трех вариантах было примерно одинаковым: количество клеток составило $2.0 \cdot 10^4$ — $2.6 \cdot 10^4$ КОЕ/см³, снижаясь на три порядка. Исследования, проведенные ранее, показали, что при сокультивировании с госпитальным штаммом *Klebsiella pneumonia* с множественной устойчивостью к антибиотикам разных групп именно штамм *Lacticaseibacillus rhamnosus* F показал высокую антагонистическую активность уже на вторые сутки с дальнейшим снижением количества патогена, в то время как *Lactobacillus helveticus* NK 1 не проявил значительного антагонистического эффекта [3].

Данные по антагонистической активности при совместном культивировании выделенного штамма *Pseudomonas aeruginosa* 42, коллекционных лактобацилл и грибковой кефирной закваски представлены на рис. 3.

Через 24 ч сокультивирования *Lactobacillus helveticus* NK 1 с *Pseudomonas aeruginosa* 42 антагонистическая активность не проявлялась и количество клеток оставалось на том же уровне, что и в исходной точке. Через 48 ч сокультивирования отмечено снижение количества клеток патогена на три порядка, оно составило $2.5 \cdot 10^3$ КОЕ/см³.

Антагонистическое действие *L. rhamnosus* F также через 24 ч сокультивирования не проявлялось, наблюдался рост синегнойной палочки по сравнению с исходной точкой — количество

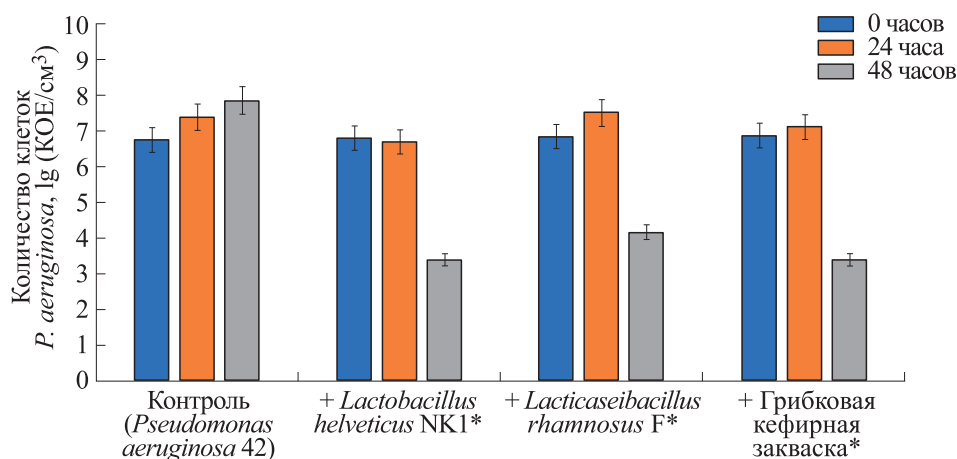


Рис. 3. Изменение количества клеток *P. aeruginosa* 42 в монокультуре и при сокультивировании с лактобациллами и грибковой кефирной закваской.

клеток при сокультивировании составило $3.2 \cdot 10^7$ КОЕ/см³. Через 48 ч антагонистическое действие было выраженным — наблюдалось снижение количества клеток *P. aeruginosa* 42 на два порядка по сравнению с исходным значением, оно составило $1.5 \cdot 10^4$ КОЕ/см³.

При сокультивировании *P. aeruginosa* 42 с грибковой кефирной закваской отмечалась тенденция, аналогичная результатам, полученным для *L. rhamnosus* F, где через 24 ч отмечался рост культуры на порядок. Однако через 48 ч сокультивирования антагонистическое действие было более выраженным, наблюдалось снижение количества клеток *P. aeruginosa* на три порядка, их количество составило $2.5 \cdot 10^3$ КОЕ/см³.

Данные по антагонистической активности при совместном культивировании выделенного штамма *P. aeruginosa* 47, коллекционных лактобацилл и грибковой кефирной закваски представлены на рис. 4.

При сокультивировании с *L. helveticus* NK1 через 24 ч количество клеток *P. aeruginosa* 47 снижалось с $2.0 \cdot 10^7$ КОЕ/см³ до $1.0 \cdot 10^7$ КОЕ/см³ (на четыре порядка). Влияние *L. rhamnosus* F на рост *P. aeruginosa* 47 практически отсутствовало. Количество клеток *P. aeruginosa* 47 при сокультивировании составило $1.9 \cdot 10^7$ КОЕ/см³ по сравнению с $2.1 \cdot 10^7$ КОЕ/см³ в контроле. На вторые сутки сокультивирования антагонистический эффект *L. rhamnosus* F возрастал и количество клеток *P. aeruginosa* 47 снижалось на четыре порядка. Ин-

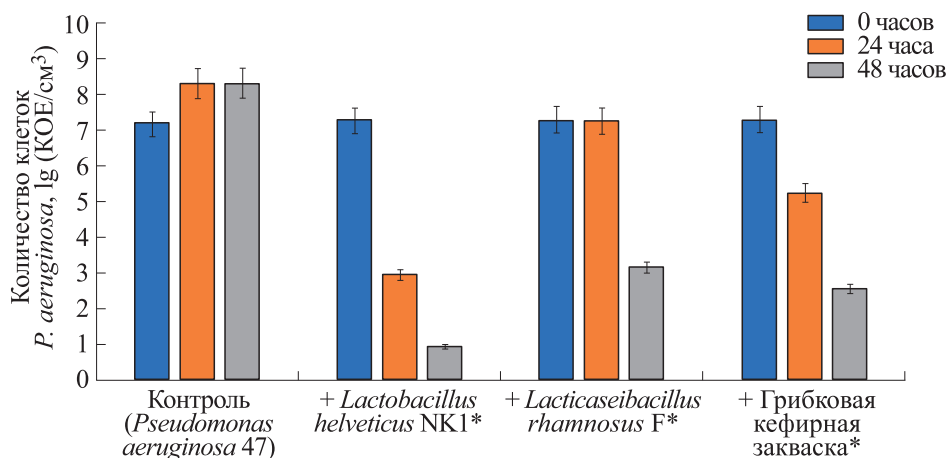


Рис. 4. Изменение количества клеток *P. aeruginosa* 47 в монокультуре и при сокультивировании с лактобациллами и грибковой кефирной закваской.

ингибирующий эффект грибковой кефирной закваски был менее заметным — количество клеток *P. aeruginosa* 47 снижалось на два порядка — с $1.9 \cdot 10^7$ КОЕ/см³ до $1.9 \cdot 10^5$ КОЕ/см³. При этом в монокультуре наблюдался рост с $2.3 \cdot 10^7$ КОЕ/см³ до $2.1 \cdot 10^8$ КОЕ/см³.

Анализ полученных данных показал различия в степени подавление роста *Pseudomonas aeruginosa* 47 при сокультивировании с *L. helveticus* NK1, *L. rhamnosus* F и грибковой кефирной закваской как через 24 ч, так и через 48 ч инкубирования, что подтверждает штаммоспецифичность антагонистического действия на патоген. Так, через 24 ч сокультивирования наибольший ингибирующий эффект на *P. aeruginosa* оказывал штамм *L. helveticus* NK1, количество клеток патогена снижалось до $1.6 \cdot 10^3$ КОЕ/см³. Однако ингибирующий эффект грибковой кефирной закваски и *L. helveticus* NK1 был еще более ощутимым и составил $7 \cdot 10^2$ и менее 10^2 КОЕ/см³ соответственно.

Проведенные ранее исследования антагонистической активности штаммов *L. helveticus* NK1 и *L. rhamnosus* F в отношении ряда полирезистентных госпитальных штаммов *Klebsiella pneumoniae* показали, что наибольший антагонистический эффект отмечался у штамма *L. helveticus* NK1, в то время как штамм *L. rhamnosus* F имел меньшую степень подавления, но более широкий спектр действия на патогенные штаммы [2]. В работе [3], также проведенной ранее в ФГАНУ «ВНИМИ», подтвердилась антагонистическая эффективность *L. rhamnosus* F по отношению к изоляту *Klebsiella pneumoniae* 10898, полученному из Национального медицинского исследовательского центра хирургии им. Вишневого (Москва, Россия), в то время как штамм *L. helveticus* NK1 в отношении данного госпитального штамма не проявлял значительного антагонистического эффекта. Известна способность лактобацилл проявлять избирательную активность в отношении различных видов патогенных бактерий. При исследовании антимикробного действия 21 штамма лактобацилл в отношении госпитальных штаммов *Clostridium difficile* были выделены три наиболее активных штамма, у которых подтвердилось наличие бактериоцинов [19]. Исследования *L. rhamnosus* F при совместном культивировании с *Klebsiella pneumoniae* продемонстрировали наличие в его секрете большого спектра литических ферментов (трансликозилаз) [2], действие которых на клеточную стенку грамотрицательных бактерий сходно с действием бактериофагов (лизис). Возможны и другие механизмы, дающие этому штамму

возможности ингибировать широкий круг патогенов. Полученные данные дали основания предположить значительную антимикробную эффективность штамма *L. rhamnosus* F также относительно представителей *P. aeruginosa*. Однако результаты показали, что наибольшее ингибирующее действие на «дикие» штаммы синегнойной палочки оказывал штамм *L. helveticus* NK1, причем в случае с *P. aeruginosa* 47 подавление роста составляло практически 100%. Есть данные об антимикробной активности пептидов, образующихся в результате действия протеаз молочнокислых бактерий на казеин — основной белок молока [4]. В проведенном ранее исследовании антагонистической активности штаммов *L. rhamnosus* F и *L. helveticus* NK1 относительно *Klebsiella pneumoniae* в зависимости от питательной среды культивирования методом диффузии в агар показано, что при инкубировании на бульоне MRS зона ингибирования *L. rhamnosus* F превышает зону ингибирования патогена штаммом *L. helveticus* NK1 почти в два раза, а при культивировании на молоке различия практически отсутствовали [3]. Полученные нами результаты выраженной антагонистической активности штамма *L. helveticus* NK1 при инкубировании на молоке могут косвенно подтвердить предположение о его способности образовывать антимикробные пептиды как ответ на стрессовое условие — присутствие в ростовой среде бактерий другого вида. Многочисленные исследования различных видов лактобацилл свидетельствуют, что у отдельных штаммов при стрессовых воздействиях могут включаться специфические метаболические пути, что приводит к изменениям в составе их секретомов [20, 21].

В процессе культивирования наблюдались отличия в характере роста культур *P. aeruginosa* на молоке. При культивировании монокультуры *P. aeruginosa* 42 отмечались визуальные выраженные признаки порчи молока — образование плотного пористого сгустка, расслоение, изменение цвета. Контрольный тест-штамм не оказывал на молоко столь значительного разрушающего действия, визуально фиксировалось только некоторое изменение цвета. Для *P. aeruginosa* 47 было характерно сильное пигментообразование в среде инкубирования, сгустки отсутствовали, наблюдался характерный для *P. aeruginosa* поверхностный пленочный рост (рис. 5). Это свидетельствует о различиях биохимической активности выделенных диких штаммов по сравнению с коллекционным и, возможно, более высокой у них активности протеолитических ферментов.

Оценка характера роста на молоке чистой культуры *P. aeruginosa* 47 и при совместном куль-

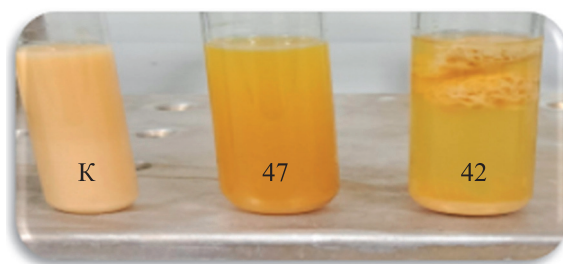


Рис. 5. Характер роста штаммов *P. aeruginosa* ATCC 25668, *P. aeruginosa* 42 и *P. aeruginosa* 47 на молоке через 48 ч инкубирования.

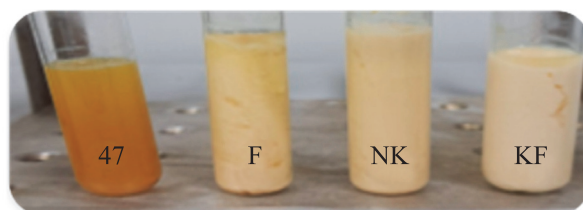


Рис. 6. Характер роста монокультуры (*P. aeruginosa* 47) при сокультивировании с *L. rhamnosus* (F), *L. helveticus* (NK1) и грибковой кефирной закваской (KF) через 48 ч.

тивировании *P. aeruginosa* 47 с *L. rhamnosus* F, *L. helveticus* NK1 и грибковой кефирной закваской представлена на рис. 6.

На основе полученных данных можно судить о соответствии визуальных изменений среды инкубирования (молока) с антагонистическим действием культур. В монокультуре отмечается изменение цвета молока с поверхностным пленочным ростом *P. aeruginosa* 47.

При сокультивировании с *L. rhamnosus* F наблюдается незначительное изменение цвета молока. При совместном инкубировании с *L. helveticus* NK1 с грибковой кефирной закваской, проявивших более высокую антимикробную активность, заметные визуальные изменения среды культивирования не наблюдались.

Полученные данные могут свидетельствовать о вариативности штаммов *P. aeruginosa*, циркулирующих на одном предприятии и возможности их мутаций.

ВЫВОДЫ

Подтверждена высокая антагонистическая активность коллекционных лактобацилл, грибковой кефирной закваски и их метаболитных комплексов относительно условно-патогенных бактерий *P. aeruginosa*, как коллекционного типового штамма, так и изолятов дикого типа. Штамм *L. helveticus* NK1 зарекомендовал себя как более

активный антагонист *P. aeruginosa* по сравнению с *L. rhamnosus* F, что, возможно, связано с его способностью к образованию пептидов с антимикробным действием. Полученные данные подтверждают перспективность использования штамма *L. helveticus* NK1 и грибковой кефирной закваски для разработки кисломолочного продукта, обогащенного метаболитами пробиотических культур.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках Государственного задания (шифр темы FNSS-2022-0004).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андреева С. В., Бахарева Л. И. и Нохрин Д. Ю. Видовой состав микрофлоры ожоговых ран пациентов Челябинского областного ожогового центра. *Вестн. Челябинского гос. ун-та*, № 7 (298), 58–59 (2013).

2. Рожкова И. В., Бегунова А. В., Васина Д. В., Кубанова М. Х., Крупенин Т. В. Шарапченко, С. О. и Габриэлян Н. И. Антагонистическая активность *Lactobacillus* spp. в отношении госпитальных штаммов *Klebsiella* spp. *Вестн. трансплантологии и искусственных органов*, **20** (S1), 180–180 (2018). DOI: 10.7868/S05551099118030054
3. Кишилова С. А., Терехова Р. И., Рожкова И. В. и Юрова Е. А. Сравнительная оценка антагонистической активности коллекционных лактобацилл в отношении полирезистентных *Klebsiella pneumoniae*. *Вопросы питания*, **92** (6), 120–127 (2023). DOI: 10.33029/0042-8833-2023-92-6-00-00
4. Кручинин А. Г. и Агаркова Е. Ю. Биологически активные пептиды молока: обзор. *Пищевая промышленность*, № 12, 92–96 (2020). DOI: 10.24411/0235-2486-2020-10151
5. Savinova O. S., Glazunova O. A., Moiseenko K. V., Begunova A. V., Rozhkova I. V., and Fedorova T. V. Exoproteome analysis of antagonistic interactions between the probiotic bacteria *Limosilactobacillus reuteri* LR1 and *Lactocaseibacillus rhamnosus* F and multidrug resistant strain of *Klebsiella pneumonia*. *Int. J. Mol. Sci.*, **22** (20), 10999 (2021). DOI: 10.3390/ijms222010999
6. Zimina M., Babich O., Prosekov A., Sukhikh S., Ivanova S., Shevchenko M., and Noskova S. Overview of global trends in classification, methods of preparation and application of bacteriocins. *Antibiotics*, **9** (9), 553 (2020). DOI: 10.3390/antibiotics9090553
7. Стоянова Л. Г. Выделение и идентификация молочнокислых бактерий *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* с антимикробным действием. *Изв. Тимирязев. с.-х. акад.*, № 5, 41–61 (2017). DOI: 10.26897/0021-342X-2017-5-41-61
8. Файзуллина Р. А., Самороднова Е. А. и Федотова О. Б. Кисломолочные продукты в питании детей раннего возраста: эволюция от традиционных к функциональным. *Рос. вестн. перинатологии и педиатрии*, **64** (4), 133–140 (2019). DOI: 10.21508/1027-4065-2019-64-4-133-140
9. Valdez J. C., Peral M. C., Rachid M., Santana M., and Perdigon G. Interference of *Lactobacillus plantarum* with *Pseudomonas aeruginosa* in vitro and in infected burns: the potential use of probiotics in wound treatment. *Clin. Microbiol. and Infection*, **11** (6), 472–479 (2005). DOI: 10.1111/j.1469-0691.2005.01142.x
10. Shokri D., Khorasgani M. R., Mohkam M., Fatemi S. M., Ghasemi Y., and Taheri-Kafrani A. The inhibition effect of lactobacilli against growth and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, **10** (1), 34–42 (2018). DOI: 10.1007/s12602-017-9267-9
11. Пиядина А. Ю. Воздействие антибактериальных веществ на рост и развитие биопленок клинических изолятов. В кн. *Фундаментальные и прикладные исследования: от теории к практике* (2018), сс. 245–250.
12. Каледина М. В., Федосова А. Н. и Байдина И. А. Антипатогенная активность национальных кисломолочных напитков. *Пищевая промышленность*, № 10, 72–75 (2019). DOI: 10.24411/0235-2486-2019-10163
13. Bolla P. A., Carasi P., de los Angeles Bolla M., De Antoni G. L., and de los Angeles Serradell M. Protective effect of a mixture of kefir-isolated lactic acid bacteria and yeasts in a hamster model of *Clostridium difficile* infection. *Anaerobe*, **21**, 28–33 (2013). DOI: 10.1016/j.anaerobe.2013.03.010
14. Garrote G. L., Abraham A. G., and De Antoni G. L. Inhibitory power of kefir: the role of organic acids. *J. Food Protection*, **63** (3), 364–369 (2000). DOI: 10.4315/0362-028X-63.3.364
15. МУ 2.3.2789-10 «Продовольственное сырье и пищевые продукты. Методические указания по санитарно-эпидемиологической оценке безопасности и функционального потенциала пробиотических микроорганизмов, используемых для производства пищевых продуктов».
16. МУК 4.2.1890-04 «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам».
17. Pang Z., Raudonis R., Glick B. R., Lin T. J., and Cheng Z. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnol. Adv.*, **37** (1), 177–192 (2019). DOI: 10.1016/j.biotechadv.2018.11.013
18. Рыбальченко О. В. и Бондаренко В. М. Образование биопленок симбионтными представителями микробиоты кишечника как форма существования бактерий. *Вестн. Санкт-Петербургского университета. Медицина*, № 1, 179–186 (2013).
19. Сухина М. А., Шелыгин Ю. А., Жуховицкий В. Г., Фролов С. А., Кашников В. Н., Веселов А. В. и Чистякова Д. А. Перспективы использования антагонистической активности лактобацилл для подавления роста *Clostridium* (*Clostridioides*) *difficile*. *Эксперим. клин. гастроэнтерология*, № 12 (160), 19–24 (2018). DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-160-12-19-24
20. Calasso M., Di Cagno R., De Angelis M., Campanella D., Minervini F., and Gobbetti M. Effects of the peptide pheromone plantaricin A and cocultivation with *Lactobacillus sanfranciscensis* DPPMA174 on the exoproteome and the adhesion capacity of *Lactobacillus plantarum* DC400. *Appl. Environ. Microbiol.*, **79** (8), 2657–2669 (2013). DOI: 10.1128/AEM.03625-12
21. Агаркова Е. Ю. и Кручинин А. Г. Ферментативная конверсия как способ получения биологически активных пептидов. *Вестн. Мурманского гос. техн. ун-та*, **21** (3), 412–419 (2018). DOI: 10.21443/1560-9278-2018-21-3-412-419

Antimicrobial Activity of Metabolite Complexes of *Lactobacillus* against *Pseudomonas aeruginosa*

S.A. Kishilova*, A.Y. Kolokolova*, and I.V. Rozhkova*

**All-Russian Dairy Research Institute, Lyusinovskaya ul. 35/7, Moscow, 115093 Russia*

The aim of the work was to carry out a comparative evaluation of antagonistic activities of collection strains *Lactobacillus helveticus* NK1 and *Lacticaseibacillus rhamnosus* F, fungal kefir starter culture and their metabolite complexes against representatives of *Pseudomonas aeruginosa* strains. The results obtained confirmed high activities of collection strains lactobacilli, fungal kefir starter culture and their metabolite complexes against opportunistic pathogenic bacteria *P. Aeruginosa*, used both as a type strain from culture collection and a wild-type isolate. Compared with *L. rhamnosus* F, the strain *L. helveticus* NK1 is regarded as an active antagonist of *P. aeruginosa*. It might be due to the ability of *L. helveticus* NK1 to create peptides with the antimicrobial effect. Our findings demonstrate perspectives on the application of the strain *L. helveticus* NK1 and fungal kefir starter culture in the development of fermented dairy products enriched with metabolites of probiotic cultures. Further research is needed to determine the mechanisms of the antimicrobial action of these metabolites.

Keywords: Pseudomonas aeruginosa, collection strains lactobacilli, antagonist strains, metabolite complexes