

УДК 579.24+579.222

ПРОДУКЦИЯ АНТИМИКРОБНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В КЛЕТКАХ *LACTOBACILLUS BREVIS*

© 2024 г. Н. А. Сидорова^а, *, А. И. Савушкин^а

^аПетрозаводский государственный университет, Петрозаводск, 185035, Россия

*e-mail: vanlis@petrsu.ru

Поступила в редакцию 13.10.2023 г.

После обработки 29.05.2024 г.

Принята к публикации 30.05.2024 г.

В результате выполненного исследования получены первичные данные по кинетике роста и продукции антимикробных соединений бактериями *Lactobacillus brevis* 2kGv22-17. В условиях эксперимента изучен антибактериальный эффект суспензии лактобактерий, протопластов и внутриклеточная антибактериальная активность в лизатах клеток. Кинетика роста оценена в статических условиях с помощью персонального биореактора RTS-1C. Антагонистическая активность лактобактерий исследована в серии экспериментов с использованием в качестве индикаторных тест-культур *Cytophaga psychrophila* IM-87, *Flexibacter columnaris* IM-216 и *Pseudomonas fluorescens* IM-43. Опытным путем подтверждена способность исследуемых лактобактерий к продукции антимикробных соединений в экспоненциальной фазе роста. Наиболее выраженный эффект подавления роста обнаружен в присутствии протопластов лактобактерий.

Ключевые слова: антимикробные соединения, микробный антагонизм, кинетика роста, лизаты клеток, протопласты, фазы роста, *Lactobacillus brevis*

DOI: 10.31857/S0026365624050174

Одной из распространенных форм взаимоотношений микроорганизмов в природе является антагонизм, при котором бактерии одного вида угнетают жизнедеятельность представителей других видов. При изучении антагонистической активности пробиотиков (Бухарин и соавт., 2010, 2014) и описании механизмов влияния ассоциативных микроорганизмов на антагонистическую активность бактерий (Семенов и соавт., 2011) установлено, что ассоцианты способны стимулировать антагонизм, влиять на него индифферентно, вызывать ингибирующий или инвертирующий эффекты. Микроорганизмы в составе филлосферы и эндосферы растений отвечают за антагонизм к большому спектру фитопатогенов *Erysiphe graminis*, *Cladosporium fulvum*, *Phytophthora* sp. и др. (Каблова и соавт., 2015), повышают продуктивность растения, контролируют реакции адаптации к стрессам и прямой стимуляции роста растений (Lamont et al., 2017). Лактобактерии, выделенные из микрофлоры растений, способны вырабатывать органические кислоты и ряд антимикробных соединений, что сделало их незаменимыми при консервировании продуктов растительного и животного происхождения (de Vuyst, Vandamme, 1994) и использования в качестве пробиотиков (Naidu et al., 1999).

Для реализации цели исследования, направленной на изучение особенностей продукции антимикробных соединений лактобактериями, использован штамм *Lactobacillus brevis* 2kGv 22-17, выделенный из эпифитной микрофлоры еже сборной (*Dactylis glomerata*). Штамм *Lactobacillus brevis* 2kGv 22-17 предоставлен сотрудниками ООО “Микробиом” инновационного сектора Петрозаводского госуниверситета из фонда Коллекции молочнокислых бактерий лаборатории микробиологии. Кинетику роста лактобактерий и время достижения максимальной оптической плотности оценивали на жидкой среде MRS (Man et al., 1960) в статических температурных условиях персонального биореактора RTS-1C (“Biosan”, Латвия) с программным обеспечением и функцией контроля роста микроорганизмов в режиме реального времени.

Определение способности лактобактерий продуцировать антимикробные соединения выполняли на основе метода диффузии антибактериальных субстанций в агар [ОФС.1.2.4.0010.15.]. Для проведения эксперимента использовали ночную культуру молочнокислых бактерий, которую выращивали в среде MRS в течение 12 ч (Kurokawa, Ying, 2017). Для исследования продукции антимикробных соединений клетками *L. brevis* использовали

плотную питательную среду, состоящую из ГМФ бульона (ООО “НИЦФ”, Россия) — 30 г/л, агара бактериологического Васто (“BD”, США) — 17 г/л и глюкозы — 10 г/л. Среду разливали в стерильные чашки Петри в два слоя. После застывания нижнего слоя, в чашку Петри вносили верхний слой питательной среды, которую предварительно смешивали с суспензией, находящейся в стационарной фазе роста индикаторной культуры, в объеме 10 мл. В качестве индикаторных или тест-культур использовали *Cytophaga psychrophila* IM-87, *Flexibacter columnaris* IM-216 и *Pseudomonas fluorescens* IM-43, предоставленные сотрудниками лаборатории микробиологии НИЦ по аквакультуре Петрозаводского госуниверситета из фонда Коллекции ассоциативной микрофлоры рыб. В готовой среде на равном расстоянии друг от друга делали лунки диаметром около 5 мм. В лунки вносили по 0.1 мл микробной суспензии лактобактерий *L. brevis* 2kGv 22-17 (опыт 1), протопласты (опыт 2) и лизат клеток (опыт 3). Посевы выдерживали при температуре $21 \pm 2^\circ\text{C}$ в течение 1–2 ч, чтобы обеспечить равномерное распределение и рост микроорганизмов. Затем посевы культивировали при температуре $37.0 \pm 0.2^\circ\text{C}$ в течение 16–18 ч, после чего регистрировали зоны задержки роста бактериального газона вокруг лунок. Диаметры зон угнетения роста индикаторных микроорганизмов оценивали с точностью до 0.1 мм. Протопласты лактобактерий готовили из культуры, выращенной в MRS бульоне в течение 12 ч. Клетки осаждали на центрифуге SIGMA 1-15P при 3000 об./мин в течение 10 мин. Супернатанты обрабатывали лизоцимом (“AppliChem”, Германия) в концентрации 1.5 мг/л в присутствии стабилизатора

осмотического давления 0.5% NaCl и фильтровали через мембранные фильтры “MF-Millipore” (диаметр пор 0.22 мкм) (Алешина и соавт., 2017). Для получения лизатов клеток использовали 70% изопропанол и 0.1% трифторуксусную кислоту, согласно методу определения антимикробной активности лизата клеток (Field et al., 2008; Миралимова и соавт., 2016).

Все эксперименты ставили в трехкратной повторности, статистическую обработку данных выполняли на основе программы Statistica 6.0.

В результате культивирования в статических условиях за 58 ч эксперимента получена характеристика роста культуры *L. brevis* 2kGv 22-17. На основе данных по культивированию лактобактерий с использованием биореактора RTS-1C построен типовой график роста лактобактерий. Данные обработаны с помощью программного обеспечения Grant Instruments “Labvise”, которое позволяет контролировать рост микроорганизмов в режиме реального времени. В процессе культивирования использовалось вихревое перемешивание ингредиентов (Vortextypemixing) с интервалом в 10 мин. Адаптация микроорганизма к условиям культивирования длилась в течение 11 ч. С 12 по 21 ч отмечалась стадия экспоненциального роста, с последующим переходом в стадию стационарного роста, что соответствовало 2.14 OD и значениям μ (h^{-1}) — 0.02 в 130 точке измерения. Установлено, что антагонистическая активность выявляется в культуре в период экспоненциальной фазы, которая длилась в течение 9 ч. Также антибактериальная активность сохраняется в среде и при переходе развития культуры в стационарную стадию роста и продолжается в течение 37 ч (рисунок).

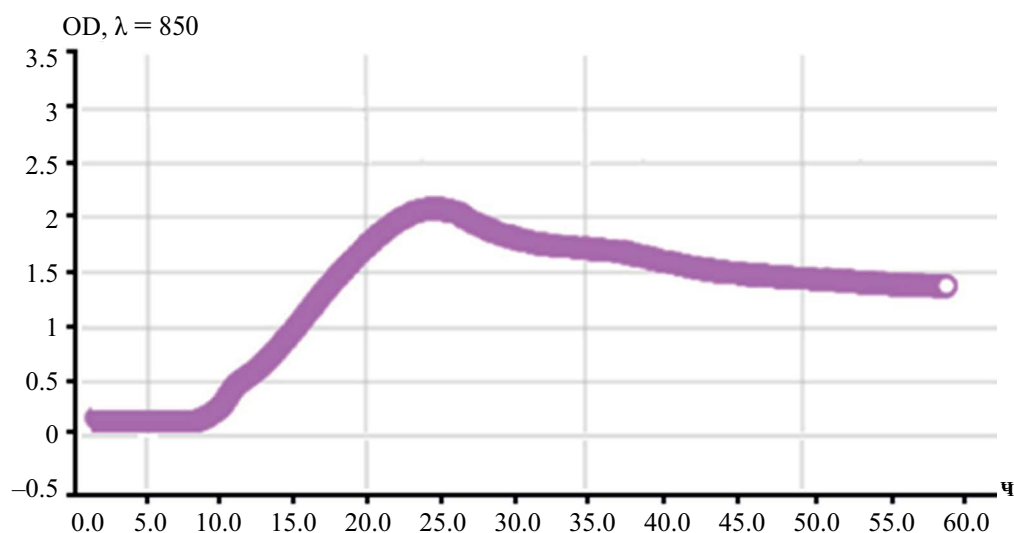


Рисунок. Кривая непрерывного роста бактерий *L. brevis* 2kGv 22-17 в жидкой среде MRS при 37°C с периодическим вихревым перемешиванием в течение 58 ч с интервалом каждые 10 мин.

Таблица. Диаметр зоны задержки роста индикаторных тест-культур

Тест-культуры	Микробная суспензия, опыт 1	Протопласты, опыт 2	Лизат клеток, опыт 3
	Зона торможения роста тест-культур, мм		
<i>C. psychrophila</i> IM-87	9.8 ± 0.2	18.6 ± 0.8	0
<i>F. columnaris</i> IM-216	9.3 ± 0.2	18.2 ± 0.4	0
<i>P. fluorescens</i> IM-43	11.4 ± 0.2	21.3 ± 0.6	0

В присутствии суспензии лактобактерий *L. brevis* 2kGv 22-17 антимикробная активность проявлялась в виде незначительного подавления роста индикаторных микроорганизмов. Средние значения диаметра зоны задержки роста тест-культур *C. psychrophila*, *F. columnaris* и *P. fluorescens* находились в пределах от 9.30 ± 0.2 мм (для *F. columnaris*) до 11.4 ± 0.2 мм (для *P. fluorescens*). Присутствие лизатов исследуемых бактерий не привело к антибактериальному эффекту в отношении индикаторных видов бактерий, во всех вариантах опыта наблюдалось проявление роста культур. Наиболее выраженной антимикробной активностью обладали только протопласты штамма *L. brevis* 2kGv, о чем свидетельствовали большие зоны торможения роста для *P. fluorescens* (21.3 ± 0.6 мм), *C. psychrophila* (18.6 ± 0.8 мм) и *F. columnaris* (18.2 ± 0.4 мм). Наибольший бактерицидный эффект обнаружен в отношении псевдомонад. Зоны торможения роста тест-культур в присутствии микробной суспензии, протопластов и лизата клеток *L. brevis* 2kGv 22-17 представлены в таблице.

В результате изучения продукции антимикробных соединений в клетках *L. brevis* 2kGv 22-17 установлено, что наиболее выраженной антимикробной активностью обладают протопласты исследуемых лактобактерий. Наибольший эффект подавления роста тест-культуры обнаружен в отношении *P. fluorescens*. В присутствии протопластов лактобактерий зона торможения роста индикаторного микроорганизма достигала 21 мм. Благодаря выполненному исследованию кинетики роста *L. brevis* 2kGv 22-17 установлено, что адаптация исследуемых бактерий к условиям культивирования длится 11 ч, экспоненциальная фаза — 9 ч и стабильная стационарная фаза роста — 37 ч. Учитывая особенность молочнокислых бактерий продуцировать антимикробные соединения в разные периоды роста микропопуляции, применение данного подхода позволяет с высокой точностью по большому количеству заданных параметров, таких как температура культивирования, оптическая плотность, удельная скорость роста, продолжительность лаг-фазы, фазы экспоненциального роста и стационарной фазы, проанализировать и предсказать физиологическое состояние микроорганизма для объективного мониторинга за его антагонистической активностью. Бактерии *L. brevis* 2kGv 22-17

способны продуцировать антимикробные соединения в процессе роста на питательной среде MRS при исходном pH 6.2 и постоянном контроле температуры биопроцесса 37°C. Продукция антибактериальных соединений начинается через 12 ч после начала культивирования в экспоненциальной фазе роста, что подтверждается данными других исследователей (Todorov, 2005). Наиболее выраженный антагонизм исследуемого штамма *L. brevis* 2kGv 22-17 выявлен в случае использования протопластов продуцента, в присутствии которых величина задержки роста индикаторных тест-культур изменялась от 1.2 до 21.3 см. Полученный эффект можно связать с тем, что антимикробным соединениям *L. brevis* 2kGv 22-17 не надо преодолевать барьер в виде клеточной стенки, за счет чего и возрастает обнаруженное бактерицидное действие.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 322-23 (Соглашение № 23-16-20026), проводимого совместно с Республикой Карелия с финансированием из Фонда венчурных инвестиций Республики Карелия (ФВИ РК).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Алешина. Е.С., Дроздова Е.А., Романенко Н.А. Культивирование микроорганизмов как основа биотехнологического процесса: учебное пособие. Оренбург: ООО ИПК “Университет”, 2017. С. 49–52.

- Бухарин О.В., Семенов А.В., Черкасов С.В. Характеристика антагонистической активности пробиотических бактерий при их взаимодействии // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2010. Т. 12. С. 347-352.
- Бухарин О.В., Перунова Н.Б., Иванова Е.В. Бифидофлора при ассоциативном симбиозе человека. Екатеринбург: ИКВС, 2014. 210 с.
- Каблова М.А., Шурхно Р.А., Сироткии А.С. Молочно-кислые бактерии в сельскохозяйственном производстве // Вестник технологического университета. 2015. Т. 18. № 23. С. 145-149.
- Миралимова Ш.М., Огай Д.К., Кукишена Г.Д., Ибрагимова А., Сохибназарова Х. Синтез бактериоциноподобного вещества штаммом, выделенным из квашеной капусты // Научный результат. Медицина и фармация. 2016. Т. 2. № 3. С. 1-8.
- Семенов Л.В., Черкасов С.В. Влияние ассоциативных микроорганизмов на антагонистическую активность бактерий // Вестник Новосибирского гос. унта. Сер. Биол. клин. мед. 2011. Т. 9. № 3. С. 20-26.
- De Man J.C., Rogosa M., Sharpe M.E. A medium for the cultivation of lactobacilli // J. Appl. Microbiol. 1960. V. 23. P. 130-135.
- De Vuyst L., Vandamme E.J. Lactic acid bacteria and bacteriocins: their practical importance // Bacteriocins of lactic acid bacteria: microbiology, genetics and applications / Eds. De L. Vuyst, E.J. Vandamme. Boston, MA: Springer US, 1994. P. 1-11.
- Field D., Connor P.M.O., Cotter P.D., Hill C., Ross R.P. The generation of nisin variants with enhanced activity against specific Gram-positive pathogens // Mol. Microbiol. 2008. V. 69. P. 218-230.
- Kurokawa M., Ying B.W. Precise, high-throughput analysis of bacterial growth // J. Visual. Exper. 2017. V. 127. C. 156-197.
- Lamont J.R., Wilkins O., Bywater-Ekegard M., Smith D.L. From yogurt to yield: potential applications of lactic acid bacteria in plant production // Soil Biol. Biochem. 2017. V. 111. P. 1-9.
- Naidu A.S., Bidlack W.R., Clemens R.A. Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB) // Crit. Rev. Food Sci. Nutrit. 1999. V. 39. P. 13-126.
- Todorov S.D., Dicks L.M. Effect of growth medium on bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* ST194BZ, a strain isolated from Boza // Food Technol. Biotechnol. 2005. V. 43. P. 165-173.

SHORT COMMUNICATIONS

Production of Antimicrobial Compounds in *Lactobacillus brevis* Cells

N. A. Sidorova¹, *, and A. I. Savushkin¹

¹Petrozavodsk State University, Petrozavodsk, 185035, Russia

*e-mail: vanlis@petrsu.ru

Abstract. As a result of the study, primary data were obtained on the kinetics of growth and production of antimicrobial compounds by the bacteria *Lactobacillus brevis* 2kGv22-17. Under experimental conditions, the antibacterial effect of a suspension of lactobacilli, protoplasts and intracellular antibacterial activity in cell lysates were studied. Growth kinetics were assessed under static conditions using a personal bioreactor RTS-1C. The antagonistic activity of lactobacilli was studied in a series of experiments using *Cytophaga psychrophila* IM-87, *Flexibacter columnaris* IM-216 and *Pseudomonas fluorescens* IM-43 as indicator test cultures. The ability of the studied lactobacilli to produce antimicrobial compounds in the exponential growth phase was experimentally confirmed. The most pronounced effect of growth suppression was found in the presence of lactobacilli protoplasts.

Keywords: antimicrobial compounds, microbial antagonism, growth kinetics, cell lysates, protoplasts, growth phases, *Lactobacillus brevis*