

ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ *LACTOCOCCUS LACTIS* K-205 В КАЧЕСТВЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОГО КОМПОНЕНТА

Аннотация.

Актуальность и цели. Изучена возможность использования бактериоцин-продуцирующего штамма *Lactococcus lactis* K-205 в качестве антибактериального компонента в составе геля.

Материалы и методы. В работе использованы K-205 *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* и очищающие гигиенические средства для рук. Применены классические микробиологические методы выделения и изучения морфологических свойств микроорганизмов. Каждый эксперимент был проведен в трех повторностях и статистически обработан.

Результаты. Изучены морфологические характеристики микроорганизмов до и после обработки гигиеническими средствами (мыло, антибактериальные салфетки и антибактериальный гель). Выявлено, что культура *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* K-205 обладает антибактериальным действием на все выделенные микроорганизмы с поверхности кожи рук.

Выводы. В результате работы было доказано, что штамм K-205 *Lactococcus lactis* в составе антибактериального геля, содержащего в своем составе кроме культуры натуральные ингредиенты, обладает пролонгированным антибактериальным действием в течение дня и может быть использован в качестве антибактериального компонента.

Ключевые слова: бактериоцин, антибактериальное действие, молочнокислые бактерии, *Lactococcus lactis*, биотехнология, антибактериальный гель.

T. D. Sul'timova, M. M. Svirina, L. G. Stoyanova

A STUDY OF THE APPLICABILITY OF *LACTOCOCCUS LACTIS* K-205 STRAIN AS AN ANTIBACTERIAL COMPONENT

Abstract.

Background. The possibility of using the bacteriocin-producing strain *Lactococcus lactis* K-205 as an antibacterial component in the gel composition was studied.

Materials and methods. The strain K-205 *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* and cleansing hand hygiene products were used. Classical microbiological methods for isolating and studying the morphological properties of microorganisms were used. Each experiment was performed in triplicate and statistically processed.

Results. Morphological characteristics of microorganisms before and after treatment with hygienic agents (soap, antibacterial napkins and antibacterial gel) were studied. It was revealed that the culture of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* K-205 has an antibacterial effect on all selected microorganisms from the surface of the skin of the hands.

Conclusions. As a result of the work, it was proved that the strain K-205 *Lactococcus lactis* in the antibacterial gel, containing in addition to the culture natural ingredients, has a prolonged antibacterial effect during the day and can be used as an antibacterial component.

Key words: bacteriocin, antibacterial action, lactic acid bacteria, *Lactococcus lactis*, biotechnology, antibacterial gel.

Введение

Интерес многих ученых к молочнокислым бактериям связан с двумя направлениями: пищевая промышленность и влияние на здоровье человека.

Молочнокислые бактерии используют для продления срока годности пищевых продуктов за счет образования молочной кислоты с сопутствующим понижением pH, а также биологически активных веществ, обладающих бактерицидным действием на специфические группы микроорганизмов, включая и патогенные формы. Ведущее место в объяснении явления антагонизма молочнокислых бактерий отводится специфическим антибиотическим веществам белковой природы – бактериоцинам. Бактериоцины – это гетерогенные антибактериальные комплексы, разнообразные по уровню активности, спектру и механизму действия, молекулярной массе, физико-химическим свойствам, но основной биологически активной частью всех бактериоцинов является белковый компонент.

В процессе скрининга штаммов лактококков широкого спектра бактерицидного и фунгицидного действия на кафедре микробиологии МГУ имени М. В. Ломоносова был выделен штамм К-205 *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* с активностью 2900 МЕ/мл из национального бурятского кисломолочного напитка курунги.

Благодаря антибиотическим свойствам молочнокислых бактерий *Lactococcus lactis*, высокой ферментативной и антибиотической активности по отношению к патогенным и условно патогенным микроорганизмам, обитающим в сырье, продуктах питания и желудочно-кишечном тракте человека и животных, их широко используют в пищевой, молочной, медицинской и микробиологической промышленности.

Основываясь на антибиотическом свойстве штамма *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* К-205, существует возможность его использования в качестве основного ингредиента антибактериальных средств, а именно, антибактериального геля для обработки поверхности кожи рук, безвредного для организма человека и окружающей среды.

Материалы и методы

Материал исследования: штамм К-205 *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, очищающие салфетки с антибактериальным эффектом “Ауга”, антибактериальный гель “Ауга”, детское мыло; микробиологические среды: мясопептонный агар (МПА), Сабуро, молочный обрат, MRS, кедровый жмых, березовые почки, экстракт березовых почек, вода, масло зародышей пшеницы.

Методы исследования. В работе использованы классические микробиологические методы для изучения микробного состава поверхности кожи рук; изучения свойств выделенных микроорганизмов. Культивирование проводили при температурах 28, 37, 43 °С в термостате в течение 24 ч. Смывы с рук проводили согласно СанПиН 2.1.3.2630-10 Санитарно-эпидемиологические требования к взятию смывов с поверхности кожи рук. Каждый эксперимент был проведен в трех повторностях и статистически обработан. Микроскопирование проводили на микроскопе Альтами БИО 8 при увеличении в 2000 раз. Исследование экстракта березовых почек на содержание витаминов, катионов и анионов проводили на Спектрофотометре Cary 300 (Varian, Австралия).

При постановке эксперимента было решено выделить два этапа проведения работы:

1-й этап – исследование микробиоты поверхности кожи рук;

2-й этап – создание рецептуры антибактериального геля и изучение возможности использования *Lactococcus lactis* ssp. *Lactis* K-205 в качестве основного ингредиента.

Результаты

1-й этап. Исследование микробиоты поверхности кожи рук до и после обработки гигиеническими средствами.

При проведении эксперимента была исследована микробиота поверхности рук пяти испытуемых без какой-либо предварительной обработки гигиеническими средствами. Проведены смывы с рук и высеяны на чашки Петри с МПА. Результаты исследования микробиоты представлены на рис. 1.

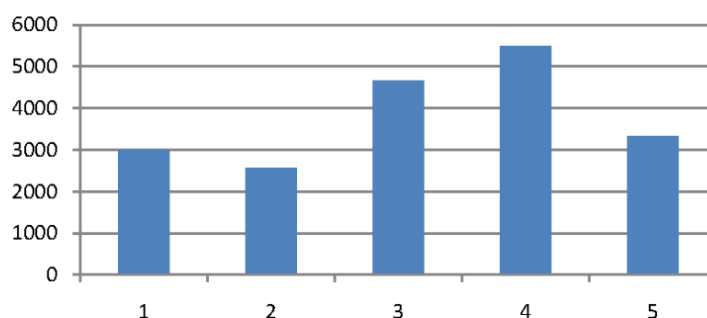


Рис. 1. Количество микроорганизмов, выявленных при смыве с рук у пяти человек при температуре культивирования 28 °С в течение 24 ч

Из рис. 1 видно, что наибольший рост микроорганизмов наблюдался у четвертого испытуемого – 5500 колоний, минимальный рост микроорганизмов у второго испытуемого – 2564 колоний. Среднее значение микроорганизмов – 3809 колоний.

Впоследствии нами были изучены состав и количество колоний сразу после мытья рук мылом, обработки влажными салфетками и спиртосодержащим антибактериальным гелем. Результаты исследования показали, что наиболее эффективным средством является спиртосодержащий антибактериальный гель, после обработки рук которым наблюдался минимальный рост микроорганизмов. Среднее количество колоний при 28 °С – 21КОЕ, при 37 °С – 39КОЕ, при 43 °С – 28 КОЕ, что существенно меньше по сравнению с контролем (необработанными руками).

Изучены морфологические свойства выделенных микроорганизмов.

В образцах без обработки на плотных средах через 24 ч культивирования в аэробных условиях бактерии формируют круглые ровные колонии кремового цвета. По форме представляют собой грамположительные кокки (стафилококки, тетракокки) и неспорообразующие палочки, расположенные одиночно и парами (рис. 2). После обработки рук антибактериальным гелем выявлены микроорганизмы кокковой формы (рис. 3), а после обработки рук влажными салфетками выявлены кокковые формы микроорганизмов и дрожжевые клетки (рис. 4). При изучении микробного состава кожи после мытья

рук детским мылом обнаружили микроорганизмы различной морфологии: палочки, кокки, дрожжи (рис. 5).

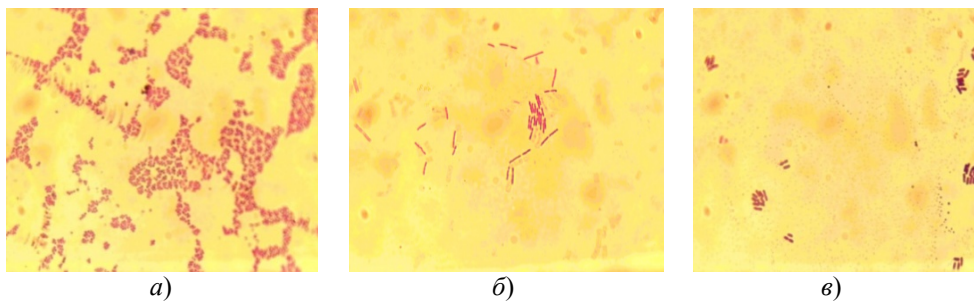


Рис. 2. Микроорганизмы кокковой (а) и палочковидной (б, в) форм (увеличение в 1000 раз)

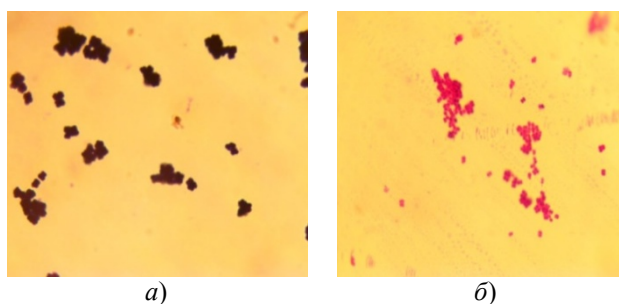


Рис. 3. Микроорганизмы тетракокки при культивировании при 43 °С (а) и кокки (б) (увеличение в 2000 раз)

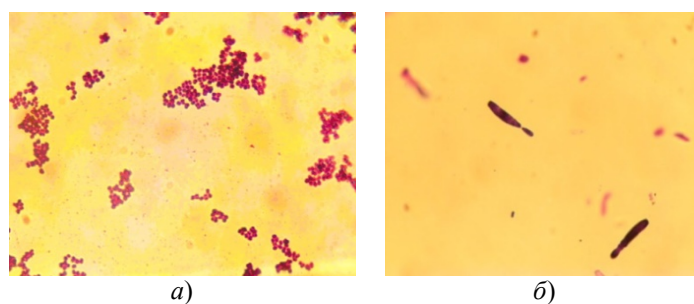


Рис. 4. Кокки (а) и дрожжевые клетки (б) (увеличение в 2000 раз)

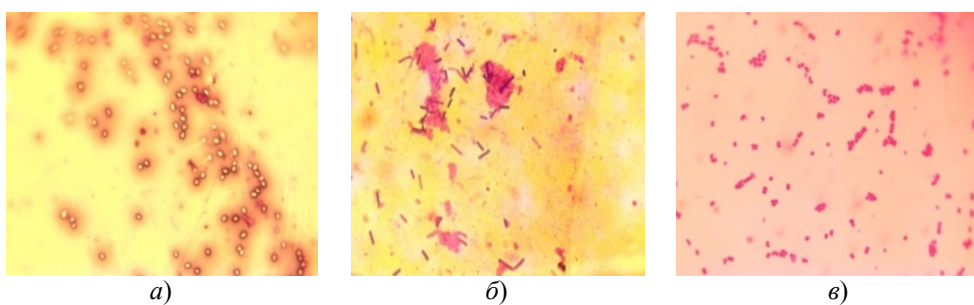


Рис. 5. Микроорганизмы кокковой (а, в) и палочковидной (б) форм (увеличение в 2000 раз)

Особенности морфологического разнообразия форм микроорганизмов представлены в табл. 1.

Таблица 1

Морфологическое разнообразие форм
и особенности микроорганизмов поверхности кожи рук

Материал обработки	Форма колоний	Форма бактерий	Окраска по Граму	Наличие спор
Влажные салфетки 30 °С	круглые ровные, кремового и белого цвета	кокки	Грам+	неспорообразующие
37 °С	колонии розового цвета	кокки	Грам+	неспорообразующие
43 °С	колонии ярко-розового и розового цвета	дрожжи	–	неспорообразующие
Антибактериальный гель 30 °С	колонии розового цвета	кокки	Грам+	неспорообразующие
37 °С	колонии розового и красного цвета	кокки и палочки	Грам+	неспорообразующие
43 °С	колонии розового цвета	тетракокки	Грам+	неспорообразующие
Детское мыло 30 °С	колонии розового цвета	палочки	Грам+	неспорообразующие
37 °С	колонии ярко розового цвета	крупные кокки	Грам+	неспорообразующие
43 °С	колонии красного цвета	дрожжи	–	–
Контроль (без обработки) 30 °С	круглые ровные, кремового цвета	кокки, палочки	Грам+	неспорообразующие

В результате проведенных исследований микробиоты поверхности кожного покрова пяти человек выявлено большое разнообразие форм микроорганизмов (кокки, палочки, дрожжевые клетки), культивируемых при различных температурных условиях.

По количеству микроорганизмов, обнаруженных после обработки гигиеническими средствами, антибактериальный эффект наблюдался после применения всех средств, но наибольший – после применения антибактериального геля.

2-й этап. Следующим этапом исследовательской работы являлось изучение возможности использования *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* K-205 в составе антибактериального геля для рук.

Для начала проведено изучение антибиотического действия культуры *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* на выделенные микроорганизмы с поверхности

кожи рук. Выявлено, что штамм проявлял антибиотическую активность по отношению ко всем выделенным микроорганизмам до и после обработки рук антибактериальными средствами. В связи с этим культура *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* использована в качестве основного антибактериального компонента в составе геля. Остальные ингредиенты в составе геля были подобраны исходя из их свойств, полезных для ухода за кожей рук, доступности сырья и низкой себестоимости: водный экстракт березовых почек, масло зародышей пшеницы, вода, кедровый жмых, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* К-205. Дополнительно было проведено исследование экстракта березовых почек на содержание витаминов, катионов и анионов (рис. 6).

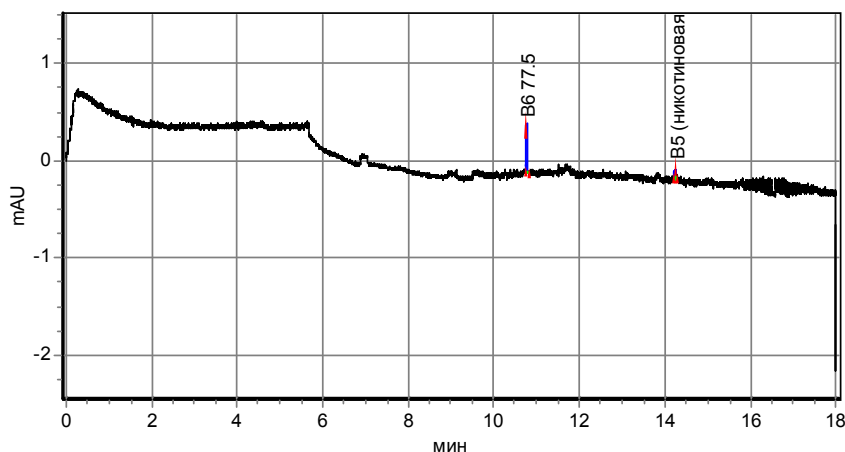


Рис. 6. Содержание витаминов в водном экстракте березовых почек

В результате исследования в водном экстракте березовых почек обнаружены витамины В₅ (77,5 мг/л) и В₆ (19,6 мг/л), катионы: К, Na, Li, Mg, Са и анионы: хлориды, сульфаты, нитраты, фториды, фосфаты.

После смешивания всех ингредиентов определяли антибиотическую активность полученного продукта. Для проведения эксперимента изучали смывы с рук у четырех человек до обработки (контроль) и после обработки полученным нами гелем (табл. 2).

Таблица 2

Изучение антибактериальной активности геля

Образцы	Количество колоний на МПА, 37 °С		Эффективность применения
	Без обработки	После обработки гелем	
1	14	5 (35,7 %)	64,3 %
2	212	71 (33,5 %)	66,5 %
3	232	16 (5 %)	95 %
4	15	4 (26,6 %)	73,4 %

В табл. 2 показан значительный антибактериальный эффект геля по сравнению с контролем, средняя эффективность применения геля составляет 74,8 %.

Проведено изучение антибактериальной активности геля в течение пяти часов. Для этого выполнялись смывы с рук шести человек и наблюдалась активность действия геля в течение пяти часов после обработки гелем.

В результате выявлено, что действие геля в течение пяти часов не ослабляется, что говорит о пролонгированном антибактериальном эффекте полученного продукта.

Заключение

Таким образом, в результате выполненной работы изучен состав микроорганизмов с поверхности рук, изучены морфологические характеристики микроорганизмов до и после обработки гигиеническими средствами (мыло, антибактериальные салфетки и антибактериальный гель).

Выявлено, что культура *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* K-205 обладает антибактериальным действием на все выделенные микроорганизмы с поверхности кожи рук. В результате работы было доказано, что штамм K-205 *Lactococcus lactis* в составе антибактериального геля, содержащий в своем составе, кроме культуры, натуральные ингредиенты, обладает пролонгированным антибактериальным действием в течение дня и может быть использован в качестве антибактериального компонента очищающих гигиенических средств.

Библиографический список

1. **Стоянова, Л. Г.** Выделение и идентификация бактериоцинообразующих штаммов *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* из свежего молока / Л. Г. Стоянова, Т. Д. Сульимова, С. Г. Ботина // Прикладная биохимия и микробиология. – 2006. – Т. 42, № 5. – С. 560–568.
2. СанПиН 2.1.3.2630-10 Санитарно-эпидемиологические требования к взятию смывов с поверхности кожи рук. – М., 2010.
3. **Нетрусов, А. И.** Микробиология : учеб. для высших учеб. заведений / А. И. Нетрусов, И. Б. Котова. – М. : Академия, 2006. – 362 с.
4. Микробиология : практикум для высш. учеб. заведений / А. И. Нетрусов, И. Б. Котова, М. А. Егорова, Л. М. Захарчук, Н. Н. Колотилова ; под ред. А. И. Нетрусова. – М. : Академия, 2005. – 608 с.
5. **Ратникова, И. А.** Идентификация антибиотических веществ молочнокислых бактерий / И. А. Ратникова, Н. Н. Гаврилова, Н. Н. Колокова // Биотехнология. – 2005. – № 5-6. – С. 19, 20.
6. **Стоянова, Л. Г.** Микробиологическая характеристика нового штамма *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* K-205 / Л. Г. Стоянова, Т. Д. Сульимова, А. Р. Строева, А. И. Нетрусов // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2008. – № 1. – С. 60–63.
7. **Квасников, Е. И.** Молочнокислые бактерии и их использование / Е. И. Квасников, О. А. Нестеренко. – М. : Наука, 2003. – С. 23, 290–359.

References

1. Stoyanova L. G., Sul'timova T. D., Botina S. G. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya* [Applied biochemistry and microbiology]. 2006, vol. 42, no. 5, pp. 560–568.
2. SanPiN 2.1.3.2630-10 *Sanitarno-epidemiologicheskie trebovaniya k vzyatiyu smyvov s poverkhnosti kozhi ruk* [SanPin 2.1.3.2630-10 Sanitary epidemiological standard of swab taking from hand skin]. Moscow, 2010.
3. Netrusov A. I., Kotova I. B. *Mikrobiologiya: ucheb. dlya vysshikh ucheb. zavedeniy* [Microbiology: textbook for universities]. Moscow: Akademiya, 2006, 362 p.

4. Netrusov A. I., Kotova I. B., Egorova M. A., Zakharchuk L. M., Kolotilova N. N. *Mikrobiologiya: praktikum dlya vyssh. ucheb. zavedeniy* [Microbiology: tutorial for universities]. Moscow: Akademiya, 2005, 608 p.
5. Ratnikova I. A., Gavrilova N. N., Kolokova N. N. *Biotekhnologiya* [Biotechnology]. 2005, no. 5-6, pp. 19, 20.
6. Stoyanova L. G., Sul'timova T. D., Stroeveva A. R., Netrusov A. I. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii* [Journal of microbiology, epidemiology and immunology]. 2008, no. 1, pp. 60–63.
7. Kvasnikov E. I., Nesterenko O. A. *Molochnokislye bakterii i ikh ispol'zovanie* [Lactobacilli and their use]. Moscow: Nauka, 2003, pp. 23, 290–359.

Сультимова Татьяна Доржиевна

кандидат биологических наук, доцент,
кафедра биотехнологии, Восточно-Сибирский государственный университет технологий и управления (Россия, г. Улан-Удэ, ул. Ключевская, 40в)

E-mail: tsultimova@mail.ru

Sul'timova Tat'yana Dorzhievna

Candidate of biological sciences, associate professor, sub-department of biotechnology, East Siberia State University of Technology and Management (40v Klyuchevskaya street, Ulan-Ude, Russia)

Свирина Мария Михайловна

магистрант, Восточно-Сибирский государственный университет технологий и управления (Россия, г. Улан-Удэ, ул. Ключевская, 40в)

E-mail: tsultimova@mail.ru

Svirina Mariya Mikhaylovna

Master's degree student, East Siberia State University of Technology and Management (40v Klyuchevskaya street, Ulan-Ude, Russia)

Стоянова Лидия Григорьевна

доктор биологических наук, профессор, кафедра микробиологии, Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова (Россия, г. Москва, Ленинские горы, 1)

E-mail: stoyanovamsu@mail.ru

Stoyanova Lidiya Grigor'evna

Doctor of biological sciences, professor, sub-department of microbiology, Lomonosov State University of Moscow (1 Leninskie Gory street, Moscow, Russia)

УДК 579.63: 579.66

Сультимова, Т. Д.

Исследование возможности применения *Lactococcus lactis* K-205 в качестве антибактериального компонента / Т. Д. Сультимова, М. М. Свирина, Л. Г. Стоянова // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Естественные науки. – 2018. – № 1 (21). – С. 66–73. – DOI 10.21685/2307-9150-2018-1-7.