

# ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ФАКТОРОВ НА ОБРАЗОВАНИЕ БИОПЛЕНОК МОЛОЧНОКИСЛЫМИ БАКТЕРИЯМИ

**ТЯПКИН Александр Юрьевич**, Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова  
**ФОКИНА Надежда Александровна**, Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова

**УРЯДОВА Галина Тимофеевна**, Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова

**КАРПУНИНА Лидия Владимировна**, Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова

*Впервые изучена способность молочнокислых бактерий (*Lactococcus lactis* В-1662 и *Streptococcus thermophilus*) образовывать биопленки. Исследованы различные факторы (время, температура, pH, экзополисахариды), влияющие на образование биопленки.*

В последнее время большое внимание уделяется биопленкам и образующим их бактериям, в частности, бактериям продуцирующим экзополисахариды (ЭПС). Установлено, что биопленки являются одним из патогенетических факторов формирования хронических инфекционных процессов у человека и животных [3]. Позитивное значение биопленок связано с возможностью их практического применения в биотехнологических отраслях. Например, они эффективно используются для деградации ксенобиотиков в биореакторах. Биопленки, образовавшиеся при сорбции микробных клеток на носителях, используются в реакторах при производстве этанола, бутанола, молочной, уксусной, янтарной и фумаровой кислот. Биопленки могут действовать как природные репелленты. Весьма перспективно использование биопленок, формируемых бактериями с антагонистическими свойствами по отношению к другим микроорганизмам [5]. Известно, что бактерии семейства Enterobacteriaceae и бактерии *Acinetobacter* spp. способны образовывать биопленку [2].

Цель данной работы – изучение способности молочнокислых бактерий (*Lactococcus lactis* В-1662 и *Streptococcus thermophilus*) образовывать биопленки и исследование влияния различных факторов на их образование.

**Методика исследований.** Объектом исследований явились культура *L. lactis* В-1662, полученная из Российской коллекции микроорганизмов (Пушино-на-Оке) и *S. thermophilus*, которая была получена из сухого порошка лиофилизированной бактериальной закваски термофильного стрептококка (ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности», г. Москва).

Оценку способности к формированию биопленки бактериями проводили по методу [7]. Для этого в иммунологические планшеты вносили культуру бактерий, затем добавляли стерильную питательную среду А. Welman. Инкубировали, помещая их в термостат, при температуре выращивания этих бактерий. Затем содержимое осторожно отбирали, вносили дистиллированную воду и спиртовой раствор кристаллиолета. Далее планшеты инкубировали при 20 °С в течение 45 мин. Краситель осторожно отбирали и промывали лунки дважды дистиллированной водой. В отмытые от не связавшейся краски лунки вносили этиловый спирт и оставляли на 45 мин при комнатной температуре. По интенсивности окрашивания при 540 нм судили о способности образования биопленки.

Для выделения экзополисахаридов из *L. lactis* В-1662 и *S. thermophilus* культуры выращивали на среде А. Welman [8] в течение 46–48 ч. Выделение ЭПС из культур *S. thermophilus* и *L. lactis* В-1662 проводили по методу Cerning J [6], в модификации [1, 4].

**Результаты исследований.** При изучении влияния различных факторов (температура, время, pH, ЭПС) на способность *L. lactis* В-1662 и *S. thermophilus* к образованию биопленки первоначальным этапом было исследование возможности самих молочнокислых бактерий (в разведении  $10^{-1}$  до  $10^{-5}$ ) образовывать биопленки.

В процессе исследований было показано, что культуры *L. lactis* В-1662 и *S. thermophilus* способны образовывать пленку при всех концентрациях, но лучше при концентрации  $10^{-1}$  (табл. 1).

При изучении образования биопленки в зависимости от времени культивирования культуры молочнокислые бактерии выращивали в плоскодонных планшетах в течение 24, 36 и 48 ч при оптимальной температуре: для *L. lactis* В-1662 при 28 °С и для *S. thermophilus* при 38 °С.

Как видно из табл. 2, максимальное количество биопленки, о чем мы судили по оптической плотности, для *L. lactis* В-1662 приходится на 48 ч при разведении  $10^{-1}$ , а для *S. thermophilus* – на 24 ч при разведении  $10^{-1}$  кл/мл.

Ранее было показано [1, 4], что максимальное количество ЭПС у *L. lactis* В-1662 приходится на 48 ч, а у *S. thermophilus* на 24 ч. Это позволяет нам говорить о том, что в образовании биопленки участвует ЭПС этих культур.

При изучении зависимости образования биопленки от температуры было установлено, что оптимальной для *L. lactis* В-1662 является температура 28 °С при разведении  $10^{-1}$  кл/мл, а для *S. thermophilus* 38 °С, также при разведении  $10^{-1}$  кл/мл (табл. 3). Ранее нами было обнаружено [1, 4], что температура 27–28 и 38 °С является оптимальной для образования ЭПС этими культурами. Это свидетельствует о том, что в образовании биопленки участвуют ЭПС этих культур.

При изучении влияния pH на образование биопленки было показано, что оптимальным значением для обеих культур *L. lactis* В-1662 и *S. thermophilus* являлось pH 6 (табл. 4).

Дальнейшие исследования были связаны с изучением влияния ЭПС *L. lactis* В-1662 и *S. thermophilus* на образование биопленки при подобранных выше





Таблица 1

Способность образования биопленки *L. lactis* B-1662 и *S. thermophilus*

| Концентрация, кл/мл | Оптическая плотность ( $\lambda_{540 \text{ нм}}$ ) |                        |
|---------------------|-----------------------------------------------------|------------------------|
|                     | <i>L. lactis</i> B-1662                             | <i>S. thermophilus</i> |
| $10^{-1}$           | $0,221 \pm 0,012^*$                                 | $0,242 \pm 0,023^*$    |
| $10^{-2}$           | $0,216 \pm 0,020^*$                                 | $0,237 \pm 0,019^*$    |
| $10^{-3}$           | $0,209 \pm 0,022^*$                                 | $0,219 \pm 0,022^*$    |
| $10^{-4}$           | $0,187 \pm 0,021^*$                                 | $0,209 \pm 0,025^*$    |
| 10                  | $0,181 \pm 0,023^*$                                 | $0,197 \pm 0,023^*$    |
| Контроль            | $0,130 \pm 0,021$                                   | $0,131 \pm 0,023$      |

\* достоверность при  $p < 0,05$  (здесь и далее).

Таблица 2

Способность образования биопленки *L. lactis* B-1662 и *S. thermophilus* в зависимости от времени культивирования

| Концентрация, кл/мл | Оптическая плотность ( $\lambda_{540 \text{ нм}}$ ) |                     |                     |                        |                     |                     |
|---------------------|-----------------------------------------------------|---------------------|---------------------|------------------------|---------------------|---------------------|
|                     | <i>L. lactis</i> B-1662                             |                     |                     | <i>S. thermophilus</i> |                     |                     |
|                     | 24 ч                                                | 36 ч                | 48 ч                | 24 ч                   | 36 ч                | 48 ч                |
| $10^{-1}$           | $0,145 \pm 0,019^*$                                 | $0,134 \pm 0,018^*$ | $0,223 \pm 0,023^*$ | $0,239 \pm 0,014^*$    | $0,139 \pm 0,019^*$ | $0,143 \pm 0,021^*$ |
| $10^{-2}$           | $0,139 \pm 0,023^*$                                 | $0,139 \pm 0,020^*$ | $0,148 \pm 0,018^*$ | $0,192 \pm 0,018^*$    | $0,135 \pm 0,023^*$ | $0,142 \pm 0,020^*$ |
| $10^{-3}$           | $0,131 \pm 0,021^*$                                 | $0,140 \pm 0,021^*$ | $0,144 \pm 0,024^*$ | $0,175 \pm 0,023^*$    | $0,129 \pm 0,026^*$ | $0,147 \pm 0,024^*$ |
| $10^{-4}$           | $0,135 \pm 0,020^*$                                 | $0,135 \pm 0,024^*$ | $0,143 \pm 0,023^*$ | $0,135 \pm 0,025^*$    | $0,136 \pm 0,023^*$ | $0,149 \pm 0,021^*$ |
| $10^{-5}$           | $0,124 \pm 0,023^*$                                 | $0,132 \pm 0,023^*$ | $0,132 \pm 0,021^*$ | $0,124 \pm 0,021^*$    | $0,131 \pm 0,024^*$ | $0,146 \pm 0,023^*$ |
| Контроль            | $0,130 \pm 0,021$                                   | $0,130 \pm 0,021$   | $0,130 \pm 0,021$   | $0,131 \pm 0,023$      | $0,131 \pm 0,023$   | $0,131 \pm 0,023$   |

Таблица 3

Зависимость образования биопленки *L. lactis* B-1662 и *S. thermophilus* от температуры

| Концентрация, кл/мл | Оптическая плотность ( $\lambda_{540 \text{ нм}}$ ) |                     |                        |                     |
|---------------------|-----------------------------------------------------|---------------------|------------------------|---------------------|
|                     | <i>L. lactis</i> B-1662                             |                     | <i>S. thermophilus</i> |                     |
|                     | 28 °C                                               | 38 °C               | 28 °C                  | 38 °C               |
| $10^{-1}$           | $0,223 \pm 0,019^*$                                 | $0,139 \pm 0,022^*$ | $0,145 \pm 0,019^*$    | $0,239 \pm 0,020^*$ |
| $10^{-2}$           | $0,148 \pm 0,020^*$                                 | $0,143 \pm 0,023^*$ | $0,148 \pm 0,023^*$    | $0,192 \pm 0,023^*$ |
| $10^{-3}$           | $0,144 \pm 0,021^*$                                 | $0,134 \pm 0,022^*$ | $0,141 \pm 0,024^*$    | $0,175 \pm 0,025^*$ |
| $10^{-4}$           | $0,143 \pm 0,023^*$                                 | $0,142 \pm 0,019^*$ | $0,143 \pm 0,018^*$    | $0,135 \pm 0,021^*$ |
| $10^{-5}$           | $0,132 \pm 0,024^*$                                 | $0,131 \pm 0,023^*$ | $0,132 \pm 0,021^*$    | $0,124 \pm 0,024^*$ |
| Контроль            | $0,130 \pm 0,021$                                   | $0,130 \pm 0,021$   | $0,131 \pm 0,023$      | $0,131 \pm 0,023$   |

Таблица 4

Зависимость образования биопленки *L. lactis* B-1662 и *S. thermophilus* от pH

| pH       | Оптическая плотность ( $\lambda_{540 \text{ нм}}$ ) |                        |
|----------|-----------------------------------------------------|------------------------|
|          | <i>L. lactis</i> B-1662                             | <i>S. thermophilus</i> |
| 5,5      | $0,263 \pm 0,019^*$                                 | $0,259 \pm 0,018^*$    |
| 6,0      | $0,279 \pm 0,022^*$                                 | $0,268 \pm 0,020^*$    |
| 6,5      | $0,265 \pm 0,023^*$                                 | $0,264 \pm 0,025^*$    |
| Контроль | $0,130 \pm 0,021$                                   | $0,131 \pm 0,023$      |

Таблица 5

Влияние ЭПС *L. lactis* B-1662 и *S. thermophilus* на образование биопленки

| Концентрация, кл/мл | Оптическая плотность ( $\lambda_{540 \text{ нм}}$ ) |                            |
|---------------------|-----------------------------------------------------|----------------------------|
|                     | ЭПС <i>L. lactis</i> B-1662                         | ЭПС <i>S. thermophilus</i> |
| $10^{-1}$           | $0,297 \pm 0,012^*$                                 | $0,289 \pm 0,017^*$        |
| $10^{-2}$           | $0,276 \pm 0,017^*$                                 | $0,281 \pm 0,026^*$        |
| $10^{-3}$           | $0,251 \pm 0,026^*$                                 | $0,269 \pm 0,024^*$        |
| $10^{-4}$           | $0,233 \pm 0,019^*$                                 | $0,264 \pm 0,021^*$        |
| $10^{-5}$           | $0,211 \pm 0,024^*$                                 | $0,252 \pm 0,027^*$        |
| Контроль            | $0,130 \pm 0,021$                                   | $0,131 \pm 0,023$          |

условиях. Для этого ЭПС (0,06 г/мл) исследуемых культур в качестве «затравки» добавляли в соответствующие пробы и смотрели на образование биопленки. Было показано, что использование ЭПС в данном случае способствует большему образованию биопленки исследуемыми молочнокислыми бактериями. Причем наибольшее образование биопленки наблюдали при разведении  $10^{-1}$  (табл. 5). Таким образом, добавление ЭПС приводит к увеличению способности культур *L. lactis* B-1662 и *S. thermophilus* образовывать биопленку на 81 и 72 % соответственно.

**Выводы.** Исследования показали, что *L. lactis* B-1662 и *S. thermophilus* способны образовывать био-

пленку, максимальное количество которой обнаруживается при концентрации  $10^{-1}$  кл/мл.

Установлено, что максимальное образование биопленки *L. lactis* B-1662 наблюдается при 48 ч культивирования и температуре 28 °C, а для *S. thermophilus* при 24 ч культивирования и температуре 38 °C.

Оптимальным для образования биопленки *L. lactis* B-1662 и *S. thermophilus* является pH 6.

Обнаружено, что внесение ЭПС в качестве «затравки» приводит к увеличению способности культур образовывать биопленку.

1. Выделение экзополисахарида *Streptococcus thermophilus* / Г.Т. Урядова [и др.] // Актуальные проблемы ветеринарной медицины, пищевых и биотехнологий: материалы Всерос. науч.-практ. конф. – Саратов, 2015. – С. 109–110.
2. Образование биопленок бактериями, выделенными от больных кишечными инфекциями из окружающей среды / Е.В. Анганова [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 6. – С. 12–18.
3. Регуляция процесса формирования биопленок *Pseudomonas chlororaphis* в системе in vitro / А.В. Ганнесен [и др.] // Микробиология. – 2015. – Т. 8. – № 3. – С. 281–290.
4. Фокина Н.А., Урядова Г.Т., Карпунина Л.В. Выделение экзополисахарида из *Lactococcus lactis* при различных условиях культивирования // Аграрный научный журнал. – 2016. – № 12. – С. 40–42.
5. Чеботарь И.В., Маянский Н.А., Кончакова Е.Д. Новый метод исследования антибиотикорезистентности бактериальных биопленок // Клиническая микробиологическая антимикробная химиотерапия. – 2012. – Т. 14. – № 4. – С. 303–308.
6. Cerning J., Bouillanne C., Desmazeaud M.J. Exocellular polysaccharide production by *Streptococcus thermophilus* // Biotechnol. Lett., 1988, Vol. 10, P. 255–260.

7. O'Toole G.A., Kolter R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. // Mol. Microbiol., 1998, Vol. 28, No 3, P. 449–461.

8. Welman A.D., Maddox I.X., Archer R.H. Screening and selection of exopolysaccharide-producing strains of *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* // Journal of Applied Microbiology, 2003, Vol. 95, P. 1200–1206.

**Тяпкин Александр Юрьевич**, аспирант кафедры «Микробиология, биотехнология и химия», Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова. Россия.

**Фокина Надежда Александровна**, микробиолог кафедры «Микробиология, биотехнология и химия», Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова. Россия.

**Урядова Галина Тимофеевна**, аспирант кафедры «Микробиология, биотехнология и химия», Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова. Россия.

**Карпунина Лидия Владимировна**, д-р биол. наук, проф. кафедры «Микробиология, биотехнология и химия», Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова. Россия.

410005, г. Саратов, ул. Б. Садовая, 220.

Тел.: (8452) 69-25-32.

**Ключевые слова:** молочнокислые бактерии; культивирование бактерий; биопленки; экзополисахариды.

#### THE INFLUENCE OF VARIOUS FACTORS ON THE BIOFILM FORMATION OF LACTIC ACID BACTERIA

**Tyapkin Alexander Yuryevich**, Post-graduate Student of the chair "Microbiology, Biotechnology and Chemistry", Saratov State Agrarian University named after N.I. Vavilov. Russia.

**Fokina Nadezhda Alexandrovna**, Microbiologist of the chair "Microbiology, Biotechnology and Chemistry", Saratov State Agrarian University named after N.I. Vavilov. Russia.

**Uryadova Galina Timofeevna**, Post-graduate Student of the chair "Microbiology, Biotechnology and Chemistry", Saratov State Agrarian University named after N.I. Vavilov. Russia.

**Karpunina Lidia Vladimirovna**, Doctor of Biological Sciences,

Professor of chair "Microbiology, Biotechnology and Chemistry", Saratov State Agrarian University named after N.I. Vavilov. Russia.

**Keywords:** lactic acid bacteria; cultivation of bacteria; biofilms; exopolysaccharides.

*It has been studied for the first time the ability of lactic acid bacteria (*Lactococcus lactis* B-1662 и *Streptococcus thermophilus*) to form a biofilms. Various factors (time, temperature, pH, exopolysaccharides) influencing on its formation are investigated.*

УДК 619:618. 19-002:636.2:637

## ПРИМЕНЕНИЕ В РАЦИОНАХ КОРОВ ПРИРОДНОГО ГЛАУКОНИТА И ЕГО ВЛИЯНИЕ НА САНИТАРНЫЕ СВОЙСТВА МОЛОКА

**ФИЛАТОВА Алена Владимировна**, Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова

**АВДЕЕНКО Владимир Семенович**, Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова

**МОЛЧАНОВ Алексей Вячеславович**, Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова

**РЫХЛОВ Андрей Сергеевич**, Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова

**КРИВЕНКО Дмитрий Валентинович**, Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова

**ЕГУНОВА Алла Владимировна**, Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова

Установлено, что у коров при введении в рацион глауконита в секрете вымени достоверно изменяется (с высокой степенью корреляции) содержание соматических клеток. В начале применения экосорбента глауконита значительные изменения происходят в активности мурамидазы ( $r = 0,84$ ), в лактопероксидазе ( $r = 0,65$ ) и лактоферрине ( $r = 0,66$ ). Разница в содержании свободного оксипролина в секрете вымени при применении экосорбента снижается в 1,92 раза по сравнению с контролем. Анализ корреляционных связей между показателями неспецифической резистентности молочной железы показал, что у коров в течение лактации наблюдается выраженная положительная корреляция (65 %) между числом соматических клеток и концентрацией лактоферрина в молоке, средней степени (35 %) отрицательная корреляция между содержанием лактоферрина и активностью лактопероксидазы.

Огромное значение в настоящее время приобретают вопросы, связанные с производством качественного молока, гарантирующего получение безопасных готовых продуктов питания [2, 3]. Сани-

тарные и физико-химические свойства молока у коров во многом определяются качеством кормов [5, 6]. Глауконит – это минерал сложного химического состава, водный алюмосиликат железа, относящийся к группе

