

Сравнительная оценка антимикробной активности штаммов молочнокислых бактерий по отношению к *Pseudomonas aeruginosa*

С. А. Кишилова, В. А. Леонова

Всероссийский
научно-исследовательский
институт молочной
промышленности, г. Москва,
Российская Федерация

АННОТАЦИЯ

Введение: *Pseudomonas aeruginosa*, способная вызывать порчу пищевых продуктов, обладает многофакторной устойчивостью к различным антимикробным препаратам и дезинфектантам, что приводит к проблемам пищевой безопасности. В связи с этим необходим поиск и разработка новых эффективных методов борьбы с контаминацией *P. aeruginosa* на предприятиях пищевой промышленности. В качестве альтернативы химическим дезинфицирующим средствам и консервантам могут рассматриваться препараты на основе молочнокислых бактерий, синтезирующих различные антимикробные соединения.

Цель: Сравнительная оценка антимикробной активности различных штаммов молочнокислых бактерий (МКБ) по отношению к представителям *P. aeruginosa*, выделенным из различных источников.

Материалы и методы: Объектами исследования являлись штаммы молочнокислых бактерий (МКБ) *Lactobacillus helveticus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis*, *Lactocaseibacillus paracasei* из коллекции ФГАНУ «ВНИМИ». Для исследуемых штаммов на первом этапе оценивали антимикробную активность по отношению к типовому коллекционному тест-штамму *P. aeruginosa* ATCC 25668, полученному из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболensk». Антимикробную активность исследовали методом совместного культивирования в соответствии с МУ 2.3.2.2789-10. Для штаммов МКБ, показавших наибольшую антимикробную активность по отношению к *P. aeruginosa* ATCC 25668, дополнительно исследовалась антимикробная активность по отношению к диким штаммам *P. aeruginosa* 42, *P. aeruginosa* 47, выделенным с цехового оборудования молочного хозяйства и *P. aeruginosa* M1, выделенного из образца сливочного масла.

Результаты: Показаны различия в степени антагонистической активности представителей МКБ по отношению к коллекционному штамму *P. aeruginosa* и изолятам дикого типа. Подтверждена высокая эффективность представителей лактобацилл, относящихся к виду *L. helveticus*, в частности штамма *L. helveticus* Ббн4, как антимикробного агента относительно штаммов синегнойной палочки как коллекционного, так и дикого типа.

Выводы: Представители лактобацилл, в частности *L. helveticus*, обладали высокой ингибирующей активностью относительно штаммов синегнойной палочки как коллекционного, так и дикого типа, выделенных из разных источников, и могут рассматриваться как перспективные антимикробные агенты относительно такого сложного патогена, как *P. aeruginosa*. В частности, штамм с наибольшей ингибирующей активностью *L. helveticus* Ббн4 может являться потенциальным штаммом-антагонистом, что позволит применять в качестве защитной заквасочной культуры для снижения риска контаминации кисломолочной продукции *P. aeruginosa*. Однако необходимы дальнейшие исследования по выявлению механизмов антимикробного действия этой культуры.

Ключевые слова: *Pseudomonas aeruginosa*; молочнокислые бактерии; антимикробная активность; *Lactobacillus helveticus*; защитные заквасочные культуры; штаммы диких изолятов; совместное культивирование; биоконтроль пищевых патогенов; контаминация молочной продукции; антагонистические свойства бактерий

Корреспонденция:

Светлана Анатольевна
Кишилова

E-mail: s_kishilova@vnimi.org

Конфликт интересов:

авторы сообщают
об отсутствии конфликта
интересов.

Поступила: 17.09.2024

Принята: 15.03.2025

Опубликована: 31.03.2025

Финансирование

Данное исследование
не получало внешнего
финансирования

Copyright: © 2025 Авторы



Для цитирования: Кишилова, С.А., & Леонова, В.А. (2025). Сравнительная оценка антимикробной активности штаммов молочнокислых бактерий по отношению к *Pseudomonas aeruginosa*. FOOD METAENGINEERING, 3(1), 42-55. <https://doi.org/10.37442/fme.2025.1.72>

Comparative Study of the Antimicrobial Activity of Lactic Acid Bacteria Strains against *Pseudomonas aeruginosa*

Svetlana A. Kishilova, Victoria A. Leonova

All-Russian Dairy Research Institute,
Moscow, Russian Federation

ABSTRACT

Introduction: *Pseudomonas aeruginosa*, capable of causing food spoilage, has multifactorial resistance to various antimicrobial agents and disinfectants, which leads to food safety problems. In this regard, it is necessary to search for and develop new effective methods to control *P. aeruginosa* contamination in food processing enterprises. Preparations based on lactic acid bacteria synthesizing various antimicrobial compounds can be considered as an alternative to chemical disinfectants and preservatives.

Purpose is a comparative evaluation of antimicrobial activity of different strains of lactic acid bacteria in relation to representatives of *P. aeruginosa* isolated from different sources.

Materials and methods: the objects of the study were strains of lactic acid bacteria (LAB) *Lactobacillus helveticus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis* and *Lactiseibacillus paracasei* from the collection of FGANU VNIMI. The antimicrobial activity of the strains under study was evaluated against the type test strain *P. aeruginosa* ATCC 25668. Antimicrobial activity was investigated by co-culture method in accordance with MU 2.3.2.2789-10. For the lactic acid bacteria strains that showed the highest antimicrobial activity against *P. aeruginosa* ATCC 25668, the antimicrobial activity against wild strains of *P. aeruginosa* 42, *P. aeruginosa* M1 and *P. aeruginosa* 47 was additionally investigated.

Results: Differences in the degree of antagonistic activity of lactic acid bacteria representatives in relation to the collection strain of *P. aeruginosa* and wild-type isolates were shown. The high efficiency of lactobacilli representatives belonging to the species *L. helveticus*, in particular strain *L. helveticus* Bbn4, as an antimicrobial agent against strains of *P. aeruginosa* of both collection and wild type was confirmed.

Conclusion: The results of the study showed that representatives of lactobacilli, in particular *L. helveticus*, had high inhibitory activity against strains of collection and wild type *P. aeruginosa*, isolated from different sources, and can be considered as promising antimicrobial agents against such a complex pathogen as *P. aeruginosa*. In particular, the strain with the highest inhibitory activity, *L. helveticus* Bbn4, may be a potential antagonist strain with a broad spectrum of antimicrobial activity. However, further studies are needed to identify the mechanisms of antimicrobial action of this culture.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*; lactic acid bacteria; antimicrobial activity; *Lactobacillus helveticus*; protective starter cultures; wild strain isolates; co-cultivation method; biocontrol of foodborne pathogens; dairy product contamination; bacterial antagonistic properties

Correspondence:

Svetlana A. Kishilova

E-mail: s_kishilova@vnimi.org

Conflict of interest:

The authors report the absence of a conflict of interest.

Received: 17.09.2024

Accepted: 15.03.2025

Published: 31.03.2025

Copyright: © 2025 The Authors



To cite: Kishilova, S.A., & Leonova, V.A. (2025). Comparative study of the antimicrobial activity of lactic acid bacteria strains against *Pseudomonas aeruginosa*. *FOOD METAENGINEERING*, 3(1), 42-55. <https://doi.org/10.37442/fme.2025.1.72>

ВВЕДЕНИЕ

Бактерии рода *Pseudomonas aeruginosa* (синегнойная палочка) — грамотрицательные психротрофные условно-патогенные микроорганизмы, часто контаминирующие питьевую воду и пищевые продукты с высоким содержанием воды и pH 6,5–7,4 (красное мясо, рыба, птица, молоко и молочные продукты) (Chang et al., 2024). Питательные вещества молока, такие как белок, жир, углеводы и витамины, делают молоко восприимчивым к загрязнению представителями псевдомонад (Li et al., 2023). Источниками контаминации могут быть молочный скот, вода, корма, доильное и производственное оборудование, в связи чем существуют риски заражения *P. aeruginosa* на всех стадиях производства питьевого молока и молочных продуктов (Badawy et al., 2023). Благодаря высокой адаптации к низким температурам, *P. aeruginosa* способна непрерывно размножаться при температуре $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$, что приводит к порче молока и молочных продуктов в процессе транспортировки и хранения (Li et al., 2023).

Большую проблему для молочной промышленности представляют внеклеточные ферменты *P. aeruginosa* из-за их высокой термостабильности. После пастеризации активность ферментов *P. aeruginosa* сохраняется до 60–70% даже в случае тепловой деструкции клеток патогена, и до 30–40% при УВТ-обработке (Narvhusm et al., 2021). К внеклеточным ферментам *P. aeruginosa* относятся протеазы и липазы. Протеазы *P. aeruginosa* гидролизуют как κ -казеин, так и α_{s1} -казеин и β -казеин, что приводит к разрушению казеиновых мицелл и гелеобразованию. Под действием липаз в молоке образуются свободные жирные кислоты, обуславливающие прогорклый вкус (Narvhusm et al., 2021; Caldera et al., 2016).

Рост устойчивости *Pseudomonas aeruginosa* и ее способность к биопленкообразованию представляют серьезную угрозу для пищевой безопасности. В процессе роста *P. aeruginosa* синтезирует экзополисахариды, образуя биопленку, которая обеспечивает дополнительную защиту бактерий от неблагоприятных факторов окружающей среды. Благодаря наличию жгутиков и пилей способность к формированию биопленок у *P. aeruginosa* чрезвычайно высока (Лазарева и др., 2015). Этот механизм значительно усиливает устойчивость бактерий к действию дезинфектантов и пищевых консервантов (Chen et al., 2023; Chang et al., 2024), особенно в сочетании с врожденной многофакторной устойчивостью к антимикробным препаратам, характерной

для данного вида. Способность *P. aeruginosa* быстро адаптироваться к различным стрессовым воздействиям, включая антимикробные препараты и традиционные дезинфицирующие средства, создает реальный риск попадания устойчивых форм в пищевые цепочки человека (Atolani et al., 2020; Тутельян и соавт., 2019). Эти факторы подчеркивают необходимость разработки альтернативных стратегий контроля *P. aeruginosa* в пищевой промышленности, способных эффективно преодолевать барьеры, связанные с устойчивостью и биопленкообразованием.

Одним из перспективных направлений в разработке альтернативных методов контроля является использование молочнокислых бактерий и их метаболитов в качестве биозащитных агентов. В качестве замены традиционным химическим дезинфектантам и консервантам, в том числе для борьбы с биопленками, рассматривается применение молочнокислых бактерий (МКБ) и их биологически активных соединений (Bonneville et al., 2021; Mokoena et al., 2021). Живые культуры МКБ, обладающие антимикробной активностью, способны снижать риск микробной порчи продуктов и увеличивать их срок хранения (Marcelli et al., 2024). Антимикробное действие МКБ обусловлено синтезом веществ, нарушающих целостность клеточных мембран, ингибирующих синтез клеточной стенки и препятствующих транспорту питательных веществ через мембрану (Zapasnik et al., 2022). Например, в экзопротеоме штамма *Lactobacillus plantarum* LB95, выделенного из ферментированных оливок, были обнаружены гидролитические ферменты, разрушавшие матрицу биопленки *Listeria monocytogenes*, повышая ее чувствительность к дезинфицирующим средствам (Bonneville, 2021). Несмотря на перспективность данного подхода, стандартизированные процедуры применения МКБ для целей биодезинфекции пока не разработаны, однако ряд их метаболитов, таких как низин, синтезируемый *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, уже широко используется в пищевой промышленности (Стоянова и соавт., 2012).

Ингибирующая активность молочнокислых бактерий обусловлена синтезом различных антимикробных соединений. Наиболее значимыми являются органические кислоты и бактериоцины. Органические кислоты ингибируют транспорт питательных веществ через цитоплазматическую мембрану и снижают внутриклеточный pH микроорганизмов. Оптимальный pH для роста *P. aeruginosa* составляет 7,2–7,5, возможно сохра-

С. А. Кишилова, В. А. Леонова

нение жизнеспособности в диапазоне 4,5–9,0 (Токарева, 2015). Данные исследований ингибирующего влияния pH на штаммы синегнойной палочки, выделенные из молочных продуктов в Багдаде, показали, что только 12 % изолятов сохраняли жизнеспособность при pH 2,3 (Al-Shammary, 2015). Бактериоцины — рибосомально-синтезируемые антимикробные пептиды, которые вызывают пермеабиллизацию клеточной стенки, приводящую к утечке питательных веществ из клетки и ее гибели (Стоянова и соавт., 2012; Singh et al., 2022). Кроме того, есть данные об антимикробной активности пептидов, образующихся в результате действия протеаз молочнокислых бактерий на казеин — основной белок молока (Фёдорова и соавт., 2018).

Ранее с цехового оборудования частного молочного хозяйства нами были выделены штаммы *P. aeruginosa* 42 и *P. aeruginosa* 47, показавшие ряд отличий по характеру роста на средах культивирования, антибиотикорезистентности, чувствительности к литическому действию синегнойного бактериофага, действию дезинфицирующего средства (нейтральный анолит), в том числе с добавлением поверхностно-активных веществ (ПАВ) (Кишилова, 2024). Штамм *P. aeruginosa* M1 был выделен из сливочного масла при проведении микробиологического контроля.

Таблица 1
Исследуемые штаммы МКБ

Table 1
Tested LAB Strains

№ п/п	Вид	Наименование штамма	Источник выделения
1	<i>Lactobacillus helveticus</i>	AK	Aeces здорового человека
2		14вв	Национальный ферментированный зерновой продукт ЮАР — махеву
3		2вв	Национальный ферментированный зерновой продукт ЮАР — махеву
4		5вв	Национальный ферментированный зерновой продукт ЮАР — махеву
5	<i>Lactococcus lactis</i>	Б6п4	Самоквасный кисломолочный продукт
6		MA1	Национальный ферментированный зерновой продукт ЮАР — махеву
7		AM1	Национальный ферментированный зерновой продукт ЮАР — махеву
8		dLA	Сметана
9	<i>Streptococcus thermophilus</i>	16t	Самоквасный кисломолочный продукт
10		163	Самоквасный кисломолочный продукт
11		159	Листья апельсина
12		ABK	Кефирный грибок (Бегунова и др. 2021)
13	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	MA2	Национальный ферментированный зерновой продукт ЮАР — махеву (Моисеенко и др. 2022)
14		MA3	Национальный ферментированный зерновой продукт ЮАР — махеву (Моисеенко и др. 2022)
15		KF1	Кефирный грибок (Бегунова и др. 2021)

Цель данного исследования: сравнительная оценка антимикробной активности различных штаммов МКБ по отношению к представителям *P. aeruginosa*.

Исследовательские вопросы:

RQ#1: Проявляют ли коллекционные штаммы МКБ антимикробную активность по отношению к типовому коллекционному тест-штамму *P. aeruginosa* ATCC 25668?

RQ#2: Проявляют ли штаммы, обладающие антимикробной активностью к коллекционному тест-штамму *P. aeruginosa* ATCC 25668, антимикробное действие по отношению к диким штаммам *P. aeruginosa* 42, *P. aeruginosa* 47 и *P. aeruginosa* M1, выделенным из разных источников?

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ
Объекты исследования

Объектами исследования являлись штаммы молочнокислых бактерий (МКБ) из коллекции пробиотических и молочнокислых микроорганизмов Всероссийского научно-исследовательского института молочной промышленности (ФГАНУ «ВНИМИ»). Для проведения исследования использовались 15 штаммов МКБ, перечень исследуемых штаммов МКБ представлен в Таблице 1.

Методы

Антимикробную активность исследовали методом совместного культивирования в соответствии с МУ 2.3.2.2789–10. Из всех экспериментальных и контрольных образцов готовили ряд последовательных десятикратных разведений, из которых проводили посев в трех повторностях. Посевы культивировали при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$. Подсчет клеток *P. aeruginosa* проводили через 24 ч и через 48 ч.

Процедура исследования

Подготовка культур

Исследуемые штаммы МКБ хранили в лиофилизированном состоянии при температуре минус $(50 \pm 1)^\circ\text{C}$. Восстановление лиофилизированных культур проводили в стерильном обезжиренном молоке (ОМС) марки «Стандарт» (Комплимилк, Слуцкий сыродельный комбинат, г. Слуцк, Беларусь), путем инкубации в течение 16 часов. Инкубацию штаммов *L. helveticus* и *S. thermophilus* проводили при температуре при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$, штаммов *L. lactis*, *L. paracasei* — при температуре $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$.

Штаммы *P. aeruginosa* хранили на полужидком питательном агаре при температуре $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$. Перед проведением исследований пересевали на среду СПА (НПЦ Биокompас-С, Россия) и культивировали при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$. Для приготовления инокулятов *P. aeruginosa* из культур, выросших на СПА, готовили суспензии с мутностью, эквивалентной 5–6 ед. по MacFarland (Biomérieux, Франция).

Подготовка образцов

Для определения антимикробной активности в 20 см³ стерильного обезжиренного молока вносили по 1 см³ инокулятов исследуемых штаммов МКБ и *P. aeruginosa* и инкубировали в течение 24 и 48 часов при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$. Контролем являлся образец, инокулированный только 1 см³ *P. aeruginosa*.

Определение антимикробной активности

После инкубации в каждом из образцов определяли количество *P. aeruginosa* путем высева на селективную среду для псевдомонад — цетримидный агар (Himedia, Индия). Посевы на цетримидном агаре инкубировали

при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 24 ч, затем проводили подсчет выросших колоний.

На первом этапе оценивалась антимикробная активность исследуемых штаммов по отношению к коллекционному тест-штамму *P. aeruginosa* ATCC 25668, полученному из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск». Для штаммов МКБ, показавших наибольшую антимикробную активность по отношению к *P. aeruginosa* ATCC 25668, дополнительно исследовалась антимикробная активность по отношению к диким штаммам *P. aeruginosa* 42, *P. aeruginosa* 47 и *P. aeruginosa* M1.

Анализ результатов

Для обработки результатов и построение графиков использовали программу MS Office Excel 2016. Эксперименты проводили в трех независимых повторностях, результаты выражены как среднее значение, на графиках указано $\pm$ стандартное отклонение. Статистически значимыми по двустороннему критерию Стьюдента считали отличия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На первом этапе исследований продемонстрирована антимикробная активность исследуемых штаммов МКБ по отношению к коллекционному тест-штамму *P. aeruginosa* ATCC 25668. По результатам данного этапа были отобраны два штамма: *S. thermophilus* 16t и *L. helveticus* Ббн4, показавшие наибольшую ингибирующую активность. На втором этапе исследований проводилось определение антимикробной активности выбранных МКБ по отношению к изолятам *P. aeruginosa* 42, *P. aeruginosa* 47 и *P. aeruginosa* M1 дикого типа.

Исследование антимикробной активности МКБ по отношению к коллекционному тест-штамму *P. aeruginosa* ATCC 25668

Результаты исследования антимикробной активности исследуемых штаммов МКБ по отношению к *P. aeruginosa* ATCC 25668 представлены на Рисунках 1–4.

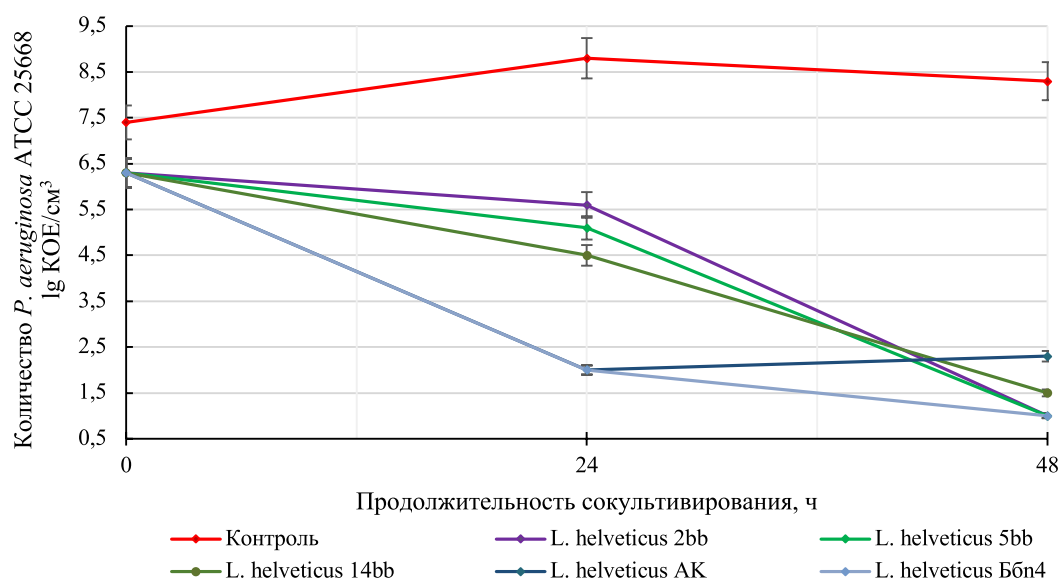
На Рисунке 1 представлены результаты антимикробной активности представителей *L. helveticus* по отношению к типовому коллекционному штамму *P. aeruginosa* ATCC 25668

Рисунок 1

Антимикробная активность *L. helveticus* по отношению к *P. aeruginosa* ATCC 25668

Figure 1

Antimicrobial Activity of *L. Helveticus* against *P. Aeruginosa* ATCC 25668



В целом, все изученные штаммы *L. helveticus* оказывали выраженное ингибирующее действие на синегнойную палочку. Через 48 часов сокультивирования количество клеток *P. aeruginosa* ATCC 25668 снижалось на 4–5 порядков и составляло от $2,2 \times 10^2$ до $1,0 \times 10^1$ КОЕ/см³. В то же время в контрольном образце наблюдался рост монокультуры *P. aeruginosa* ATCC 25668 — до $6,4 \times 10^8$ КОЕ/см³ через 24 ч с незначительным снижением до $1,9 \times 10^8$ КОЕ/см³ через 48 ч. При этом ингибирование роста патогена было наиболее выражено у штамма *L. helveticus* Ббп4 — количество *P. aeruginosa* ATCC 25668 уже через 24 ч составило $1,0 \times 10^2$ КОЕ/см³ с дальнейшим снижением количества клеток на порядок — до $1,0 \times 10^1$ КОЕ/см³.

На Рисунке 2 представлены результаты антимикробной активности представителей *L. paracasei* по отношению к коллекционному штамму *P. aeruginosa* ATCC 25668

Ингибирующее действие штаммов *L. paracasei*, за исключением *L. paracasei* АВК, на рост *P. aeruginosa* ATCC 25668 было слабым. Через 24 ч сокультивирования во всех вариантах наблюдалось или отсутствие ингибирующего эффекта или даже рост патогена. В то же время при сокультивировании с *L. paracasei* АВК через 48 ч количество патогена снижалось до $1,0 \times 10^3$ КОЕ/см³, что может быть связано с накоплением культурой антимикробных метаболитов.

На Рисунке 3 представлены результаты изучения антимикробной активности представителей *S. thermophilus* по отношению к коллекционному штамму *P. aeruginosa* ATCC 25668

Все три изученных штамма *S. thermophilus* активно подавляли рост патогена и через 48 часов количество клеток *P. aeruginosa* ATCC 25668 часов снизилось на 5 порядков и составило $1,0 \times 10^1$ КОЕ/см³, при увеличении за тот же период количества клеток синегнойной палочки в контрольном образце. Причем *S. thermophilus* 163 через 24 часа практически не оказывал подавляющего действия на синегнойную палочку, значительно усиливая его к 48 часам, что, возможно связано с особенностями штамма и медленным накоплением антимикробных метаболитов.

Представители *L. lactis* не обладали значительной антагонистической активностью по отношению к *P. aeruginosa* ATCC 25668. Максимальный ингибирующий эффект оказывал штамм *L. lactis* AM1. При сокультивировании с данным штаммом количество клеток *P. aeruginosa* ATCC 25668 через 24 ч составило $2,3 \times 10^7$ КОЕ/см³, снижаясь через 48 ч до $6,5 \times 10^3$ КОЕ/см³.

В целом, можно констатировать, что ингибирующее действие *L. helveticus* и *S. thermophilus* на синегнойную палочку было более выражено по сравнению с *L.*

Рисунок 2

Антимикробная активность *L. paracasei* по отношению к *P. aeruginosa* ATCC 25668

Figure 2

Antimicrobial Activity of *L. paracasei* against *P. aeruginosa* ATCC 25668

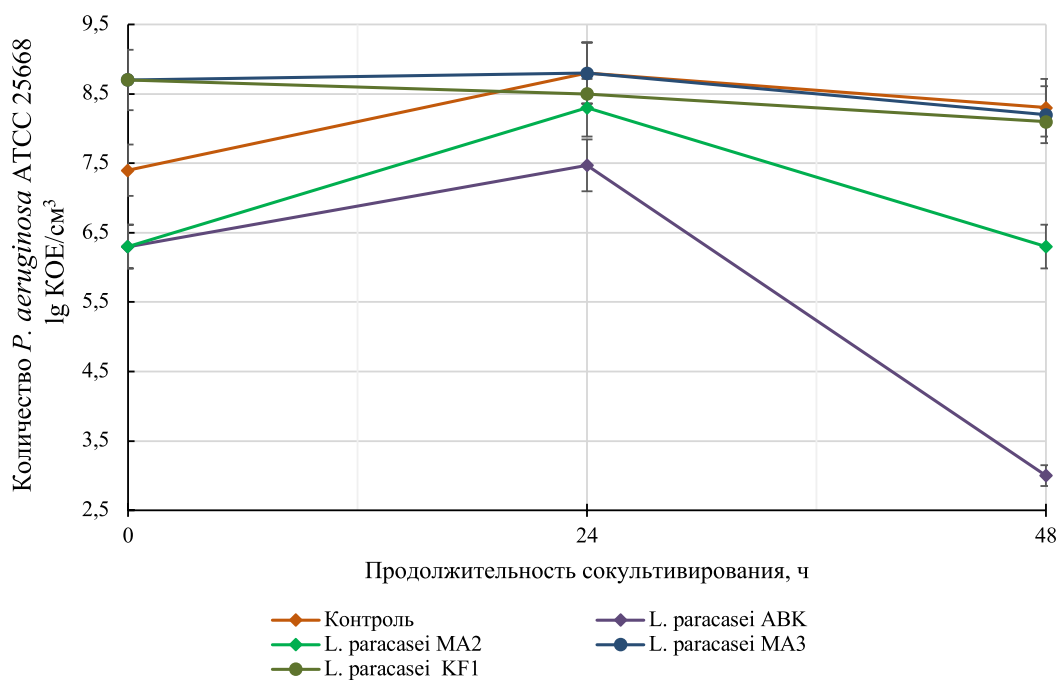
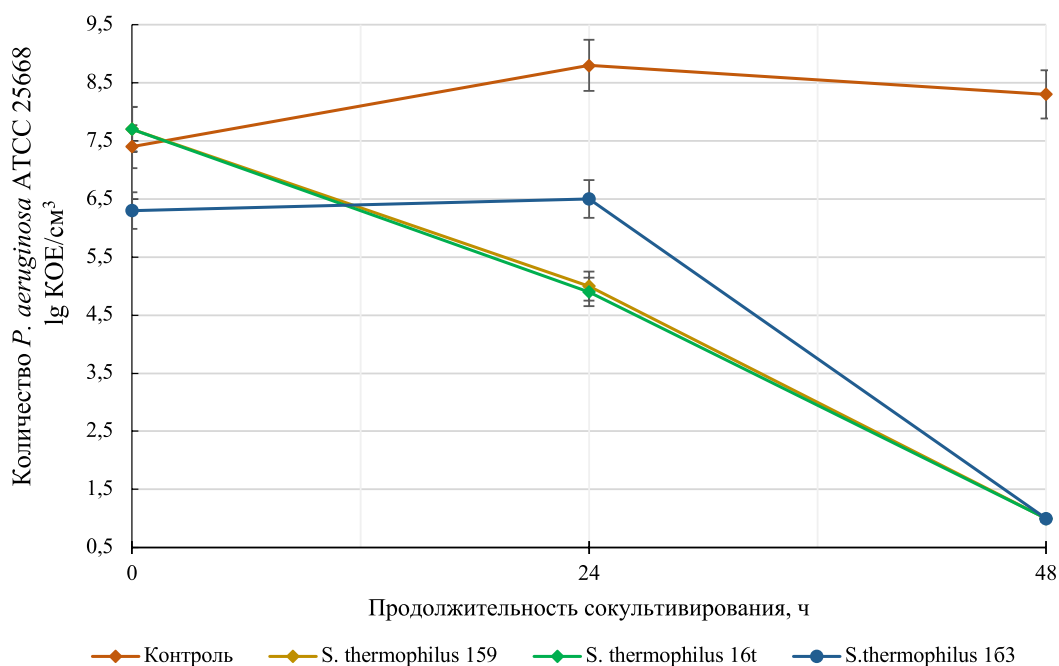


Рисунок 3

Антимикробная активность *S. thermophilus* по отношению к *P. aeruginosa* ATCC 25668

Figure 3

Antimicrobial Activity of *S. Thermophilus* against *P. aeruginosa* ATCC 25668



paracasei и *L. lactis*. В результате первого этапа исследований, для подтверждения ингибирующих свойств МКБ относительно изолятов *P. aeruginosa* 42, *P. aeruginosa* 47 и *P. aeruginosa* M1 были выбраны 2 штамма: *S. thermophilus* 16t и *L. helveticus* Б6н4.

Исследование антимикробной активности МКБ по отношению к изолятам *P. aeruginosa* 42, *P. aeruginosa* 47 и *P. aeruginosa* M1 дикого типа

На Рисунке 4 представлены результаты изучения антимикробной активности штаммов *S. thermophilus* 16t и *L. helveticus* Б6н4 по отношению к изоляту *P. aeruginosa* 47

Показана высокая антимикробная активность *L. helveticus* Б6н4 по отношению *P. aeruginosa* 47. Количество клеток патогена снижалось на 6 порядков, с дальнейшим снижением на порядок к 48 ч сокультивирования и составил $2,0 \times 10^3$ КОЕ/см³, по сравнению с $1,0 \times 10^9$ КОЕ/см³ в контроле, что согласуется с результатами, полученными для коллекционного типового штамма. В то же время, ингибирующее действие *S. thermophilus* 16t на *P. aeruginosa* 47 было крайне незначительно — через 24 часа даже наблюдался незначительный рост патогена до $1,5 \times 10^9$ КОЕ/см³, а через 48 ч сокультиви-

рования количество клеток синегнойной палочки составило $4,0 \times 10^7$ КОЕ/см³. Таким образом, можно предположить наличие у изолята *P. aeruginosa* 47, в отличие от коллекционного штамма, устойчивости к метаболитам *S. thermophilus* 16t. Резистентность может возникать вследствие изменения поверхностных структур клетки и продукции протеолитических ферментов, разрушающих бактериоцины, синтезируемые МКБ (Андюков, 2018). В результате проведенных ранее исследований, обнаружены различия в эффективности действия дезинфицирующих растворов на штаммы *P. aeruginosa*. *P. aeruginosa* 47 сохранял жизнеспособность при воздействии анолита с добавлением ПАВ окиси дециламина и окиси алкилдиметиламина (Кишилова & Маневич 2024). Учитывая также большую устойчивость *P. aeruginosa* 47 к ряду антибактериальных препаратов по сравнению с *P. aeruginosa* ATCC 25668 и *P. aeruginosa* 42 (Кишилова и др., 2024), можно предположить, что данный штамм обладает более эффективной системой эффлюкса.

На Рисунке 5 представлены результаты изучения антимикробной активности штаммов *S. thermophilus* 16t и *L. helveticus* Б6н4 по отношению к изоляту *P. aeruginosa* M1

Рисунок 4

Антимикробная активность штаммов МКБ по отношению к *P. aeruginosa* 47

Figure 4

Antimicrobial Activity of LAB Strains against *P. aeruginosa* 47

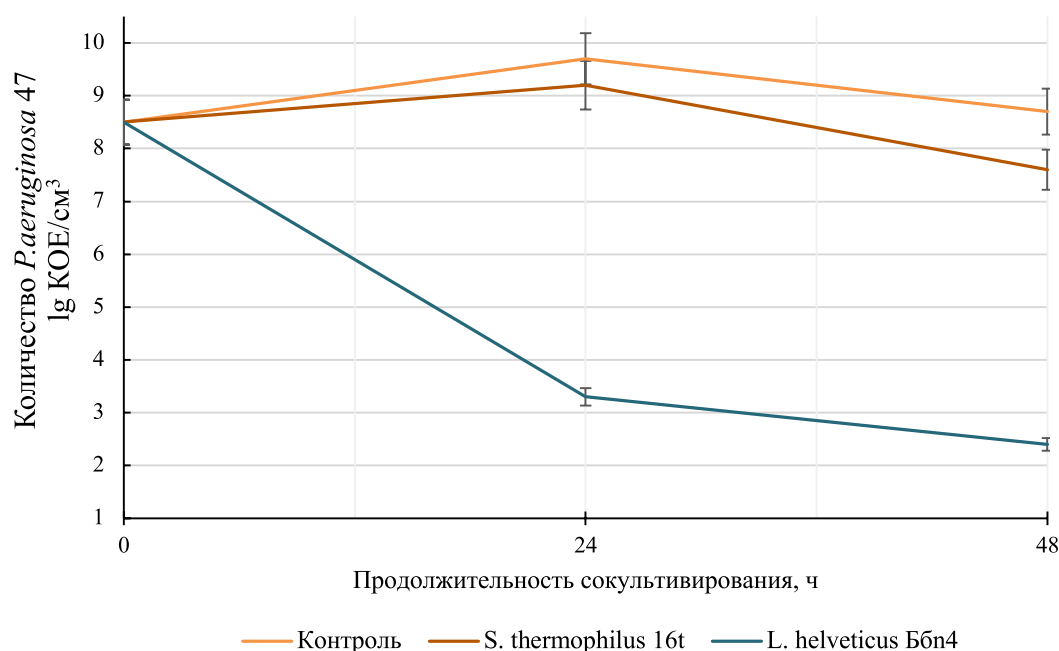


Рисунок 5

Антимикробная активность штаммов МКБ по отношению к *P. aeruginosa* M1

Figure 5

Antimicrobial Activity of LAB Strains against *P. aeruginosa* M1

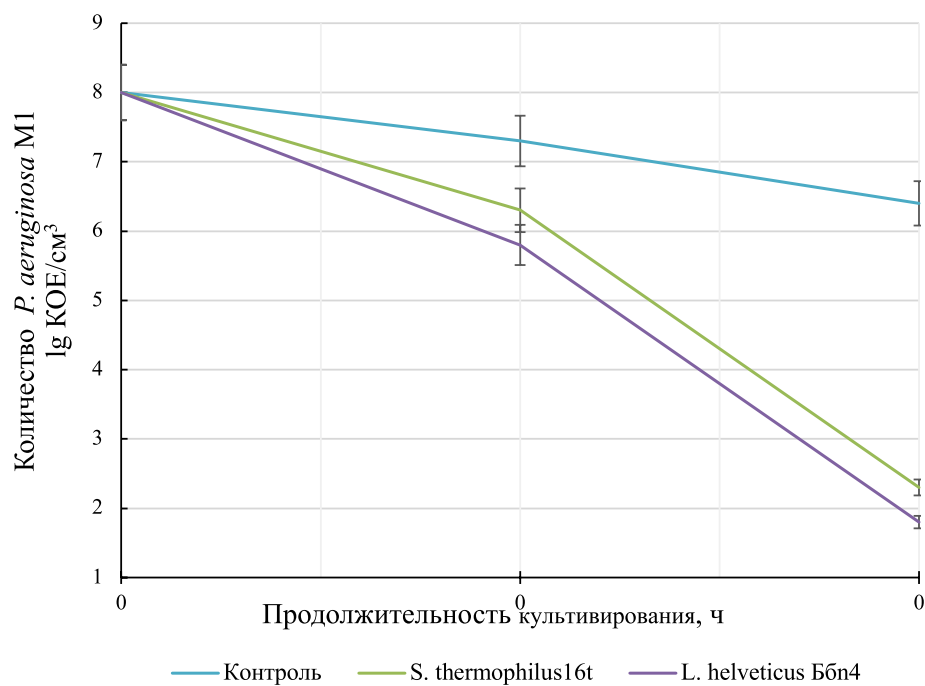
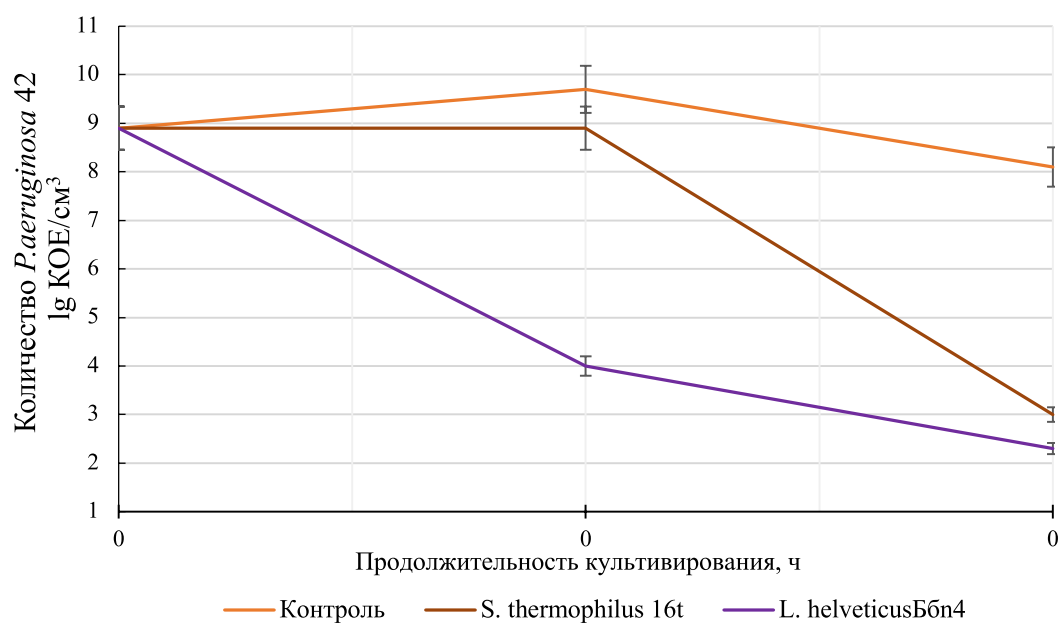


Рисунок 6

Антимикробная активность штаммов МКБ по отношению к *P. aeruginosa* 42

Figure 6

Antimicrobial Activity of LAB Strains against *P. aeruginosa* 42



Представленные данные свидетельствуют, что оба штамма МКБ оказывали значительное ингибирующее действие на *P. aeruginosa* М1, снижая количество клеток патогена через 24 часа на 1,5–2 порядка и на 5,5–6 порядков через 48 часов, что согласуется с данными для коллекционного штамма, при этом действие *L. helveticus* Ббн4 было чуть более выраженным как через 24, так и через 48 часов сокультивирования. При сокультивировании *L. helveticus* Ббн4 и *P. aeruginosa* М1 через 24 ч количество клеток *P. aeruginosa* М1 составило $6,0 \times 10^5$ КОЕ/см³, через 48 ч количество клеток *P. aeruginosa* М1 снизилось до $7,0 \times 10^1$ КОЕ/см³.

На Рисунке 6 представлены результаты изучения антимикробной активности штаммов *S. thermophilus* 16t и *L. helveticus* Ббн4 по отношению к изоляту *P. aeruginosa* 42

При сокультивировании *L. helveticus* Ббн4 и *P. aeruginosa* 42 через 24 ч количество клеток *P. aeruginosa* составило $1,0 \times 10^4$ КОЕ/см³, а через 48 ч – $4,0 \times 10^1$ КОЕ/см³. В контрольном образце количество клеток *P. aeruginosa* варьировалось от $2,0 \times 10^8$ до $6,0 \times 10^9$ КОЕ/см³ в течение периода культивирования. По результатам исследований, наибольшую антимикробную активность по отношению к диким штаммам *P. aeruginosa* 42, *P. aeruginosa* М1 и *P. aeruginosa* 47 проявлял штамм *L. helveticus* Ббн4.

Штамм *S. thermophilus* 16t, показавший высокую антимикробную активность по отношению к типовому коллекционному штамму, подтвердил ее только относительно *P. aeruginosa* М1, выделенному из масла сливочного. Ингибирующее действие *S. thermophilus* 16t на штамм *P. aeruginosa* 42 было менее выражено, по сравнению со штаммом *L. helveticus* Ббн4, и практически отсутствовало при сокультивировании с *P. aeruginosa* 47.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Штамм *Lactobacillus helveticus* Ббн4 продемонстрировал наибольшую антимикробную активность против штаммов *Pseudomonas aeruginosa* различного происхождения среди исследованных молочнокислых бактерий. При сокультивировании с *L. helveticus* Ббн4 количество клеток *P. aeruginosa* во всех исследуемых образцах снижалось примерно на шесть порядков. Эти результаты подтверждают литературные данные о выраженной антимикробной активности представителей *L. helveticus* по отношению как к грамположительным, так и к грамотрицательным патогенным микроорганизмам, включая *P. aeruginosa* (Hassan et al., 2020; Du et al., 2024). Следова-

тельно, штамм *L. helveticus* Ббн4 может рассматриваться как перспективный биологический агент для биоконтроля контаминации пищевых продуктов, связанной с *P. aeruginosa*.

Антимикробная активность молочнокислых бактерий в отношении *P. aeruginosa* также подтверждается результатами других исследований. Так, Rana et al. (2020) продемонстрировали ингибирующее действие бесклеточных супернатантов *Lactobacillus fermentum* и *Lactobacillus rhamnosus* на формирование биопленки *P. aeruginosa*. При этом антибиопленочная активность существенно снижалась после нейтрализации супернатантов, что свидетельствует о ключевой роли органических кислот, синтезируемых молочнокислыми бактериями, в механизме ингибирования. Аналогичные данные получены в исследовании Al-Melkey et al. (2017), где было показано антимикробное действие лактобацилл в отношении штаммов *P. aeruginosa*, обладающих устойчивостью к лекарственным антимикробным препаратам.

Ингибирующее действие *L. helveticus* Ббн4 может быть обусловлено синтезом антимикробных соединений, в первую очередь органических кислот, являющихся сильными ингибиторами роста патогенных микроорганизмов (Ozcelik et al., 2016). Известно, что представители *L. helveticus* являются активными кислотообразователями (Wang et al., 2021; Hati et al., 2018). Кроме того, некоторые представители *L. helveticus* также могут синтезировать бактериоцины, ингибирующие рост пищевых патогенов, в том числе *P. aeruginosa*, и действующие в широком диапазоне pH (Hassan et al., 2020; Angelescu et al., 2022; Jena et al., 2013). Есть данные, подтверждающие эффективность бактериоцинов лактобацилл по отношению к синегнойной палочке в составе биопленок (Ouali et al., 2014). Потенциальное наличие в метагеноме штамма *L. helveticus* Ббн4 антимикробных соединений требует дальнейшего изучения.

L. helveticus также могут синтезировать бактериоцины с широким спектром антимикробного действия. Бактериоцины *L. helveticus* ингибируют рост грамположительных и грамотрицательных пищевых патогенов, в том числе *P. aeruginosa*. Данные соединения сохраняют активность в диапазоне pH от 2 до 10 ед. pH и устойчивы к термическому воздействию (Hassan et al., 2020; Angelescu et al., 2022; Jena et al., 2013). За счет своих свойств бактериоцины интересны для пищевой промышленности в качестве потенциальных пищевых консервантов.

P. aeruginosa способна продуцировать сидерофоры — низкомолекулярные вещества, способные связывать железо и солюбилизовать его (Лазарева и соавт., 2015). Лактобациллы, в отличие от большинства микроорганизмов, не нуждаются в железе для роста, и сидерофоры *P. aeruginosa* не представляют угрозы их развитию. При этом органические кислоты, являющиеся основными метаболитами МКБ, обладают хелатирующими свойствами и способны связывать из субстрата железо, необходимое для роста *P. aeruginosa* (Quintieri et al., 2019). Кроме того, антимикробное действие бактерий рода *Lactobacillus* может быть связано с индукцией ферментов: литических трансгликозилаз и литических гликозил-гидролаз (эндопептидаз), разрушающих пептидогликан клеточной стенки грамотрицательных бактерий (Фёдорова и соавт., 2018).

Штамм *L. helveticus* Ббп4 можно использовать в качестве защитной заквасочной культуры для производства кисломолочной продукции с целью снижения риска контаминации *P. aeruginosa*. Однако для промышленного применения выбранного штамма необходимы исследования механизма его антимикробного действия. Дальнейшие исследования предполагают изучение метаболитного профиля *L. helveticus* Ббп4 и повышение синтеза антимикробных веществ.

Ограничения исследования

Полученные результаты не касаются клинических изолятов *P. aeruginosa* с лекарственной устойчивостью, в исследовании проводилась оценка антимикробной активности только по отношению к контаминантам, выделенным на молочных производствах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты исследования показали, что представители лактобацилл, в частности *L. helveticus*, обладали высокой ингибирующей активностью относительно штаммов синегнойной палочки как коллекционного, так и дикого типа, выделенных из разных источников, и могут рассматриваться как перспективные антимикробные агенты относительно такого сложного патогена, как *P. aeruginosa*. В частности, штамм с наибольшей ингибирующей активностью *L. helveticus* Ббп4 может потенциально применяться в качестве защитной заквасочной культуры с целью снижения риска контаминации кисломолочной продукции *P. aeruginosa*. Однако необходимы дальнейшие исследования по выявлению механизмов антимикробного действия этой культуры.

АВТОРСКИЙ ВКЛАД

Светлана Анатольевна Кишилова: концептуализация, проведение исследования, формальный анализ, написание черновика рукописи.

Виктория Александровна Леонова: проведение исследования, формальный анализ, визуализация результатов, написание рукописи — рецензирование и редактирование.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Svetlana A. Kishilova: conceptualization, investigation, formal analysis, writing — original draft preparation.

Victoria A. Leonova: investigation, formal analysis, visualization, writing — reviewing & editing.

ЛИТЕРАТУРА/ REFERENCES

- Андрюков, Б. Г., Недашковская, Е. П. (2018). Вступая в пост-антибиотиковую эру: перспективные стратегии поиска новых альтернативных стратегий борьбы с инфекционными заболеваниями. *Здоровье. Медицинская экология. Наука*, (75), 36–50 <https://doi.org/10.5281/zenodo.1488026>
- Andriukov, B. G., Nedashkovskaya, E. P. (2018). Entering the post-antibiotic era: Promising strategies for finding new alternative strategies to combat infectious diseases. *Health. Medical ecology. Science*, (75), 36–50. (In Russ) <https://doi.org/10.5281/zenodo.1488026>
- Бегунова, А. В., Савинова, О. С., Моисеенко, К. В., Глазунова, О. А., Рожкова, И. В., & Фёдорова, Т. В. (2021). Характеристика и функциональные свойства лактобацилл, выделенных из кефирных грибков. *Прикладная биохимия и микробиология*, 57(4), 362–373. <https://doi.org/10.31857/S0555109921040036>

- Begunova, A. V., Savinova, O. S., Moiseenko, K. V., Glazunova, O. A., Rozhkova, I. V., & Fedorova, T. V. (2021). Characterization and functional properties of lactobacilli isolated from kefir grains. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 57(4), 362–373. (In Russ) <https://doi.org/10.31857/S0555109921040036>
- Кишилова, С.А., Маневич, Б.В., & Рожкова, И.В. (2024). Оценка действия биоцидных агентов на штаммы *Pseudomonas aeruginosa*, выделенные из содержимого молочной фермы. *Пищевая промышленность*, (11), 71–76. <https://doi.org/10.52653/PPI.2024.11.11.013>
- Kishilova, S.A., Manevich, B.V., & Rozhkova, I.V. (2024). Evaluation of the effect of biocidal agents on *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from dairy farm contents. *Food Industry*, (11), 71–76. (In Russ) <https://doi.org/10.52653/PPI.2024.11.11.013>
- Кишилова, С.А., Колоколова, А.Ю., & Рожкова И.В. (2024). Антимикробная активность метаболитных комплексов лактобактерий в отношении *Pseudomonas aeruginosa*. *Биофизика*, 69(2), 324–332. <https://doi.org/10.31857/S0006302924020141>
- Kishilova, S.A., Kolokolova A. Yu., & Rozhkova, I.V. (2024). Antimicrobial activity of metabolite complexes of lactobacillus against pseudomonas aeruginosa. *Biophysics*, 69(2), 324–332. <https://doi.org/10.31857/S0006302924020141>
- Лазарева, А. В., Чеботарь, И. В., Крыжановская, О. А., Чеботарь, В. И., & Маянский, Н. А. (2015). *Pseudomonas aeruginosa*: патогенность, патогенез и патология. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*, 17(3), 170–186.
- Lazareva, A. V., Chebotar, I. V., Kryzhanovskaya, O. A., Chebotar, V. I., & Mayansky, N. A. (2015). *Pseudomonas aeruginosa*: Pathogenicity, pathogenesis and diseases. *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*, 17(3), 170–186. (In Russ)
- Моисеенко, К. В., Бегунова, А. В., Рожкова, И. В., & Федорова, Т. В. (2022). Выделение и характеристика штаммов *Lacticaseibacillus paracasei*, из кефирных грибков и традиционного зернового продукта ЮАР-махеу, *Актуальная биотехнология*, (1), 111–114.
- Moiseenko, K. V., Begunova, A. V., Rozhkova, I. V., & Fedorova, T. V. (2022). Isolation and characterization of strains of *Lacticaseibacillus paracasei*, from kefir grains and a traditional grain product of South Africa-mahevu. *Actual Biotechnology*, (1), 111–114. (In Russ).
- Стойанова, Л. Г., Устюгова, Е. А., & Нетрусов, А. И. (2012). Антимикробные метаболиты молочнокислых бактерий: разнообразие и свойства (обзор). *Прикладная биохимия и микробиология*, 48(3), 259–259.
- Stoyanova, L.G., Ustyugova, E.A., & Netrusov, A.I. (2012). Antibacterial metabolites of lactic acid bacteria: Their diversity and properties. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 48(3), 259–259. (In Russ).
- Токарева, Д. Н., & Худеева, К. А. (2015). Стимулирование продукции пеоцианина бактерией *Pseudomonas aeruginosa*. *Высокие технологии в современной науке и технике: сборник научных трудов IV Международной научно-технической конференции молодых ученых, аспирантов и студентов* (с. 234–238). Томск: Изд-во ТПУ.
- Tokareva, D. N., & Khudeeva, K. A. (2015). Stimulation of pyocyanin production by the bacterium *Pseudomonas aeruginosa*. *High technologies in modern science and technology: collection of scientific papers of the IV International Scientific and Technical Conference of Young Scientists, Postgraduates and Students* (с. 234–238). (In Russ). Tomsk: TPU Publishing House.
- Тутельян, А. В., Юшина, Ю. К., Соколова, О. В., Батаева, Д. С., Фесюн, А. Д., & Датий, А. В. (2019). Образование биологических пленок микроорганизмов на пищевых производствах. *Вопросы питания*, 88(3), 32–43. <https://doi.org/10.24411/0042-8833-2019-10027>
- Tutelyan, A. V., Yushina, Y. K., Sokolova, O. V., Bataeva, D. S., Fesyun, A. D., & Datiy, A. V. (2019). Formation of biological films by microorganisms in food productions. *Voprosy Pitaniia*, 88(3), 32–43. (In Russ). <https://doi.org/10.24411/0042-8833-2019-10027>
- Фёдорова, Т. В., Васина, Д. В., Бегунова, А. В., Рожкова, И. В., Раскошная, Т. А., & Габриэлян, Н. И. (2018). Антагонистическая активность молочнокислых бактерий *Lactobacillus SPP.* в отношении клинических изолятов *Klebsiella pneumoniae*. *Прикладная биохимия и микробиология*, 54(3), 264–276. <https://doi.org/10.7868/S0555109918030054>

- Fedorova, T.V., Vasina, D.V., Begunova, A.V., Rozhkova, I.V., Raskoshnaya, T.A., & Gabrielyan, N.I. (2018). Antagonistic activity of lactic acid bacteria *Lactobacillus* SPP. against clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 54(3), 264–276. (In Russ) <https://doi.org/10.7868/S0555109918030054>
- Al-Malkey, M. K., Ismeeal, M. C., Al-Hur, F. J. A., Mohammed, S. W., & Nayyef, H. J. (2017). Antimicrobial effect of probiotic *Lactobacillus* spp. on *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Contemporary Medical Sciences*, 3(10), 218–223. <https://doi.org/doi.org/10.22317/jcms.06201704>
- Al-Shammary, A. H. A. (2015). The effect of heat treatment, pH and osmotic pressure on viability of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from raw dairy products in Baghdad. *International Journal of Advanced Research*, 3(3), 675–681.
- Angelescu, I. R., Grosu-Tudor, S. S., Cojoc, L. R., Maria, G. M., Chirițoiu, G. N., Munteanu, C. V., & Zamfir, M. (2022). Isolation, characterization, and mode of action of a class III bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 34.9. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 38(12), 220. <https://doi.org/10.1007/s11274-022-03408-z>
- Atolani, O., Baker, M. T., Adeyemi, O. S., Olanrewaju, I. R., Hamid, A. A., Ameen, O. M., Oguntoye, S.O., & Usman, L. A. (2020). COVID-19: Critical discussion on the applications and implications of chemicals in sanitizers and disinfectants. *EXCLI Journal*, 19, 785–799. <https://doi.org/10.17179/excli2020-1386>
- Badawy, B., Moustafa, S., Shata, R., Sayed-Ahmed, M. Z., Alqahtani, S. S., Ali, M. S., Alam, N., Ahmad, N., Kasem, N., Elbaz, E., El-Bahkiry, H.S., Radwan, R.M., El-Gohary, A. & Elsayed, M. M. (2023). Prevalence of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from dairy cattle, milk, environment, and workers' hands. *Microorganisms*, 11(11), 2775. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11112775>
- Bonneville, L., Maia, V., Barroso, I., Martínez-Suárez, J. V., & Brito, L. (2021). *Lactobacillus plantarum* in dual-species biofilms with *Listeria monocytogenes* enhanced the anti-*Listeria* activity of a commercial disinfectant based on hydrogen peroxide and peracetic acid. *Frontiers in Microbiology*, 12, 631627. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.631627>
- Caldera, L., Franzetti, L., Van Coillie, E., De Vos, P., Stragier, P., De Block, J., & Heyndrickx, M. (2016). Identification, enzymatic spoilage characterization and proteolytic activity quantification of *Pseudomonas* spp. isolated from different foods. *Food Microbiology*, 54, 142–153. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.10.004>
- Chang, G., Li, Q., Wang, T., Zhang, B., Wu, W., Lv, C., Sun, T., Zhou T., Zheng, W, Wang, Y. & Wang, X. (2024). Characterization of *Pseudomonas* spp. contamination and in situ spoilage potential in pasteurized milk production process. *Food Research International*, 188, 114463. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2024.114463>
- Chen, S. Y., Yang, R. S., Ci, B. Q., Xin, W. G., Zhang, Q. L., Lin, L. B., & Wang, F. (2023). A novel bacteriocin against multiple foodborne pathogens from *Lactocaseibacillus rhamnosus* isolated from juice ferments: ATF perfusion-based preparation of viable cells, characterization, antibacterial and antibiofilm activity. *Current Research in Food Science*, 6, 100484. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2023.100484>
- Du, Y., Xu, J., Li, J., & Wu, R. (2024). Evaluation of probiotic properties and safety of *Lactobacillus helveticus* LH10 derived from Vinegar through comprehensive analysis of genotype and phenotype. *Microorganisms*, 12(4), 831. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12040831>
- Hassan, M. U., Nayab, H., Shafique, F., Williamson, M. P., Almansouri, T. S., Asim, N., Shafi, N., Khalid, M., Ali, N., & Akbar, N. (2020). Probiotic properties of *Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus plantarum* isolated from traditional Pakistani yoghurt. *BioMed Research International*, 2020(1), 8889198. <https://doi.org/10.1155/2020/8889198>
- Hati, S., Patel, N., & Mandal, S. (2018). Comparative growth behaviour and biofunctionality of lactic acid bacteria during fermentation of soy milk and bovine milk. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 10, 277–283. <https://doi.org/10.1007/s12602-017-9279-5>
- Jena, P. K., Trivedi, D., Chaudhary, H., Sahoo, T. K., & Seshadri, S. (2013). Bacteriocin PJ4 active against enteric pathogen produced by *Lactobacillus helveticus* PJ4 isolated from gut microflora of Wistar rat (*Rattus norvegicus*): Partial purification and characterization of bacteriocin. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 169, 2088–2100. <https://doi.org/10.1007/s12010-012-0044-7>
- Li, X., Gu, N., Huang, T. Y., Zhong, F., & Peng, G. (2023). *Pseudomonas aeruginosa*: A typical biofilm forming pathogen and an emerging but underestimated pathogen in food processing. *Frontiers in Microbiology*, 13, 1114199. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1114199>

- Marcelli, V., Osimani, A., & Aquilanti, L. (2024). Research progress on the use of lactic acid bacteria as natural bio-preservatives against *Pseudomonas* spp. in meat and meat products: A review. *Food Research International*, 115129. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2024.115129>
- Mokoena, M. P., Omatola, C. A., & Olaniran, A. O. (2021). Applications of lactic acid bacteria and their bacteriocins against food spoilage microorganisms and foodborne pathogens. *Molecules*, 26(22), 7055. <https://doi.org/10.3390/molecules26227055>
- Narvhus, J. A., Bækkelund, O. N., Tidemann, E. M., Østlie, H. M., & Abrahamsen, R. K. (2021). Isolates of *Pseudomonas* spp. from cold-stored raw milk show variation in proteolytic and lipolytic properties. *International Dairy Journal*, 123, 105049. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105049>
- Ouali, F. A., Al Kassaa, I., Cudennec, B., Abdallah, M., Bendali, F., Sadoun, D. & Drider, D. (2014). Identification of lactobacilli with inhibitory effect on biofilm formation by pathogenic bacteria on stainless steel surfaces. *International journal of food microbiology*, 191, 116–124. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.09.011>
- Ozcelik, S., Kuley, E., & Ozogul, F. (2016). Formation of lactic, acetic, succinic, propionic, formic and butyric acid by lactic acid bacteria. *LWT*, 73, 536–542. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.06.066>
- Rana, S., Bhawal, S., Kumari, A., Kapila, S., & Kapila, R. (2020). pH-dependent inhibition of AHL-mediated quorum sensing by cell-free supernatant of lactic acid bacteria in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Microbial Pathogenesis*, 142, 104105. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104105>
- Quintieri, L., Fanelli, F., & Caputo, L. (2019). Antibiotic resistant *Pseudomonas* SPP. spoilers in fresh dairy products: An underestimated risk and the control strategies. *Foods*, 8(9), 372. <https://doi.org/10.3390/foods8090372>
- Wang, Y., Wu, J., Lv, M., Shao, Z., Hungwe, M., Wang, J., Bai, X., Xie, J & Geng, W. (2021). Metabolism characteristics of lactic acid bacteria and the expanding applications in food industry. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 612285. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.612285>
- Zapasnik, A., Sokolowska, B., & Bryla, M. (2022). Role of lactic acid bacteria in food preservation and safety. *Foods*, 11(9), 1283. <https://doi.org/10.3390/foods11091283>