



Биолог. журн. Армении, 1 (69), 2017

ПОДАВЛЕНИЕ РОСТА НЕКОТОРЫХ МИЦЕЛИАЛЬНЫХ ГРИБОВ АНТИМИКРОБНЫМИ БИОПРЕПАРАТАМИ

Н.С. ХАЧАТУРЯН, Ф.Н. ТХРУНИ, Ц.Р. БАЛАБЕКЯН, А.А. ВЕРДЯН

НПЦ “Армбиотехнология” НАН РА ГНКО
microbio@sci.am

Проведен скрининг антимикробных биопрепаратов, полученных из культуральных жидкостей молочнокислых бактерий и дрожжей. Показано, что имеет место подавление роста некоторых видов мицелиальных грибов *Alternaria* sp. 8122, *Aspergillus ustus* 8464 и *Aspergillus unilateralis* 10648, вызывающих порчу пищевых продуктов. Подавление роста грибов зависит от родовой принадлежности штаммов и концентрации используемых частично очищенных препаратов, полученных из МКБ и дрожжей.

Мицелиальные грибы – антимикробный биопрепарат – подавление роста

Կատարվել է կաթնաթթվային բակտերիաների և շաքարասկերի կուլտուրաներից ստացված հակամանրէային կենսապատրաստուկների սկրինինգ: Ցույց է տրված սննդամթերքի փչացում առաջացնող միցելիալ սկերի որոշ տեսակների՝ *Alternaria* sp. 8122, *Aspergillus ustus* 8464 և *Aspergillus unilateralis* 10648, աճի ճնշում: Սկերի աճի ճնշումը կախված է կաթնաթթվային բակտերիաներից և շաքարասկերից ստացված մասնակի մաքրված պատրաստուկների կոնցենտրացիայից և շտամերի ցեղային պատկանելիությունից:

Միցելիալ սկեր – հակամանրէային կենսապատրաստուկ – աճի ճնշում

Antimicrobial biopreparations obtained from culture liquids of lactic acid bacteria and yeasts have been screened. It was shown that there was growth inhibition of some species of mycelial fungi *Alternaria* sp. 8122, *Aspergillus ustus* 8464 and *Aspergillus unilateralis* 10648 that caused food spoilage. Growth inhibition of fungi depends on the generic belonging of strains and concentration of the used partially purified preparations derived from LAB and yeasts.

Mycelial fungi – antimicrobial biopreparation – growth inhibition

Гигиенические нормативы, предъявляемые для микробиологических показателей и пищевой безопасности продуктов, включают разные группы микроорганизмов: мезофильные, аэробные и факультативно-анаэробные, условно патогенные и патогенные, сульфидпродуцирующие бактерии, дрожжи, плесень и др.

Потребительский спрос на минимально обработанные пищевые продукты или еду без химических консервантов стимулировал исследователей на поиск натуральных антимикробных средств. В настоящее время молочнокислые бактерии (МКБ) и синтезируемые ими антимикробные вещества, в том числе бактериоцины, считаются натуральными консервантами или биоконсервантами [7]. Поэтому поиск бактериоцинов с улучшенными физико-химическими свойствами и широким антимикробным спектром представляет большой интерес для пищевой про-

мышленности. Указанными качествами обладает множество бактериоцинов, синтезируемых различными штаммами *Bacillus*. Вместе с тем, отсутствие статуса “безопасности” (GRAS – generally recognise as safety) у большинства видов *Bacillus* (исключая некоторые штаммы *B. subtilis* и *B. licheniformis*) стало серьезной помехой для получения объективной оценки эффективности применения в пищевых продуктах бактериоцинов из бацилл. Среди многочисленных публикаций удельный вес работ, посвященных практическому использованию бактериоцинов, совсем небольшой. Подавляющее большинство исследований в этом направлении было сосредоточено главным образом на низине и педиоцине – единственных из лицензированных биопрезервантов группы бактериоцинов [7]. Однако сферы их применения ограничены из-за низкой активности при нейтральных или щелочных значениях pH [10].

Сегодня особенно актуальной является защита пищевых продуктов от заражения плесневыми грибами. Пищевые продукты заражаются в основном грибами рода *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, которые попадают из окружающей среды. Плесневые грибы синтезируют такие вредные вещества как афлатоксины, трихотецины, фумоноцины, охратоксины А и др. Подсчитано, что 5-10% пищевых продуктов уничтожаются ежегодно по причине грибного заражения [8].

Для сохранения продовольствия используются несколько методов. Некоторые химические добавки (органические кислоты: уксусная, молочная, пропионовая и соли сорбиновой и бензойной кислоты) используются в качестве консервантов, даже несмотря на то что точные механизмы неизвестны. Бензойная кислота и бензоат натрия используются главным образом как противогрибковые средства. Однако показано, что плесневые грибы обладают устойчивостью к антибиотикам, а также к сорбиновой и бензойной кислотам, а некоторые штаммы *Penicillium*, *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces* растут в присутствии консерванта сорбата натрия [8, 9].

Литературных сведений относительно использования МКБ в качестве био-консервантов достаточно, однако практически отсутствуют данные относительно подавления роста грибов, вызывающих порчу пищевых продуктов. Показано, что некоторые МКБ рода *Lactobacillus* способны *in vitro* связывать афлатоксины. Пробиотические штаммы *L. rhamnosus* GG и *L. rhamnosus* LC-705 способны утилизировать В1 афлатоксин на 80% из раствора, содержащего 20 мкг/мл данного вещества. Показана способность 29 штаммов МКБ рода *Lactobacillus* и *Lactococcus* уменьшать количество охратоксина. Однако отсутствуют объяснения механизма взаимодействия МКБ с токсинами [5]. Данные относительно влияния бактериоцинов на рост мицелиальных грибов немногочисленны. Так, в последние годы показан эффект влияния бактериоцинов durancin A5-11a и durancin A5-11, которые синтезируют штамм *Enterococcus durans* A5-11, выделенный из монгольского сыра айраг, на рост грибов [6].

Ранее нами было показано, что некоторые частично очищенные антимикробные препараты (АМП) штаммов МКБ способны подавлять широкий рост грамположительных и грамотрицательных бактерий в концентрациях 50-1000 AU/ml. В связи с этим, в настоящее время большой интерес представляет исследование влияния этих препаратов на способность подавлять рост мицелиальных грибов различной родовой принадлежности.

Материал и методика. Использовали АМП, полученные после очистки культуральных жидкостей (КЖ) штаммов МКБ *L. rhamnosus* 2012 и *L. acidophilus* 1991 с антимикробной активностью 4000 AU/ml, а также АМП, полученные после очистки КЖ дрожжей *Kluveromyces marxianus* 412, *Kl. marxianus* 86 и *Candida sp.* 151 с антимикробной активностью 3000 AU/ml. Очистку КЖ проводили методом ионообменной хроматографии [1] и стандартным методом гельфильтрации (Сефадекс -25) [11].

Объектом исследований были грибы рода *Aspergillus* (9 видов), *Alternaria* (2 видов), *Penicillium* (3 видов) из Коллекции Центра депонирования микробов, НПЦ “Армбиотехнология” НАН Армении.

Для получения спорулирующих штаммов выращивание грибов проводили в течение 14 сут на скошенном агаре питательной среды Чапека в термостате при температуре 28°C. Для получения грибов в вегетативной стадии роста выращивание проводили в течение 3 сут при тех же условиях.

Для исследования антимикробной активности используемых препаратов применяли водную суспензию спор грибов, полученную после выращивания в течение 14 сут. Суспензию разбавляли стерильной дистиллированной водой в соотношении 1:100, после чего 5 мл суспензии добавляли в 100 мл агаризованной среды Чапека (7%), предварительно охлажденной до 40°C. Для определения эффективности используемых препаратов применяли метод спот-теста с нанесением аликвоты (100 мкл) исследуемых препаратов на твердую питательную среду Чапека с культурой грибов. Чашки оставляли на 1-2 ч, затем помещали в термостат и инкубировали при температуре 28°C в течение 5-7 сут. Эффективность используемых препаратов проверяли также методом контактирования грибов с препаратами определенной концентрации в жидкой питательной среде Чапека.

Для исследования подавления роста вегетативных клеток грибов антимикробными препаратами использовали суспензию 3-суточных культур грибов. Полученные суспензии культур переносили в свежую питательную среду Чапека и инкубировали с антимикробным препаратом в течение 120 ч в термостате (28°C). Результаты исследований выражали измерением зоны подавления роста грибов в мм, а в жидкой среде – по появлению мутности, свидетельствующей о росте мицелиальных грибов. Контролем служила визуальная оценка роста клеток грибов без добавления препаратов.

Результаты и обсуждение. Ранее было показано, что полученные частично очищенные препараты АМП штамма *L.rhamnosus* 2012 содержат низкомолекулярные бактериоцины с молекулярным весом около 1500 Да [7]. Штамм *L. acidophilus* 1991 также синтезирует бактериоцины с мол. весом около 2000 Да [2]. Подавление роста патогенных бактерий полученными нами АМП из исследуемых дрожжей показано в работе [4].

Результаты подавления роста грибов, используемыми АМП, приведены в табл. 1.

Как видно, при нанесении аликвоты 100 мкл АМП (4000 AU/ml) штамма *L. rhamnosus* 2012 на поверхность среды Чапека с грибами имеет место полное подавление роста грибов (3 штамма рода *Aspergillus* и 2 штамма рода *Alternaria*) в виде лизиса, в течение 72 ч наблюдения. Подавление роста было отмечено также у 3 штаммов рода *Penicillium*: при этом наблюдается изменение пигментации реверзума, которое в процессе инкубирования в течение 14 сут при 28°C остается без изменения. АМП штамма *L. acidophilus* 1991 не подавляет рост исследуемых грибов в аналогичных условиях эксперимента. Ингибирование роста штамма *A. niger* 8467 при нанесении используемого антимикробного препарата *L.rhamnosus* 2012 проявлялось в виде подавления спорообразования. Антимикробные препараты штаммов дрожжей *Kl. marxianus* 86, *Kl. marxianus* 412 и *Candida sp.*151 также в исследуемых концентрациях не подавляют рост грибов. Необходимо отметить, что при использовании высоких концентраций препаратов дрожжей (1000 AU/ml) имеет место подавление роста исследуемых штаммов *Penicillium funiculosum* 10676, *Aspergillus ustus* 8464, *Alternaria sp.* 8122, в то время как рост этих штаммов подавляется препаратами, полученными из МКБ *L. rhamnosus* 2012 в концентрации 400 AU/ml.

Как видно из приведенных результатов, представленных в табл. 2, в процессе инкубирования имеет место различное проявление эффективности подавления роста исследуемыми антимикробными препаратами в зависимости от времени ин-

кубации. Рост подавляется полностью только у штаммов *Alternaria sp.* 8122, *Aspergillus ustus* 8464, *A. unilateralis* 10648. Рост некоторых штаммов *Alternaria alternata* 8126, *Aspergillus fumigatus* 8344 частично восстанавливается в процессе инкубирования.

Таблица 1. Подавление роста некоторых видов грибов исследуемыми антимикробными препаратами (spot-test, 72 ч инкубирования, 28°C).

Штаммы грибов	АМП, AU/ml				
	<i>L. rhamnosus</i> 2012 (400)	<i>L. acidophilus</i> 1991 (400)	<i>Kl. marxianus</i> 412 (400)	<i>Kl. marxianus</i> 86 (400)	<i>Candida sp.</i> 151 (400)
<i>Aspergillus niger</i> 8467	подавление спорообразования	-	-	-	-
<i>A. flavus</i> 8134	-	-	-	-	-
<i>A. terreus</i> 8163	-	-	+	-	+
<i>A. candidus</i> 10547	-	-	+	-	+
<i>A. fumigatus</i> 8344	лизис	-	-	-	-
<i>A. nidulans</i> 10651	-	-	-	-	-
<i>A. oryzae</i> 8213	-	-	-	-	-
<i>A. ustus</i> 8464	лизис	-	-	-	-
<i>A. unilateralis</i> 10648	лизис	-	-	-	-
<i>Alternaria alternata</i> 8126	лизис	-	-	-	-
<i>Alternaria sp.</i> 8122	лизис	+	-	-	-
<i>Penicillium chrysogenum</i> 8354	изменение пигментации реверзума	-	-	-	-
<i>P. expansum</i> 8189	изменение пигментации реверзума	-	-	-	-
<i>P. funiculosum</i> 10676	изменение пигментации реверзума	-	-	-	-

Примечание: "+" – частичный рост; "-" – отсутствие роста.

Таблица 2. Характеристика подавления роста грибов под влиянием АМП *L. rhamnosus* 2012 (400 AU/ml) в зависимости от времени инкубирования в термостате (28°C, spot-test)

Штаммы грибов	Время инкубирования, ч		
	48	72	120
<i>Alternaria alternata</i> 8126	лизис	лизис	-
<i>Alternaria sp.</i> 8122	лизис	лизис	лизис
<i>Aspergillus fumigatus</i> 8344	лизис	-	-
<i>A. ustus</i> 8464	лизис	лизис	лизис
<i>A. unilateralis</i> 10648	лизис	лизис	лизис
<i>P. expansum</i> 8189	-	-	изменение пигментации реверзума
<i>P. funiculosum</i> 10676	лизис	-	изменение пигментации реверзума

Изменение пигментации реверзума наблюдается только у 2 штаммов грибов рода *Penicillium* (*P. expansum* 8189 и *P. funiculosum* 10676) в течение 120 ч инкубации. Таким образом, при использовании частично очищенных антимикробных препаратов наблюдалось подавление роста в виде лизиса в месте нанесения аликвоты препарата (spot-test) только у 3 видов мицелиальных грибов из исследованных 14-и видов.

При использовании жидкой питательной среды также отмечена высокая эффективность подавления роста вегетативных клеток исследуемых грибов *Alternaria alternata* 8126, *Aspergillus ustus* 8464, *P. funiculosus* 10676 препаратами штаммов МКБ в концентрации 250, 400 AU/ml в течение 120 ч, в то время как в контрольном варианте отмечен рост грибов. Низкие концентрации препаратов (100 AU/ml) не подавляли рост грибов.

Определенный интерес представляет изучение влияния препаратов, полученных после очистки КЖ штамма *L.rhamnosus* 2012 методом гельфильтрации на исследуемые грибы *Alternaria sp.* 8122, *Aspergillus ustus* 8464 и *A. unilateralis* 10648. Полученные результаты показывают, что при концентрации 400-1000 AU/ml полученных препаратов имеет место бактерицидное влияние, а при 400 AU/ml – бактериостатическое действие относительно контроля. Можно допустить, что эффективность подавления роста обуславливается использованием различных концентраций бактериоцинов, синтезируемых *L.rhamnosus* 2012 и содержащихся в АМП [3].

Результаты показывают, что подавление роста грибов зависит от родовой принадлежности штаммов и концентрации используемых частично очищенных препаратов, полученных из МКБ и дрожжей.

Таким образом, полученные данные показывают, что для подавления роста некоторых штаммов видов *Alternaria sp.* 8122, *Aspergillus ustus* 8464 и *A. Unilateralis* 10648 можно использовать частично очищенные препараты, полученные очисткой КЖ штамма вида *L.rhamnosus* 2012 методами ионообменной хроматографии и гельфильтрации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Агаджанян А.Е., Тхруни Ф.Н., Ованисян Г.С., Егян К.С., Варданян А.А., Сагиян А.С. Способ выделения и очистки биоингибиторов из культуральной жидкости. Патент РА № 2925 А, 2015.
2. Мкртчян Э.В. Исследование антагонистического действия некоторых микроорганизмов и свойств антимикробного препарата, полученного на основе штамма *Lactobacillus acidophilus* 1991. Канд. дисс. 2005.
3. Тхруни Ф.Н., Сагиян А.С., Балабекян Ц.Р., Карапетян К.Дж., Хачатрян Т.В., Агаджанян А.Е. *Lactobacillus rhamnosus* БТК 2012 штамм бактерий, продуцирующий бактериоцины Rhamn 20-12 BCN1, Rhamn 20-12 BCN2. Патент РА № 2924 А, 2015.
4. Хачатрян Т.В., Агаян А.С., Каримтур Ф.С., Караханян М.Г. Сравнительная характеристика антимикробных свойств некоторых штаммов дрожжей. Известия Национального аграрного университета Армении. 4. с. 117- 122, 2012.
5. Falguni P., Shilpa V., Mann B. Production of proteinaceous antifungal substances from *Lactobacillus brevis* NCDC. International Journal of Dairy Technology. 63, p.70-76, 2010.
6. Haertlé T., Chobert J.-M. Different Antifungal Strategies of Lactic Acid Bacteria Biopolymères Interactions Assemblées, Institut National de Recherche Agronomique, équipe Fonctions et Interactions des Protéines, Nantes, France. Russian Journal of Infection and Immunity. Special issue, 2014.
7. Lovitt R.W. Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria a Review Article. 3rd International Conference on Biotechnology and Food Science (ICBFS 2012), April 7-8. 2, p. 50-56, 2012.
8. Magnusson J. Antifungal activity of lactic acid bacteria. PhD thesis, Agraria 397, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden. 2003.
9. Nielsen P.V., de Boer E. Food preservatives against fungi. In introduction to food and airborne fungi. Edited by R.A. Samson, E. S. Hoekstra, J.C. Frisvad & O. Filtenborg. Centraalbureau voor Schimmelcultures. Utrecht, The Netherlands, p. 357-363, 2000.
10. Rodriguez J.M., Martinez M. I., Kok J. Pediocin PA-1, a wide-spectrum bacteriocin from lactic acid bacteria. In Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 42, 2, p. 91-121, 2002.
11. Vijay Simha B., Sood S.K., Kumariya R., Kumari Garsa A. Simple and rapid purification of pediocin PA-1 from *Pediococcus pentosaceus* NCDC 273 suitable for industrial application Microbiological Research, 167, Issue 9, 12 October, p. 54-549, 2012.

Поступила 25.11.2016