УДК 602.4:637.344.8
https://doi.org/10.21603/1019-8946-2023-5-16

Влияние *Lactobacillus acidophilus* на рост биопленок в подсырной сыворотке*

Светлана Андреевна Рябцева, д-р техн. наук, профессор
E-mail: ryabtseva07@mail.ru
Юлия Александровна Брежнева, аспирант
Георгий Сергеевич Анисимов, канд. техн. наук, директор Центра биотехнологического инжиниринга
Северо-Кавказский федеральный университет

Проведено моделирование образования биопленок в подсырной сыворотке на стекле в статических условиях, в том числе с участием Lactobacillus acidophilus. Биопленки развивались быстрее в подсырной сыворотке, нежели в пермеате, полученном методом ультрафильтрации. Основу трехмерной структуры зрелой биопленки составили представители родов, входящих в группу санитарно-показательных микроорганизмов. Дрожжи участвовали во всех этапах формирования биопленок. Клетки L. acidophilus закваски «БК-Углич-АВ» активно встраивались в структуру биопленки, подавляя рост грамотрицательных бактерий и способствуя разрушению экзополисахаридного слоя, но не влияя на дрожжи. Полученные данные можно использовать как для разработки методов контроля биопленок в молочной промышленности, так и для биотехнологических целей.

Ключевые слова: *биопленки, формирование, подсырная сыворотка, Lactobacillus acidophilus.*

Ryabtseva S. A., Brezhneva Yu. A., Anisimov G. S. Effect of Lactobacillus acidophilus on biofilm growth in cheese whey
North-Caucasus Federal University

The modeling of the biofilms formation in cheese whey on glass under static conditions including with Lactobacillus acidophilus was carried out. Biofilm development in cheese whey is faster than in its ultrafiltration permeate. The basis of the three-dimensional structure of a mature biofilm is made up of representatives of the genera included in the group of sanitary indicative microorganisms. Yeasts are involved in all stages of biofilm formation. L. acidophilus cells of the «BK-Uglich-AV» starter actively integrate into the biofilm structure, inhibiting the growth of gram-negative bacteria and contributing to the destruction of the exopolysaccharide layer, but without affecting yeast. The data obtained can be used both for the development of biofilm control methods in the dairy industry and for biotechnological purposes.
Key words: *biofilms, formation, cheese whey, Lactobacillus acidophilus.*

Биопленки являются одной из ключевых проблем в молочной промышленности. Они приводят к ухудшению характеристик оборудования, снижению эффективности его мойки и дезинфекции, качества и безопасности продуктов. Для контроля биопленок традиционно используют технические, физические и химические методы. К перспективным экологически безопасным способам относится биологическое воздействие на биопленки, в том числе применение ферментов, бактериоцинов, вирусов [1]. Среди пробиотических культур, проявляющих ингибиторные свойства по отношению к биопленкам, наиболее распространены молочнокислые термобактерии *Lactobacillus acidophilus* [2].

С другой стороны, известно применение биопленок для производства биоматериалов на основе формирования моделей (шаблонов) с определенными временными и пространственными структурами [3]. Свойства биопленочных микроорганизмов интересны с точки зрения синтеза ценных соединений (поверхностно-активных веществ, этанола и др.) и повышения хранимоспособности некоторых пищевых продуктов. По сути, это аналог иммобилизованных на различных носителях клеток, которые можно использовать для деградации загрязняющих веществ, производства ферментов, пробиотиков и других метаболитов [4].

Особо важно применение биопленок для получения лактулозы и других олигосахаридов-пребиотиков ферментативным путем. Продуцентами применяемых при этом бета-галактозидаз могут быть как грибы (дрожжи и плесени), так и бактерии [5]. В качестве среды формирования биопленок, получения ферментов и биосинтеза лактулозы целесообразно использовать побочное молочное сырье, в том числе подсырную сыворотку.

Цель работы — изучение влияния ацидофильной палочки на развитие биопленок в подсырной сыворотке в статических условиях на стекле. В качестве среды культивирования использовали подсырную сыворотку, соответствующую требованиям ГОСТ 34352–2017 «Сыворотка молочная — сырье», предоставленную АО Молочный комбинат «Ставропольский», в качестве источника *L. acidophilus* — закваску «БК-Углич-АВ» (ФГУП «Экспериментальная биофабрика», г. Углич).

Для моделирования процесса образования биопленок в чашки Петри помещали предметные стекла (26×76 мм) и заливали 25 см^3 сыворотки. Работы проводили в стерильных условиях. Чашки Петри закрывали и термостатировали при 25±1 °С. Через определенные промежутки времени предметные стекла доставали пинцетом, промывали в дистиллированной воде и использовали для приготовления фиксированных препаратов, которые окрашивали с использованием метиленового синего. Микропрепараты просматривали с помощью бинокулярного микроскопа с цифровой камерой Axio Imager 2 (A2) (Carl Zeiss, Германия) при увеличении изображения в 1000 раз.

На первом этапе изучили формирование биопленок в подсырной сыворотке без добавления закваски (рис. 1, *а–в*). Биопленки развивались в подсырной сыворотке быстрее, чем в пермеате, полученном методом ультрафильтрации [6]. Отдельные участки экзополисахаридного слоя просматривались уже через 24 ч, причем в их образовании участвовали дрожжевые клетки. По-видимому, это стадия обратимого прикрепления клеток к поверхности, когда

**Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках реализации комплексного проекта по созданию высокотехнологичного производства по теме «Создание первого в России высокотехнологичного производства пребиотика лактулозы и функциональных молочных ингредиентов для импортозамещения в медицине, ветеринарии, детском питании, производстве лечебно-профилактических продуктов для людей и животных» (Соглашение № 075-11-2022-021 от 07.04.2022 г.).*

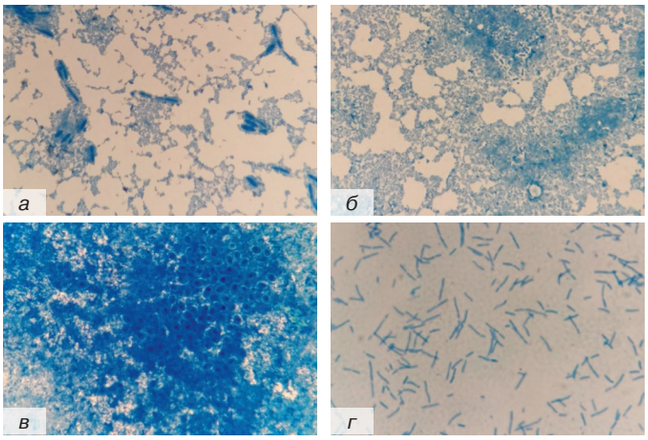

Рис. 1. Биопленки, сформированные в подсырной сыворотке на стекле: а — через 24 ч; б — через 48 ч; в — через 72 ч; г — с L. acidophilus через 48 ч

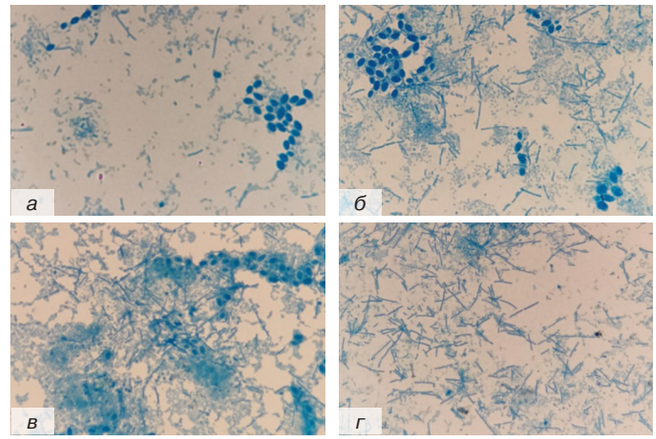

Рис. 2. Биопленки, сформированные в подсырной сыворотке на стекле после обработки L. acidophilus: а — через 24 ч; б — через 48 ч; в, г — через 72 ч

их можно удалить довольно легко [7]. В дальнейшем биопленка становилась более однородной и утолщалась, превращаясь в сложную трехмерную структуру. Как показали проведенные ранее исследования, основу этой структуры составляли грамотрицательные бактерии, среди которых могут быть представители родов *Escherichia, Citrobacter, Enterobacter, Klebsiella, Serratia*, входящих в группу санитарно-показательных микроорганизмов (БГКП) [6, 7]. В составе зрелых биопленок также присутствовали дрожжи. Клетки дрожжей на поверхности хорошо прокрашивались в отличие от расположенных в глубине слоев, которые защищены от красителя экзополисахаридным слоем или лизированы.

В параллельных опытах в подсырную сыворотку вносили 5 % закваски *L. acidophilus*. Сыворотку ферментировали при 37 °С в течение 24 ч, после чего проводили эксперимент по формированию биопленки аналогично описанному ранее. Клетки ацидофильной палочки уже через 24 ч прикреплялись к поверхности стекла. Через 48 ч их было довольно много (рис. 1, *г*), в дальнейшем структура биопленки оставалась такой же. В течение всего опыта не наблюдали прикрепления к стеклу спорообразующих палочек, грамотрицательных бактерий, а также образования плотных экзополисахаридных слоев и трехмерных биопленочных структур. Это позволяет высказать предположение о том, что изученный штамм *L. acidophilus* может ингибировать рост биопленок в подсырной сыворотке.

В следующей серии экспериментов проверяли возможность разрушения уже сформированных в подсырной сыворотке биопленок с помощью ацидофильной палочки. Для этого моделировали образование биопленок на стекле через 24, 48 и 72 ч. Затем промытые дистиллированной водой и непромытые стекла с биопленками заливали сывороткой, ферментированной *L. acidophilus* в течение 24 ч при 37 °С, и термостатировали при 25 °С в течение 1 сут. Значительной разницы между предварительно промытыми препаратами и препаратами без промывки не выявлено (рис. 2).

Клетки ацидофильной палочки активно встраивались в структуру биопленки, подавляя рост грамотрицательных бактерий и способствуя разрушению экзополисахаридного слоя. Особенно это было заметно на зрелых биопленках после 72 ч их формирования. Наблюдаемый эффект можно объяснить способностью молочнокислых бактерий продуцировать поверхностно-активные вещества, бактериоцины, экзополисахариды, органические кислоты, молочную кислоту, короткоцепочечные жирные кислоты, ферменты и перекись водорода. Эти вещества могут ингибировать рост патогенных, условно-патогенных и санитарно-показательных бактерий, спорообразующих палочек, а также препятствовать их адгезии к поверхностям. В частности, показано, что бактериоцин пробиотического штамма *L. acidophilus* ATCC 4356 ингибирует рост планктонных клеток и биопленок *Bacillus subtilis* BM19, а экзополисахарид *L. acidophilus* A4 подавляет образование биопленок *Escherichia coli* O157: H7 за счет снижения экспрессии генов, связанных с хемотаксисом. Однако полностью механизмы, с помощью которых пробиотики предотвращают образование биопленок, пока неясны [2].

Следует отметить, что добавление ферментированной *L. acidophilus* сыворотки не влияет на рост дрожжей в биопленке. Это явление необходимо учитывать при создании комбинированных биопленок дрожжей и ацидофильной палочки как матрицы для биосинтеза лактулозы и других олигосахаридов-пребиотиков. Полученные данные можно использовать как для разработки методов контроля биопленок в молочной промышленности, так и для биотехнологических целей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Рябцева, С. А.** *Биопленки в молочной промышленности: значение, формирование, контроль/С. А. Рябцева [и др.]// Молочная промышленность. 2018. № 1. С. 57–59.*

2. **Barzegari, A.** *The battle of probiotics and their derivatives against biofilms/A. Barzegari [et al.]// Infection and drug resistance. 2020. V. 13. P. 659–672. DOI:10.2147/IDR. S232982*

3. **Fang, K.** *Controlling biofilms using synthetic biology approaches/K. Fang, O. J. Park, S. H. Hong// Biotechnology Advances. 2020. V. 40. P. 107518. doi: 10.1016/j.biotechadv.2020.107518*

4. **Berlanga, M.** *Living together in biofilms: the microbial cell factory and its biotechnological implications/M. Berlanga, R. Guerrero// Microbial Cell Factories. 2016. V. 15. P. 165. https://doi.org/10.1186/s12934-016-0569-5*

5. **Wang, M.** *Lactulose production from lactose isomerization by chemocatalysts and enzymes: Current status and future perspectives/M. Wang [et al.]// Biotechnology Advances. 2022. P. 108021. doi: 10.1016/j. biotechadv. 2022.108021*

6. **Ryabtseva, S. A.** *Modelling biofilms formation and removal in secondary dairy raw materials/S. A. Ryabtseva [et al.]// Foods and Raw Materials. 2021. V. 9 (1). P. 59–68. https://doi.org/10.21603/2308-4057-2021-1-59-68*

7. **Marka, S.** *Feed substrates influence biofilm formation on reverse osmosis membranes and their cleaning efficiency/S. Marka, S. Anand// Journal of Dairy Science. 2017. V. 101. P. 1–12.*