

УДК 579.67:579.262

DOI: 10.25687/1996-6733.prodanimbiol.2025.4.41-50

:

**ИССЛЕДОВАНИЕ АНТАГОНИСТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ
НОВЫХ ДРОЖЖЕВЫХ КУЛЬТУР *K. marxianus* И *D. hansenii* ПРОТИВ
ЧЕТЫРЁХ ПАТОГЕНОВ***

Никанова Д.А., Артемьева О.А., Колодина Е.Н., Довыденкова М.В.

*Федеральный исследовательский центр животноводства - ВИЖ им. Л.К. Эрнста,
Подольск–Дубровицы Московской обл., Российская Федерация*

Результаты зарубежных исследований показали, что дрожжи *Kluyveromyces marxianus* проявляют выраженную антибактериальную активность против *Staphylococcus aureus*, включая метициллин-резистентные штаммы (MRSA). Дрожжи *D. hansenii* выделяют токсин-киллер, обладающий противомикробной активностью по отношению к условно-патогенным микроорганизмам. Цель исследования – изучение антагонистических свойств новых дрожжевых культур *K. marxianus* и *D. hansenii* в отношении ряда условно-патогенных микроорганизмов. Для идентификации дрожжевую ДНК выделяли с использованием набора D-Plants (Биолабмикс, Россия). Для амплификации 5.8S-ITS-фрагмента использовали стандартные праймеры, синтез которых осуществляли в компании «Биолабмикс» (Россия). Работу с полученными нуклеотидными последовательностями проводили в программе Unipro UGENE 49.0. Антимикробную активность изучали в отношении тест-штаммов бактерий: *Escherichia coli* 3912/41, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* 766, *Salmonella typhimurium* 79. Из образцов молока от коров было выделено 6 изолятов *K. marxianus* и 3 изолята *D. hansenii*. Из всех изолятов *K. marxianus* Cm 214 проявлял наибольшую антимикробную активность в отношении штаммов *L. monocytogenes*, *S. aureus* и *E. coli* с процентом ингибирования 59,1, 65,0 и 45,2%, изолят М1 20 в отношении *S. aureus* – 63,4%, Мс 64 в отношении *S. aureus* и *S. typhimurium* – 58,0 и 32,7%. Из выделенных и изученных изолятов *D. hansenii* наиболее эффективным и перспективным для дальнейшего изучения и использования отмечен штамм Cm 84, активный в отношении *S. aureus* и *E. coli* – 26,3 и 44,3%, соответственно. Ни один из штаммов не обладал антагонистической активностью ко всем тест-штаммам, что свидетельствует о необходимости объединять их в многоштабные консорциумы при использовании в качестве пробиотических препаратов.

Ключевые слова: пробиотики, дрожжевые культуры, Kluyveromyces marxianus, Debaryomyces hansenii, филогенетическое родство, антагонистическая активность, условно-патогенные бактерии.

Проблемы биологии продуктивных животных. 2025. 4: 41-50.

Введение

При рассмотрении результатов исследований по микробному разнообразию биотопов и микробиомов животных и человека, наблюдается более низкое разнообразие дрожжеподобных грибов по сравнению с бактериальным. При этом, при анализе запроса «дрожжи-антагонисты» в поисковой системе PubMed, с каждым годом наблюдается возрастающий интерес к дрожжам, поскольку велик их потенциал с прикладной точки зрения. Это связано с возможностью

применения живых (активных) форм и использованием продуцируемых патоген-специфичных биоактивных молекул, которые подавляют рост и метаболизм патогенов.

Антагонистическое действие дрожжей по отношению к другим микроорганизмам привлекает всё большее внимание и стимулирует их применение в качестве средств общего биоконтроля для защиты сельскохозяйственных культур и в качестве терапевтических средств для использования в биопрепаратах для человека и в ветеринарии. Способность разных видов дрожжей ингибировать тестовые бактерии в значительной степени зависит от производства ингибирующих метаболитов (Каночкина и др., 2023).

Несколько исследований продемонстрировали противомикробный потенциал дрожжей *Rhodotorula glutinis* (штамм Y-44), *Rhodotorula phylloplana*, *Rhodotorula minuta*, *Rhodospiridium paludigenum*, *Kloeckera apiculata*, *Leucosporidium scottii* (штамм At17), *Candida azyma*, *Candida sake*, *Candida saitoana*, *Candida ciferrii*, *Metschnikowia fructicola* и *Alternaria alternata* в отношении таких патогенов сельскохозяйственных культур, как *Botrytis cinerea*, *Penicillium italicum* и *P. expansum* (Dukare et al., 2019).

В то же время использование пробиотических дрожжей, в различных отраслях промышленности также обусловлено их антагонистическим потенциалом в отношении патогенной и условно-патогенной микрофлоры животных и человека. Помимо пробиотического эффекта, при выборе пробиотиков-кандидатов следует учитывать дополнительные критерии, такие как способность прикрепляться и колонизировать клетки кишечника, переносить условия желудочно-кишечного тракта, вырабатывать противомикробные вещества и стимулировать активность пищеварительных ферментов, что напрямую или косвенно влияет на микробный профиль желудочно-кишечного тракта (Elghandour et al., 2020). Дрожжи способны проявлять антагонистическую активность, благодаря наличию в них микоцинов. Обладая выраженной антимикробной активностью, дрожжевые токсины могут эффективно сдерживать рост патогенной микрофлоры. Широко распространён среди дрожжей киллерный феномен, и на сегодняшний день описано около 100 видов дрожжей с таким фенотипом. В спектр действия вырабатываемых ими киллер-токсинов (КТ) часто попадают и патогенные микроорганизмы. Таким образом, они обладают потенциалом в качестве природных противомикробных препаратов и терапевтических средств, против инфекций животных и человека (Mannazzu et al., 2019). Известно о распространённости таких элементов в дрожжах вида *Debaryomyces hansenii*, выделенных из голубых сыров (Polomska et al., 2021). КТ дрожжей *Metschnikowia pulcherrima* были протестированы против трёх широко распространённых микроорганизмов: *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus* и *Candida albicans*. Дрожжи могут обладать несколькими механизмами антагонистического действия, включая конкуренцию за питательные вещества и пространство и выработку ферментов, разрушающих клеточную стенку чувствительных организмов (Шагалова и др., 2023). Дрожжи *K. marxianus* синтезируют комплекс биологически активных соединений (органические кислоты, бактериоцины), эффективно ингибирующих рост таких патогенов как *Salmonella spp.*, *Candida albicans*, *Listeria monocytogenes* и различных видов *Bacillus*. Это связано с их способностью продуцировать специфические токсины, изменять pH среды и конкурировать за ресурсы. *K. marxianus* продуцирует низкомолекулярные белки (10–30 кДа), которые связываются с β -1,3-глюканами клеточной стенки *S. aureus*, нарушая её целостность (Massaferrì et al., 2012), а также ингибируют синтез пептидогликана, что приводит к лизису клеток (Cho et al., 2018).

В исследованиях *in vitro* при введении 107 КОЕ/день *K. marxianus* B0399 было изучено влияние на состав и метаболическую активность кишечной микробиоты человека в 3-х ступенчатой системе непрерывной культуры, имитирующей толстую кишку человека (Massaferrì et al., 2012). Было показано, что *K. marxianus* B0399 влияет на микробиоту толстой кишки, повышая концентрацию бифидобактерий. Количество короткоцепочечных жирных кислот ацетата и пропионата также увеличилось после добавления дрожжей. Также было обнаружено,

что *K. marxianus* B0399 снижает цитотоксический потенциал культуральной жидкости на первом этапе модели толстой кишки (Maccafferri et al., 2012).

В работе (Youn et al., 2023) авторы протестировали дрожжи *K. marxianus* на предмет выживаемости, непатогенности, а также антиоксидантной и антимикробной активности. Они сравнили штаммы кефирных дрожжей *K. marxianus* A4 (Км А4) и *K. marxianus* A5 (Км А5) с *S. boulardii* ATCC MYA-796 (Sb MYA-796). Штамм *K. marxianus* в большей степени увеличивал содержание *Bacteroidetes*, *Bacteroidales* и *Bacteroides* по сравнению с Sb MYA-796. Кроме того, Км А5 увеличивал количество *Corynebacteriales* и *Corynebacterium* по сравнению с Км А4. Таким образом, было показано, что Км А4 и Км А5 способны модулировать микробиоту кишечника при кратковременном введении здоровым мышам (Youn et al., 2023).

Дрожжи могут обладать дополнительной генетической информацией в виде цитоплазматических линейных молекул дцДНК, называемых вирусоподобными элементами. Некоторые из них кодируют токсины-убийцы. Известно о распространённости таких элементов в дрожжах *Debaryomyces hansenii*, депонированных в коллекциях культур, а также в штаммах, выделенных из голубых сыров (Polomska et al., 2021).

Антагонистическая активность *D. hansenii* представляет немалый интерес. Было показано, что *D. hansenii* DSMZ70238 выделяет токсин-киллер, противомикробную активность которого авторы изучили, а также условия, при которых она максимальна (Safaa et al., 2017). Оптимальная противомикробная активность достигалась при высокой концентрации NaCl, низком pH и мезофильной температуре. Кроме того, результаты показали, что эти дрожжи хорошо подавляют рост тестируемых патогенных бактерий (*S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Str. pyogenes*, *C. albicans* и *C. neoformans*) и являются биологическим средством борьбы с изучаемыми грибами, такими как *T. rubrum*, *T. concentricum*, *A. Alternata* и *C. lunata*. Выяснилось также, что эти дрожжи обладают высокой эффективностью в подавлении радиального роста тестируемых патогенов, а значения противогрибковой активности варьировали от 48,4 до 62,7%. Результаты также показали, что 25°C – это оптимальная температура для уничтожения токсинов всеми исследуемыми микроорганизмами. Кроме того, активность токсина-киллера значительно замедляла рост грибкового мицелия для всех целевых патогенных грибов, и процент ингибирования составил 47,8, 48,9, 52,2 и 61,1% для *Trichophyton rubrum*, *Alternaria alternata*, *Trichophyton concentricum* и *Curvularia lunata*, соответственно (Al-Qaysi et al., 2017).

В исследованиях (Banjara et al., 2016) установлено, что *D. hansenii* продуцирует микоцины, эффективные против других видов дрожжей. Изоляты *D. hansenii* были получены из 22 сыров и оценены на киллерную активность в отношении *C. albicans* и *C. tropicalis* в широком диапазоне температур и значений pH. Для 23 штаммов показана киллерная активность против *C. albicans* и *C. tropicalis*, которая зависела от pH и температуры. Ни у одного штамма не наблюдалась киллерная активность при $\text{pH} \geq 6,5$ или температуре ≥ 35 °C (физиологические условия в желудочно-кишечном тракте человека) (Hirschey et al., 2010).

Однако до сих пор открытым остаётся вопрос об антагонистической активности дрожжевых грибов в отношении условно-патогенных бактерий.

Цель работы – изучение антагонистических свойств новых дрожжевых культур *Kluyveromyces marxianus* и *Debaryomyces hansenii* в отношении ряда условно-патогенных микроорганизмов.

Материал и методы

Работа проводилась на базе лаборатории микробиологии ФИЦ ВИЖ им Л.К. Эрнста. Методологическая основа исследования включала в себя современные микробиологические, биохимические и молекулярно-генетические подходы, позволяющие получить

воспроизводимые и статистически значимые результаты. В этическом одобрении не было необходимости, поскольку не было задействовано живых животных.

Для идентификации изолятов дрожжей проводили полимеразную цепную реакцию на ДНК-амплификаторе MiniAmp Plus (Thermo Fisher, Сингапур). Дрожжевую ДНК выделяли с использованием набора D-Plants по протоколу фирмы-изготовителя (Биолабмикс, Россия). Для амплификации 5.8S-ITS-фрагмента (ген 5.8S РНК и внутренние транскрибируемые спейсеры ITS1/ITS4) использовали стандартные праймеры, синтез которых осуществляли в компании «Биолабмикс» (Россия). ПЦР проводили в 30 мкл. буфера, содержащего 2.5 mM MgCl₂, 0.1 mM каждого дНТФ, 50 пмоль каждого праймера, 2.5 единицы Taq-полимеразы («Синтол», Россия), 20–200 нг ДНК. Начальную денатурацию осуществляли при 94°C в течение 3 мин, затем 30 циклов в следующем режиме: денатурация при 94°C, 45 с; отжиг праймеров при 52°C, 30 с; синтез ДНК при 72°C, 120 с; конечная достройка при 72°C, 10 мин. Продукты амплификации подвергали электрофорезу в 1%-ном агарозном геле при 60-65 В 0.5× TBE буфере (45 mM трис, 10 mM ЭДТА, 45 mM борная кислота; pH 8.0) в течение 2 ч.

Полученные нуклеотидные последовательности анализировали с использованием программного обеспечения ClustalW, пакет Unipro UGENE 49.0 (<https://ugene.net/ru/>). Поиск гомологии с известными нуклеотидными последовательностями проводили в базе данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) с использованием программы BLAST. Множественное выравнивание изученных нуклеотидных последовательностей осуществляли с использованием программы Unipro UGENE 49.0. Филогенетические деревья строили методом объединения соседей (Neighbor-Joining) в программе MEGA 11.

Штаммы дрожжей культивировали в жидкой среде YPD (10% пептон, 10% глюкоза, 10% дрожжевой экстракт, 15% агар) в течение 24 ч, после культивирования осаждали клетки центрифугированием при 4000 об/мин в течение 10 мин. и использовали надосадочную жидкость. Культивирование тест-штаммов условно-патогенных бактерий проводили в среде TSB (HiMedia, Индия) при 37±0,5°C в течение 24 ч, после чего доводили средой TSB до оптической плотности OD₅₄₀ равной 1 (≈8 log₁₀ КОЕ мл⁻¹) по стандартной нефелометрической шкале МакФарланда. Результаты по ингибированию патогенов выражены как среднее значение 4 параллелей в трёх независимых экспериментах.

Антагонистическую активность оценивали по изменению оптической плотности суспензии условно-патогенных бактерий на микробиологическом анализаторе Multiskan FC (ThermoFisher Scientific Inc., Финляндия). Исследования проводили в течение 24 ч в 96-луночных планшетах в общем объёме 200 мкл на лунку, смешивая 1:1 надосадочную жидкость, полученную при культивировании изолятов дрожжей и суспензии бактерий (OD₅₄₀). Тестовые условно-патогенные бактерии, используемые в этом исследовании, были: *Escherichia coli* 3912/41, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* 766, *Salmonella typhimurium* 79 полученные из коллекции Государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии» (ГНЦ ПМБ, РФ), которые хранились на среде TSA (HiMedia, Индия). Возможность изменения антимикробной активности супернатанта *D. hansenii* изучали в жидкой среде YPD, изменив концентрации NaCl (2, 4 и 8%), значения pH (4, 5, 6 и 7) и температуры (20, 25 и 30 °C).

Статистический анализ данных проведен с использованием метода дисперсионного анализа (ANOVA) в программе STATISTICA, version 13, StatSoft, Inc., 2011 (www.statsoft.com).

Результаты и обсуждение

Проведённая классификация выделенных из молока дрожжей была основана на филогенетическом анализе нуклеотидных последовательностей молекулярных маркеров 5.8S–ITS-фрагмента, включающего ген 5.8S РНК и внутренние транскрибируемые спейсеры ITS1/ITS4. ITS-район характеризуется значительной межвидовой дивергенцией, его длина

постоянна у штаммов одного и того же вида, а последовательность может варьировать. В нашем исследовании таким способом были идентифицированы дрожжи, включая *Candida tropicalis*, *Debaryomyces hansenii*, *Yarrowia lipolytica*, *Candida inconspicua*, *Kluveromyces marxianus*, *Halomonas flagellata*, *Pichia kudriavzevii*, *Pichia kudriavzevii*, *Diutina catenulata*, *Sporobolomyces ruberrimus*. Из всех исследованных изолятов, для оценки антимикробной активности в культуральной жидкости были отобраны представляющие интерес 6 изолятов *K. marxianus* и 3 *D. hansenii*. Нуклеотидные последовательности референсных штаммов были выгружены из GenBank, полученные нами нуклеотидные последовательности сравнили с последовательностями 5.8S-ITS участка типовых культур.

Для *Kluveromyces marxianus* были выбраны штаммы Kw215318; Y-5; ATCC28838; E20682; CBS1554; BAB-7879; R97189. В качестве внешней группы (outgroup) использован штамм *Kluveromyces lactis* CBS 683 (доступ NR_166044.1), что позволяет корневать дерево и точно определять эволюционные взаимоотношения.

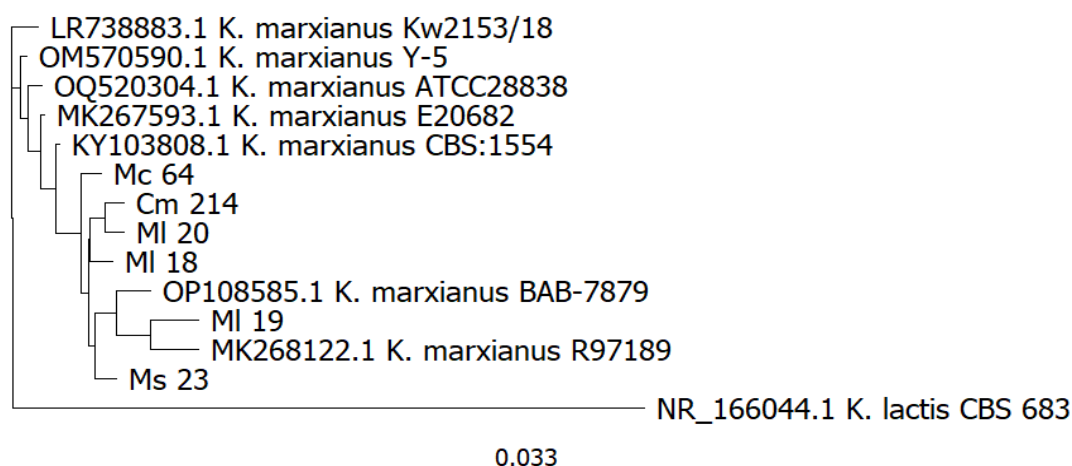


Рисунок 1. Филогенетическое древо *Kluveromyces marxianus* и изолятов Mc 64, Cm 214, MI 20, MI 18, MI 19, Ms 23, построенное на основе последовательностей 5.8S-ITS-участка. Нуклеотидное выравнивание 737 остатков выполнено с использованием Unipro UGENE.

Для *Debaryomyces hansenii* были выбраны штаммы: INM36B; MCCC2E00222 и KAS7935. На основании полученных сравнений нуклеотидных последовательностей были построены филогенетические деревья для каждого вида отдельно (рис. 1 и 2).

Филогенетическое древо, представленное на рис. 1, отражает эволюционные взаимоотношения между референсными штаммами дрожжей видов *K. marxianus*, *K. lactis* и выделенных изолятов. Все изученные изоляты (Mc 64, Cm 214, MI 20, MI 18, MI 19) сгруппированы вместе с эталонными штаммами; такие как *K. marxianus* Y-5 (OM570590.1), *K. marxianus* ATCC28838 (OQ520304.1) и другие, образуют общий кластер, что указывает на их видовую принадлежность к *K. marxianus*. Длина ветвей в 0.033 является достаточным расстоянием для четкого разделения близкородственных видов, таких как *K. marxianus* и *K. lactis*. Ветвление внутри основного кластера *K. marxianus* (включая изоляты Mc 64, Cm 214, MI 20, MI 18, MI 19) показывает наличие некоторой генетической вариабельности среди штаммов этого вида. Однако, судя по коротким ветвям, все эти штаммы тесно связаны между собой. Изолят Ms 23 находится на отдельной ветви, ведущей к внешней группе (*K. lactis*). Это указывает на то, что Ms 23 может не принадлежать к виду *K. marxianus*. Его эволюционное расстояние до кластера *K. marxianus* значительно, что свидетельствует о его принадлежности к другому, хотя и родственному, виду. Учитывая, что в качестве внешней группы используется *K. lactis*, вполне

вероятно, что изолят Ms 23 может принадлежать именно к этому виду или другому близкородственному виду рода *Kluyveromyces*, что требует дополнительных исследований (анализа гена D1/D2 области 26S рРНК) для точной видовой идентификации.

Филогенетическое древо на рис. 2 показывает эволюционные взаимоотношения между эталонными штаммами вида *D. hansenii* и тремя исследуемыми изолятами (Mc73, Cm84, Ms 25). Масштабная линейка 0.007 указывает на эволюционное расстояние, соответствующее 0.007 заменам на нуклеотидный сайт, что типично для сравнений внутри одного вида дрожжей. Все три изолята (Mc73, Cm84, Ms 25) сгруппированы вместе с эталонными штаммами *D. hansenii* (номера: KY694997.1, EF194843.1, MZ956800.1), что является молекулярным доказательством того, что все они принадлежат к виду *D. hansenii*. Изолят Cm 84 образует отдельную, но очень близкую ветвь по отношению к эталонному штамму EF194843.1. Короткая длина ветви свидетельствует о минимальных генетических различиях между ними. Изоляты Mc73 и Ms 25 формируют отдельную подветвь внутри общего кластера *D. hansenii*. Ms 25 имеет тесное родство с эталонным штаммом MZ956800.1, что указывает на их высокую генетическую идентичность. Mc73 находится в одной группе с Ms 25, но на своей собственной ветви, что позволяет предположить наличие незначительных генетических вариаций между этими двумя изолятами.

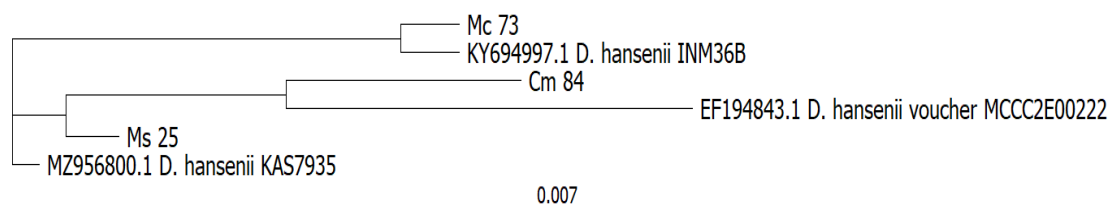


Рисунок 2. Филогенетическое древо *Debaryomyces hansenii* и изолятов Mc73, Cm84, Ms 25, построенное на основе последовательностей 5.8S-ITS участка. Нуклеотидное выравнивание 644 остатков выполнено с использованием Unipro UGENE.

Способность этих видов дрожжей ингибировать рост условно-патогенных бактерий в значительной степени зависит от производства ингибирующих метаболитов. Нами проведено исследование по изучению влияния на рост условно-патогенных бактерий бесклеточного супернатанта, полученного после культивирования изолятов дрожжей *K. marxianus* и *D. hansenii*.

Показатели оптической плотности бесклеточного супернатанта через 24 ч культивирования с тест-культурами условно-патогенных бактерий представлены в табл. 1.

Отмечена ингибирующая активность супернатантов выделенных штаммов дрожжей против выбранных патогенов. Бесклеточный супернатант дрожжей *K. marxianus* оказывал статистически значимое ($P < 0,001$) ингибирующее действие на рост ряда тест-штаммов условно патогенных бактерий (рис. 3). Эффект варьировал в зависимости от вида бактерий, что указывает на видоспецифическую антимикробную активность метаболитов дрожжей этого вида.

При сравнении разницы оптической плотности между нулевой точкой и через 24 ч инкубации выявлено, что штаммы *K. marxianus* Cm 214; Ml 20; Ms 23 и Mc 64 задерживают рост *L. monocytogenes* на 59,1 ($P < 0,001$); 29,5 ($P < 0,01$); 24,0 ($P < 0,01$) и 22,4%, соответственно, по сравнению с контролем, что составило 0,150; 0,075; 0,061 и 0,057 ед. (рис. 3). Два штамма *K. marxianus*, а именно Ml 19 и Ml 18, имели разницу в оптической плотности на 0,14 и 0,07 ед. меньше по сравнению с контролем, что косвенно свидетельствует об отсутствии подавляющего действия, и в дальнейшем было подтверждено при посеве этих образцов на плотную среду TSB. Низкое ингибирование в супернатантах дрожжей может означать, что антимикробные соединения не секретируются внеклеточно, а связываются с клетками.

Таблица 1. Оптическая плотность бесклеточного супернатанта при культивировании с тест-культурами бактерий в течение 24 ч.

Исследуемый изолят дрожжей	<i>L. monocytogenes</i> 766	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i> 3912/41	<i>S. typhimurium</i> 79
Контроль	0,54±0,02	1,14±0,02	1,56±0,07	1,30±0,03
<i>K. marxianus</i> MI 20	0,46±0,01**	0,83±0,03***	1,38±0,01*	1,13±0,02***
<i>K. marxianus</i> MI 19	0,61±0,10	0,94±0,03***	1,41±0,00	1,12±0,03***
<i>K. marxianus</i> Ms 23	0,48±0,01**	0,96±0,06**	1,38±0,01*	1,21±0,01*
<i>K. marxianus</i> Ms 64	0,48±0,03	0,86±0,03***	1,30±0,09*	1,12±0,02**
<i>K. marxianus</i> Cm 214	0,39±0,01***	0,83±0,02***	1,19±0,02***	1,22±0,01*
<i>K. marxianus</i> MI 18	0,64±0,06	0,94±0,01***	1,56±0,00	1,32±0,01
<i>D. hansenii</i> Ms 73	0,53±0,04	1,04±0,03*	1,17±0,01***	1,18±0,01**
<i>D. hansenii</i> Cm 84	0,48±0,03	1,02±0,01**	1,12±0,02***	1,19±0,01**
<i>D. hansenii</i> Ms 25	0,45±0,04	1,02±0,15	1,30±0,02**	1,18±0,01***

Примечания: *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001 по F- критерию при сравнении с контролем

По отношению ко всем остальным исследуемым тест-штаммам (*S. aureus*, *E. coli*, *S. typhimurium*) бесклеточный супернатант всех дрожжей *K. marxianus* проявил антагонистическую активность. В отношении клеток штамма *S. aureus* максимальная разница оптической плотности была отмечена в образцах штаммов Cm 214 и MI 20, которая составила 65,0 и 63,3% или 0,32 и 0,31 ед. по сравнению с контролем (P<0,001). В отношении штамма *E. coli* максимальная разница OD была отмечена у изолятов Cm 214 и Ms 64 (45,2 и 33,1% или 0,37 (P<0,001) и 0,27 ед. (P<0,05). В отношении тест-штамма *S. typhimurium* наблюдалась наименьшая, по сравнению с другими условно-патогенными бактериями, но тем не менее не менее выраженная антимикробная активность бесклеточного супернатанта исследуемых изолятов *K. marxianus*. Максимальная разница оптической плотности наблюдалась у штаммов Ms 64 и MI 19 – 32,7 (P<0,01) и 32,2% (P<0,001), минимальная – у штамма MI 18 (1,6%).

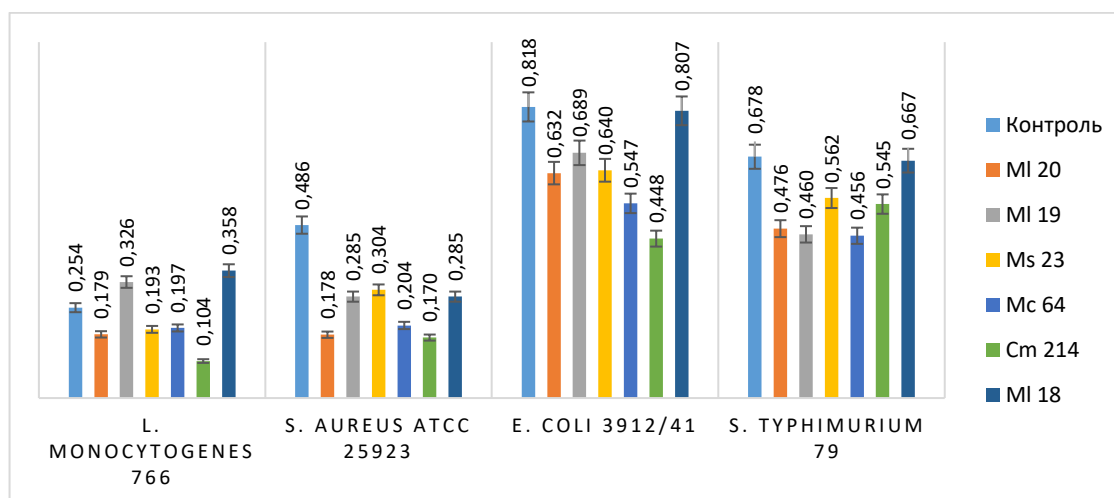


Рисунок 3. Влияние бесклеточного супернатанта изолятов *K. marxianus* на рост условно-патогенных бактерий. Приведены значения разницы оптической плотности (ΔOD_{540}) между контрольной (без супернатанта) и опытной группой через 24 ч инкубации.

Дрожжи *D. hansenii*, в отличие от *K. Marxianus*, способны вырабатывать киллер-токсин, обладающий антимикробной активностью при разных концентрациях NaCl, pH и температуры, что также было изучено в наших исследованиях. При анализе полученных результатов антимикробного действия бесклеточного супернатанта дрожжей *D. hansenii* отмечена его высокая активность в отношении всех исследуемых (*S. aureus*, *E. coli*, *S. typhimurium*, *L. monocytogenes*) тест-штаммов бактерий. При pH 4,5 наблюдалось минимальное изменение оптической плотности бактериальных культур (рис. 4).

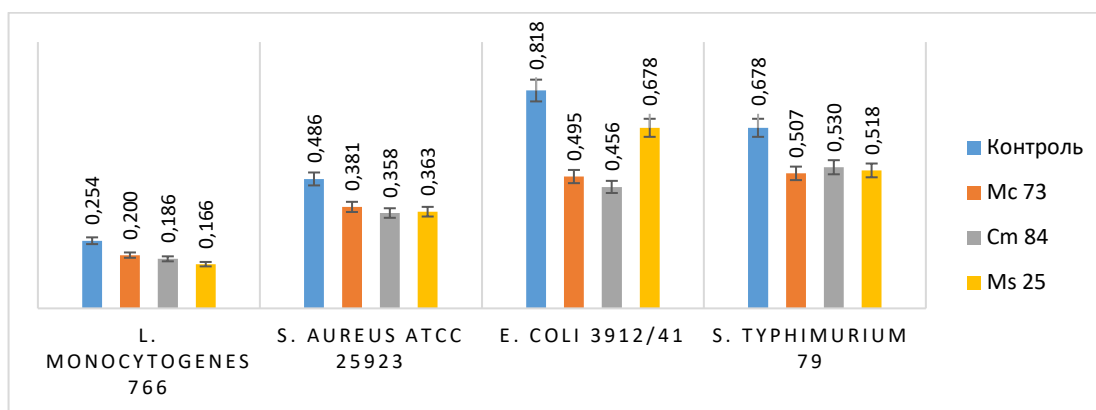


Рисунок 4. Разница OD540 при влиянии бесклеточного супернатанта (n=12) дрожжей *D. hansenii* на рост тест-штаммов условно-патогенных бактерий при инкубировании в течение 24 ч.

Изоляты *D. hansenii* Ms 73 и Cm 84 проявили максимальную ингибирующую способность в отношении *E. coli* 3912/41 (39,5% и 44,2% или 0,32 и 0,36 ед. OD по сравнению с контролем, соответственно). В отношении *S. aureus*, *S. typhimurium*, *L. monocytogenes* разница с контролем у изолята Ms 73 составила 21,6; 25,2 и 21,3% или 0,10; 0,17 и 0,05 ед. оптической плотности, а у изолята Cm 84 – 26,3; 21,8 и 26,8% или 0,13; 0,15 и 0,07 ед. OD. Антимикробная активность изолята *D. hansenii* Ms 25 в отношении тест-штаммов составила от 17,1% или 0,14 ед. OD по отношению к *E. coli* до 34,6% или 0,88 ед. OD по отношению к *L. monocytogenes*. В отношении *S. aureus* и *S. typhimurium* эти показатели составили 25,3 и 23,6% от уровня контроля. При остальных значениях pH действие супернатанта не различалось по способности подавлять рост тестируемых патогенов. Результаты также показали, что уровень pH 7,0 снижал подавляющую активность бесклеточного супернатанта до уровня контроля.

На основании общего анализа антимикробной активности можно отметить, что из всех изолятов *K. marxianus* Cm 214 проявлял наибольшую антимикробную активность в отношении штаммов *L. monocytogenes*, *S. aureus* и *E. coli* – процент ингибирования 59,1; 65,0 и 45,2%, изолят M1 20 в отношении *S. aureus* – 63,4%, Ms 64 в отношении *S. aureus* и *S. typhimurium* – 58,0 и 32,7%. Из выделенных и изученных изолятов *D. hansenii* наиболее эффективным и перспективным для дальнейшего изучения и использования отмечен штамм Cm 84, активный в отношении *S. aureus* и *E. coli* с процентом ингибирования 26,3 и 44,3% соответственно. Ни один из штаммов не обладал антагонистической активностью ко всем тест-штаммам, что свидетельствует о необходимости объединять их в многоштаммовые консорциумы при использовании в качестве пробиотических препаратов.

Заключение

В проведенном исследовании выделены и молекулярно-генетическими методами идентифицированы 9 изолятов дрожжей, из них 6 отнесены к виду *K. marxianus* и 3 к *D. hansenii*. Определена антимикробная активность против выделенных изолятов в отношении тест-штаммов

условно-патогенных бактерий. Изолят *K. marxianus* Cm 214 проявлял наибольшую антимикробную активность в отношении штаммов *L. monocytogenes* (процент ингибирования 59,1), *S. aureus* (65,0%) и *E. coli* (45,2%) по отношению к контролю. Изолят *D. hansenii* Cm 84 проявили максимальную подавляющую способность в отношении *E. coli* 3912/41 (44,2%), *S. aureus* (26,3%), *S. typhimurium* (21,8%), *L. monocytogenes* (26,8%).

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России FGGN-2024-0016 (124020200032-4).

Список литературы

1. Каночкина М.С., Тарасова В.В., Коновалова А.Д. Антагонистическая активность пептидов, продуцируемых молочнокислыми бактериями и дрожжами: механизмы их действия и возможности целенаправленного применения в пищевой промышленности. // Пищевая промышленность. 2023. Т. 7. С. 40-46. DOI: 10.52653/PPI.2023.7.7.008
2. Шагалова В.А., Вустин М.М., Машенцева Н.Г. Киллерные токсины аскомицетовых дрожжей, подавляющие фитопатогенные грибы *Botrytis cinerea*. // Хранение и переработка сельхозсырья. 2023. № 2. С. 146-162. DOI: 10.36107/spfp.2023.440.
3. Al-Qaysi S.A.S., Al-Haideri H., Thabit Z.A., Al-Kubaisy W.H.A.A., Ibrahim J.A.A. Production, characterization, and antimicrobial activity of mycocin produced by *Debaryomyces hansenii* DSMZ70238. // Int. J. Microbiol. 2017. Art. ID 2605382. DOI: 10.1155/2017/2605382
4. Banjara N., Nickerson K.W., Suhr M.J., Hallen-Adams H.E. Killer toxin from several food-derived *Debaryomyces hansenii* strains effective against pathogenic *Candida* yeasts. // Int. J. Food Microbiol. 2016. Vol. 222. P. 23-29. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.01.016
5. Cho Y.J., Kim D.H., Jeong D.H. Probiotic characteristics of *Kluyveromyces marxianus* DMKU 3-1042 isolated from yogurt. // J. Microbiol. Biotechnol. 2018. Vol. 28. nr 10. P. 892-899. DOI: 10.4014/jmb.1804.04013
6. Dukare A.S., Paul S., Nambi V.E., Gupta R.K., Singh R., Sharma K., Vishwakarma R.K. Exploitation of microbial antagonists for the control of postharvest diseases of fruits: a review. // Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 2019. Vol. 59. nr 9. P. 1498-1513. DOI: 10.1080/10408398.2017.1417235
7. Elghandour M.M.Y., Tan Z.L., Abu Hafsa S.H., Adegbeye M.J., Greiner R., Ugbogu E.A., Salem A.Z.M. *Saccharomyces cerevisiae* as a probiotic feed additive for non- and pseudo-ruminant animals: a review. // J. Appl. Microbiol. 2020. Vol. 128. P. 658-674. DOI: 10.1111/jam.14416
8. Maccaferri S., Klinder A., Brigidi P., Cavina P., Costabile A. Potential probiotic *Kluyveromyces marxianus* B0399 modulates the immune response in Caco-2 cells and peripheral blood mononuclear cells and impacts the human gut microbiota in an in vitro colonic model system. // Appl. Environ. Microbiol. 2012. Vol. 78. nr 4. P. 956-964. DOI: 10.1128/AEM.06385-11.
9. Mannazzu I., Domizio P., Carboni G., Zara S., Zara G., Comitini F., Budroni M., Ciani M. Yeast killer toxins: From ecological significance to application. // Crit. Rev. Biotechnol. 2019. Vol. 39. nr 5. P. 603-617. DOI: 10.1080/07388551.2019.1601679.
10. Polomska X., Neuveglise C., Zyzak J., Zarowska B., Casaregola S., Lazar Z. New cytoplasmic virus-like elements (Vles) in the yeast *Debaryomyces hansenii*. // Toxins. 2021. Vol. 13. nr 9. Art. 615. DOI: 10.3390/toxins13090615.
11. Youn H.Y., Kim H.J., Kim D.H., Jang Y.S., Kim H., Seo K.H. Gut microbiota modulation via short-term administration of potential probiotic kefir yeast *Kluyveromyces marxianus* A4 and A5 in BALB/c mice. // Food Sci. Biotechnol. 2023. Vol. 32. nr 4. P. 589-598. DOI: 10.1007/s10068-023-01268-3

References (for publications in Russian)

1. Kanochkina M.S., Tarasova V.V., Konovalova A.D. [Antagonistic activity of peptides produced by lactic acid bacteria and yeast: mechanisms of their action and possibilities of targeted use in the food industry]. *Pishchevaya promyshlennost'* (Food industry). 2023. 2: 146-162. DOI: 10.36107/spfp.2023.440
2. Shagalova V.A., Vustin M.M., Mashentseva N.G. [Killer toxins of ascomycetous yeasts that suppress phytopathogenic fungi *Botrytis cinerea*]. *Khranenie i pererabotka sel'khozsyrya* (Storage and processing of agricultural raw materials). 2023. 2: 146-162. DOI: 10.36107/spfp.2023.440

UDC 579.67:579.262

**Study of antagonistic activity of new yeast cultures *K. marxianus*
and *D. hansenii* against four pathogens**

Nikanova D.A., Artemyeva O.A., Kolodina E.N., Dovydenkova M.V.

*Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry, Podol'sk–Dubrovitsy,
Moscow oblast, Russian Federation*

ABSTRACT. Results from international studies have shown that *Kluyveromyces marxianus* yeast exhibits pronounced antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*, including methicillin-resistant strains (MRSA). *D. hansenii* yeast secretes a killer toxin with antimicrobial activity against opportunistic microorganisms. The aim of this study was to investigate the antagonistic properties of new yeast cultures of *K. marxianus* and *D. hansenii* against a range of opportunistic microorganisms. For identification, yeast DNA was isolated using the D-Plants kit (Biolabmix, Russia). Standard primers synthesized by Biolabmix (Russia) were used to amplify the 5.8S-ITS fragment. The obtained nucleotide sequences were processed using the Unipro UGENE 49.0 software. Antimicrobial activity was studied against the following test strains of bacteria: *Escherichia coli* 3912/41, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* 766, *Salmonella typhimurium* 79. As a result of the studies, 6 isolates of *K. marxianus* and 3 isolates of *D. hansenii* were isolated from milk samples from cattle. Based on the general analysis of antimicrobial activity, it can be noted that of all the *K. marxianus* isolates, Cm 214 exhibited the highest antimicrobial activity against strains of *L. monocytogenes*, *S. aureus* and *E. coli* in 59.1%, 65.0 and 45.2%, isolate Ml 20 against *S. aureus* – 63.4%, Mc 64 against *S. aureus* and *S. typhimurium* – 58.0 and 32.7%. Of the isolated and studied *D. hansenii* isolates, the most effective and interesting for further study and use was the strain Cm 84, active against *S. aureus* and *E. coli* 26.3 and 44.3%, respectively. None of the strains had antagonistic activity to all test strains, which indicates the need to combine them into multi-strain consortia when used as probiotic preparations.

Keywords: probiotics, yeast cultures, Kluyveromyces marxianus, Debaryomyces hansenii, phylogenetic relationship, antagonistic activity, opportunistic bacteria.

Problemy biologii produktivnykh zhivotnykh (Productive Animal Biology). 2025. 4: 41-50.

Поступило в редакцию: 21.10.2025 Получено после доработки: 21.11.2025:

Сведения об авторах:

Никанова Дарья Александровна, к.б.н, с.н.с., +7(967)012-39-42 +7 (4967)65-11-33; dap2189@gmail.com;

Артемьева Ольга Анатольевна, к.б.н, вед.н.с., +7 (4967)65-11-33; vjkmikrob@mail.ru;

Колодина Евгения Николаевна, к.б.н, с.н.с., +7 (4967)65-11-33; kolodin77@mail.ru;

Довыденкова Мария Валентиновна, к.с-х.н., вед. спец., +7 (4967)65-11-33);

majra_2005@list.ru