

К. М. КЕБЕКБАЕВА, Г. Т. ДЖАКИБАЕВА,

А. К. ДЖОБУЛАЕВА, А. В. МЕДВЕДЕВА, А. Е. МОЛЖИГИТОВА

(РГП «Институт микробиологии и вирусологии» КН МОН РК, г. Алматы)

ВЛИЯНИЕ МЕТОДОВ ХРАНЕНИЯ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ МОЛОЧНОКИСЛЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Аннотация

Проведены исследования по влиянию методов хранения на жизнеспособность и пробиотическую актив-ность молочнокислых микроорганизмов из коллекции Института микробиологии и вирусологии. Показано, что при закладке на хранение разными способами не все исследуемые штаммы сохранили пробиотическую активность. Наиболее приемлемыми методами для хранения молочнокислых микроорганизмов является хранение под слоем минерального масла и в 10% растворе глицерина при низких температурах.

Ключевые слова: Молочнокислые бактерии, генофонд, коллекция, жизнеспособность, хранение, методы, пробиотическая активность, тест-культуры, антагонистическая активность, противомикробная активность.

Кілт сөздер: Сүт қышқылы бактериялары, генофонд, коллекция, тіршілікке қабілеттілік, сақтау, әдістер, пробиотикалық белсенділік, тест-культуры, антагонистік белсенділік, микробқа қарсы белсенділік.

Key words: lactic microorganisms, genofond, collection, storage, methods, probiotic characteristics, test-microorganisms, antogonistic characteristics, antimicrobial activity.

Необходимым условием поддержания генофонда микроорганизмов, является сохранение в течение длительного времени жизнеспособности, таксономических свойств и физиологической активности коллекционных штаммов, для чего требуется подбор соответствующих условий консервации с последующей реактивацией микроорганизмов.

Практическое значение проблемы связано с возрастающей потребностью микробиологии и биотехнологии в жизнеспособных и стабильных культурах, а также в продуцентах биологически активных веществ, использующихся для нужд медицины, сельского хозяйства и охраны окружаю-щей среды.

Интерес к изучению молочнокислых бактерий объясняется широким спектром их биологической активности и безвредностью для человека и животных. В последние годы особое внимание исследователей привлекают пробиотические свойства этих бактерий [1-3]. Анализ имеющихся литературных данных свидетельствует о многогранном воздействии пробиотиков на микроэко-логию пищеварительного тракта. Наиболее важными аспектами взаимодействия пробиотических штаммов с микрофлорой кишечника и организмом человека и животных являются образование антибактериальных веществ, конкуренция за питательные вещества и места адгезии, стимуляция иммунной системы [4]. Отмечено, что среди одних и тех же видов встречаются как сильные, так и слабые антагонисты, что свидетельствует о том, что антагонистическая активность является в большей степени штаммовым признаком [5].

Приведенные выше сведения свидетельствуют о необходимости поддержания коллекции активных штаммов молочнокислых бактерий и пополнении ее новыми штаммами с пробиотическими свойствами.

Материалы и методы исследования

В качестве объектов исследования служили коллекционные штаммы молочнокислых бактерий : *Lactobacillus plantarum* № 53Н, *Lactobacillus plantarum* 22, *Lactobacillus plantarum* 2, *Lactobacillus cellobiosus* 20, *Lactobacillus acidophilus* 27W, *Lactobacillus curvatus* 18д, *Lactobacillus casei* 139, *Lactobacillus casei* 173а, *Lactobacillus salivarius* 8д, *Lactobacillus fermentium* 27.

Количество жизнеспособных клеток молочнокислых бактерий определяли с помощью титра мутности одинакового для всех трех методов хранения; затем методом серийных разведений с последующим высевом на агаризованные среды подсчитывали число выросших микроколоний.

Антагонистическую активность устанавливали диффузионным методом в отношении тест-культур: *Escherichia coli* 113, *Bacillus cereus*.

Результаты исследования и их обсуждение

С целью подбора оптимальных методов консервации молочнокислых бактерий для длительного хранения в условиях коллекции проведена закладка 10 штаммов тремя способами: методом пересева, хранение под минеральным маслом, хранение в глицерине при низких температурах.

Таблица 1 – Жизнеспособность молочнокислых микроорганизмов при различных методах хранения

Название культуры	Жизнеспособность, КОЕ, мл		
	Хранение на твердой среде	Хранение под вазелиновым маслом	Хранение в 10% р-ре глицерина при низких T ⁰
<i>Lactobacillus plantarum</i> 53H	11 x10 ⁷	10 x10 ⁷	12 x10 ⁷
<i>Lactobacillus plantarum</i> 22	13 x10 ⁵	9 x10 ⁶	5 x10 ⁶
<i>Lactobacillus plantarum</i> 2	10 x10 ⁷	8 x 10 ⁷	9x 10 ⁷
<i>Lactobacillus cellobiosus</i> 20	8 x 10 ⁷	7 x 10 ⁷	7 x 10 ⁷
<i>Lactobacillus acidophilus</i> 27w	3x10 ⁵	3x10 ⁶	10x10 ⁶
<i>Lactobacillus curvatus</i> 18д	8x10 ⁶	4x10 ⁶	8x10 ⁶
<i>Lactobacillus casei</i> 139	10x10 ⁶	7x10 ⁶	9x10 ⁶
<i>Lactobacillus casei</i> 173a	6x 10 ⁶	5x 10 ⁶	8x 10 ⁶
<i>Lactobacillus salivaris</i> 8д	8 x 10 ⁷	9 x 10 ⁷	10 x 10 ⁷
<i>Lactobacillus fermentum</i> 27	6x10 ⁶	5x10 ⁶	8x10 ⁶
Примечания. Если есть внутри таблицы.			

Из результатов, представленных в таблице, видно, что наилучшим способом хранения для молочнокислых микроорганизмов является хранение под слоем вазелинового масла и при хранении молочнокислых микроорганизмов в 10% растворе глицерина при низких температурах (–20°C). Выживаемость при хранении методом пересева для таких культур как *L. plantarum* 2, *L. curvatus* 18, *L. salivaris* 8д оказалось хуже, чем при хранении под слоем вазелинового масла и при хранении в 10% растворе глицерина при низких температурах.

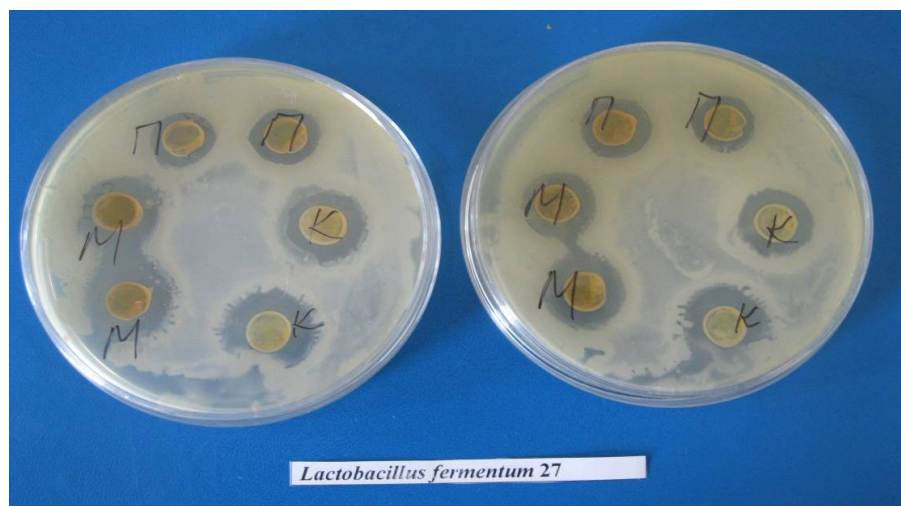
Была проверена антимикробная активность молочнокислых микроорганизмов по отношению к тест-культуре *E.coli* (таблица 2). Все молочнокислые бактерии в той или иной степени проявили антагонистическую активность по отношению к *E.coli*.

Наилучшие показатели по антимикробной активности были получены после хранения молочнокислых культур в 10% растворе глицерина при низких температурах. Диаметры зон подавления роста *E.coli* у таких культур как *L. plantarum* 53Н, *L.cellobiosus* 20, *L. fermentum* 27 достигали от 15мм до 20 мм.

Таблица 2 – Антагонистическая активность молочнокислых микроорганизмов

Название культур	Диаметр зон подавления роста <i>E.coli</i>		
	Хранение на твердой среде	Хранение под вазелиновым маслом	Хранение в 10% р-ре глицерина при низких Т(-20°С)
<i>Lactobacillus plantarum</i> 53Н	12±0,1	15,5±0,2	14±0,4
<i>Lactobacillus plantarum</i> 22	10±0,1	13,5±0,6	13±0,7
<i>Lactobacillus plantarum</i> 2	0	12±0,2	15±0,1
<i>Lactobacillus cellobiosus</i> 20	11±0,4	13,5±0,5	20±0,3
<i>Lactobacillus acidophilus</i> 27w	13,7±0,5	13±0,6	10±0,1
<i>Lactobacillus curvatus</i> 18д	13±0,6	12±0,4	13±0,6
<i>Lactobacillus casei</i> 139	10±0,5	11±0,2	10±0,2
<i>Lactobacillus casei</i> 173a	11±0,1	11±0,3	13±0,4
<i>Lactobacillus salivaris</i> 8д	12,5±0,5	13±0,3	15±0,1
<i>Lactobacillus fermentum</i> 27	15±0,1	17±0,5	18±0,5

Более слабую пробиотическую активность проявила культура *Lactobacillus casei* 139 при всех трех методах хранения. При хранении методом пересева наилучшую антимикробную активность проявили культуры – *L. acidophilus* 27w и *L.fermentum* 27.



П – метод пересева, М – хранение под слоем минерального масла, К – хранение в 10% р-ре глицерина при низких Т (-20°C)

Рисунок 1 – Антагонистическая активность *L. fermentum 27* к тест культуре *E.coli*

У *L. plantarum 2* после хранения методом пересевов не наблюдалось антимикробной активности. При хранении молочнокислых культур под вазелиновым маслом все культуры проявили антимикробную активность по отношению к тест-культуре *E.coli*. Наилучшие показатели по антагонистической активности были у культуры *L. fermentum 27* при всех трех методах хранения. Таким образом, после хранения молочнокислых микроорганизмов такими методами как метод пересевов, хранение под вазелиновым маслом и в 10% растворе глицерина при низких температурах была сохранена антимикробная активность молочнокислых микроорганизмов к возбудителю кишечных заболеваний – *E.coli*.

Исследовали антибиотические свойства молочнокислых микроорганизмов по отношению к тест культуре, вызывающей кишечные инфекции *Bac.subtilis* (таблица 3). При хранении молочно-кислых культур на твердой среде методом пересевов ни одна из культур не проявила антагонистическую активность при высеве на агаризованную среду МРС за исключением культуры *L.plantarum 53Н*. При хранении молочнокислых культур под слоем вазелинового масла на скошенном агаре пять культур проявили антагонистическую активность; из них четыре культуры:

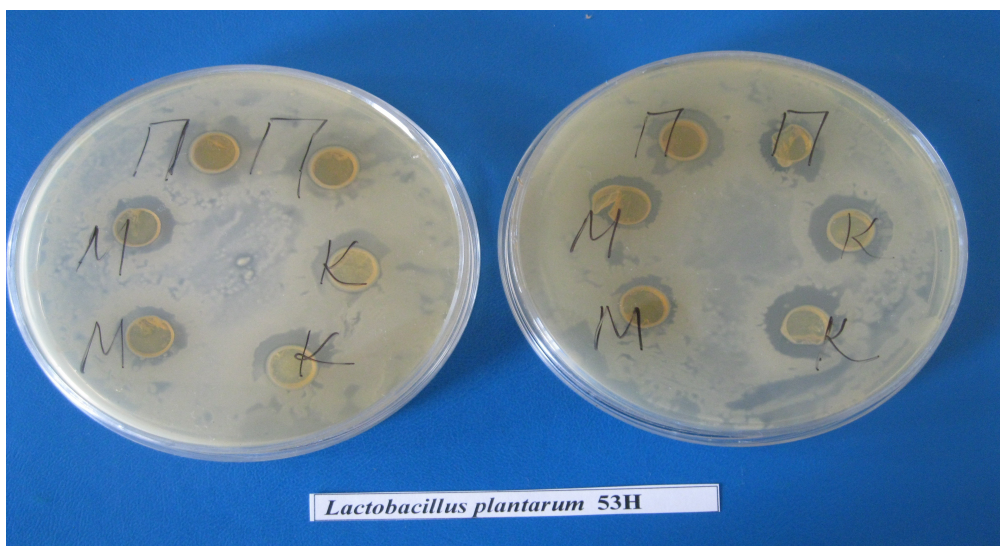
Таблица 3 – Антагонистическая активность молочнокислых микроорганизмов

Название культур	Диаметр зон подавления роста <i>Bac.subtilis</i> , мм
------------------	---

	Хранение на твердой среде	Хранение под вазелиновым маслом	Хранение в 10% р-ре глицерина при низких Т(- 20°C)
<i>Lactobacillus plantarum</i> 53H	15±0,7	14±0,3	15±0,4
<i>Lactobacillus plantarum</i> 22	0	20±0,1	22±0,3
<i>Lactobacillus plantarum</i> 2	0	0	0
<i>Lactobacillus cellobiosus</i> 20	0	0	0
<i>Lactobacillus acidophilus</i> 27w	0	17±0,9	25±0,3
<i>Lactobacillus curvatus</i> 18д	0	0	0
<i>Lactobacillus casei</i> 139	0	20±0,1	0
<i>Lactobacillus casei</i> 173а,	0	20±0,4	20±0,1
<i>Lactobacillus salivaris</i> 8д	0	0	0
<i>Lactobacillus fermentum</i> 27	0	0	22±0,7

L. plantarum 22, *L. acidophilus* 27w, *L. casei* 139, *L. casei* 173а проявили повышенную антимикроб-ную активность. Хранение в 10% растворе глицерина при низких температурах дало аналогичную картину, что при хранении под вазелиновым маслом: пять культур проявили повышенную антимикробную активность.

Из десяти исследованных молочнокислых культур четыре культуры: *L. plantarum* 2, *L. Cello-biosus* 20, *L. curvatus* 18д, *Lactobacillus salivaris* 8д не проявили антагонистической активности по отношению к *Vac. subtilis* ни при одном методе хранения. Из полученных данных следует, что хранение методом пересева отрицательно сказывается на сохранении молочнокислыми бактериями антимикробных свойств. При хранении молочнокислых культур под слоем вазелинового масла и в 10% растворе глицерина при низких температурах молочнокислые культуры сохраняют антимикробные свойства.



П – метод посева, М – хранение под слоем минерального масла, К – хранение в 10% р-ре глицерина при низких Т(-20°C)

Рисунок 2 – Антагонистическая активность *L. plantarum* 53Н к тест культуре *Bac.subtilis*

Проведенные исследования по влиянию методов хранения на жизнеспособность и пробиоти-ческую активность молочнокислых микроорганизмов показали, что при закладке на хранение разными способами не все исследуемые штаммы сохранили пробиотическую активность.

Наиболее приемлемыми методами для хранения молочнокислых микроорганизмов является хранение под слоем минерального масла и в 10% растворе глицерина при низких температурах.

ЛИТЕРАТУРА

1 Гаврилова Н.Н., Ратникова И.А. Основные достижения лаборатории микробных препаратов в области биотехнологии // Известия Национальной академии Наук РК. Сер. биол. и мед. – 2003. – № 2. – С. 48-57.

2 Ратникова И. А, Гаврилова Н.Н. Создание пробиотиков для лечения социально значимых инфекций // Материалы Конгресса «Пробиотики, пребиотики, синбиотики и функциональные продукты питания». – СПб., 2007.

3 Ратникова И. А, Гаврилова Н.Н. Создание комплексных пробиотиков для лечения социально значимых инфекций // Материалы тезисов Международного конгресса по пробиотикам. – СПб., 2009. – С. 33.

4 Гаврилова Н.Н Ратникова И.А. Создание пробиотиков широкого спектра действия // Тезисы докладов на Международном конгрессе «Биотехнология – состояние и перспективы развития». – М., 2010. – С. 471.

5 Хорошилова Н.В. Иммуномодулирующее и лечебное действие пробиотиков // Иммунология. – 2003. – № 6. – С. 352-356.

REFERENCES

1 Gavrilova N.N., Ratnikova I.A. Osnovnye dostezhenia laboratorii mikrobnnyh preparatov v oblasti biotekhnologii // Izvestia Nacionalnoi Akademii Nauk RK. Ser. biol. i med. – 2003. – № 2. – S. 48-57.

2 Ratnikova I.A., Gavrilova N.N. Sozdanie probiotikov dlya lechenia socialno znachimykh infekcii // Materialy Kongressa “Probiotiki, prebiotiki, sinbiotiki i funktsionalnye produkty pitaniya”. – Sankt-Peterburg, 2007.

3 Ratnikova I.A., Gavrilova N.N. Sozdanie kompleksnykh probiotikov dlya lechenia socialno znachimykh infekcii // Materialy tezisev Mezhdunarodnogo kongressa po probiotikam. – Sankt-Peterburg., 2009. – С. 33.

4 Gavrilova N.N., Ratnikova I.A. Sozdanie probiotikov shirokogo spektra deistvia // tezisy dokladov na Mezhdunarodnom kongresse “Biotehnologia – sostoianie i perspektivy razvitiya”. – М., 2010. – С. 471.

5 Horoshilova N.V. Immunomoduliruiushee I lechebnoe deistvie probiotikov // Immunologia. – 2003. – № 6. – С. 352-356.

Резюме

К. М. Кебекбаева, Г. Т. Жәкібаева,

А. К. Жобулаева, А. В. Медведева, А. Е. Молжігітова

(ҚР БЖҒМ ҒК «Микробиология и вирусология институты» РМК , Алматы қ.)

СҮТ ҚЫШҚЫЛЫ БАКТЕРИЯЛАРЫНЫҢ ТІРШІЛІККЕ

ҚАБІЛЕТТІЛІГІНЕ САҚТАУ ӘДІСТЕРІНІҢ ӘСЕР ЕТУІ

Микробиология және вирусология институтының коллекциясынан алынған микроорганизмдердің про-биотикалық белсенділігін және тіршілікке қабілеттілігіне сақтау әдістерінің әсер етуі бойынша зерттеулер жүргізілді. Әртүрлі әдістермен сақтауда кейбір штамдар пробиотикалық белсенділігін сақтап қалмаған-дығын көрсетті. Сүт қышқылы бактериялар үшін төменгі температурада 10%-тік глицериннің ерітіндісінде және минералды майдың астында сақтау анағұрлым жақсы әдістер болып табылады.

Кілт сөздер: Сүт қышқылы бактериялары, генофонд, коллекция, тіршілікке қабілеттілік, сақтау, әдістер, пробиотикалық белсенділік, тест-культуры, антагонистік белсенділік, микробқа қарсы белсенділік.

Summary

K. M. Kebekbaeva, G. T. Dzhakibaeva,

A. K. Jobulaeva, A. V. Medvedeva, A. E. Molzhigitova

(“Institute of microbiology and virology” CS MES RK, Almaty)

INFLUENCE OF STORAGE METHODS ON VIABILITY LACTIC MICROORGANISMS

The research conducted on the effect of storage methods on the viability and probiotic activity of lactic acid microorganisms from the collection of the Institute of Microbiology and Virology. It is shown that when placing the storage in many ways, not all researched probiotic strains retained activity. Most acceptable method for the storage of lactic acid microorganisms is storage under a layer of mineral oil and 10% glycerol solution at low temperatures.

Key words: lactic microorganisms, genofond, collection, storage, methods, probiotic characteristics, test-microorganisms, antogonistic characteristics, antimicrobial activity.

Поступила 11.01.2013 г.