

К.М.КЕБЕКБАЕВА, Г.Т.ДЖАКИБАЕВА, А.К.ДЖОБУЛАЕВА

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

ПРОБИОТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ МОЛОЧНОКИСЛЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ, ХРАНЯЩИХСЯ РАЗЛИЧНЫМИ МЕТОДАМИ В КОЛЛЕКЦИИ КУЛЬТУР МИКРООРГАНИЗМОВ

Аннотация

Целью исследования являлось изучение влияния методов хранения на пробиотическую активность молочнокислых микроорганизмов, хранящихся в коллекции РГП «Институт микробиологии и вирусологии» КН МОН РК. В работе использовались общепринятые микробиологические методы исследования. Проведенные исследования по влиянию методов хранения на жизнеспособность и пробиотическую 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. Полученные результаты дали возможность выявить наиболее приемлемые способы хранения для молочнокислых микроорганизмов, обладающих пробиотическими свойствами.

Ключевые слова: пробиотическая активность, молочнокислые микроорганизмы, микроорганизмы.

Введение

Проблема сохранения микробного разнообразия является столь же глобальной и многоплановой, как и вопросы сохранения благополучия окружающей среды. Для ее решения, наряду с вопросами оздоровления и сохранения экосистемы, особого внимания требует коллекционная работа. Одной из важнейших задач коллекций является разработка наиболее эффективных методов долговременного хранения микробных культур, обеспечивающих длительное сохранение жизнеспособности, биологических свойств и генетической стабильности.

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 микроэкологию пищеварительного тракта. Одним из путей борьбы с инфекционными заболеваниями является использование с лечебной и профилактической целью молочнокислых бактерий и их метаболитов. Эти микроорганизмы являются симбионтами желудочно-кишечного тракта, безвредны для человека и животных. 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].

В коллекции Института микробиологии и вирусологии хранятся различными методами молочнокислые микроорганизмы, обладающие 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 fermentum* 27.

Антагонистическую активность устанавливали диффузионным методом в отношении тест-культур: *Bacillus subtilis*, *Streptococcus aureus* 10, Вакцина Ценковского.

Результаты 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. Культуры молочнокислых микроорганизмов хранились в течение года. По истечении срока хранения у молочнокислых бактерий была проверена антимикробная активность.

При изучении антагонистической активности молочнокислых микроорганизмов по отношению к тест-культуре *Bac.subtilis* выяснилось, что при хранении молочнокислых культур на твердой среде методом пересевов ни одна из культур не проявила антагонистическую активность на агаризованной среде 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: *L.plantarum* 22, *L. acidophilus* 27w, *L. casei* 139, *L. casei* 173а проявили повышенную антимикробную активность. Хранение в 10% растворе глицерина при низких температурах дало аналогичную картину, что и при хранении под вазелиновым маслом: пять культур проявили повышенную антимикробную активность.

Из десяти исследованных молочнокислых культур четыре культуры: *L. plantarum* 2, *L. cellobiosus* 20, *L.curvatus* 18д, *L. salivaris* 8д не проявили антагонистической активности по отношению к *Bac.subtilis* ни при одном методе хранения.

Таблица 1 - 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%-ре глицерина при низких Т(-20°С)
<i>Lactobacillus plantarum</i> 53Н	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	
<i>Lactobacillus cellobiosus</i> 20	0	0	
<i>Lactobacillus acidophilus</i> 27w	0	17±0,9	3
<i>Lactobacillus curvatus</i> 18д	0	0	
<i>Lactobacillus casei</i> 139	0	20±0,1	1
<i>Lactobacillus casei</i> 173а,	0	20±0,4	1
<i>Lactobacillus salivaris</i> 8д	0	0	
<i>Lactobacillus fermentum</i> 27	0	0	7

Из полученных данных следует, что хранение методом пересева отрицательно сказывается на сохранении молочнокислыми бактериями антимикробных свойств.



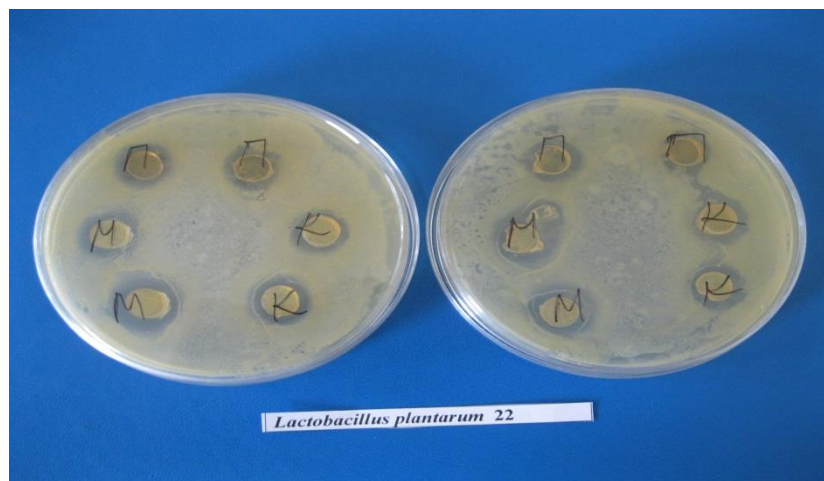
П- метод посева, М-хранение под слоем минерального масла, К-хранение в 10% р-ре глицерина при низких Т(-20°C)

Рисунок 1 – Антагонистическая активность *L. plantarum* 53H к тест-культуре *Bac.subtilis*

Проверена антагонистическая активность молочнокислых микроорганизмов по отношению к тест-культуре *Staph. aureus* (табл.2) . При всех трех методах хранения у молочнокислых культур сохранилась антимикробная активность к *Staph. aureus*. Из десяти проверенных культур лишь одна культура *L. plantarum* 2 при хранении методом посева не проявила антагонистической активности. При хранении под слоем вазелинового масла две культуры: *L. casei* 173a, *L. salivaris* 8д не проявили антимикробной активности. Метод хранения в 10% растворе глицерина при низких температурах оказался наиболее приемлемым для молочнокислых микроорганизмов. Из десяти проверенных молочнокислых культур все проявили антимикробную активность по отношению к тест-культуре *Staph. aureus*.

Таблица 2 - Антагонистическая активность молочнокислых микроорганизмов

Название культур	Диаметр зон подавления роста <i>Staph. aureus</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	10±0,2	11±0,4	11±0,2
<i>Lactobacillus plantarum</i> 22	11±0,3	13±0,2	15±0,2
<i>Lactobacillus plantarum</i> 2	0	11±0,2	13±0,2
<i>Lactobacillus cellobiosus</i> 20	10±0,7	11±0,7	14±0,1
<i>Lactobacillus acidophilus</i> 27w	9±0,8	10±0,8	16±0,2
<i>Lactobacillus curvatus</i> 18д	10±0,2	13±0,2	15±0,3
<i>Lactobacillus casei</i> 139	11±0,8	14±0,2	16±0,8
<i>Lactobacillus casei</i> 173a,	10±0,9	0	12±0,6
<i>Lactobacillus salivaris</i> 8д	9±0,3	0	12±0,7
<i>Lactobacillus fermentum</i> 27	10±0,5	12±0,3,	15±0,3,



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

Рисунок 2 – Антагонистическая активность *L. plantarum* 22 к тест- культуре *Staph. aureus*

Проверка антагонистической активности молочнокислых микроорганизмов (таблица 3) по отношению к тест-культуре Вакцина Цинковского дала следующие результаты: все культуры проявили антагонистическую активность по отношению к Вакцине Цинковского при всех трех методах хранения.

Таблица 3 - Антагонистическая активность молочнокислых микроорганизмов

Название культур	Диаметр зон подавления роста Вакцины Цинковского, мм		
	Хранение на твердой среде	Хранение под вазелиновым маслом	Хранение в 10% р-ре глицерина при низких Т (-20°С)
<i>Lactobacillus plantarum</i> 53Н	10±0,3	11±0,5	14±0,2
<i>Lactobacillus plantarum</i> 22	9±0,3	9,5±0,5	11±0,4
<i>Lactobacillus plantarum</i> 2	10±0,7	11±0,8	15,5±0,5
<i>Lactobacillus cellobiosus</i> 20	9±0,3	10±0,2	12,5±0,4
<i>Lactobacillus acidophilus</i> 27w	10±0,8	11,5±0,4	15±0,3
<i>Lactobacillus curvatus</i> 18д	9±0,4	10 ±0,3	12±0,3
<i>Lactobacillus casei</i> 139	9±0,4,	10,5±0,2	11,5±0,4
<i>Lactobacillus casei</i> 173a,	11±0,7	11±0,2	13±0,2,
<i>Lactobacillus salivaris</i> 8д	10±0,3	15±0,2	16±0,3
<i>Lactobacillus fermentum</i> 27	11±0,9	12±05	12±0,3

Наилучшие показатели по антимикробной активности были у *Lactobacillus salivaris* 8д: диаметр зон подавления роста при хранении в 10% р-ре глицерина при низких температурах доходил до 16 мм.

Проведенная работа показала, что при хранении молочнокислых микро-организмов методом посева антагонистическая активность либо отсутствует, либо очень низкая. Наиболее приемлемыми методами хранения для молочнокислых микроорганизмов являются хранение под слоем вазелинового масла и в 10% растворе глицерина при низких температурах.

Литература:

- 1 Гарилова Н.Н., Ратникова И.А. Микробиологические препараты- альтернатива антибиотикам //Биотехнология. Теория и практика. - 1998. - №1. - С.140-141.
- 2 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.

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

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

5 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.

Түйін

К.М.КЕБЕКБАЕВА, Г.Т.ДЖАКИБАЕВА, А.К.ДЖОБУЛАЕВА

ҚР ҒБМ ҒК «Микробиология және вирусология институты» РМК, Алматы қ.

МИКРООРГАНИЗМДЕРДІҢ КУЛЬТУРАЛАР КОЛЛЕКЦИЯСЫНДА ӘР ТҮРЛІ ӘДІСТЕРМЕН САҚТАЛҒАН СҮТ ҚЫШҚЫЛДЫ БАКТЕРИЯЛАРДЫҢ ПРОБИОТИКАЛЫҚ БЕЛСЕНДІЛІГІ

Зерттеудің мақсаты «Микробиология және вирусология институтының» РМК коллекциясында сүт қышқылды бактериялардың пробиотикалық белсенділігіне әр түрлі әдістермен сақтаудың әсерлерін зерттеу. Жұмысты жүргізу барысында жалпы қабылданған микробиологиялық зерттеу әдістері қолданылды. Жүргізілген зерттеулердің нәтижесінде әр түрлі әдістермен сақтауда, сүт қышқылды бактериялардың кейбір штаммдары, пробиотикалық белсенділігі мен тіршілікке қабілеттілігін сақтап қалмағандығын көрсетті. Сүт қышқылды бактериялар үшін төменгі температурада 10%-тік глицерин ерітіндісінде және минералды майдың астында сақтау анағұрлым жақсы әдістер болып табылды. Алынған нәтижелер бойынша, пробиотикалық қасиетке ие, сүт қышқылды бактерияларды сақтаудың қолайлы әдістері бар екені анықталды.

К.М.КЕБЕКБАЕВА, G.T.DZHAKIBAEVA, A.K.DZHOBULAEVA

RSOE "Institute of Microbiology and Virology", Committee of Science, Ministry of Education and Science, Almaty, Republic of Kazakhstan

PROBIOTIC ACTIVITY OF LACTIC ACID MICROORGANISMS, STORED BY DIFFERENT TECHNIQUES IN THE CULTURE COLLECTION OF MICROORGANISMS

Summary

The aim of the study was to investigate the effect of storage techniques on probiotic activity of lactic acid microorganisms stored in the collection of RSOE "Institute of Microbiology and Virology". In the work the conventional microbiological procedures were used. Studies on the effect of storage techniques on the viability and probiotic activity of lactic acid microorganisms showed that when laying down on storage by different techniques, not all strains under study retained probiotic activity. The most suitable techniques to preserve lactic acid microorganisms was a storage under a layer of mineral oil and in the 10% glycerol solution at low temperatures. The findings made it possible to identify the most suitable techniques for the storage of lactic acid microorganisms with probiotic properties.

Key words: Probiotic, microorganisms, culture collection

The problem of preservation of microbial diversity is as global and multi-aspect as the issues of the environmental welfare protection. To solve the problem, along with the issues of

ecosystem enhancement and conservation, the collection activity requires a special attention. One of the most important tasks of collections is to develop the most effective techniques for long-term storage of microbial cultures that ensure the sustained preservation of viability, biological properties, and genetic stability.

Interest in the studying lactic acid bacteria is due to their broad spectrum of biological activity and harmlessness to humans and animals. In recent years, the bacterial probiotic properties attract particular attention of researchers [1-3]. Analysis of the available in the literature data suggests the many-sided effects of probiotics on the microecology of the digestive system. One of the ways to combat infectious diseases is the use of lactic acid bacteria and their metabolites with the therapeutic and preventive purpose. These microorganisms are symbionts of the gastrointestinal tract, harmless to humans and animals. The most important aspects of the interaction of probiotic strains with the intestinal microflora and human and animal body are the formation of antibacterial substances, competition for nutrients and adhesion sites, stimulation of the immune system [4]. It is noted that among the same species there are both strong and weak antagonists, indicating that the antagonist activity is largely a strain characteristic [5].

In the collection of the Institute of Microbiology and Virology, the lactic acid bacteria that have probiotic properties are stored using the different techniques.

Material and methods of testing

The objects of study were collection strains of lactic acid bacteria: *Lactobacillus plantarum* № 53H, *Lactobacillus plantarum* 22, *Lactobacillus plantarum* 2, *Lactobacillus cellobiosus* 20, *Lactobacillus acidophilus* 27W, *Lactobacillus curvatus* 18d, *Lactobacillus casei* 139, *Lactobacillus casei* 173a, *Lactobacillus salivarius* 8d, *Lactobacillus fermentum* 27.

Antagonistic activity was established by the diffusion method against the test cultures: *Bacillus subtilis*, *Streptococcus aureus* 10, Tsenkovsky's vaccine.

Results and discussion

In order to select the optimal preservation techniques for long term storage of lactic acid bacteria, in the conditions of collection 10 strains were laid down in three ways: subculturing, storage under mineral oil, storage in glycerol at low temperatures. Cultures of lactic acid microorganisms were stored for a year. On the expiration of the storage time, the lactic acid bacteria were tested for antimicrobial activity.

When studying the antagonistic activity of lactic acid microorganisms against the test culture *Bac.subtilis*, it was found that when storing lactic acid cultures on a solid medium by subculturing, none of the cultures showed antagonistic activity on MRS agar medium except the *L. plantarum* 53H culture. When storing lactic acid cultures under a layer of vaseline oil on slant agar, five cultures revealed antagonistic activity, of which four cultures: *L. plantarum* 22, *L. acidophilus* 27w, *L. casei* 139, *L. casei* 173a showed increased antimicrobial activity. Storage in 10% glycerol at low temperatures gave a similar picture as that of storage under vaseline oil: five cultures exhibited enhanced antimicrobial activity.

Of the ten investigated lactic acid cultures, four cultures: *L. Plantarum* 2, *L. cellobiosus* 20, *L.curvatus* 18d, *L. salivaris* 8d showed no antagonistic activity against *Bac.subtilis* with any storage technique.

Table 1 - Antagonistic activity of lactic acid microorganisms

Culture name	Diameter for growth suppression zone of <i>Bac.subtilis</i> , mm		
	Storage on solid medium	Storage under vaseline oil	Storage in 10% glycerol at low T(-20oC)
1	2	3	4
<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

Continued table 1

1	2	3	4
Lactobacillus acidophilus 27w	0	17±0,9	25±0,3
Lactobacillus curvatus 18д	0	0	0
Lactobacillus casei 139	0	20±0,1	23±0,1
Lactobacillus casei 173a,	0	20±0,4	20±0,1
Lactobacillus salivaris 8д	0	0	0
Lactobacillus fermentum 27	0	0	22±0,7

The findings show that the storage by subculturing technique has a negative impact on the preservation of antimicrobial properties by lactic acid bacteria.



П- subculturing, M- storage under the layer of mineral oil, K- storage in 10% glycerol at low T (-20°C)

Figure 1 - Antagonistic activity of *L. plantarum* 53H against the test culture *Bac. subtilis*

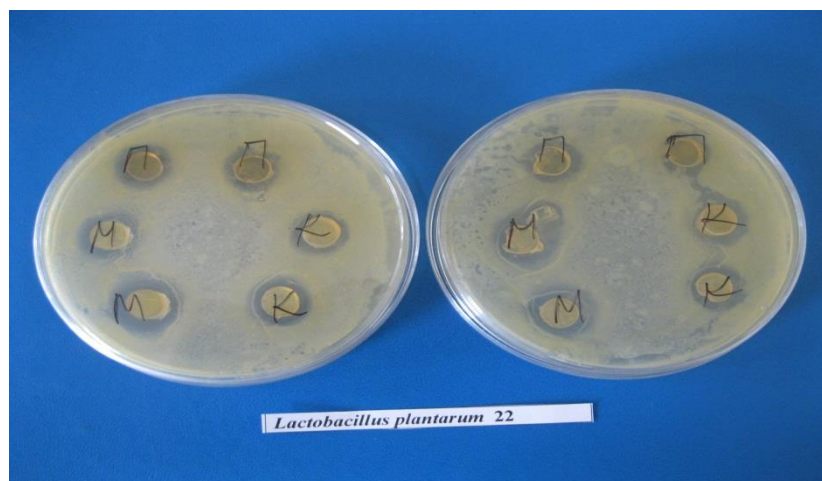
The antagonistic activity of lactic acid microorganisms was examined against the test culture *Staph. aureus* (Table 2). With all three storage techniques, the lactic cultures preserved the antimicrobial activity against *Staph. aureus*. Of the ten tested, only one culture *L. plantarum* 2, when storing by subculturing, showed no antagonistic activity. When stored under a layer of vaseline oil, two cultures: *L. casei* 173a, *L. salivaris* 8d revealed no antimicrobial activity. The technique of storage in 10% glycerol at low temperatures appeared to be most suitable for lactic acid microorganisms. Of the ten tested lactic acid cultures, all of them displayed antimicrobial activity against the test culture *Staph. aureus*.

Table 2 - Antagonistic activity of lactic acid microorganisms

Culture name	Diameter for growth suppression zone of <i>Staph. aureus</i> , mm		
	Storage on solid medium	Storage under vaseline oil	Storage in 10% glycerol at low T (-20°C)
1	2	3	4
Lactobacillus plantarum 53H	10±0,2	11±0,4	11±0,2
Lactobacillus plantarum 22	11±0,3	13±0,2	15±0,2
Lactobacillus plantarum 2	0	11±0,2	13±0,2
Lactobacillus cellobiosus 20	10±0,7	11±0,7	14±0,1
Lactobacillus acidophilus 27w	9±0,8	10±0,8	16±0,2
Lactobacillus curvatus 18д	10±0,2	13±0,2	15±0,3
Lactobacillus casei 139	11±0,8	14±0,2	16±0,8

Continued table 1

1	2	3	4
Lactobacillus casei 173a,	10±0,9	0	12±0,6
Lactobacillus salivaris 8д	9±0,3	0	12±0,7
Lactobacillus fermentum 27	10±0,5	12±0,3	15±0,3,



II- subculturing, M- storage under the layer of mineral oil, K- storage in 10% glycerol at low T (-20°C)

Figure 2 - Antagonistic activity of *L. plantarum* 22 against the test culture *Staph. Aureus*

Testing antagonistic activity of lactic acid microorganisms (Table 3) against the test culture Tsenkovsky's vaccine gave the following results: all cultures showed antagonistic activity against Tsenkovsky's vaccine under all three storage techniques.

Table 3 - Antagonistic activity of lactic acid microorganisms

Culture name	Diameter for growth suppression zone of Tsenkovsky's vaccine, mm		
	Storage on solid medium	Storage under vaseline oil	Storage in 10% glycerol at low T (-20oC)
<i>Lactobacillus plantarum</i> 53H	10±0,3	11±0,5	14±0,2
<i>Lactobacillus plantarum</i> 22	9±0,3	9,5±0,5	11±0,4
<i>Lactobacillus plantarum</i> 2	10±0,7	11±0,8	15,5±0,5
<i>Lactobacillus cellobiosus</i> 20	9±0,3	10±0,2	12,5±0,4
<i>Lactobacillus acidophilus</i> 27w	10±0,8	11,5±0,4	15±0,3
<i>Lactobacillus curvatus</i> 18δ	9±0,4	10±0,3	12±0,3
<i>Lactobacillus casei</i> 139	9±0,4	10,5±0,2	11±0,4
<i>Lactobacillus casei</i> 173a,	11±0,7	11±0,2	13±0,2,
<i>Lactobacillus salivaris</i> 8δ	10±0,3	15±0,2	16±0,3
<i>Lactobacillus fermentum</i> 27	11±0,9	12±0,5	12±0,3

Lactobacillus salivaris 8d showed the best indices of antimicrobial activity: the diameter of growth suppression zones when storing in 10% glycerol at low temperatures reached 16 mm.

The study demonstrated that under the storage of lactic acid microorganisms by subculturing technique, the antagonistic activity was absent or very low. The most suitable techniques for lactic acid microorganisms were the storage under the layer of vaseline oil and in 10% glycerol at low temperatures.

References:

- 1 Gariylova N.N., Ratnikova I.A. Microbiological preparations - alternative to antibiotics // Biotechnology . Theory and practice. - 1998 . - №1.- P.140 -141.
- 2 Gavrilova N.N., Ratnikova I.A. The main achievements of the laboratory of microbial preparations in biotechnology // Proceedings of the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan, biol. and med.series. - 2003 . - №2. - P. 48-57.
- 3 Ratnikova I. A, Gavrilova N.N. Creation of probiotics for the treatment of socially significant infections // Proceedings of the Congress "Probiotics, prebiotics, synbiotics, and functional foodstuffs". - St. Peterburg. - 2007.
- 4 Ratnikova I. A, Gavrilova N.N. Creation of complex probiotics for the treatment of socially significant infections // Materials of abstracts of the International Congress on probiotics. - St. Petersburg. - 2009. - P.33.
- 5 Gavrilova N.N., Ratnikova I.A. Creating probiotics of a broad action spectrum // Abstracts of the International Congress "Biotechnology - a state and prospects for development". - Moscow, 2010. - P.471.