

Н.Н.ГАВРИЛОВА¹, И.А.РАТНИКОВА¹, К.БАЯКЫШЕВА¹, З.Ж. ТУРЛЫБАЕВА¹,
С.Д.ЫБЫШЕВА¹, О.Г.ЧУГАЙ²

¹РГП «Институт микробиологии и вирусологии» КН МОН РК, г. Алматы. Казахстан
²Республиканский клинический госпиталь инвалидов ВОВ

ПОВЫШЕНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ МОЛОЧНОКИСЛЫХ, ПРОПИОНОВОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ И ИХ АССОЦИАЦИЙ К НИЗКИМ ЗНАЧЕНИЯМ pH

Аннотация

Изучена адаптация молочнокислых, пропионовокислых бактерий и их ассоциаций к низким значениям pH. Отобраны варианты, превосходящие исходные культуры по антагонистической активности и устойчивости к низким значениям pH.

Установлено, что ассоциации из исходных культур более чувствительны к низким значениям pH по сравнению с адаптированными культурами. При этом снижение титра клеток у них происходит на один порядок. В ассоциациях из адаптированных культур титр бактерий и антагонистическая активность под воздействием низких значений pH практически не снижались.

Ключевые слова: молочнокислые бактерии, пропионовокислые бактерии

Обширное число имеющихся на рынке пробиотиков для ветеринарии и медицины свидетельствуют о том, что проблеме их разработки уделяется достаточное внимание. Однако рекомендуемые пробиотики часто не дают желаемого результата. Дальнейшее совершенствование таких препаратов с учетом эволюции знаний в области микробиологии и биотехнологии является одним из наиболее перспективных путей создания современных высокоэффективных средств антидисбиозной терапии.

Эффективность пробиотиков зависит от многих факторов: их состава, спектра биологической активности, концентрации клеток пробиотической микрофлоры и др. Штаммы микроорганизмов, входящие в состав пробиотиков, должны обладать также адгезивными и ростовыми свойствами, которые позволят им быстро колонизировать слизистую поверхность желудочно-кишечного тракта. Резистентность бактериальных клеток к реактогенной среде желудка и верхних отделов кишечника также является необходимым условием выживания пробиотических микроорганизмов [1, 2].

Материалы и методы

Объектом исследования служили молочнокислые бактерии *Lactobacillus plantarum* 2в, 22, 14д, *Lactobacillus fermentum* 127, *Lactobacillus fermentum* 27, *Lactobacillus brevis* Б-3, *Lactobacillus cellobiosus* 20, *Lactobacillus salivarius* 8д, пропионовокислые бактерии *Propionibacterium shermanii*, 2 ассоциации из молочнокислых и пропионовокислых бактерий, отличающиеся по составу молочнокислых бактерий.

Культивирование молочнокислых и пропионовокислых бактерий, а также ассоциаций при адаптации к низкому значению pH, проводили в жидкой питательной среде MRS [3] в течение 18 ч при 37⁰С; затем из них отбирали по 1 мл и вносили в 10 мл стерильного физиологического раствора с pH 3,0 и выдерживали в термостате при 37⁰С в течение 40 и 60 мин, отбирали пробы, нейтрализовали и определяли количество выживших бактерий. Контролем служила исходная культура. После подсчета и описания морфологии колоний, выросших на твердой питательной среде, производили их отсев в жидкую питательную среду MRS. Выросшие жидкие культуры микроскопировали и определяли в них pH и антагонистическую активность. Всего исследовано не менее 80

изолятов из каждой культуры молочнокислых и пропионовокислых бактерий, подвергшихся влиянию низкого значения pH. Наиболее активные изоляты повторно выдерживали в стерильном физиологическом растворе с pH 3,0. Опыт проводили до получения вариантов, устойчивых к низким значениям pH без потери производственно-ценных признаков.

Ассоциации А (культуры молочнокислых бактерий *L. plantarum* 2в и 14д, *L. brevis* Б-3 и пропионовокислых бактерий *P. shermanii*) и П (*L. plantarum* 22 и *L. fermentum* 27), составленные из исходных и адаптированных к низким значениям pH культур микроорганизмов, выращивали в жидкой питательной среде MRS с кобальтом в течение 18 ч, затем из них отбирали по 1 мл и вносили в 10 мл стерильного физиологического раствора с pH 3,0 и выдерживали в термостате при 37⁰С в течение 40 и 60 мин, отбирали пробы, нейтрализовали и определяли количество выживших бактерий. Кроме того, после экспозиции при низком значении pH ассоциации засеивали в питательную среду MRS с кобальтом. Через 18 ч культивирования в ассоциациях определяли pH, титр и антагонистическую активность. Контролем служили ассоциации из исходных и адаптированных культур до их экспозиции при низком значении pH.

Количество бактериальных клеток определяли путем посева культур из соответствующих разведений в чашки Петри на твердую питательную среду MRS, антагонистическую активность - методом диффузии в агар в отношении тест-культур: *Escherichia coli*, *Salmonella gallinarum*, *Staphylococcus aureus* № 9, *Staphylococcus aureus* № 3316, *Klebsiella pneumoniae* 444, *Candida albicans*, *Mycobacterium* B₅[3].

Адгезивную активность определяли на эритроцитах человека [6], устойчивость к антибиотикам бисептолу, левомицетину, гентамицину, линкомицину, ципрофлоксацину в концентрациях 100 и 50 мкг/мл - методом промышленных дисков [4].

В таблицах представлены средние результаты не менее чем из трех повторностей.

Результаты и обсуждение

В результате исследований установлено, что использованные культуры молочнокислых и пропионовокислых бактерий довольно устойчивы к низким значениям pH. При этом существенных изменений в морфологии колоний и бактериальных клеток не отмечено, за исключением некоторого уменьшения размеров колоний у штаммов *L. cellobiosus* 20, *L. fermentum* 127 и 27. Снижение титров у испытываемых культур произошло на 1-2 порядка, что является, по данным литературы [1], хорошим показателем.

Более чувствительными к низким значениям pH оказались штаммы *L. plantarum* 22, *L. cellobiosus* 20, *L. fermentum* 127, у которых через 40 мин экспозиции при pH 3 титр бактерий снизился на 2 порядка. У штаммов *L. plantarum* 14д, *L. plantarum* 2в, *L. fermentum* 27, *L. salivarius* 8д после 40-минутной экспозиции снизился на 1 порядок, а через 60 мин – на 2 порядка. Штаммы же *L. brevis* Б-3 и *P. Shermanii* оказались более устойчивыми к низким значениям pH. Снижение числа бактериальных клеток у них произошло на 1 порядок, независимо от продолжительности экспозиции.

Таблица 1 - Выживаемость молочнокислых и пропионовокислых бактерий при низких значениях pH

Штаммы	Содержание жизнеспособных клеток, КОЕ/мл		
	исходное	40 мин при pH3	60 мин при pH3
1	2	3	4
<i>L. plantarum</i> 22	3,2x10 ⁹	3,2x10 ⁷	2,5x10 ⁷
<i>L. plantarum</i> 14д	2,7x10 ⁹	2,2x10 ⁸	2,2x10 ⁷
<i>L. plantarum</i> 2в	6,0x10 ⁹	3,0x10 ⁸	2,7x10 ⁷
<i>L. cellobiosus</i> 20	1,3x10 ⁸	5,2x10 ⁶	2,0x10 ⁶

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4
<i>L. fermentum</i> 27	8,0 x10 ⁹	10,0x10 ⁸	1,3x10 ⁷
<i>L.fermentum</i> 127	8,8 x10 ⁹	7,9x10 ⁷	7,5x10 ⁷
<i>L. salivarius</i> 8d	12,0 x10 ⁹	8,5x10 ⁸	2,0x10 ⁷
<i>L.brevis</i> Б-3	1,2 x10 ⁸	2,0x10 ⁷	4,0x10 ⁷
<i>P.shermanii</i>	3,0x10 ⁸	1,2x10 ⁷	1,5x10 ⁷

Выделены и исследованы изоляты из каждой культуры молочнокислых и пропионовокислых бактерий, подвергшейся влиянию низкого значения pH. Установлено, что большинство из них обладает высокой кислотообразующей способностью и антагонистической активностью в отношении тест-культур: MRSA №9; MRSA №3316, *E. coli*, *S.gallinarum*, *K. pneumonia* 444, *Mycobacterim* B₅, *C. albicans*.

В таблице 2 представлены наиболее активные варианты, выделенные из культур, подвергшихся однократному воздействию низкого значения pH. У адаптированной к pH 3 культуры *L. Plantarum* 2в повысилась антагонистическая активность в отношении *E. coli*, *S. gallinarum*, *Mycobacterim* B₅ по сравнению с исходной. У *L. salivarius* 8д появилась активность к *S. aureus* № 9 и повысилась в отношении *S. aureus* №3316, у *L. plantarum* 14д повысилась активность в отношении *E. coli*, *S. gallinarum*, *S. aureus* № 9 и 3316 и снизилась в отношении *Mycobacterim* B₅, у *L. brevis* Б-3 – повысилась активность к *S. gallinarum*, *S. aureus* № 3316, *C. albicans*, снизилась к *Mycobacterim* B₅ и *S. aureus* № 9. У остальных культур молочнокислых бактерий заметных изменений в антибиотической активности не произошло (табл.2).

Таблица 2 - Антагонистическая активность штаммов молочнокислых бактерий, отобранных после первой экспозиции в кислой питательной среде

Штаммы микроорганизмов, продолжительность экспозиции, мин	Диаметр зон подавления роста тест-культур, мм							pH
	<i>E. coli</i>	<i>S. gallinarum</i>	<i>S. aureus</i> № 9	<i>S. aureus</i> № 3316	<i>K. pneumonia</i> 444	<i>C. albicans</i>	<i>Mycobacterim</i> B ₅	
2в исходный	15,0	12,0	12,0	12,0	13,0	0	16,0	3,8
2в ¹ – 40 мин	17,0	15,0	14,0	12,0	14,0	0	17,0	3,8
2 в ² в-60мин	18,0	14,0	12,0	12,0	13,0	0	17,0	3,8
8g исходный	9,0	9,0	0,0	12,0	13,0	0	9,0	4,4
8 g ¹ – 40 мин	11,0	10,0	11,0	14,0	11,0	0	11,0	4,4
8g ² – 60 мин	10,0	10,0	13,0	16,0	14,0	0	10,0	4,4
14д– исходный	14,0	15,0	11,0	11,0	12,0	0	17,0	3,8
14 д ¹ – 40мин	15,0	15,0	13,0	10,0	15,0	0	15,0	3,8
14д ² – 60мин	17,0	16,0	13,0	13,0	14,0	0	14,0	3,8
Б-3 исходный	11,0	17,0	16,0	17,0	21,0	20,0	29,0	4,1
Б-3 ¹ - 40мин	11,0	22,0	14,0	22,0	20,0	18,0	14,0	4,1
Б-3 ² - 60мин	11,0	22,0	14,0	22,0	21,0	22,0	22,0	4,1
127 исходный	10,0	10,0	15,0	13,0	10,0	10,0	0	3,7
1271-40 мин	10,0	10,0	13,0	12,0	10,0	10,0	0	3,7
1272-60 мин	10,0	10,0	12,0	09,0	10,0	10,0	0	3,7
22 исходный	10,0	10,0	13,0	13,0	10,0	10,0	0	3,8
221-40 мин	10,0	10,0	12,0	12,0	10,0	10,0	0	3,7
222-60 мин	10,0	10,0	10,0	12,0	10,0	10,0	0	3,7

Отобранные наиболее активные варианты по антагонистической активности были повторно проверены на устойчивость к низким значениям pH по сравнению с исходными культурами. Результаты по выживаемости культур представлены в таблице 3.

Таблица 3 - Титры молочнокислых бактерий после второй экспозиции при pH 3,0

Штаммы	Содержание жизнеспособных клеток, КОЕ/мл		
	исходное	40мин. при pH 3	60 мин. при pH3
<i>L.plantarum 28</i> ²	3,5x10 ⁹	1,0x10 ⁹	1,5x10 ⁹
<i>L.plantarum 140</i> ²	6,0x10 ⁹	1,3x10 ⁹	1,7x10 ⁹
<i>L.plantarum 22</i> ²	6,0x10 ⁹	5,0x10 ⁹	4,0x10 ⁹
<i>L. cellobiosis 20</i> ²	2,0x10 ⁸	1,5x10 ⁸	1,0x10 ⁸
<i>L.fermentum 27</i> ²	8,0x10 ⁹	4,2x10 ⁹	2,0x10 ⁸
<i>L.fermentum 127</i> ²	4,8x10 ⁹	2,5x10 ⁹	2,8x10 ⁹
<i>L.salivarius 80</i> ²	10x10 ⁹	9,0x10 ⁹	4x10 ⁹
<i>L.brevis Б-3</i> ²	3,0x10 ⁹	2,3x10 ⁹	2,5x10 ⁹
<i>P.shermanii</i> ²	3,0x10 ⁸	3,2x10 ⁸	1,5x10 ⁸

Установлено, что отобранные варианты значительно превосходят исходные культуры по устойчивости к низким значениям pH. При этом после экспозиции в течение 60 мин при pH3 количество в них жизнеспособных клеток существенно не снижается. Отобраны варианты культур микроорганизмов с повышенной, по сравнению с исходными культурами, антагонистической активностью в отношении испытанных тест-культур (таблица 4).

Таблица 4 - Антагонистическая активность штаммов молочнокислых бактерий, отобранных после второго пассажа в кислой среде

Варианты	Диаметр зон подавления роста тест-культур, мм							
	<i>E. coli</i>	<i>S. gallinarum</i>	<i>S. aureus № 9</i>	<i>S. aureus № 3316</i>	<i>P multocida</i>	<i>K. pneumoniae 444</i>	<i>C. albicans</i>	<i>Mycobacterim B₅</i>
2в исходный	18,0	22,0	23,0	23,0	20,0	12,0	0	30,0
2в ² – б/5	25,0	24,0	27,0	27,0	23,0	20,0	0	30,0
14д исходный	22,0	20,0	21,0	23,0	22,0	20,0	29,0	26,0
14 2- а/8	28,0	22,0	21,0	30,0	22,0	18,0	20,0	38,0
22исходный	10,0	10,0	13,0	13,0	10,0	10,0	0	0
222- б/7	10,0	10,0	15,0	14,0	10,0	10,0	0	0
8д исходный	13,0	13,0	14,0	18,0	10,0	15,0	0	19,5
8д2 -б/5	18,0	18,0	28,0	25,0	18,5	21,0	0	30,0
Б-3исходный	12,0	18,0	13,0	19,0	23,0	26,0	30,0	30,0
Б-32- б/9	19,0	20,0	15,0	19,0	25,0	24,0	30,0	30,0
127 исходный	10,0	11,0	13,0	0	11,0	13,0	0	10,0
1272- б/6	9,0	10,0	12,0	9,0	12,0	14,0	0	10,0

Отобран вариант пропионовокислых бактерий ПКБ 2/10, превышающий исходную культуру по каталазной активности, которая, как известно, коррелирует с биосинтезом витамина B₁₂.

Установлено, что ассоциации из исходных культур более чувствительны к низким

значениям рН по сравнению с ассоциациями из адаптированных культур. При этом снижение титра клеток у них происходит на 1 порядок. В ассоциациях из адаптированных культур титр бактерий и антагонистическая активность под воздействием низких значений рН практически не снижались (табл. 5).

Таблица 5 - Содержание бактериальных клеток и антагонистическая активность ассоциаций, приготовленных из исходных и адаптированных культур к низким значениям рН

Наименование ассоциации и время экспозиции	рН	Диаметр зоны подавления ростатест-культур, мм							Титр, КОЕ/мл
		1	2	3	4	5	6	7	
Ассоциация П из исходных культур	3,8	12,0	11,0	10,0	9,0	11,0	10,0	0	5x10 ¹¹
40 мин	3,9	10,0	9,0	10,0	9,0	10,0	11,0	0	5x10 ¹⁰
60 мин	3,9	10,0	11,0	10,0	10,0	10,0	11,0	0	4x10 ¹⁰
То же, из адаптированных культур	3,8	10,0	9,0	9,0	10,0	10,0	10,0	0	8x10 ¹¹
40 минут	3,8	10,0	9,0	9,0	10,0	10,0	10,0	0	4x10 ¹¹
60 мин	3,8	10,0	9,0	9,0	10,0	10,0	10,0	0	2x10 ¹¹
Ассоциация: БЗ+ПКБ+2в исходные культуры	3,8	10,0	9,0	12,0	12,0	11,0	10,0	0	2x10 ¹¹
40 мин	3,9	10,0	9,0	9,0	10,0	10,0	10,0	0	3x10 ¹⁰
60 мин	3,8	10,0	9,0	10,0	11,0	10,0	10,0	0	1x10 ¹⁰
Ассоциация: БЗ+ПКБ+2в, адаптированные культуры	3,9	15,0	16,0	10,5	12,0	12,0	11,5	13,5	5x10 ¹¹
40 мин	3,9	13,5	13,5	10,0	10,0	11,0	11,0	12,0	6x10 ¹¹
60 мин	3,9	13,0	13,0	10,0	10,0	11,0	11,0	12,0	2x10 ¹¹
Ассоциация: ПКБ+14д+2в исходные культуры	3,9	10,0	10,0	12,0	11,0	16,0	15,0	0	9x10 ¹¹
40 мин	3,9	0	9,0	10,0	10,0	9,0	10,0	0	5x10 ¹⁰
60 мин	4,0	10,0	9,0	9,0	9,0	9,0	10,0	0	2x10 ¹⁰
Ассоциация: ПКБ+14д+2в, адаптированные культуры	3,8	13,0	12,5	9,5	10,0	11,5	13,0	13,0	8x10 ¹¹
40 мин	3,8	14,5	12,0	9,5	11,0	12,0	13,0	13,0	5x10 ¹¹
60 минут	3,9	10,0	11,0	9,0	10,0	10,0	11,0	9,0	1x10 ¹¹
Ассоциация: БЗ+ПКБ+»в+14д исходные культуры	3,9	10,0	9,0	11,0	11,0	9,0	10,0	0	8x10 ¹⁰
40 мин	3,9	10,0	9,0	11,0	11,0	11,0	10,0	0	4x10 ⁹
60 мин	3,9	10,0	9,0	11,0	12,0	10,0	12,0	0	1x10 ⁹
Ассоциация: БЗ+ПКБ+2в+14д, адаптированные культуры	3,9	15,5	15,0	10,0	11,0	10,0	15,0	13,0	8x10 ¹⁰
40 мин	4,0	16,0	16,5	9,5	11,0	10,5	12,0	13,0	7x10 ¹⁰
60 мин	3,9	14,0	13,0	9,5	10,0	12,0	12,0	12,0	2x10 ¹⁰
<i>Примечания</i>									
1 - MRSA №9									
2 - MRSA № 3316									
3 - <i>E. coli</i>									
4- <i>Salmonellasp.</i>									
5 - <i>K. pneumoniae</i> 444									
6 - <i>Mycobacterim</i> B ₅									
7 - <i>C. albicans</i>									

Пересев ассоциаций после их экспозиции при низком значении рН в свежую питательную среду приводил к полному восстановлению титра бактерий.

Таким образом, проведена адаптация молочнокислых и пропионовокислых бактерий, входящих в состав разработанных комплексных пробиотиков, к низким

значениям рН. Отобраны варианты, превосходящие исходные культуры по антагонистической активности и устойчивости к низким значениям рН.

Установлено, что ассоциации из исходных культур более чувствительны к низким значениям рН по сравнению с адаптированными культурами. При этом снижение титра клеток у них происходит на 1 порядок. В ассоциациях из адаптированных культур титр бактерий и антагонистическая активность под воздействием низких значений рН практически не снижались.

Литература:

1 Ху Юю-gang, et.al. Изучение характеристик жизнеспособности рекомбинантного *Lactobacillus casei* 393 в искусственных желудочно-кишечных средах // *J. Microcol.*- 2006.- № 6.- С.423-426.

2 Голод Н.А., Лойко Н.Г., Мулюкин А.Л. и др. Адаптация молочнокислых бактерий к неблагоприятным для роста условиям // *Прикладная биохимия и микробиология.* - 2009.-Т.42, № 2. - С.317-335.

3 Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках. - М.: Наука, 1986. – 273с.

4 Гизатулина С.С. Изучение адгезивной способности грамотрицательных бактерий, выделенных от больных диареей // *Сб. науч. Трудов «Кишечные инфекции у детей».* – М., 1986. – С.106-110.

Түйін

рН-ТЫҢ ТӨМЕНГІ МӘНДЕРІНЕ СҮТ ЖӘНЕ ПРОПИОН ҚЫШҚЫЛЫ БАКТЕРИЯЛАРЫ МЕН ОЛАРДЫҢ АССОЦИАЦИЯЛАРЫНЫҢ ТҰРАҚТЫЛЫҒЫН АРТТЫРУ

ГАВРИЛОВА Н.Н, РАТНИКОВА¹И.А, БАЯҚЫШОВА¹ Қ, ТҰРЛЫБАЕВА¹ З.Ж,
ЫБЫШЕВА¹ С.Д., ЧУГАЙ² О.Г.

Қазақстан. Алматы қ. ¹ҚР БҒМ ҒК«Микробиологияжәне вирусология институты» РМК
²Республикалық клиникалық ОСА мүгедектерінің госпиталі

Сүт, пропион қышқылы бактериялары мен олардың ассоциацияларының рН-тың төменгі мәндеріне бейімделуі зерттелінді. Антагонистік белсенділігі мен рН-тың төменгі мәндеріне тұрақтылығы жағынан, бастапқы культуралардан жоғары болып келетін нұсқалар іріктелініп алынды.

Бастапқы культуралардың ассоциациялары бейімделінген культуралармен салыстырғанда рН-тың төменгі мәндеріне сезімталдау келетіні анықталды. Мұнда клеткалар титрінің төмендеуі бір қатарға кемиді. Бейімделінген культуралар ассоциацияларындағы бактериялардың титрі мен антагонистік белсенділігі рН-тың төменгі мәндерінің әсерінен іс жүзінде өзгермеді.

INCREASE IN RESISTANCE OF LACTIC AND PROPIONIC ACID BACTERIA AND THEIR ASSOCIATIONS TO LOW pH VALUES

N.N. GAVRILOVA¹, I.A. RATNIKOVA¹, K.BAYAKYSHEVA¹, Z. Zh. TURLYBAEVA¹,
S.D.YBYSHEVA¹, O.G.CHUGAY²

¹RSOE “Institute of Microbiology and Virology”, Committee of Science, Ministry of Education
and Science, Almaty, Republic of Kazakhstan

²Republican Clinical Hospital for the Great Patriotic War disabled veterans

Summary

Adaptation of lactic and propionic acid bacteria and their associations to low pH values was studied. The variants exceeding the stock cultures by antagonistic activity and resistance to low pH were selected.

It was found that associations of the stock cultures are more sensitive to low pH values as compared with the adapted cultures. In this case, a cell titer decreases by one order of magnitude. In associations of adapted cultures a bacterial titer and antagonistic activity under the low pH effect were not virtually lowered.

Key words: increase in resistance of lactic and propionic acid bacteria and their associations to low pH values

The vast number of commercially available probiotics for veterinary science and medicine suggests that the problem of their development is given adequate attention. However, the recommended probiotics often do not give the desired result. Further improvement of such preparations, taking into account the evolution of knowledge in the field of microbiology and biotechnology, is one of the most promising ways to develop an up-to-date highly effective anti-dysbiosis therapy.

The efficiency of probiotics depends on many factors: their composition, spectrum of biological activity, concentration of cells of probiotic microflora, etc. The strains of microorganisms belonging to the probiotics should also possess adhesive and growth properties that allow them to quickly colonize the mucosal surface of the gastrointestinal tract. Resistance of bacterial cells to reactogenic environment of the stomach and upper part of intestine is also essential for the survival of probiotic microorganisms [1, 2].

Material and methods

The objects of the study were the lactic acid bacteria *Lactobacillus plantarum* 2v, 22, 14d, *Lactobacillus fermentum* 127, *Lactobacillus fermentum* 27, *Lactobacillus brevis* B-3, *Lactobacillus cellobiosus* 20, *Lactobacillus salivarius* 8d; propionic acid bacteria *Propionibacterium shermanii*; 2 associations of lactic and propionic acid bacteria, which differ by the composition of lactic acid bacteria.

Culturing of lactic and propionic acid bacteria as well as associations in the adaptation to low pH value was carried out in the liquid MRS medium [3] for 18 hours at 37⁰C; further, 1 ml was taken and added to 10 ml of sterile saline, pH 3.0, and incubated at 37⁰C for 40 and 60 minutes; the samples were taken, neutralized, and number of viable bacteria evaluated. The stock culture was used as the control. After counting and describing the morphology of colonies grown on a solid nutrient medium, their inoculation into the liquid MRS medium was carried out. The grown liquid cultures were examined with a microscope, and their pH and antagonistic activity determined. In all at least 80 isolates from each culture of lactic and propionic acid bacteria undergone the low pH effect, were investigated. Most active isolates were again kept in sterile saline, pH 3.0. Experiment was conducted pending the production of variants that are resistant to low pH values without loss of productive-valuable characteristics.

Associations A (cultures of lactic acid bacteria *L. plantarum* 2v and 14d, *L. brevis* B-3 and propionic acid bacteria *P. shermanii*) and P (*L. plantarum* 22 and *L. fermentum* 27), composed of the stock and adapted to low pH cultures of microorganisms were cultivated in the liquid MRS medium with cobalt for 18 hours, further 1 ml was taken and added to 10 ml of sterile saline, pH 3.0, and incubated at 37⁰C for 40 and 60 minutes; the samples were taken, neutralized, and the number of viable bacteria evaluated. In addition, after exposure with a low pH value, the associations were inoculated into the culture medium MRS with cobalt. After 18 hours of culturing in the associations, the pH value, titer, and antagonistic activity were evaluated. As a

control, the associations of stock and adapted cultures prior to their exposure at a low pH were used.

The number of bacterial cells was determined by inoculating appropriate dilutions of cultures into Petri dishes on the solid MRS medium, antagonistic activity – by agar diffusion method against the test cultures: *Escherichia coli*, *Salmonella gallinarum*, *Staphylococcus aureus* № 9, *Staphylococcus aureus* № 3316, *Klebsiella pneumoniae* 444, *Candida albicans*, *Mycobacterium B₅* [3].

The adhesive activity was determined in human erythrocytes [6]; resistance to antibiotics biseptol, chloramphenicol, gentamicin, lincomycin, ciprofloxacin at concentrations of 100 and 50 µg/ml - by manufactured disk method [4].

The tables represent average results of at least three replicates.

Results and discussion

The study results show that the used cultures of lactic and propionic acid bacteria are rather resistant to low pH values. At that, significant changes in morphology of the colonies and bacterial cells were not observed except for a decrease in size of the colonies in strains *L. cellobiosus* 20, *L. fermentum* 127 and 27. Reduction of titers in the test cultures was by 1-2 orders of magnitude, which is, according to the literature data [1], a good indicator.

The strains *L. plantarum* 22, *L. cellobiosus* 20, *L. fermentum* 127 were more sensitive to low pH, in which after a 40-minute exposure at pH 3 the bacterial titer decreased by 2 orders of magnitude. In strains *L. plantarum* 14d, *L. plantarum* 2v, *L. fermentum* 27, *L. salivarius* 8d after a 40-minute exposure the bacterial titer decreased by 1 order, and after 60 minutes – by 2 orders of magnitude. Strains of *L. brevis* B-3 and *P. shermanii* were more resistant to low pH. Reducing the number of bacterial cells was by 1 order of magnitude, regardless of the exposure duration.

Table 1 - Survival of lactic and propionic acid bacteria at low pH values

Strains	Maintenance of viable cells, CFU/ml		
	Initial	40minat pH 3	60 minat pH3
<i>L. plantarum</i> 22	3,2x10 ⁹	3,2x10 ⁷	2,5x10 ⁷
<i>L. plantarum</i> 14д	2,7x10 ⁹	2,2x10 ⁸	2,2x10 ⁷
<i>L. plantarum</i> 2e	6,0x10 ⁹	3,0x10 ⁸	2,7x10 ⁷
<i>L. cellobiosis</i> 20	1,3x10 ⁸	5,2x10 ⁶	2,0x10 ⁶
<i>L. fermentum</i> 27	8,0 x10 ⁹	10,0x10 ⁸	1,3x10 ⁷
<i>L. fermentum</i> 127	8,8 x10 ⁹	7,9x10 ⁷	7,5x10 ⁷
<i>L. salivarius</i> 8д	12,0 x10 ⁹	8,5x10 ⁸	2,0x10 ⁷
<i>L. brevis</i> B-3	1,2 x10 ⁸	2,0x10 ⁷	4,0x10 ⁷
<i>P. shermanii</i>	3,0x10 ⁸	1,2x10 ⁷	1,5x10 ⁷

The isolates from each culture of lactic and propionic acid bacteria exposed to the low pH effect were prepared and studied. It was established that most of them have a high acid-forming capacity and antagonistic activity against test cultures: MRSA № 9; MRSA № 3316, *E. coli*, *S. gallinarum*, *K. pneumonia* 444, *Mycobacterium B₅*, *C. albicans*.

Table 2 covers the most active variants isolated from cultures exposed to the single low pH effect. In the adapted to pH 3 culture *L. plantarum* 2v the antagonistic activity against *E. coli*, *S. gallinarum*, *Mycobacterium B₅* increased as compared with the stock one. In *L. salivarius* 8d, the activity to *S. aureus* № 9 appeared and against *S. aureus* № 3316 increased; in *L. plantarum* 14d the activity against *E. coli*, *S. gallinarum*, *S. aureus* № 9 and 3316 increased and against *Mycobacterium B₅* decreased, in *L. brevis* B-3 the activity against *S. gallinarum*, *S. aureus* № 3316, *C. albicans* increased, and against *Mycobacterium B₅* and *S. aureus* № 9 decreased. In the remaining lactic acid bacterial cultures noticeable changes in antibiotic activity were not observed (Table 2).

Table 2 - Antagonist activity of lactic acid bacterial strains selected after the first exposure in the acid nutrient medium

Strains microorganisms, duration expositions, min	Zones of test-cultures growth inhibition, mm							pH
	<i>E. coli</i>	<i>S. gallinarum</i>	<i>S. aureus</i> № 9	<i>S. aureus</i> № 3316	<i>K. pneumoniae</i> 444	<i>C. albicans</i>	<i>Mycobacterium B₅</i>	
2B Initial	15,0	12,0	12,0	12,0	13,0	0	16,0	3,8
2B ¹ – 40 min	17,0	15,0	14,0	12,0	14,0	0	17,0	3,8
2 B ² B-60 min	18,0	14,0	12,0	12,0	13,0	0	17,0	3,8
8g Initial	9,0	9,0	0,0	12,0	13,0	0	9,0	4,4
8 g ¹ – 40 min	11,0	10,0	11,0	14,0	11,0	0	11,0	4,4
8g ² – 60 min	10,0	10,0	13,0	16,0	14,0	0	10,0	4,4
14d– Initial	14,0	15,0	11,0	11,0	12,0	0	17,0	3,8
14 d ¹ – 40 min	15,0	15,0	13,0	10,0	15,0	0	15,0	3,8
14d ² – 60 min	17,0	16,0	13,0	13,0	14,0	0	14,0	3,8
B-3 Initial	11,0	17,0	16,0	17,0	21,0	20,0	29,0	4,1
B-31 - 40 min	11,0	22,0	14,0	22,0	20,0	18,0	14,0	4,1
B-32 - 60 min	11,0	22,0	14,0	22,0	21,0	22,0	22,0	4,1
127 Initial	10,0	10,0	15,0	13,0	10,0	10,0	0	3,7
1271-40 min	10,0	10,0	13,0	12,0	10,0	10,0	0	3,7
1272-60 min	10,0	10,0	12,0	09,0	10,0	10,0	0	3,7
22 Initial	10,0	10,0	13,0	13,0	10,0	10,0	0	3,8
221-40 min	10,0	10,0	12,0	12,0	10,0	10,0	0	3,7
222-60 min	10,0	10,0	10,0	12,0	10,0	10,0	0	3,7

The selected most active variants by the antagonist activity were retested for resistance to low pH values as compared with the stock cultures. The results on the survival of cultures are shown in Table 3.

Table 3 - Titters of lactic acid bacteria after the second exposure at pH 3.0

Strains	Maintenance of viable cells, CFU/ml		
	Initial	40 min at pH 3	60 min at pH3
<i>L. plantarum</i> 2e2	3,5x10 ⁹	1,0x10 ⁹	1,5x10 ⁹
<i>L. plantarum</i> 14d2	6,0x10 ⁹	1,3x10 ⁹	1,7x10 ⁹
<i>L. plantarum</i> 222	6,0x10 ⁹	5,0x10 ⁹	4,0x10 ⁹
<i>L. cellobiosis</i> 202	2,0x10 ⁸	1,5x10 ⁸	1,0x10 ⁸
<i>L. fermentum</i> 272	8,0x10 ⁹	4,2x10 ⁹	2,0x10 ⁸
<i>L. fermentum</i> 1272	4,8x10 ⁹	2,5x10 ⁹	2,8x10 ⁹
<i>L. salivarius</i> 8d2	10x10 ⁹	9,0x10 ⁹	4x10 ⁹
<i>L. brevis</i> B-32	3,0x10 ⁹	2,3x10 ⁹	2,5x10 ⁹
<i>P. shermanii</i> 2	3,0x10 ⁸	3,2x10 ⁸	1,5x10 ⁸

It was found that selected variants significantly exceed the stock cultures in resistance to low pH values. In this case, after 60-minute exposure at pH 3 the number of viable cells in them

is not significantly reduced. Variants of microorganism cultures were selected with increased as compared with the stock cultures antagonistic activity against the used test cultures (Table 4).

Table 4 - Antagonistic activity of lactic acid bacterial strains selected after the second passage in acidic medium

Variant	Zones of test-cultures growth inhibition, mm							
	<i>E. coli</i>	<i>S. gallinarum</i>	<i>S. aureus</i> № 9	<i>S. aureus</i> № 3316	<i>P. multocida</i>	<i>K. pneumoniae</i> 444	<i>C. albicans</i>	<i>Mycobacterium B₅</i>
2B Initial	18,0	22,0	23,0	23,0	20,0	12,0	0	30,0
2B ² - b/5	25,0	24,0	27,0	27,0	23,0	20,0	0	30,0
14Д Initial	22,0	20,0	21,0	23,0	22,0	20,0	29,0	26,0
14 ² - a/8	28,0	22,0	21,0	30,0	22,0	18,0	20,0	38,0
22Initial	10,0	10,0	13,0	13,0	10,0	10,0	0	0
222- b/7	10,0	10,0	15,0	14,0	10,0	10,0	0	0
8Д Initial	13,0	13,0	14,0	18,0	10,0	15,0	0	19,5
8Д2 -b/5	18,0	18,0	28,0	25,0	18,5	21,0	0	30,0
B-3Initial	12,0	18,0	13,0	19,0	23,0	26,0	30,0	30,0
B-32- b/9	19,0	20,0	15,0	19,0	25,0	24,0	30,0	30,0
127 Initial	10,0	11,0	13,0	0	11,0	13,0	0	10,0
127 2- b/6	9,0	10,0	12,0	9,0	12,0	14,0	0	10,0

The variant of propionic acid bacteria PAB 2/10 was selected exceeding the stock culture in the catalase activity, which is known to correlate with the biosynthesis of vitamin B₁₂.

It was found that the associations of the stock cultures are more sensitive to low pH values as compared with the associations of adapted cultures. The decrease in cell titer is by 1 order of magnitude. In associations of adapted cultures the bacterial titer and antagonistic activity under the low pH effect virtually did not reduce (Table 5).

Table 5 - Contents of bacterial cells and antagonistic activity of associations prepared from the stock and adapted to low pH values cultures

Name associations and exposition time	pH	Zones of test-cultures growth inhibition, mm								Maintenance of viable cells,
		1	2	3	4	5	6	7		
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Association P from initial cultures	3,8	12,0	11,0	10,0	9,0	11,0	10,0	0	5x10 ¹¹	
40 min	3,9	10,0	9,0	10,0	9,0	10,0	11,0	0	5x10 ¹⁰	
60 min	3,9	10,0	11,0	10,0	10,0	10,0	11,0	0	4x10 ¹⁰	
The same, from the adapted cultures	3,8	10,0	9,0	9,0	10,0	10,0	10,0	0	8x10 ¹¹	
40 min	3,8	10,0	9,0	9,0	10,0	10,0	10,0	0	4x10 ¹¹	
60 min	3,8	10,0	9,0	9,0	10,0	10,0	10,0	0	2x10 ¹¹	
Association: B3+PAB+2B initial cultures	3,8	10,0	9,0	12,0	12,0	11,0	10,0	0	2x10 ¹¹	
40 min	3,9	10,0	9,0	9,0	10,0	10,0	10,0	0	3x10 ¹⁰	
60 min	3,8	10,0	9,0	10,0	11,0	10,0	10,0	0	1x10 ¹⁰	
Association: B3+PAB +2B, adapted cultures	3,9	15,0	16,0	10,5	12,0	12,0	11,5	13,5	5x10 ¹¹	
40 min	3,9	13,5	13,5	10,0	10,0	11,0	11,0	12,0	6x10 ¹¹	

60 min	3,9	13,0	13,0	10,0	10,0	11,0	11,0	12,0	2x10 ¹¹
Association: PAB+14d+2B initial cultures	3,9	10,0	10,0	12,0	11,0	16,0	15,0	0	9x10 ¹¹
40 min	3,9	0	9,0	10,0	10,0	9,0	10,0	0	5x10 ¹⁰
60 min	4,0	10,0	9,0	9,0	9,0	9,0	10,0	0	2x10 ¹⁰
Association: PAB+14d+2B, adapted cultures	3,8	13,0	12,5	9,5	10,0	11,5	13,0	13,0	8x10 ¹¹
40 min	3,8	14,5	12,0	9,5	11,0	12,0	13,0	13,0	5x10 ¹¹
60 min	3,9	10,0	11,0	9,0	10,0	10,0	11,0	9,0	1x10 ¹¹
Association: B3+PAB+2B+14d initial cultures	3,9	10,0	9,0	11,0	11,0	9,0	10,0	0	8x10 ¹⁰
40 min	3,9	10,0	9,0	11,0	11,0	11,0	10,0	0	4x10 ⁹
60 min	3,9	10,0	9,0	11,0	12,0	10,0	12,0	0	1x10 ⁹
Association: B3+PAB+2B+14d, adapted cultures	3,9	15,5	15,0	10,0	11,0	10,0	15,0	13,0	8x10 ¹⁰
40 min	4,0	16,0	16,5	9,5	11,0	10,5	12,0	13,0	7x10 ¹⁰
60 min	3,9	14,0	13,0	9,5	10,0	12,0	12,0	12,0	2x10 ¹⁰
<i>Notes</i>									
1 - MRSA №9									
2- MRSA № 3316									
3- <i>E. coli</i>									
4- <i>Salmonellasp.</i>									
5- <i>K. pneumoniae</i> 444									
6- <i>Mycobacterim</i> B ₅									
7 - <i>C. albicans</i>									

Continued table 5

Subculturing associations after exposure at a low pH into a fresh nutrient medium resulted in complete recovery of bacterial titer.

Thus, the adaptation of lactic and propionic acid bacteria that are part of our developed complex probiotics to low pH values was performed. The variants exceeding the stock cultures in antagonistic activity and resistance to low pH values were selected.

It was found that the associations from the stock cultures are more sensitive to low pH values as against the adapted cultures. The decrease in cell titer is by 1 order of magnitude. In associations from adapted cultures the bacterial titer and antagonistic activity under the low pH effect were virtually not reduced.

References:

- 1 Hu Uyu-gang, et.al. Studying the viability characteristics of recombinant *Lactobacillus casei* 393 in artificial gastrointestinal environments // *J. Microecol.* - 2006. - №6. - P.423-426.
- 2 Golod N.A., Loyko N.G., Mulyukin A.L., et al. Adaptation of lactic acid bacteria to adverse growth conditions // *Applied Biochemistry and Microbiology.* - 2009. - Vol.42, №2. - P.317-335.
- 3 Egorov N.S. *Fundamental study of antibiotics.* - Moscow: Nauka, 1986. - 273 p.
- 4 Gizatulina S.S. Studying the adhesive ability of gram-negative bacteria isolated from diarrhea patients // *Collected research papers "Intestinal infections in children".* - M., 1986. - P.106-110.