

Влияние условий криоконсервирования на сохранность пробиотика *Lactobacillus plantarum*

UDC 57.043:579.61

O.V. ZHELOBETSKAYA, O.M. BABINETS, I.P. VYSEKANTSEV*, V.V. RYAZANTSEV

Effect of Cryopreservation Conditions of Viability of *Lactobacillus plantarum* Probiotic

Показана возможность криоконсервирования промышленного штамма молочнокислых бактерий *Lactobacillus plantarum* в сахарозо-желатиновой среде. Установлено, что при замораживании бактериального концентрата (5×10^{11} КОЕ/мл) жизнеспособность бактерий не отличается от контроля и на нее не влияют состав среды и режим охлаждения.

Ключевые слова: криоконсервирование, молочнокислые бактерии, бактериальный концентрат.

Доведена можливість криоконсервування промислового штаму молочнокислих бактерій *Lactobacillus plantarum* в сахарозо-желатиновому середовищі. Встановлено, що при заморожуванні бактеріального концентрату (5×10^{11} КУО/мл) життєздатність бактерій не відрізняється від контролю і на неї не впливають склад середовища та режим охолодження.

Ключові слова: криоконсервування, молочнокислі бактерії, бактеріальний концентрат.

There was shown the possibility of cryopreserving an industrial strain of lactic-acid bacteria *Lactobacillus plantarum* in sucrose-gelatine medium. It has been established that when freezing bacterial concentrate (5×10^{11} CFU/ml) the bacteria viability did not differ from the control and it was not affected by the media compositions and cooling protocols.

Key-words: cryopreservation, lactic-acid bacteria, bacterial concentrate.

Иммунная система слизистых оболочек кишечника представляет сложный защитный барьер, состоящий из иммунокомпетентных клеток, которые взаимодействуют с эпителиоцитами, нервными, мышечными и стромальными клетками. Для нормального функционирования иммунной системы слизистых оболочек необходимо наличие эубиотиков – микроорганизмов, которые находятся в комменциальных отношениях с организмом человека [7, 10].

Возрастные нарушения иммунитета, влияние негативных факторов (антибиотики, токсины, профессиональные факторы, неблагоприятные условия окружающей среды) – причины дисбактериоза. Для коррекции микрофлоры кишечника используют препараты из микроорганизмов эубиотиков (пробиотики). Механизм их действия обусловлен модуляцией иммунных реакций на патогены, стимуляцией реакций специфических Ig A – антител, индукцией пролиферации лимфоцитов, колонизацией эпителиоцитов, поддержанием параметров pH среды и др. [7, 9, 12].

Обязательными этапами производства пробиотиков являются хранение коллекционных штаммов-продуцентов готовых препаратов, консервирование стартовых культур. Наиболее распростра-

ненные методы хранения пробиотиков – лиофилизация и тепловая сушка [4, 11]. С точки зрения долгосрочного хранения коллекционных штаммов и стартовых культур наиболее эффективно криоконсервирование, однако по некоторым причинам эта технология при производстве пробиотиков практически не используется. После введения законодательства, предусматривающего обязательное депонирование культур промышленных штаммов микроорганизмов [4], этот метод целесообразно использовать при производстве пробиотиков.

Существующий опыт криоконсервирования микроорганизмов различных видов свидетельствует о том, что на сохранность микроорганизмов в процессе криоконсервирования влияют условия культивирования и возраст периодической культуры, режим охлаждения, состав консервирующей среды, родовые или видовые морфофункциональные особенности клеток и др. [1, 4, 11]. Большинство этих факторов характерно для разных видов микробов.

Цель работы – исследование влияния режимов охлаждения и исходной концентрации клеток в замораживаемых образцах на сохранность промышленного штамма бактерий *Lactobacillus plantarum*.

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию: ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 373-31-26, факс: +38 (057) 373-30-84, электронная почта: cryo@online.kharkov.ua

* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 3126, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Материалы и методы

Объектом исследования являлся промышленный штамм молочнокислых бактерий *Lactobacillus plantarum* 377D, который культивировали в жидкой и на агаризированной среде МРС [8]. Жизнеспособность бактерий определяли “чашечным” методом Коха [5], чувствительность к антибиотикам – диско-диффузионным методом Кирби-Бауэра [6]. Способность к сбраживанию молока определяли по образованию сгустка [2]. В качестве среды консервирования использовали сахарозо-желатиновую среду (СЖС) [1]. Для определения выхода из клеток УФ-поглощающих веществ бактерии осаждали центрифугированием при 6000 об/мин в течение 30 мин. Затем сравнивали оптическую плотность надосадка с оптической плотностью надосадка контрольных проб на спектрофотометре “Pye Unicam SP 8000” при длине волны 260 нм. Образцы замораживали в криопробирках фирмы “Nunc” с рабочим объемом 1,8 мл по программам с различными скоростями: 1 – охлаждение со скоростью 40°С/мин до –100°С и дальнейшее погружение в жидкий азот; 2 – охлаждение со скоростью 1°С/мин до –40°С и дальнейшее погружение в жидкий азот; 3 – охлаждение со скоростью 5°С/мин до –40°С и дальнейшее погружение в жидкий азот.

Образцы отогревали на водяной бане при температуре 37°С. Статистическую обработку результатов проводили по общепринятым в биологии методам [9].

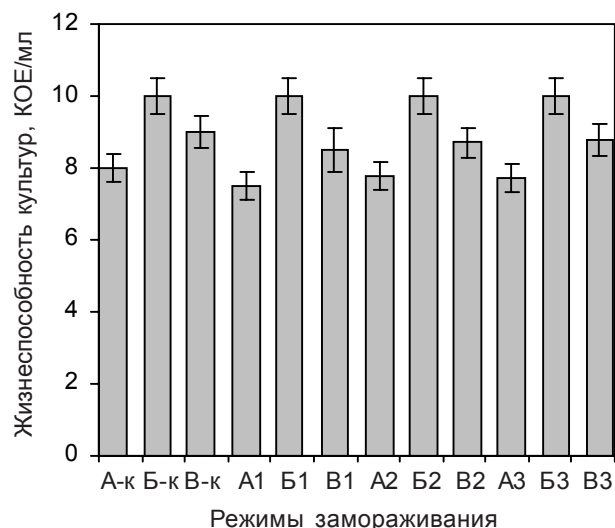
Результаты и обсуждение

При изучении влияния скоростей охлаждения на жизнеспособность бактерий биомассу бактерий осаждали центрифугированием, ресуспендировали в среде СЖС и вносили в криопробирки. Исходная концентрация бактерий в контрольных образцах составляла 10^8 КОЕ/мл.

Установлено, что наиболее высокую жизнеспособность обеспечивает замораживание по программам 2 и 3 (рисунок).

При последующем посеве криоконсервированных бактерий в жидкую среду МРС в соотношении 1 мл бактерий на 50 мл среды их концентрация через 48 ч во всех образцах увеличивалась в 100 раз. Достоверных различий между скоростью прироста культур в образцах не выявлено. Скорость прироста культур из криоконсервированных образцов через 24 ч культивирования была меньше, чем в контроле.

Способность бактерий к сбраживанию молока после криоконсервирования сохранялась. При посеве контрольных и криоконсервированных культур на 2-е сутки сгусток отсутствовал и формировался на 4-е сутки.



Жизнеспособность бактерий *Lactobacillus plantarum* после замораживания по различным режимам и прирост культур после последующего культивирования в течение 48 ч (к – контроль; 1, 2, 3 – режимы замораживания; А – исходная жизнеспособность культур; Б – прирост культур через 48 ч, В – прирост через 24 ч).

Установлено, что замораживание также не влияло на чувствительность криоконсервированных бактерий к антибиотикам (таблица).

В последующих экспериментах исследовали влияние исходной концентрации бактерий в образцах на жизнеспособность после замораживания. Выявлено, что с повышением концентрации бактерий, суспендированных в СЖС, до 5×10^{11} КОЕ/мл и выше их жизнеспособность после замораживания достоверно не отличалась от исходной независимо от режима охлаждения. Увеличение концентрации бактерий до 5×10^{11} КОЕ/мл и выше при использовании в качестве суспензионных сред дистиллированной воды и физиологического раствора также обеспечивало сохранность криоконсервированных бактерий на исходном уровне. Выход УФ-поглощающих веществ из бактерий на единицу объема увеличивался с повышением исходной концентрации бактерий.

Полученные результаты подтверждают возможность эффективного криоконсервирования промышленного штамма *Lactobacillus plantarum* 377D, используемого в качестве пробиотика. Криозащитное действие в процессе замораживания проявляет СЖС. Установлено, что при увеличении исходной концентрации до 5×10^{11} КОЕ/мл обеспечивается жизнеспособность изучавшегося штамма бактерий на исходном уровне независимо от режима охлаждения и среды консервирования. В исследовании [4] выдвинуто предположение, что при замораживания из бактерий выходят во внешнюю среду, преимущественно, нуклеотиды, белки и нуклеиновые кислоты. Можно предположить, что вышедшие из клеток УФ-поглощающие вещества

Чувствительность бактерий *Lactobacillus plantarum* к антибиотикам после замораживания

Антибиотики	Активность диска	Диаметр зон ингибирования роста, мм			
		Контроль	Программа 1	Программа 2	Программа 3
Бензилпенициллин	10 ед.	23	24	23	20
Оксацилин	1 мкг	R	R	R	R
Ампицилин	10 мкг	25	28	26	23
Карбеницилин	25 мкг	23	25	24	22
Пиперацилин	100 мкг	27	30	30	26
Гентамицин	10 мкг	12	11	13	12
Тобрамицин	10 мкг	R	R	R	R
Сизомицин	10 мкг	10	8	10	11
Амикацин	30 мкг	12	12	12	12
Нетилимицин	30 мкг	18	18	19	15
Эритромицин	15 мкг	24	20	26	22
Азитромицин	15 мкг	16	14	17	15
Линкомицин	15 мкг	11	10	9	13
Тетрациклин	30 мкг	18	19	19	18
Доксициклин	10 мкг	18	19	17	17

Примечание: R – штамм резистентен.

выступают как криопротекторы. Они могут стабилизировать клеточные стенки и ЦПМ бактериальных клеток, а также влиять на процесс кристаллизации воды, аналогично действию экзоцеллюлярных криопротекторов. Другим механизмом повышения жизнеспособности после увеличения концентрации клеток может быть влияние высокой концентрации клеток на единицу объема на кристаллизационные и рекристаллизационные процессы при охлаждении-отогреве.

Исследование выполнено по проекту Государственного фонда фундаментальных исследований Украины № 14.4 / 027.

Выводы

1. Экспериментально установлена возможность криоконсервирования бактерий *Lactobacillus plantarum*, используемых для производства пробиотика в СЖС. На жизнеспособность криоконсервированных бактерий этого вида влияют режимы охлаждения.

2. Повышение исходной концентрации бактерий до 5×10^{11} КОЕ/мл и выше сохраняет жизнеспособность бактерий после криоконсервирования на

исходном уровне. Выживаемость бактерий при этом не зависит от режима охлаждения и состава среды консервирования.

3. У бактерий *Lactobacillus plantarum* после криоконсервирования сохраняются динамика прироста культур через 48 ч, способность к сбраживанию молока и чувствительность к антибиотикам.

Литература

1. *Актуальные проблемы криобиологии* / Под общ. ред. Н.С. Пушкаря и А.М.Белоуса.– Киев: Наук. думка, 1981.– 608 с.
2. *Богданов В.М., Королева Н.С., Банникова Л.А.* Микробиологический контроль на предприятиях молочной промышленности.– М., 1967.– 229 с.
3. *Красноголовцев Н.В.* Дисбактериоз кишечника.– М.: Медицина, 1989.– 208 с.
4. *Криобиология и биотехнология* / А.А. Цуцаева, В.Г. Попов, К.Н. Сытник и др.– Киев: Наук. думка, 1987.– 216 с.
5. *Луста К.А., Фихте Б.А.* Методы определения жизнеспособности микроорганизмов.– Пушино: ОНТИ НЦБИ АН СССР.– 1990.– 186 с.
6. *Наказ МОЗ України №167 від 05.04.2007 р.* Про затвердження методичних вказівок «Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів» // *Новости медицины и фармации.*– 2007.– С. 1–7.

7. Поздеев О.К. *Медицинская микробиология* / Под. ред. В.И. Покровского.– Москва, 2001.– 768 с.
8. Поляк М.С., Сухаревич В.И., Сухаревич М.Э. Питательные среды для медицинской и санитарной микробиологии.– 2008.– 351 с.
9. Приседський Ю.Г. Статистична обробка результатів біологічних експериментів. Навч. посібник.– Донецьк, 1999.– 186 с.
10. Федоровская Е.А., Немировская Л.Н. Взаимосвязь микробных экосистем и иммунитета человека // *Мікробіол. журн.*– 1999.– Т. 61, №5.– С. 85–96.
11. Цуцаева А.А., Ананьина А.Е., Балыбердина Л.М., Степанюк Л.В. Методология разработки технологий криоконсервирования промышленных штаммов микроорганизмов // *Цитология.*– 2004.– Т. 46, №10.– С. 878–879.
12. Щербінська А.М. Імунобіологічні препарати як необхідна складова у системі охорони здоров'я населення // *Ліки.*– 1996.– №1.– С. 13–16.

Поступила 1.07.2008