

Антимикробна активност на щам *Lactobacillus acidophilus* Z10 спрямо патогенни микроорганизми

Росица Денкова, Любка Георгиева, Запряна Денкова, Величка Янакиева

Antimicrobial activity of *Lactobacillus acidophilus* strains against pathogens. The antimicrobial activity of the strain *Lactobacillus acidophilus* Z10 against the pathogens *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Salmonella abony* NTCC 6017, *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus* ATCC 25093, *Proteus vulgaris* J is determined by co-cultivation at $37 \pm 1^\circ\text{C}$. It is shown that the strain inhibits the growth of *Enterobacteriaceae* - for 48-60 h the numbers of viable cells of the pathogens are reduced. The only exception is *Staphylococcus aureus* ATCC 25093 - at the end of the cultivation 10^5cfu/cm^3 viable cells are determined. It has been shown that changes in the proportions in the mixed population are a result of the formed lactic acid which acidifies the environment and changes the conditions for the growth of the pathogens.

Key words: *Lactobacillus*, Pathogen, Co-cultivation, Probiotic.

ВЪВЕДЕНИЕ

Пробиотиците са живи микроорганизми, които оказват благоприятен ефект върху гостоприемника, приети в подходящи концентрации [2, 6]. Доказани са техните благоприятни ефекти при гастро-интестинални инфекции, редукция на серумния холестерол, протектиране на имунната система, антиканцерогенни свойства, антимутагенно действие, противодиарични свойства, потискане на инфекции, причинени от *Helicobacter pylori*, болест на Крон, възстановяване на микрофлората в стомаха и червата след антибиотикотерапия и др. [1, 4, 10, 12].

Лактобацилите и бифидобактериите са естествени компоненти на стомашно-чревната микрофлора на здравия човек. Те се включват в състава на пробиотици и пробиотични храни, предвид тяхното доказано здравословно действие върху организма [3, 5, 9]. Те са основните микроорганизми, които поддържат баланса на стомашно-чревната микрофлора [11].

Не всички щамове лактобацили и бифидобактерии могат да се използват като компоненти на пробиотици и пробиотични храни, а само онези, които отговарят на определени изисквания: да са от човешки произход, да са непатогенни, да са резистентни към стомашен сок, жлъчни соли и да позволяват провеждането на технологични процеси, при които се натрупва висока концентрация жизнеспособни клетки; те трябва да притежават потенциал да се адхезират към стомашно-чревната епителна тъкан, да продуцират антимикробни вещества, да са резистентни към прилаганите в лечебната практика антибиотици, да позволяват промишлено култивиране, инкапсулиране, сублимационно сушене и да запазват активността си в процеса на съхранение [7, 8]. Това изисква задължителна селекция на щамове лактобацили и бифидобактерии с пробиотични свойства.

Едно от изискванията към пробиотичните щамове е да притежават антимикробна активност спрямо условнопатогенните, карциногенни и патогенни микроби, което е свързано с инактивиране на техни ензимни системи, преодоляване на адхезията им, потискане на растежа им и изтласкване от биологичната ниша, в резултат на което се нормализира стомашно-чревната микрофлора.

Целта на настоящето изследване е да се определи антимикробната активност на щам *Lactobacillus acidophilus* Z10, изолиран от естествено ферментирало тесто – срещу 6 клинични патогена – *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Salmonella abony* NTCC 6017, *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus* ATCC 25093, *Proteus vulgaris* J чрез съвместно култивиране на *Lactobacillus acidophilus* Z10 с всеки един от патогенните микроорганизми.

ИЗЛОЖЕНИЕ

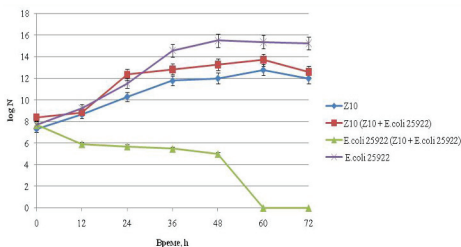
Определена е антимикробната активност на щам *Lactobacillus acidophilus* Z10, изолиран от естествено ферментирало кисело тесто, срещу патогенни микроорганизми.

При самостоятелното развитие на *Lactobacillus acidophilus* Z10 при статични условия за 12-24 h натрупва над 10^{12} cfu/cm³ жизнеспособни клетки (Фиг. 1 и фиг. 2). За същото време титруемата киселинност на средата достига до 70°T (Фиг. 3).

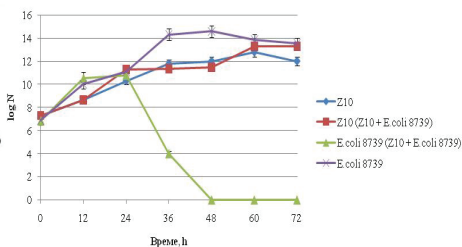
Висока концентрация на живи клетки образуват и коли-бактериите от 24 – 36 h от старта на процеса - над 10^{14} cfu/cm³ (Фиг. 1 и Фиг.2). Едва с 20 – 30°T се изменя титруемата активност на средата (Фиг. 3).

При съвместното култивиране на щама с *E. coli* ATCC 25922 при 37±1°С при статични условия се наблюдава нарастване на концентрацията на жизнеспособните клетки на *Lactobacillus acidophilus* Z10 – по-рязко до 24 h, а след това по-плавно. Концентрацията на живите клетки на патогена постепенно се редуцира, като на 60^h практически не са определени живи клетки (Фиг. 1).

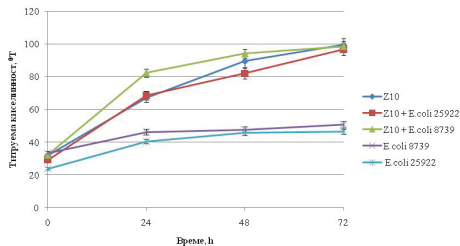
При съвместното култивиране на *E. coli* ATCC 8739 с *Lactobacillus acidophilus* Z10 при 37±1°С при статични условия се наблюдава бавно постоянно нарастване на живите клетки на лактобацила, докато при патогена нарастване има само първите 24 h. След това започва рязко намаляване на броя живи клетки на *E. coli* ATCC 8739, като след 48 h не са определени жизнеспособни клетки на патогения микроорганизъм (Фиг. 2).



Фиг. 1. Преживяемост на *Lactobacillus acidophilus* Z10 и *E. coli* ATCC 25922 при самостоятелно развитие и в смесена популация при температура на култивиране 37±1°С



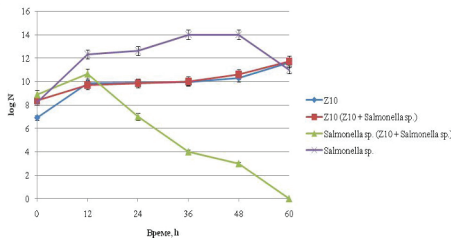
Фиг. 2. Преживяемост на *Lactobacillus acidophilus* Z10 и *E. coli* ATCC 8739 при самостоятелно развитие и в смесена популация при температура на култивиране 37±1°С



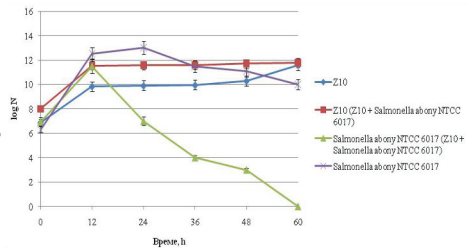
Фиг. 3. Изменение на титруемата киселинност на средата при съвместно и самостоятелно развитие на *Lactobacillus acidophilus* Z10 с патогенни микроорганизми при температура 37±1°С

При култивирането на *Lactobacillus acidophilus* Z10 със *Salmonella* sp. при $37\pm 1^\circ\text{C}$ се наблюдава нарастване на концентрацията на жизнеспособните клетки както на *Lactobacillus acidophilus* Z10, така и на *Salmonella* sp. през първите 12 h, като скоростите на нарастване са съизмерими, след което концентрацията на жизнеспособните клетки на лактобацила продължава да нараства, но с по-ниска скорост, докато тази на патогена се редуцира, като на 60^{a} h не са определени живи клетки на *Salmonella* sp. (Фиг. 4).

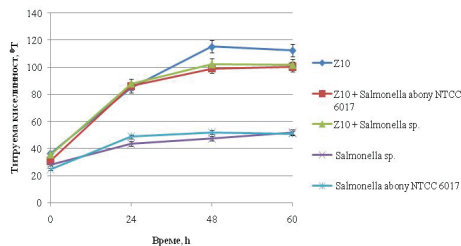
При съвместното развитие на *Salmonella abony* NTCC 6017 и *Lactobacillus acidophilus* Z10 също има нарастване на концентрацията на клетките на лактобацила и патогена през първите 12 h. От 12^{a} до 60^{a} h концентрацията на млечнокиселите бактерии остава постоянна, а тази на *Salmonella abony* NTCC 6017 намалява, като на 60^{a} h не са определени живи клетки на патогения микроорганизъм (Фиг. 5).



Фиг. 4. Преживяемост на *Lactobacillus acidophilus* Z10 и *Salmonella* sp. при самостоятелно развитие и в смесена популация при температура на култивиране $37\pm 1^\circ\text{C}$

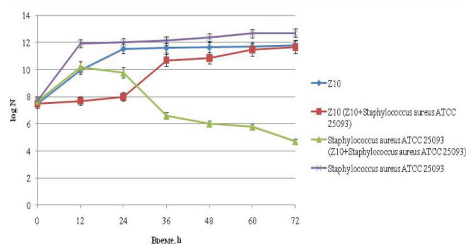


Фиг. 5. Преживяемост на *Lactobacillus acidophilus* Z10 и *Salmonella abony* NTCC 6017 при самостоятелно развитие и в смесена популация при температура на култивиране $37\pm 1^\circ\text{C}$

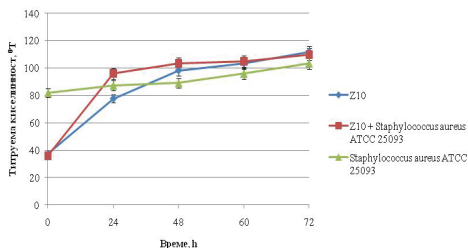


Фиг. 6. Изменение на титруемата киселинност на средата при съвместно и самостоятелно развитие на *Lactobacillus acidophilus* Z10 с патогенни микроорганизми (*Salmonella abony* NTCC 6017 и *Salmonella* sp.) при температура $37\pm 1^\circ\text{C}$

При съвместното култивиране на *Lactobacillus acidophilus* Z10 със *Staphylococcus aureus* ATCC 25093 също се наблюдава намаляване на концентрацията на клетките на патогена, започващо след 12^{a} h. За разлика от *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Salmonella* sp. и *Salmonella abony* NTCC 6017 този патоген не се редуцира под действие на *Lactobacillus acidophilus* Z10. В края на процеса са определени 10^5 cfu/cm³ жизнеспособни клетки на патогена (Фиг. 7).



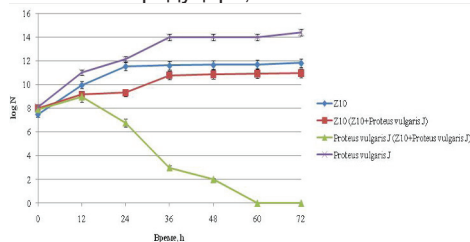
Фиг. 7. Преживяемост на *Lactobacillus acidophilus* Z10 и *Staphylococcus aureus* ATCC 25093 при самостоятелно развитие и в смесена популация при температура на култивиране 37±1°C



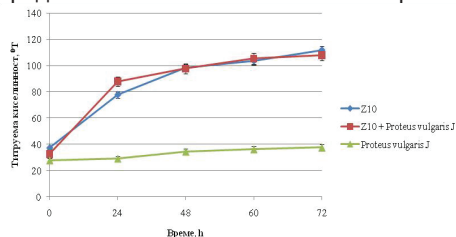
Фиг. 8. Изменение на титруемата киселинност на средата при съвместно и самостоятелно развитие на *Lactobacillus acidophilus* Z10 с патогенни микроорганизми при температура 37±1°C

Сходни са зависимостите, отразяващи нарастване на броя на живите клетки на *Lactobacillus acidophilus* Z10 и *Proteus vulgaris* J при самостоятелно развитие при 37±1°C.

При съвместното култивиране на щама с *Proteus vulgaris* J при 37±1°C при статични условия се наблюдава нарастване на концентрацията на жизнеспособните клетки както на *Lactobacillus acidophilus* Z10, така и на *Proteus vulgaris* J през първите 12 h, като скоростите на нарастване са съизмерими, след което концентрацията на жизнеспособните клетки на лактобацила продължава да нараства, докато тази на патогена се редуцира, като на 60^h не са определени живи клетки на патогена-фиг.9.



Фиг. 9. Преживяемост на *Lactobacillus acidophilus* Z10 и *Proteus vulgaris* J при самостоятелно развитие и в смесена популация при температура на култивиране 37±1°C



Фиг. 10. Изменение на титруемата киселинност на средата при съвместно и самостоятелно развитие на *Lactobacillus acidophilus* Z10 с патогенни микроорганизми при температура 37±1°C

Редукцията на клетките на патогенните микроорганизми е в корелация с промяната на киселинността на средата (Фиг. 6, Фиг. 8 и Фиг. 10). Подкисляването на средата води до промяна в условията за развитие на патогенните микроорганизми.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Lactobacillus acidophilus Z10 запазва висока концентрация на жизнеспособни клетки при самостоятелно и съвместно култивиране при температура на развитие 37±1°C, като най-чувствителен към антимикробното му действие са клетките на *Proteus vulgaris* J, следвани от салмонелните бактерии, а най-устойчиви на действието на *Lactobacillus acidophilus* Z10 при съвместно култивиране са клетките на *Staphylococcus aureus* ATCC 25093. Високата антимикробна активност на *Lactobacillus acidophilus* Z10 прави щама потенциално пробиотичен.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Agerholm-Larsen L., Raben A., Haulrik N., Hansen A. S., Manders M., Astrup A. (2000). Effect of 8 week intake of probiotic milk products on risk factors for cardiovascular diseases. *Eur. J. Clin. Nutr.* 54: 288–297.
- [2] Brown A. C., Valiere A. (2004). Probiotics and medical nutrition therapy. *Nutr. Clin. Care* 7: 56–68.
- [3] Hirayama K., Rafter J. (2000). The role of probiotic bacteria in cancer prevention. *Microbes Infect.* 2: 681–686.
- [4] Imasse K., Tanaka A., Tokunaga K., Sugano H., Ishida H., Takahashi S. (2007). *Lactobacillus reuteri* tablets suppress *Helicobacter pylori* infection: a double-blind randomised placebo-controlled cross-over clinical study. *Kansenshogaku zasshi. J. Jpn. Assoc. Infect. Dis.* 81: 387–393.
- [5] Isolauri E. (2001). Probiotics in human disease. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73(6): 1142S–1146.
- [6] Kalliomaki M., Salminen S., Arvilommi H., Kero P., Koskinen P., Isolauri E. (2001). Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 357: 1076–1079.
- [7] Kirtzalidou E., Pramateftaki P., Kotsou M., Kyriacou A. (2011). Screening for lactobacilli with probiotic properties in the infant gut microflora. *Anaerobe* 17: 440 - 443.
- [8] Marteau P. R., de Vrese M., Cellier C. J., Schrezenmeir J. (2001). Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. *American Journal of Clinical Nutrition* 73(Suppl. 2): 430S–436S.
- [9] Mitsuoka T. (1999). The human gastrointestinal tract. In: Wood BJB, editor. *The lactic acid bacteria*. vol.1, Gaithersburg, MD, USA: Aspen Publishers Inc.: 69–114 p.
- [10] Nomoto K. (2005). Review prevention of infections by probiotics. *J. Biosci. Bioeng.* 100: 583–592.
- [11] Rybka S., Kailasapathy K. (1995). The survival of culture bacteria in fresh and freeze-dried AB yoghurts. *The Australian Journal of Dairy Technology* 50(2): 51–57.
- [12] Shah N. P. (2007). Functional cultures and health benefits. *Int. Dairy J.* 17: 1262–1277.

За контакти:

Докторант Росица Стефанова Денкова, Катедра "Биотехнологии", Софийски университет "Св. Климент Охридски", тел.: 0899 085 525, e-mail: rositsa_denkova@mail.bg

Проф.д-р Любка Василева Георгиева, Институт по Криобиология и Хранителни Технологии, София, e-mail: ljubka_georgieva@abv.bg

Проф.д.т.н. Запряна Рангелова Денкова, Университет по хранителни технологии, Пловдив, e-mail: zdenkova@abv.bg

Гл. ас. д-р Величка Борисова Янакиева, Университет по хранителни технологии, Пловдив, e-mail: yanakieva_vili@abv.bg

Докладът е рецензиран.