

**АНТИМИКРОБНА АКТИВНОСТ НА ЩАМ *LACTOBACILLUS PLANTARUM* BG 24
СПРЯМО ПАТОГЕННИ МИКРООРГАНИЗМИ**

**Ремзи Чолаков, Нериман Чакърва, Йоскан Салим, Величка Янакиева,
Запряна Денкова, Сафие Сюлейман**

*Университет по хранителни технологии, Технологичен факултет, катедра
„Микробиология“ гр. Пловдив, e-mail: inj.cholakov@gmail.com*

*Автор за кореспонденция: докторант Ремзи Чолаков, Университет по хранителни
технологии, катедра „Микробиология“, e-mail: inj.cholakov@gmail.com, тел.: 0889761720*

**ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF *LACTOBACILLUS PLANTARUM* BG 24 AGAINST
PATHOGENIC MICROORGANISMS**

**Remzi Cholakov, Neriman Chakarova, Yoskan Salim, Velichka Yanakieva,
Zapriana Denkova, Safie Syuleyman**

*University of Food Technologies, Technological Faculty, Department of Microbiology, Plovdiv, e-
mail: inj.cholakov@gmail.com*

ABSTRACT

The antimicrobial activity of *Lactobacillus plantarum* BG 24 isolated from naturally fermented cereal beverage (boza) against pathogens - *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* 1390-2 and *Listeria monocytogenes* - by co-cultivation at 37±1°C was determined. It has been found that the strain *Lb. plantarum* BG 24 inhibits the growth of pathogenic microorganisms, the reduction being strain specific, and within 60 to 72 hours practically no viable pathogenic cells were detected. In co-culturing of *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Lb. plantarum* BG 24 complete inhibition occurred at the 72nd h, while in co-culturing of *Lb. plantarum* BG 24 and *Pseudomonas aeruginosa* 1390-2 or *Listeria monocytogenes* – at the 60th h. It has been shown that the inhibition of the growth of the pathogens is a result of the produced lactic acid and other organic acids which acidify the medium and change the conditions of growth and development of the pathogens.

Key words: *probiotic, antimicrobial, Lactobacillus, co-cultivation, pathogen*

Въведение

Полезната микрофлора (лактобацили и бифидобактерии) постъпва в организма като концентрати наречени пробиотици чрез пробиотични функционални храни. Живите клетки на лактобацили и бифидобактерии поддържат баланса на микрофлората в стомаха и червата и оказват положително влияние върху функционирането на храносмилателната и свързаните с нея органи и системи. 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 притежават висока антимикуробна активност, 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 антимикуробни 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 [1, 5, 6]. Това изисква задължителна селекция на щамове лактобацили и бифидобактерии с пробиотични свойства. Изследванията на Saxelin et al., 1996 a, b; Donohue & Salminen, 1996; Salminen et al., 1998 показват, че безопасността на млечнокиселите

бактерии и бифидобактериите е доказана и щамовете, отнасящи се към родовете *Lactobacillus*, *Lactococcus* и *Bifidobacterium* са най-често с GRAS статус [2, 4, 7, 8, 9].

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 [2, 3].

Целта на настоящото изследване е да се определи антимикробната активност на щам *Lactobacillus plantarum* BG 24 изолиран от естествено ферментирала зърнена напитка (боза) спрямо – *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* 1390-2 и *Listeria monocytogenes* чрез съвместното му култивиране с всеки един от патогените микоорганизми.

Материали и методи

Хранителни среди:

1. Среда MRS-бульон (среда на De Man, Rogosa & Sharpe). Състав (g/dm^3): пептон от казеин – 10; дрождев екстракт - 4; месен екстракт - 8; глюкоза – 20; K_2HPO_4 – 2; натриев ацетат – 5; диамониев цитрат - 2; MgSO_4 – 0.2; MnSO_4 – 0.04; Tween 80 – 1 ml; pH=6.5. Средата се стерилизира за 15 минути при 121°C.

2. LAPTg10-агар. Състав (g/dm^3): LAPTg10-бульон + 2% агар. Стерилизация - 20 минути при 121°C.

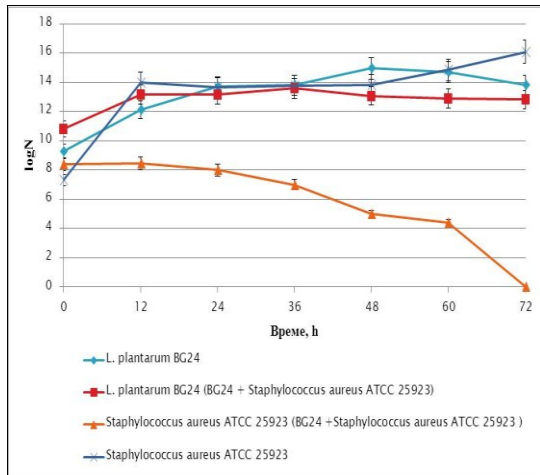
3. LBG-агар. Състав (g/dm^3): триптон – 10, дрождев екстракт – 5, NaCl - 10, глюкоза – 10, агар – 20. pH се коригира до 7.5. Стерилизация - 20 минути при 121°C.

Определяне на антимикробна активност спрямо патогенни микроорганизми

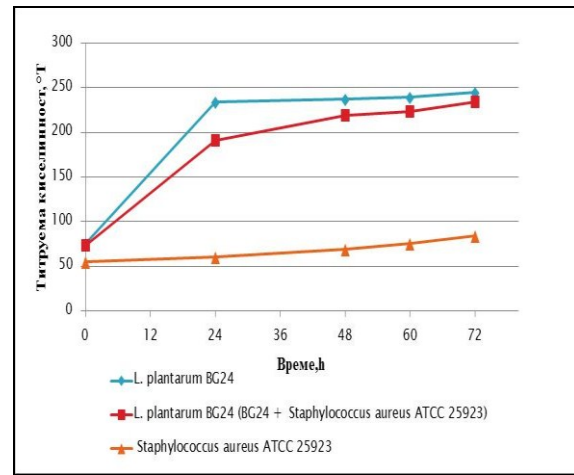
За определяне на антимикробната активност на изследвания щам спрямо патогенни микроорганизми се използва 48 часова култура от щам *Lactobacillus plantarum* BG 24, като в смесите се смесват 0.5 ml от суспензията на лактобацила, 0.5 ml от суспензията на патогена и 9 ml хранителна среда (MRS-бульон), а за контролата на лактобацилите и патогените се смесват 9.5 ml хранителна среда и 0.5 ml съответно от суспензията на лактобацилите и патогените. Провежда се съвместно култивиране щам *Lactobacillus plantarum* BG 24 и патогените при статични условия в термостат при температура $37\pm 1^\circ\text{C}$ в продължение на 60 часа, като се вземат проби на 0, 12, 24, 36, 48 и 60 час и се проследява изменението на титруемата киселинност и концентрацията на жизнеспособни клетки, както на патогените, така и на лактобацилите.

Резултати и обсъждане

При самостоятелно култивиране на *Lactobacillus plantarum* BG 24 при статични условия при температура $37\pm 1^\circ\text{C}$ до 48h натрупва над 10^{14} cfu/cm³ жизнеспособни клетки (Фиг.1а, Фиг.2а, Фиг.3а). За същото време титруемата киселинност на средата приема стойности над 200°Т, като продължава да нараства до 72h (Фиг.1б, Фиг.2б, Фиг.3б). Висока концентрация на живи клетки се наблюдава и при *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. На 72h броят им достига до 10^{15} cfu/cm³, като титруемата киселинност на средата достига до 80°Т на 72h (Фиг.1а, Фиг.1б).



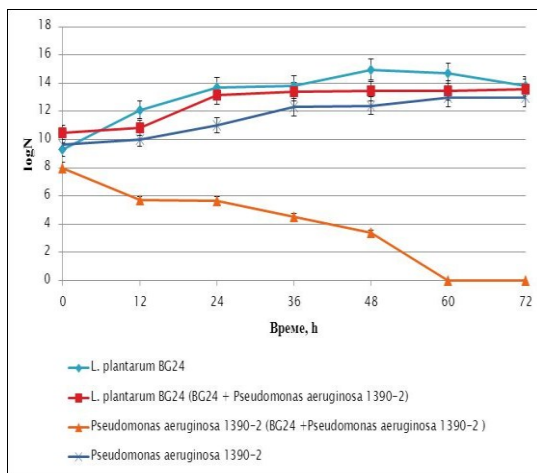
Фиг. 1 а) Преживяемост на *L. plantarum* BG 24 и *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 при самостоятелно развитие и в смесена популация при температура на култивиране 37±1°C



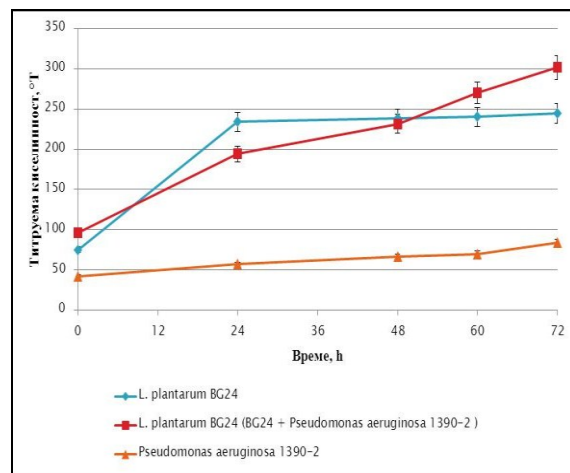
Фиг. 1 б) Изменение на титруемата киселинност на средата при съвместно и самостоятелно развитие на *L. plantarum* BG 24 със *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 при температура 37±1°C

В смесената суспензия на *Lactobacillus plantarum* BG 24 със *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 при 37±1°C се наблюдава нарастване концентрацията на живи клетки на *Lactobacillus plantarum* BG 24 и на 36h достига до $3,8 \cdot 10^{13}$ cfu/cm³, а след това настъпва слабо изменение в броя на жизнеспособни клетки. Концентрацията на живите клетки на патогена се редуцира и на 72h практически не са определени живи клетки на патогена (Фиг.1а). Титруемата киселинност на средата достига до 234,1°Т.

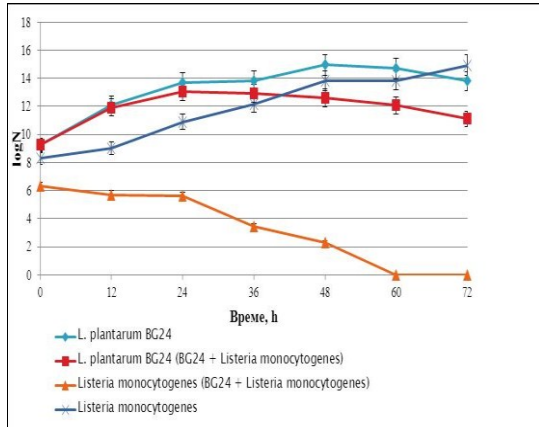
При култивирането на *Lactobacillus plantarum* BG 24 със *Pseudomonas aeruginosa* 1390-2 при 37±1°C се наблюдава нарастване на концентрацията на жизнеспособните клетки на *Lactobacillus plantarum* BG 24 и на 72h са отчетени $3,8 \cdot 10^{13}$ cfu/cm³. Жизнеспособните клетки на *Pseudomonas aeruginosa* 1390-2 от началото на съвместното култивиране се редуцират, като на 60h не са определени живи клетки на патогена (Фиг.2а). Титруемата киселинност на средата за това време достига до 270 °Т (Фиг.2б).



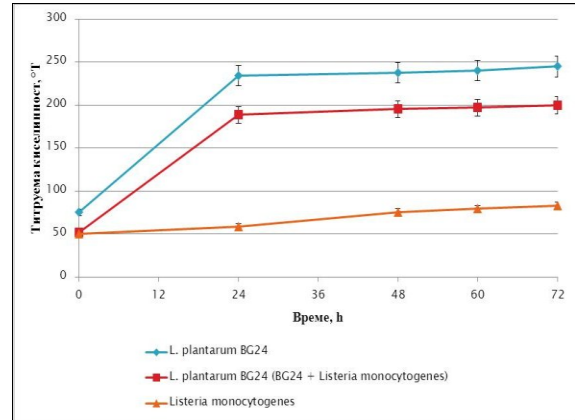
Фиг. 2 а) Преживяемост на *L. plantarum* BG 24 и *Pseudomonas aeruginosa* 1390-2 при самостоятелно развитие и в смесена популация при температура на култивиране 37±1°C



Фиг. 2 б) Изменение на титруемата киселинност на средата при съвместно и самостоятелно развитие на *L. plantarum* BG 24 със *Pseudomonas aeruginosa* 1390-2 при температура 37±1°C



Фиг. 3 а) Преживяемост на *Lactobacillus plantarum* BG 24 и *Listeria monocytogenes* при самостоятелно развитие и в смесена популация при температура на култивиране $37\pm 1^{\circ}\text{C}$



Фиг. 3 б) Изменение на титруемата киселинност на средата при съвместно и самостоятелно развитие на *Lactobacillus plantarum* BG 24 със *Listeria monocytogenes* при температура $37\pm 1^{\circ}\text{C}$

При изследване на антимикробната активност на щам *Lactobacillus plantarum* BG 24 спрямо *Listeria monocytogenes* се наблюдава нарастване концентрацията на живите клетки на *Lactobacillus plantarum* BG 24 и на 24h надхвърля 10^{12} cfu/cm³, след което слабо се променя. Концентрацията на активните клетки на *Listeria monocytogenes* се редуцира от началото на култивирането и на 60h практически не са открити активни клетки на патогенния микроорганизъм. Титруемата киселинност на средата за това време е в границите 180 - 200°T.

Заклучение

При всички смесени култури на щам *Lactobacillus plantarum* BG 24 с патогенните микроорганизми е установена висока титруема киселинност, чрез която се потиска растежа на патогените и се редуцира съдържанието на жизнеспособни клетки. В същото време се променят условията за развитие (средата се подкислява). *Lactobacillus plantarum* BG 24 запазва висока концентрация на жизнеспособни клетки. Високата антимикробна активност на *Lactobacillus plantarum* BG 24 прави щама подходящ за влагане в закваски за функционални зърнени храни, тъй като това е естествената му среда за растеж.

Литература

1. Denkova, R., S. Ilieva, D. Nikolova, Y. Evstatieva, Z. Denkova, M. Yordanova and V. Yanakieva, 2013. Antimicrobial activity of *Lactobacillus plantarum* X2 against pathogenic microorganisms. *Bulg. J. Agric. Sci.*, Supplement 2, 19: 108–111. IF: 0,192
2. Denkova, R., V. Yanakieva, Z. Denkova, V. Nikolova, V. Radeva, 2013. In vitro inhibitory activity of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* strains against *Candida albicans*. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 16, No 3, 186–197.
3. Denkova, R., V. Yanakieva, Z. Denkova, D. Blazheva, 2013. Antimicrobial activity of probiotic lactobacilli, bifidobacteria and propionic acid bacteria, isolated from different sources. In: *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education* (A. Méndez-Vilas, Ed.). Formatex 2013, 857 - 864.
4. Donohue, D. C., S. Salminen, 1996. Safety assessment of probiotic bacteria. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 5, 25 – 28.
5. Kirtzalidou, E., P. Pramateftaki, M. Kotsou, A. Kyriacou, 2011. Screening for lactobacilli with probiotic properties in the infant gut microflora. *Anaerobe* 17: 440 - 443.

6. Marteau, P. R., M. de Vrese, C. J. Cellier, J. Schrezenmeir, 2001. Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. *American Journal of Clinical Nutrition* 73(Suppl. 2): 430S–436S.
7. Salminen, S.; M. C. Bouley, M. C. Boutron-Ruault, J. Cummings, A. Franck, G. Gibson, E. Isolauri, M.-C. Moreau, M. Roberfroid, I. Rowland, 1998. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *Br. J. Nutr., Suppl.*, 1, 147–171.
8. Saxelin, M., H. Rautelin, B. Chassy, S. L. Gorbach, S. Salminen, H. Makela, 1996a. Lactobacilli and septic infections in Southern Finland. *Clinical Infectious Diseases* 22, 564 – 566.
9. Saxelin, M., S. Salminen, 1996b. The safety of commercial products with viable Lactobacillus strains. *Infectious Diseases Clinical Practice* 5, 331 – 335.