

Сохранность жизнеспособности и морфофункциональных свойств бифидобактерий при криоконсервации в питательных средах

А.В. СИДОРЕНКО¹, Г.И. НОВИК¹, И.П. ВЫСЕКАНЦЕВ²

¹Институт микробиологии НАН Беларуси, г. Минск

²Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Keeping of Viability and Morphofunctional Properties of Bifidus Bacteria During Cryopreservation in Nutrient Media

A.V. SIDORENKO¹, G.I. NOVIK¹, I.P. VYSEKANTSEV²

¹Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

²Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

Исследована сохранность жизнеспособности, морфологических и функциональных свойств бифидобактерий после кратковременной криоконсервации в стерильной питательной среде MRS-C, традиционно используемой для культивирования данных микроорганизмов.

Установлено, что после замораживания в среде MRS-C количество жизнеспособных клеток бифидобактерий в суспензии достоверно не изменялось, и не зависело от видовой принадлежности культур. Снижение скорости роста и удлинение лаг-фазы при развитии периодических культур бифидобактерий после замораживания не отмечались. Показатели накопления биомассы и активности кислотообразования, полученные при культивировании криоконсервированных клеток, статистически значимо не отличались от интактных культур. Снижения активности развития бифидобактерий в молоке после криоконсервации не наблюдалось: культуры сквашивали стерильное молоко через 12–18 ч культивирования, в зависимости от штамма, с образованием плотного сгустка без отделения сыворотки. Показатели активной кислотности (рН 3,5–4,2) и титр клеток ($2-5 \times 10^8 \dots 1-3 \times 10^9$ КОЕ/мл) в сквашенном молоке варьировали в зависимости от штаммовой принадлежности и не отличались от величин, характерных для интактных культур. Морфологические свойства бифидобактерий под влиянием криоконсервации существенных изменений не претерпевали. При посеве последовательных разведений в тиогликолевую среду бифидобактерии образовывали характерные белые колонии диаметром 1–3 мм в виде гречишных зерен, гвоздиков или комет. При микроскопическом исследовании установлено, что бифидобактерии представляли собой прямые или слегка изогнутые палочки с булавовидными утолщениями на концах. Наблюдалось одиночное, парное, V- или Y-образное расположение клеток.

Установлено, что чувствительность бифидобактерий к тепловому и кислотному шоку после криоконсервации существенно не изменялась. Достоверного изменения антибиотикочувствительности бифидобактерий после криоконсервации также не было выявлено. Спектр сбраживаемых углеводов после замораживания не изменялся: все исследуемые культуры ферментировали глюкозу, галактозу, лактозу и фруктозу. Динамика развития бифидобактерий на средах с разными сахарами после криоконсервации достоверно не изменялась. Показатели накопления биомассы и активности кислотообразования, полученные при культивировании криоконсервированных клеток в питательной среде с рН 5,0, не отличались от величин, полученных для интактных клеток.

Таким образом, питательная среда MRS-C является эффективной защитной средой, обеспечивающей сохранность исходной жизнеспособности и морфофункциональных свойств бифидобактерий при криоконсервации.

Работа выполнена при финансовой поддержке БРФФИ, грант № B07K-024.

The keeping viability and morphological and functional properties of bifidus bacteria after short-term freeze-thawing in MRS-C sterile nutrient medium, traditionally used for culturing of these microorganisms has been investigated.

It has been established that after freezing in MRS-C medium number of viable cells of bifidus bacteria in suspension did not change significantly, and did not depend on cultured cell stain. The reduction of growth rate and extension of lag phase at the development of periodical cultures of bifidus bacteria after freezing was not noted. The indices of biomass accumulation and activity of acid-formation derived during culturing of frozen-thawed cells statistically and significantly did not differ from the intact cultures. The reduction of activity of bifidus bacteria development in milk after freeze-thawing was not observed: the cultures soured the sterile milk in 12–18 hrs of culturing in dependence on a strain with the formation of dense clump without serum separation. The indices of active acidity (pH 3.5–4.2) and cell titer ($2-5 \times 10^8 \dots 1-3 \times 10^9$ CFU/ml) in soured milk varied in dependence on strain but did not differ from the corresponding values of intact cultures of the same strains. The morphologic properties of bifidus bacteria under the effect of cryopreservation were not changed significantly. During inoculation of serial dilutions into thioglycolic medium bifidus bacteria formed the specific white colonies of 1–3 mm diameter as buckwheat grains, tacks or comets. Microscopic investigation revealed that bifidus bacteria were as straight or slightly curved sticks with clavate bulbs on the tips. The location of cells as single, double, V- or Y-shaped was observed.

It has been established that sensibility of bifidus bacteria to heat and acid shock after freeze-thawing did not change significantly. No significant change of bifidus bacteria antibiotic sensibility after freeze-thawing has been manifested. Spectrum of fermented carbohydrates after freezing did not change: all investigated cultures fermented glucose, galactose, lactose and fructose. Dynamics of bifidus bacteria development in media with different sucroses after cryopreservation did not change significantly. The indices of biomass accumulation and acid formation, derived during culturing of cryopreserved cells in nutrient medium with pH 5.0 did not change from the values, derived for the intact cells.

Thus, MRS-C nutrient medium is effective protective medium, providing survival of initial viability and morphofunctional properties of bifidus bacteria during cryopreservation.

The work has been carried out with financial support from Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research, grant №B07K-024.