

Užšaldytų mikroorganizmų kultūrų išlaikymo sąlygų parinkimas

Antanas Šarkinas

KTU Maisto institutas, Taikos pr. 92, LT-51180 Kaunas; direktorius@lmai.lt

Vertinant apsauginės terpės sudėties ir laikymo temperatūros įtaką gramteigiamų ir gramneigiamų bakterijų ląstelių gyvybingumui tirtos *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus cereus* (ATCC 10876) bakterijų kultūros. Paruošti apsauginės terpės variantai: regeneruotas nugriebtas pienas su 20, 30 ir 40 % glicerino bei smegenų ir širdies sultinys su 20, 30 ir 40 % glicerino. Kultūros laikytos minus 72 °C ir minus 18 °C temperatūrose.

Kultūroms saugoti tinkamesnė yra minus 72 °C temperatūra, tačiau įvairių rūšių mikroorganizmų atsparumas laikymo sąlygoms nevienodas. Abiejų temperatūrų sąlygomis lieka daugiausia gramneigiamų *S. typhimurium* gyvų ląstelių. *S. aureus* gyvybingumas vidutinis, *B. cereus* po metų kartais neaptinkama, kitur lieka tik dalys procento. Pienarūgščių bakterijų *S. thermophilus*, *L. bulgaricus*, *L. lactis* kultūros išsilaikė gerai, gyvybingumą užtikrino abi laikymo temperatūros ir visi apsauginės terpės variantai.

Lactococcus lactis subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* ir *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *paracitrovorus* užšaldytos padermės regeneruotame nugriebtame piene su 10 % glicerino buvo saugomos minus 18 °C temperatūroje 3–5 metus. 22 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* padermės išlaikė gyvybingumą 3 metus. Ląstelių skaičius atšildytoje terpeje svyravo nuo šimtų tūkstančių iki milijonų. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *paracitrovorus* užšaldyta 10 padermių, po 5 metų jos liko aktyvios, sterilų pieną suraugino per 2–4 paras, gyvų ląstelių skaičius svyravo nuo tūkstančių iki milijonų. Morfologinės savybės stabilios, mikroskopiniuose preparatuose vyravo diplokokai, buvo trumpų grandinelių. Kita grupė *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *paracitrovorus* iš 16 padermių užšaldyta išlaikyta 4 metus. Kultūros liko būdingo aktyvumo, sterilų pieną suraugino per 2–4 paras, gyvų ląstelių skaičius svyravo iki milijonų.

Raktažodžiai: Pienarūgštės bakterijos, šaldymas, gyvybingumas.

Įvadas

Saugant kolekcines mikroorganizmų kultūras visų pirma siekiama išlaikyti jų stabilias savybes ir užtikrinti grynumą. Gerai išsilaiko tiek užšaldytos, tiek ir liofilizuotos kultūros, bet abiem atvejais svarbi apsauginės terpės sudėtis, o šaldant dar ir temperatūra. Paprastai palankesnė laikymui yra žemesnė, minus 70 °C temperatūra, nors tai priklauso ir nuo rūšinių savitumų, daugelis kultūrų gerai išsilaiko ir 20 °C temperatūroje, gyvybingos išlieka metus ir daugiau [1, 2].

Vertinant kultūrų grynumą tikrinamas ne tik užterštumas pašalinėmis ląstelėmis, pastaruoju metu taikomi metodai leidžia aptikti ir lizogenines ląsteles (su neaktyviais profagais), kurios tam tikromis sąlygomis gali tapti bakteriofago šaltiniu. Patikrintoje *Streptococcus thermophilus* kolekcijoje ląstelių su profagais buvo rasta nedaug [3].

Konstruojant apsaugines terpes bandomos įvairios medžiagos. Vertinant apsauginės terpės variantus buvo lyginami sacharozės, trehalozės, nugriebto pieno bei sacharozės + nugriebto pieno,

trehalozės + nugriebto pieno, trehalozės + sacharozės + nugriebto pieno, trehalozės + sacharozės tirpalai. Distiliuotame vandenyje žūna 99 % ląstelių, trehalozė gyvybingumą padidina, o trehalozės + sacharozės + nugriebto pieno tirpalas leidžia pasiekti 85 % ląstelių gyvybingumą po liofilizavimo ir išlaikymo, drėgmės likutis neturi viršyti 2,8–5,6 % [4]. Cukraus, maltodekstrino, nugriebto pieno efektas ląstelių gyvybingumui yra svarus, išlikusių ląstelių skaičius terpeje be apsauginių medžiagų yra 0,01 %, su jomis padidėja iki 7,8 %, šios medžiagos stabilizuoja ląstelės membranines struktūras [5].

Įvertintas apsauginių angliavandenių efektyvumas *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ląstelių gyvybingumui po užšaldymo ir liofilizavimo. Trehalozės, maltozės, sacharozės, gliukozės ir laktozės 32 % tirpalai 4 °C temperatūroje išlaiko kultūrų gyvybingumą. Efektyviausias buvo trehalozės poveikis, ji sumažina ir streso veiksmų įtaką kultūroms [6].

Miltų terpėje be apsauginių medžiagų išlieka 60 % mielių ir 80 % pienarūgščių bakterijų ląstelių, o 8 % sacharozės ir 0,5 % CaCO₃ pridėjimas į terpę sutrumpina šaldymo trukmę, padidina gyvybingumą iki 100 % esant šaldymo greičiui 1,5 °C per minutę [7].

Apsauginės medžiagos, atgaivinimo terpės sudėtis, šaldymo temperatūra turi įtakos gyvybingumui, atskiroms mikroorganizmų rūšims būdinga tam tikra specifika. 4,0 % mielių ekstrakto ir 2,5 % natrio glutamato terpėje leidžia pasiekti maksimalų 67,8 % *Lactobacillus brevis* išlikimą. Atgaivinimo terpė efektyviausia, kai joje yra 10 % sacharozės. Šaldyti minus 65 °C temperatūroje reikia greitai, o minus 20 °C temperatūroje lėtai [8].

Mikroskopinių grybų sporos, išdžiovinotos krakmolo granulėse, saugotos vertinant gyvybingumą po 1, 3 ir 6 mėnesių. Gyvybingumas priklauso nuo terpės vandens aktyvumo ir glicerino priedų, jį padidina sacharozė, natrio glutamatas, nugriebto pieno milteliai, ląstelių koncentracija įtakos neturi [9]. Optimizuojant džiovinimo procesą norint pasiekti maksimalų mielių gyvybingumą į granules buvo dedama kviečių miltų. Vandens glicerino sistemoje įvertintas mielių atsparumas osmosiniam stresui, o duomenys pritaikyti procesui optimizuoti. Mielės yra atsparios osmosiniam stresui, preparatų gyvybingumas pakankamai geras, kai preparato a_w 0,38, o laikymo temperatūra mažesnė už 8 °C [10].

Sukonstruoti ir apsauginių medžiagų komplektai, galima įsigyti jų įvairių rinkinių. Palyginus keletą iš jų efektyvumą nustatyta, kad „Unipektine RS 150“ pridėjus į terpę 2,5 %, *L. casei* gyvybingumas išauga 7 %. „Raftilose P95“ taip pat veikia teigiamai [11]. Kultūrų gyvybingumą apie 20 % padidina adaptacija prieš užšaldymą laikant kultūras 14 h 10 °C temperatūroje. Minus 20 °C temperatūroje saugant kultūras pienarūgščių bakterijų gyvybingumas siekia 94,5 %, mielių – 75 % po 126 dienų [12]. Kad temperatūrinio šoko sumažinimas padidina ląstelių gyvybingumą, nurodo ir kiti autoriai. Išlaikius *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* 4, 15, 25, 37 °C temperatūrose ir esant pradiniam ląstelių skaičiui 2,27·10¹¹, gyvybingumas siekė 38,8 %, nepaveiktų ląstelių – tik 21,9 %. Geriausi rezultatai gauti po išlaikymo 4 °C temperatūroje [13].

Tyrimų objektai ir metodai

Darbas buvo atliekamas su KTU Maisto instituto Mikrobiologijos laboratorijoje saugoma pienarūgščių bakterijų ir kitų mikroorganizmų kolekcija, kultūros palaikomos periodiškai persodinant steriliame piene ir apsauginėje užšaldymo terpėje.

Užšaldant minus 18 °C temperatūroje vartota apsauginė terpė iš regeneruoto iš miltelių pieno su

10 % glicerino. Šioje terpėje 10 ml talpos buteliukuose užšaldytos padermės ir jų mišiniai laikyti nuo vienerių iki penkerių metų. Atšildytos *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* ir *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *paracitrovorus* kultūros buvo sėjamos į sterilų pieną, ribinių skiedimų metodu nustatytas gyvų ląstelių skaičius, vertintas atgaivintų kultūrų aktyvumas, gyvybingumas pagal surūgimo laiką, grynumas bei morfologiniai požymiai mikroskopuojant. Tada buvo pakartotinai persodintos į sterilų pieną ir vėl užšaldytos minus 72 °C temperatūros apsauginėje terpėje

Vertinant apsauginės terpės sudėtis ir laikymo temperatūros įtaką ląstelių gyvybingumui tirtos kultūros *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus cereus* (ATCC 10876), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*. Paruošti apsauginės terpės variantai: regeneruotas nugriebtas pienas su 20, 30 ir 40 % glicerino bei smegenų ir širdies sultinys su 20, 30 ir 40 % glicerino. Kultūros 18 h augintos optimalioje temperatūroje: *S. typhimurium*, *S. aureus*, *B. cereus* – ant nuožulnaus agaro, *L. lactis*, *L. bulgaricus*, *S. thermophilus* – steriliame piene. Kilpelė kultūros iš sterilaus pieno įdėta į 10 ml apsauginės terpės, gerai sumaišyta ir išpilstyta po 1 ml į 2 ml talpos plastikinius mėgintuvėlius. Kilpelė kultūros nuo nuožulnaus agaro išmaišyta skiediklyje, 1 ml suspensijos įpilta į 10 ml apsauginės terpės, gerai sumaišyta ir išpilstyta po 1 ml į 2 ml talpos plastikinius mėgintuvėlius. Nustačius pradinį ląstelių skaičių bandiniai lygiagrečiai užšaldyti minus 18 °C ir minus 72 °C temperatūroje. Išlikusių gyvų ląstelių, išlaikytų skirtingose terpėse ir temperatūrose, skaičius nustatytas po 12 mėnesių, *S. typhimurium*, *S. aureus*, *B. cereus* sėjant į lėkšteles, *L. lactis*, *L. bulgaricus*, *S. thermophilus* – į sterilų pieną.

Rezultatai ir jų aptarimas

Metus išlaikius užšaldytas *S. aureus* kultūras ląstelių skaičius sumažėjo visuose terpės variantuose (1 lentelė), jos sudėtis neturėjo didelės įtakos gyvybingumui, ląstelių skaičius labiausiai priklauso nuo laikymo temperatūros, minus 72 °C temperatūroje išlieka keliolika–keliasdešimt kartų daugiau gyvų mikroorganizmų negu minus 18 °C temperatūroje, kur gyvybingumas siekia tik 1–2 %. Smegenų ir širdies sultinyje gyvų ląstelių daugėja didėjant terpėje glicerino kiekiui, skirtumas siekia 2 kartus, tačiau nugriebto pieno terpėje glicerino kiekio efektas atvirkštinis – esant maksimaliai 40 % glicerino koncentracijai gyvų *S. aureus* ląstelių išlieka 3 kartus mažiau.

1 lentelė. *S. aureus* ląstelių gyvybingumas priklausomai nuo saugojimo temperatūros ir apsauginės terpės sudėties. Ląstelių skaičius bandymo pradžioje $(4,3 \pm 1,5) \cdot 10^7$

Terpės sudėtis	Gyvų ląstelių skaičius				
	Minus 18 °C		Minus 72 °C		Minus 72 °C, lyginant su minus 18 °C, kartai
	KSV/ml	Likutis, proc. nuo pradinio sk.	KSV/ml	Likutis, proc. nuo pradinio sk.	
1. Smegenų ir širdies sultinys su 20 % glicerino	$(5,1 \pm 1,5) \cdot 10^5$	1,2	$(1,1 \pm 0,2)_7 \cdot 10$	25,58	22
2. Smegenų ir širdies sultinys su 30 % glicerino	$(8,0 \pm 2,1) \cdot 10^5$	1,9	$(1,1 \pm 0,3)_7 \cdot 10$	25,58	14
3. Smegenų ir širdies sultinys su 40 % glicerino	$(1,1 \pm 0,3) \cdot 10^6$	2,6	$(1,3 \pm 0,2)_7 \cdot 10$	30,23	12
4. Nugriebtas pienas su 20 % glicerino	$(9,6 \pm 2,7) \cdot 10^5$	2,2	$(1,4 \pm 0,3)_7 \cdot 10$	32,55	15
5. Nugriebtas pienas su 30 % glicerino	$(8,7 \pm 2,9) \cdot 10^5$	2,0	$(1,3 \pm 0,4)_7 \cdot 10$	30,23	15
6. Nugriebtas pienas su 40 % glicerino	$(3,2 \pm 0,9) \cdot 10^5$	0,74	$(1,1 \pm 0,3)_7 \cdot 10$	25,58	35

Minus 72 °C temperatūroje metus išlaikytuose bandiniuose gyvų ląstelių lieka 25–30 % nuo pradinio skaičiaus. Smegenų ir širdies sultinyje daugiausiai gyvų ląstelių lieka terpėje su 40 % glicerino, o lieso pieno terpėje su 20 % glicerino.

Minus 18 °C temperatūroje gyvų *B. cereus* ląstelių po metų išlaikymo beveik nelieka visuose terpės variantuose (2 lentelė), o viename – smegenų ir širdies sultinyje su 30 % glicerino jų visai neaptikta.

Šioje terpėje ir minus 18 °C temperatūroje nustatytas mažiausias išlikusių ląstelių skaičius. Terpėje smegenų ir širdies sultinio pagrindu su visomis glicerino koncentracijomis lieka mažai gyvų ląstelių, nugriebto pieno terpėje rezultatai geresni – lieka 10–30 % pradinio skaičiaus gyvų ląstelių.

Gramneigiamoms kultūroms priklausanti *S. typhimurium* labiausiai atspari šaldymui ir pasižymi geresniu gyvybingumu, abiejose temperatūrose ir visuose terpės variantuose išlieka daugiau gyvų ląstelių. Terpėje smegenų ir širdies sultinio pagrindu minus 18 °C temperatūroje gyvybingumas siekia 35–48 % ir atsilieka nuo rezultatų nugriebto pieno terpėje, kur gyvybingumas siekia 50–70 %. Dar geresni rezultatai gaunami minus 72 °C temperatūroje, kur gyvybingumas didesnis visuose terpės variantuose iki 2 kartų, lyginant su minus 18 °C temperatūra, bei siekia 70–90 % nuo pradinio skaičiaus. Nustatyta, kad krioatsparumas priklauso nuo nesočiųjų riebalų rūgščių santykio ląstelės membranose. Jei užšaldymui atsparumas didesnis, daugiau yra nesočiųjų rūgščių ir

mažiau sočiųjų. Saugojimo metu geriau išlieka ląstelės, turinčios daugiau ciklinių C19:0 rūgščių [1]. Tai galėtų paaiškinti ir geresnį gramneigiamų mikroorganizmų atsparumą šaldymui, nes jų membranose daugiau lipidų, kurių beveik nėra gramteigiamose ląstelėse.

Nepaisant priklausymo gramteigiamoms bakterijoms, pienarūgštės bakterijos (4–6 lentelės) pasižymi geru krioatsparumu ir išlieka gyvybingos saugojimo metu. Užšaldytos tuose pačiuose terpės variantuose *S. thermophilus*, *L. bulgaricus*, *L. lactis* kultūros išsilaiko gerai ir ląstelių skaičius po metų svyruoja pradiniam lygyje. Sunku tiksliau įvertinti gyvybingumo tyrimų rezultatus dėl naudojamo tikėtiniausio skaičiaus metodo, bet augimas iki 7 skiedinio rodo pakankamai didelį ląstelių skaičių.

Gerą pienarūgščių bakterijų gyvybingumą po užšaldymo ir ilgalaikio saugojimo patvirtina ir *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetyllactis* ir *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *paracitrovorus* kultūrų, išlaikytų minus 18 °C temperatūroje 3–5 metus, tyrimo duomenys. Greta gyvų ląstelių skaičiaus kultūrų aktyvumas buvo apibūdinamas ir pieno surauginimo trukme po atgaivinimo ir pirmo persodinimo. Nustatyta, kad *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetyllactis* ląstelių skaičius po atgaivinimo liko pradiniam lygyje ir siekė 10^5 – 10^6 , pienas buvo suraugintas mažiau nei per parą, o po pirmo persodinimo – per 18 h, mikroskopinis vaizdas būdingas (7 lentelė).

2 lentelė. *B. cereus* ląstelių gyvybingumas priklausomai nuo saugojimo temperatūros ir apsauginės terpės sudėties. Ląstelių skaičius bandymo pradžioje $(6,3 \pm 1,9) \cdot 10^6$

Terpės sudėtis	Gyvų ląstelių skaičius				
	Minus 18 °C		Minus 72 °C		Minus 72 °C, lyginant su minus 18 °C, kartai
	KSV/ml	Likutis, proc. nuo pradinio sk.	KSV/ml	Likutis, proc. nuo pradinio sk.	
1. Smegenų ir širdies sultinys su 20 % glicerino	$(2,0 \pm 0,5) \cdot 10^1$	$0,32 \cdot 10^{-5}$	$(1,7 \pm 0,4) \cdot 10^5$	2,7	85000
2. Smegenų ir širdies sultinys su 30 % glicerino	0,0	-	$(5,7 \pm 1,5) \cdot 10^4$	0,9	57000
3. Smegenų ir širdies sultinys su 40 % glicerino	$(2,0 \pm 0,3) \cdot 10^1$	$0,32 \cdot 10^{-5}$	$(7,6 \pm 1,7) \cdot 10^4$	1,2	38000
4. Nugriebtas pienas su 20 % glicerino	$(3,0 \pm 0,7) \cdot 10^2$	$0,48 \cdot 10^{-5}$	$(5,6 \pm 0,9) \cdot 10^5$	8,9	1870
5. Nugriebtas pienas su 30 % glicerino	$(4,7 \pm 1,2) \cdot 10^2$	$0,75 \cdot 10^{-5}$	$(1,9 \pm 0,3) \cdot 10^6$	30,1	4050
6. Nugriebtas pienas su 40 % glicerino	$(1,5 \pm 0,2) \cdot 10^2$	$0,24 \cdot 10^{-5}$	$(6,4 \pm 3,5) \cdot 10^5$	10,1	4270

3 lentelė. *S. typhimurium* ląstelių gyvybingumas priklausomai nuo saugojimo temperatūros ir apsauginės terpės sudėties. Ląstelių skaičius bandymo pradžioje $(8,3 \pm 2,7) \cdot 10^7$

Terpės sudėtis	Gyvų ląstelių skaičius				
	Minus 18 °C		Minus 72 °C		Minus 72 °C, lyginant su minus 18 °C, kartai
	KSV/ml	Likutis, proc. nuo pradinio sk.	KSV/ml	Likutis, proc. nuo pradinio sk.	
1. Smegenų ir širdies sultinys su 20 % glicerino	$(2,9 \pm 0,7) \cdot 10^7$	35,1	$(6,1 \pm 0,9) \cdot 10^7$	73,5	2,1
2. Smegenų ir širdies sultinys su 30 % glicerino	$(4,0 \pm 1,2) \cdot 10^7$	48,2	$(7,5 \pm 1,5) \cdot 10^7$	90,4	1,8
3. Smegenų ir širdies sultinys su 40 % glicerino	$(3,4 \pm 0,3) \cdot 10^7$	40,1	$(5,8 \pm 0,5) \cdot 10^7$	70,0	1,7
4. Nugriebtas pienas su 20 % glicerino	$(4,0 \pm 0,7) \cdot 10^7$	48,2	$(6,4 \pm 1,2) \cdot 10^7$	77,1	1,6
5. Nugriebtas pienas su 30 % glicerino	$(6,0 \pm 1,3) \cdot 10^7$	72,3	$(6,1 \pm 0,5) \cdot 10^6$	73,5	1,0
6. Nugriebtas pienas su 40 % glicerino	$(6,2 \pm 0,5) \cdot 10^7$	74,7	$(6,8 \pm 1,2) \cdot 10^7$	81,9	1,1

4 lentelė. *S. thermophilus* ląstelių gyvybingumas priklausomai nuo saugojimo temperatūros ir apsauginės terpės sudėties. Ląstelių skaičius bandymo pradžioje $(6,6 \pm 2,1) \cdot 10^7$

Terpės sudėtis	Gyvų ląstelių skaičius	
	Minus 18 °C	Minus 72 °C
	KSV/ml	KSV/ml
1. Smegenų ir širdies sultinys su 20 % glicerino	$(2,5 \pm 0,0) \cdot 10^6$	$(2,5 \pm 0,0) \cdot 10^6$
2. Smegenų ir širdies sultinys su 30 % glicerino	$(2,5 \pm 0,0) \cdot 10^6$	$(2,5 \pm 0,0) \cdot 10^7$
3. Smegenų ir širdies sultinys su 40 % glicerino	$(6,0 \pm 0,0) \cdot 10^6$	$(2,5 \pm 0,0) \cdot 10^7$
4. Nugriebtas pienas su 20 % glicerino	$(2,5 \pm 0,0) \cdot 10^7$	$(2,5 \pm 0,0) \cdot 10^7$
5. Nugriebtas pienas su 30 % glicerino	$(6,0 \pm 0,0) \cdot 10^6$	$(6,0 \pm 0,0) \cdot 10^6$
6. Nugriebtas pienas su 40 % glicerino	$(6,0 \pm 0,0) \cdot 10^6$	$(6,0 \pm 0,0) \cdot 10^7$

5 lentelė. *L. bulgaricus* ląstelių gyvybingumas priklausomai nuo saugojimo temperatūros ir apsauginės terpės sudėties. Ląstelių skaičius bandymo pradžioje $(9,0 \pm 0,0) \cdot 10^6$

Terpės sudėtis	Gyvų ląstelių skaičius, KSV/ml	
	Minus 18 °C	Minus 72 °C
1. Smegenų ir širdies sultinys su 20 % glicerino	$(6,0 \pm 0,0) \cdot 10^6$	$(2,5 \pm 0,0) \cdot 10^6$
2. Smegenų ir širdies sultinys su 30 % glicerino	$(6,0 \pm 0,0) \cdot 10^6$	$(2,5 \pm 0,0) \cdot 10^6$
3. Smegenų ir širdies sultinys su 40 % glicerino	$(2,5 \pm 0,0) \cdot 10^7$	$(2,5 \pm 0,0) \cdot 10^6$
4. Nugriebtas pienas su 20 % glicerino	$(2,5 \pm 0,0) \cdot 10^6$	$(2,5 \pm 0,0) \cdot 10^7$
5. Nugriebtas pienas su 30 % glicerino	$(2,5 \pm 0,0) \cdot 10^6$	$(6,0 \pm 0,0) \cdot 10^7$
6. Nugriebtas pienas su 40 % glicerino	$(6,0 \pm 0,0) \cdot 10^6$	$(6,0 \pm 0,0) \cdot 10^6$

6 lentelė. *L. lactis* ląstelių gyvybingumas priklausomai nuo saugojimo temperatūros ir apsauginės terpės sudėties. Ląstelių skaičius bandymo pradžioje $(6,6 \pm 2,1) \cdot 10^6$

Terpės sudėtis	Gyvų ląstelių skaičius, KSV/ml	
	Minus 18 °C	Minus 72 °C
1. Smegenų ir širdies sultinys su 20 % glicerino	$(2,5 \pm 0,0) \cdot 10^6$	$(6,0 \pm 0,0) \cdot 10^6$
2. Smegenų ir širdies sultinys su 30 % glicerino	$(6,0 \pm 0,0) \cdot 10^7$	$(6,0 \pm 0,0) \cdot 10^6$
3. Smegenų ir širdies sultinys su 40 % glicerino	$(6,0 \pm 0,0) \cdot 10^6$	$(2,5 \pm 0,0) \cdot 10^7$
4. Nugriebtas pienas su 20 % glicerino	$(6,0 \pm 0,0) \cdot 10^6$	$(2,5 \pm 0,0) \cdot 10^7$
5. Nugriebtas pienas su 30 % glicerino	$(6,0 \pm 0,0) \cdot 10^6$	$(2,5 \pm 0,0) \cdot 10^6$
6. Nugriebtas pienas su 40 % glicerino	$(2,5 \pm 0,0) \cdot 10^6$	$(2,5 \pm 0,0) \cdot 10^6$

7 lentelė. *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* padermių, išlaikytų 3 metus minus 18 °C temperatūroje, gyvybingumas ir savybės po atgaivinimo

Eil. Nr.	Padermė	Surūgimo laikas po atgaivinimo	Surūgimo laikas po 1 persodinimo	Gyvų ląstelių skaičius po atšildymo 1ml	Mikroskopinis vaizdas po atgaivinimo
1	dl 481/8	18	18	10^5	diplokokai, tr., ilg. gr.
2	dl 563/3	20	18	10^5	diplokokai, tr., ilg. gr.
3	dl 635	18	18	10^5	diplokokai, tr., ilg. gr.
4	dl 149 II	18	18	10^6	diplokokai, tr. gr.
5	dl 57	20	18	10^6	diplokokai, tr. gr.
6	dl 405/1	20	18	10^6	diplokokai, tr. gr.
7	dl 130	20	18	10^6	diplokokai, tr. gr.
8	dl 55/30	20	18	10^5	diplokokai, tr., ilg. gr.
9	dl 43/2	20	18	10^6	diplokokai, tr. gr.
10	dl 405/8	18	18	10^6	diplokokai, tr. gr.
11	dl 361/2	18	18	10^5	diplokokai, retai tr. gr.
12	dl 4	20	18	10^5	diplokokai, tr. gr.
13	dl 391/1	18	18	10^6	diplokokai, tr., ilg. gr.
14	dl 768/5	18	18	10^6	diplokokai, tr., ilg. gr.
15	dl x	18	18	10^5	diplokokai
16	dl 138	18	18	10^6	diplokokai, tr. gr.
17	dl 75	18	18	10^6	diplokokai, tr. gr.
18	dl n	18	18	10^6	diplokokai, tr. gr.
19	dl 448/2	18	18	10^6	diplokokai, tr. gr.
20	dl 531	18	18	10^6	diplokokai, tr. gr.
21	dl 149 I	20	18	10^6	diplokokai, tr. gr.
22	dl 378/1	20	18	10^6	diplokokai, tr. gr.

L. lactis subsp. *lactis* biovar. *paracitrovorus* padermės išsiskiria mažesniu aktyvumu, pieną traukina ilgiau, nors gyvų ląstelių liko panašus skaičius, taigi ir po užšaldymo atskiros padermės pieną sutraukina per 2–3 paras, toks aktyvumas išlieka ir po pirmo persodinimo steriliame piene

(8–9 lentelės). Galima pažymėti, kad gyvybingos išliko visos užšaldytos padermės, mikroskopinis vaizdas būdingas. Analogiški rezultatai gauti ir su kita grupe šios rūšies mikroorganizmų, išlaikytų minus 18 °C temperatūroje 4 metus.

8 lentelė. *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *paracitrovorus* padermių, išlaikytų 5 metus (užšaldyta 2001 m.) minus 18 °C temperatūroje, gyvybingumas ir savybės po atgaivinimo

Eil. Nr.	Padermė	Surūgimo laikas po atgaivinimo	Surūg. laikas po 1 pers.	Gyvų ląstelių skaičius po atšildymo 1ml	Mikroskopinis vaizdas po atgaivinimo
1	DF 75	46	46	10 ⁵	diplokokai, tr. gr.
2	24/33	44	44	10 ⁶	diplokokai, tr. gr.
3	P 22/4	72	72	10 ⁵	diplokokai, tr. gr.
4	11/24 I	72	72	10 ⁵	diplokokai, tr. gr.
5	43/1	72	72	10 ⁶	diplokokai, tr. gr.
6	P22/9	72	72	10 ⁶	diplokokai, yra grand.
7	11/22	96	96	10 ⁶	diplokokai, tr. gr.
8	A2/2	96	96	10 ⁵	diplokokai, tr. gr.
9	A2/7	96	96	10 ³	diplokokai, tr. gr.
10	9/2-25	96	96	10 ³	diplokokai, tr. gr.

9 lentelė. *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *paracitrovorus* padermių, išlaikytų 4 metus (užšaldyta 2002 m.) minus 18 °C temperatūroje, gyvybingumas ir savybės po atgaivinimo

Eil. Nr.	Padermė	Surūgimo laikas po atgaivinimo	Surūgimo laikas po 1 persodinimo	Gyvų ląstelių skaičius po atšildymo 1ml	Mikroskopinis vaizdas po atgaivinimo
1	P 23/12	48	48	10 ⁵	diplokokai, retai tr. gr.
2	21/30	48	48	10 ⁵	diplokokai, retai tr. gr.
3	69/75	48	48	10 ⁶	diplokokai, retai tr. gr.
4	P22/44	48	48	10 ⁵	diplokokai, retai tr. gr.
5	24/39	48	48	10 ⁶	diplokokai, retai tr. gr.
6	P22/9	48	48	10 ⁶	diplokokai, retai tr. gr.
7	43/7	48	48	10 ⁶	diplokokai, retai tr. gr.
8	542/16	48	48	10 ⁶	diplokokai, tr. gr.
9	9/2-25	48	48	10 ⁴	diplokokai, tr. gr.
10	18/24-I	48	48	10 ⁵	diplokokai
11	A209	50	48	10 ⁶	diplokokai, tr. gr.
12	A244	50	50	10 ⁶	diplokokai, retai tr. gr.
13	A 2/2	50	50	10 ⁶	diplokokai, retai tr. gr.
14	T/22	50	50	10 ⁶	diplokokai, retai tr. gr.
15	A210	72	72	10 ⁵	diplokokai
16	A204	98	96	10 ²	diplokokai

Tyrimų apibendrinimas

Saugojimo metu *S. aureus* ląstelių skaičius sumažėjo visuose terpės variantuose, minus 18 °C temperatūroje gyvybingumas siekia tik 1–2 %, minus 72 °C temperatūroje išlieka keliolika–keliasdešimt kartų daugiau gyvų mikroorganizmų, visuose mėginiuose gyvų ląstelių lieka 25–30 % nuo pradinio skaičiaus.

Laikymo sąlygos netinka *B. cereus*, minus 18 °C temperatūroje gyvų *B. cereus* ląstelių po metų

išlaikymo beveik nelieka visuose terpės variantuose, o smegenų ir širdies sultinyje su 30 % glicerino jų visai neaptikta. Šioje terpėje ir minus 72 °C temperatūroje nustatytas mažiausias išlikusių ląstelių skaičius. Terpėje smegenų ir širdies sultinio pagrindu su visomis glicerino koncentracijomis lieka mažai gyvų ląstelių, nugriebto pieno terpėje rezultatai geresni – lieka 10–30 % pradinio skaičiaus gyvų ląstelių.

S. typhimurium gyvybingesnės abiejose temperatūrose ir visuose terpės variantuose išlieka daugiau gyvų ląstelių. Terpėje smegenų ir širdies sultinio pagrindu minus 18 °C temperatūroje gyvybingumas siekia 35–48 %, nugriebto pieno terpėje gyvybingumas siekia 50–70 %. Minus 72 °C temperatūroje visuose terpės variantuose gyvybingumas didesnis iki 2 kartų. Geresnį gramneigiamų mikroorganizmų atsparumą šaldymui galėtų paaiškinti tai, kad jų membranose daugiau lipidų, kurių beveik nėra gramteigiamose ląstelėse.

Pienarūgštės bakterijos pasižymi geru krioatsparumu ir išlieka gyvybingos saugojimo metu. Visuose terpės variantuose *S. thermophilus*, *L. bulgaricus*, *L. lactis* kultūrų ląstelių skaičius po metų svyruoja pradiniam lygyje, ką rodo augimas iki 7 skiedinio.

Lactococcus lactis subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* ir *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *paracitrovorus* kultūros ne taip aktyviai raugina pieną. Nustatyta, kad *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* ląstelių skaičius išlaikius 3 metus po atgaivinimo svyravo pradiniam lygyje ir siekė 10^5 – 10^6 , pienas buvo suraugintas mažiau negu per parą, o po pirmo persodinimo – per 18 h, mikroskopinis vaizdas būdingas.

L. lactis subsp. *lactis* biovar. *paracitrovorus* padermės išsiskiria dar mažesniu aktyvumu, pieną traukina ilgiau, nors gyvų ląstelių liko panašus skaičius, taigi ir po užšaldymo atskiros padermės pieną sutraukina per 2–3 paras, toks aktyvumas išlieka ir po pirmojo persodinimo steriliame piene.

Išvados

1. Saugojimo metu *S. aureus* ląstelių skaičius sumažėja visuose terpės variantuose, minus 18 °C temperatūroje gyvybingumas siekia tik 1–2 %, minus 72 °C temperatūroje gyvų ląstelių lieka 25–30 % pradinio skaičiaus. Minus 18 °C temperatūroje gyvų *B. cereus* ląstelių po metų išlaikymo beveik nelieka, minus 72 °C temperatūroje lieka 10–30 % pradinio skaičiaus. *S. typhimurium* gyvybingesnės, minus 18 °C temperatūroje gyvybingumas siekia 35–48 %, minus 72 °C temperatūroje visuose terpės variantuose gyvybingesnės iki 2 kartų.
2. Pienarūgštės bakterijos pasižymi geru krioatsparumu ir išlieka gyvybingos saugojimo metu. Visuose terpės variantuose *S. thermophilus*, *L. bulgaricus*, *L. lactis* kultūrų ląstelių skaičius po metų svyruoja pradiniam lygyje.
3. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* ir *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *paracitrovorus* kultūrų ląstelių skaičius išlaikius 3–5 metus minus 18 °C temperatūroje

svyruoja pradiniam lygyje, po atgaivinimo siekia 10^6 , pieno rauginimo aktyvumas ir mikroskopinis vaizdas būdingas.

Literatūra

1. Wang Y., Corrieu G., Beal C. Fermentation and temperature influence the cryotolerance of *Lactobacillus acidophilus* RD758 // Journal of Dairy Science. 2005. Vol. 88, No. 1. P. 21–29.
2. Šarkinas A. Mikroorganizmų kultūrų atsparumo užšaldymo sąlygoms priklausomybė nuo terpės sudėties ir laikymo temperatūros // Veterinarija ir zootechnika. 2006. T. 34(56). P. 76–83.
3. Neve H., Back A., Heller K. J. Prophage screening in a *Streptococcus thermophilus* starter culture collection // Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte. 2004. Vol. 56(4). P. 265–275.
4. Zayed G., Roos Y. H. Influence of trehalose and moisture content on survival of *Lactobacillus salivarius* subjected to freeze-drying and storage // Process Biochemistry. 2004. Vol. 9(9). P. 1081–1086.
5. Oldenhof H., Wolkers W. F., Fonseca F., Passot S., Marin M. Effect of sucrose and maltodextrin on the physical properties and survival of air-dried *Lactobacillus bulgaricus*: an in situ Fourier transform infrared spectroscopy study // Biotechnology Progress. 2005. Vol. 21(3). P. 885–892.
6. Giulio B., Orlando P., Barba G., Coppola R., Rosa M., Sada A., Princo P., Nazaro F. Use of alginate and cryo-protective sugars to improve the viability of lactic acid bacteria after freezing and freeze-drying // World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2005. Vol. 21(5). P. 739–746.
7. Dziugan P., Malinowska S., Włodarczyk M., Kusewicz D. Wpływ szoku zimna na liofilizację bakterii mlekowych i drożdzy // Folia Universitatis Agriculturae Stetinensis. 2005. Vol. 246(4). P. 77–86.
8. Zhao G., Zhang G. Effect of protective agents, freezing temperature, rehydration media on viability of malolactic bacteria subjected to freeze-drying // Journal of Applied Microbiology. 2005. Vol. 99(2). P. 333–338.
9. Friesen T. J., Holloway G., Hill G. A., Pugsley T. S. Effect of conditions and protectants on the survival of *Penicillium bilaiae* during storage // Biocontrol Science and Technology. 2005. Vol. 16(1/2). P. 89–98.
10. Mille Y., Girard J. P., Beney L., Gervais P. Air drying optimization of *Saccharomyces cerevisiae* through its water-glycerol dehydration properties // Journal of Applied Microbiology. 2005. Vol. 99(2). P. 376–382.
11. Capela P., Hay T. K. C., Shah N. P. Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze-dried yoghurt // Food Research International. 2006. Vol. 39(2). P. 203–211.
12. Dziugan P., Malinowska S., Włodarczyk M., Kusewicz D. Wpływ adaptacji niskotemperaturowej bakterii fermentacji mlekowej i drożdzy na

kriotolerancje // Folia Universitatis Agriculturae Stetinensis. 2005. Vol. 246(4). P. 67–75.

13. **Ziadi M., Touhami Y., Achour M., Thonart P., Hamdi M.** The effect of heat stress on freeze-drying and conservation of *Lactococcus* // Biochemical Engineering Journal. 2005. Vol. 24(2). P. 141–145.

Pateikta spaudai 2007-10

A. Šarkinas

SELECTION OF FROZEN STORAGE CONDITIONS FOR MICROORGANISM CULTURES

Summary

In assessing the impact of the protective medium composition and storage temperature on the vitality of cells, the cultures of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), and *Bacillus cereus* (ATCC 10876) were studied. Samples of protective medium were prepared, i. e. reconstituted dried skim milk with 20, 30 and 40 % glycerin and brain-heart infusion with 20, 30 and 40 % glycerin. The samples were tested at -18 °C and -72 °C.

It is more appropriate to store cultures at -72 °C, however, the resistance of different microorganism species to storage conditions varies. At both temperatures major cells of *S. typhimurium* survive in all the media samples. The resistance of *S. aureus* to storage conditions is average. The resistance of *B. cereus* is the weakest: at the end of the experiment only percentiles of the culture remain in the samples.

The resistance of lactic acid bacteria cultures (*S. thermophilus*, *L. bulgaricus*, and *L. lactis*) was found to be better; the vitality of the cultures was ensured by both temperatures (-18 °C and -72 °C) in the different samples of protective medium.

The strains of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* ir *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *paracitrovorus* frozen in reconstituted skim milk with 10 % of glycerin were stored at -18 °C for three-five years. During this period 22 strains of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* retained their vitality, the number of cells in the defrosted medium varied between ten thousands to millions.

The 10 and 16 frozen strains of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *paracitrovorus* remained active, the number of vital cells varying from hundreds thousands to

millions, the cultures retained sufficient vitality and promoted milk fermentation within 2–4 days. The morphological characteristics of strains were found to be stabile, with dyplococcus predominating in microscopic preparations and longer and shorter chains.

Keywords: lactic acid bacteria, frozen storage, vitality.

А. Шаркинас

ПОДБОР УСЛОВИЙ СОХРАНЕНИЯ ЗАМОРОЖЕННЫХ КУЛЬТУР

Резюме

Культуры *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus cereus* (ATCC 10876) хранились в замороженном виде с целью оценки влияния состава среды и температуры хранения. Защитные среды готовились на основе обезжиренного молока и бульона мозга и сердца с добавлением 20, 30 и 40 % глицерина. Культуры хранились при температурах минус 72 °C и минус 18 °C.

Температура минус 72 °C более пригодна для сохранения культур по сравнению с минус 18 °C, хотя устойчивость штаммов различается. Более устойчивы *S. typhimurium*, устойчивость *S. aureus* средняя, *B. cereus* лучше сохраняется при температуре минус 72 °C, а при минус 18 °C в некоторых вариантах не выживает.

Молочнокислые бактерии *S. thermophilus*, *L. bulgaricus*, *L. lactis* хорошо сохранились в течение года во всех вариантах среды при обеих температурах.

Lactococcus lactis subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* и *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *paracitrovorus* в обезжиренном молоке с 10 % глицерина при температуре минус 18 °C сохранились в течение 3–5 лет.

22 штамма *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* сохранили жизнеспособность в течение 3 лет, количество жизнеспособных клеток достигало миллионов, они остались активными и свертывали молоко в течение 18 часов, морфологические особенности остались устойчивыми.

Заморожено две группы культур *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *paracitrovorus* по 10 и 16 штаммов, через 4 и 5 лет они остались активными и жизнеспособными.