

SYLWIA ŚCIESZKA, ELŻBIETA KLEWICKA, DOROTA ŻYŻELEWICZ

**WPLYW ALG *CHLORELLA VULGARIS* NA PRZEŻYWALNOŚĆ BAKTERII  
*LACTOBACILLUS BREVIS* W OBECNOŚCI WYSOKICH STĘŻEŃ  
CHLORKU SODU**

Streszczenie

Połączenie alg z produktami fermentowanymi bogatymi w bakterie fermentacji mlekowej przynosi wiele korzyści zdrowotnych oraz pozwala na utworzenie nowego segmentu żywności fermentowanej. Jedną z efektywnych metod utrwalania żywności jest stosowanie procesu odwodnienia osmotycznego polegającego na dodaniu substancji (np. chlorku sodu) obniżającej aktywność wody w produkcie.

Celem pracy było określenie wpływu *Chlorella vulgaris* na przeżywalność bakterii *Lactobacillus brevis* w niekorzystnych warunkach środowiskowych (duże stężenia chlorku sodu) metodą płytkową oraz turbidymetryczną. Zawartość 5 i 10 % chlorku sodu w środowisku wzrostowym bakterii obniżyła statystycznie istotnie liczbę badanych bakterii fermentacji mlekowej. Jednakże dodatek alg *Chlorella vulgaris* zabezpieczył badane szczepy *Lactobacillus brevis* przed obumieraniem. Ponadto w przypadku szczepów *Lactobacillus brevis* LOCK 0944 oraz LOCK 0992 nie zaobserwowano różnic statystycznie istotnych pomiędzy próbą kontrolną z bakteriami i *Chlorella vulgaris* a próbą badaną z bakteriami, algami oraz dodatkiem 10 % chlorku sodu w 48 godzinie inkubacji. Zatem wprowadzenie alg do środowiska wzrostowego bakterii fermentacji mlekowej zredukowało niekorzystne działanie chlorku sodu o stężeniu 10 %. Stwierdzono, że przeżywalność wszystkich badanych szczepów *Lactobacillus brevis* hodowanych w obecności *Chlorella vulgaris* po 48-godzinnej inkubacji była wyższa w środowisku o stężeniu 10 % chlorku sodu niż w obecności 5 %. Za pomocą skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM) stwierdzono, że prawdopodobnie spowodowane to było uwolnieniem dodatkowej treści komórek alg.

**Słowa kluczowe:** *Chlorella vulgaris*, *Lactobacillus brevis*, niekorzystne warunki środowiskowe, chlorek sodu

---

Mgr inż. S. Ścieszka, prof. dr hab. inż. E. Klewicka, Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii, Wydz. Biotechnologii i Nauk o Żywności, Politechnika Łódzka, ul. Wólczańska 171/173, 90-924 Łódź, dr hab. inż. D. Żyżelewicz, prof. nadzw., Instytut Technologii i Analizy Żywności, Wydz. Biotechnologii i Nauk o Żywności, Politechnika Łódzka, ul. Stefanowskiego 4/10, 90-924 Łódź.  
Kontakt: sylwia.scieszka@edu.p.lodz.pl

## Wprowadzenie

Algi są bogatym źródłem błonnika pokarmowego, wielu cennych witamin i pierwiastków, a także wytwarzają szeroką gamę cennych substancji bioaktywnych [1, 2, 7]. Ponadto wykazują właściwości przeciwutleniające, przeciwbakteryjne, przeciwwirusowe, przeciwgrzybicze oraz przejawiają działanie prebiotyczne, neuroochronne, przeciwzapalne, immunomodulacyjne, przeciwcukrzycowe, przeciwwkrzepowe i przeciwnowotworowe [2]. Mikroalgi należące do gatunku *Chlorella* otrzymały status GRAS (ang. *Generally Regarded as Safe*) [6]. Ze względu na swoje właściwości algi mogą być wykorzystywane do projektowania fermentowanej żywności funkcjonalnej [3, 4, 5]. Połączenie produktów fermentowanych, bogatych w bakterie kwasu mlekowego, z algami pozwala nie tylko na uzyskanie produktów zasobnych w niezbędne składniki odżywcze, ale również na utworzenie nowego segmentu żywności fermentowanej. Pomimo tak wielu korzyści wynikających z połączenia alg z bakteriami fermentacji mlekowej istnieje niewiele badań na temat wykorzystania alg w żywności fermentowanej [12]. Jednakże, aby bakterie fermentacji mlekowej mogły pozytywnie wpływać na organizm gospodarza, muszą charakteryzować się wysoką przeżywalnością w niekorzystnych warunkach środowiskowych, a także podczas stosowania metod utrwalania żywności. Jednym ze sposobów na przedłużenie trwałości żywności oraz podwyższenie cech jakościowych produktu jest zastosowanie zjawiska odwodnienia osmotycznego [11]. Proces ten polega na dodaniu substancji (np. NaCl) wytwarzającej wysokie ciśnienie osmotyczne i powodującej obniżenie aktywności wody w produkcie [10].

Celem pracy było określenie wpływu alg *Chlorella vulgaris* na przeżywalność bakterii z gatunku *Lactobacillus brevis* w niekorzystnych warunkach środowiskowych (duże stężenia chlorku sodu).

## Material i metody badań

Material biologiczny stanowiły cztery szczepy bakterii z gatunku *Lactobacillus brevis* wyizolowane ze spontanicznych kiszzonek roślinnych. Trzy z nich, należące do gatunku *Lactobacillus brevis* LOCK 0944, LOCK 0980 oraz LOCK 0992, zdeponowane są w Kolekcji Czystych Kultur Drobnoustrojów Przemysłowych LOCK 105 (Łódź, Polska). Sekwencję szczepu *Lactobacillus brevis* MG451813 zdeponowano w biotechnologicznej bazie danych GenBank National Center. Bakterie fermentacji mlekowej hodowano w płynnym podłożu MRS (DeMan, Rogosa, & Sharpe, Merck, Niemcy) przez 48 h w temp. 30 °C.

Material doświadczalny stanowiła sproszkowana *Chlorella vulgaris* (suplement diety, Bellis Food, Chiny). W badaniach zastosowano 1,5-procentowe stężenie alg, które wynika z dziennej dawki zalecanej przez producenta do spożycia.

Wpływ *Chlorella vulgaris* na przeżywalność bakterii fermentacji mlekowej w obecności 5 i 10 % chlorku sodu oznaczano metodami turbidymetryczną oraz płytkową. W pierwszej metodzie używano czytnika mikropłytek TriStar<sup>2</sup> S LB 942 (Berthold Technologies, Niemcy), a pomiary absorbancji wykonywano w 0, 2, 4, 6, 16, 21, 24 i 48 godzinie inkubacji przy  $\lambda = 540$  nm. W metodzie płytkowej stosowano podłoże MRS agar (DeMan, Rogosa & Sharpe, Merck, Niemcy). Posiewy wykonywano w punktach czasowych: 0, 24 oraz 48 godzina.

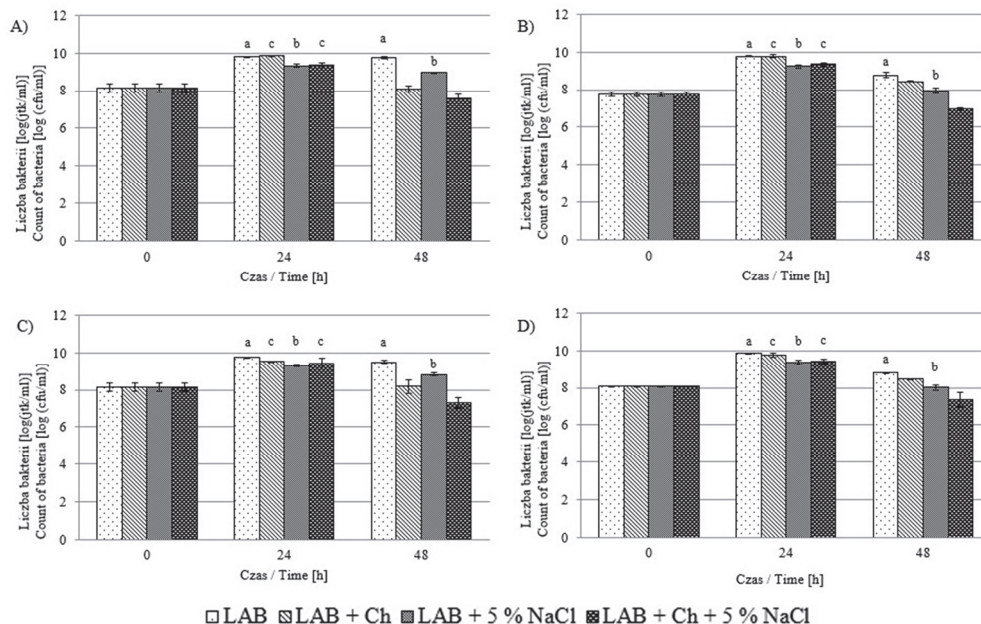
Wykonano test istotności różnic ANOVA (jednoczynnikowy) za pomocą programu OriginPro 2017 ( $p \leq 0.05$ ). Różnice pomiędzy wartościami średnimi oznaczeń weryfikowano testem Tukeya ( $p \leq 0.05$ ).

Przeprowadzono również ocenę wpływu chlorku sodu na strukturę *Chlorella vulgaris* z wykorzystaniem skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM ang. scanning electron microscope) JEOL JFC 1200 fine coater manual (Japonia). Zastosowano następujące parametry napyłania złotem: ciśnienie – 8 Pa, natężenie prądu – 30 mA, czas – 30 s.

## Wyniki i dyskusja

Obecność 5 % chlorku sodu w środowisku wzrostowym obniżyła statystycznie istotnie liczbę badanych bakterii *Lactobacillus brevis* zarówno w 24, jak i w 48 godzinie hodowli (rys. 1). Wprowadzenie do medium alg *Chlorella vulgaris* zabezpieczyło badane bakterie fermentacji mlekowej przed obumieraniem. W 24 godzinie dodatek 5 % chlorku sodu do próbek z algami spowodował nieznaczne zmniejszenie namnożenia bakterii fermentacji mlekowej, jednak w przypadku wszystkich badanych bakterii różnice te nie były statystycznie istotne.

Porównano wyniki przeżywalności bakterii fermentacji mlekowej w obecności dużych stężeń chlorku sodu uzyskane metodą płytkową i metodą turbidymetryczną. Jako przykład przedstawiono wzrost szczepu *Lactobacillus brevis* ŁOCK 0944 (rys. 2). W przypadku metody płytkowej zaobserwowano wzrost liczby bakterii do 24 godziny, a następnie obniżenie namnożenia biomasy w 48 godzinie. Przy zastosowaniu metody turbidymetrycznej stwierdzono natomiast wzrost bakterii *Lactobacillus brevis* ŁOCK 0944 również w 48 godzinie inkubacji. Wyniki uzyskane metodą turbidymetryczną nasunęły pewne wątpliwości. Prawdopodobnie wzrost liczby bakterii w 48 godzinie hodowli spowodowany był tym, że metodą turbidymetryczną oznaczane były wszystkie komórki żywe, również te w stadium VBNC (ang. *viable but non culturable*) oraz martwe [8]. Zatem w dalszej części pracy nie przedstawiono wyników uzyskanych metodą turbidymetryczną.

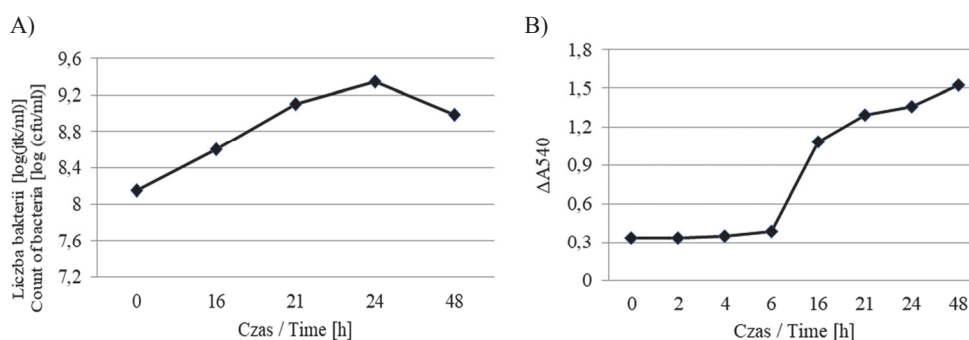


Objaśnienia / Explanatory notes:

LAB – bakterie fermentacji mlekowej / lactic acid bacteria; Ch – *Chlorella vulgaris*. Na rysunku przedstawiono wartości średnie (w postaci słupków) i odchylenia standardowe (w postaci odcinków) / Figure shows mean values (bars) and standard deviations (line segments);  $n = 4$ ; a-d – różnice statystycznie istotne między średnimi wartościami liczby bakterii tych samych szczepów w obrębie jednego przedziału czasowego ( $p \leq 0.05$ ) / statistically significant differences between mean values of the count of bacteria of the same strains within one time interval ( $p \leq 0.05$ ).

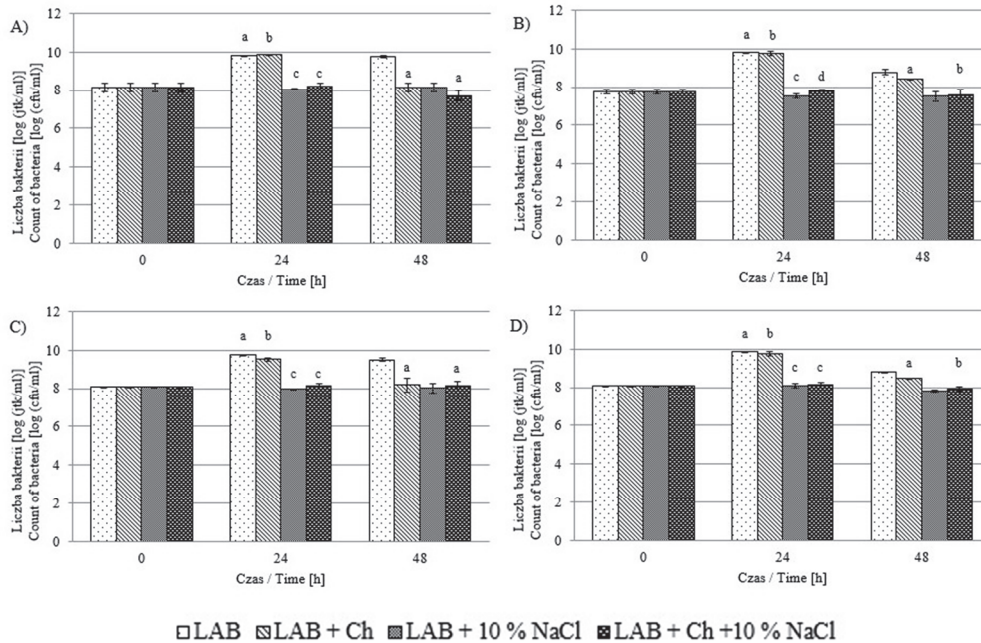
Rys. 1. Przeżywalność bakterii *Lactobacillus brevis*: A) LOCK 0944, B) LOCK 0980, C) LOCK 0992, D) MG451814 w obecności 5 % chlorku sodu

Fig. 1. Survival of *Lactobacillus brevis* bacteria: A) LOCK 0944, B) LOCK 0980, C) LOCK 0992, D) MG451814 in the presence of 5 % sodium chloride



Rys. 2. Wzrost bakterii *Lactobacillus brevis* LOCK 0944 w obecności 5 % chlorku sodu oznaczony A) metodą płytkową, B) metodą turbidymetryczną

Fig. 2. Growth of bacteria *Lactobacillus brevis* LOCK 0944 in the presence of 5 % sodium chloride, determined A) by plate method, B) turbidimetric method



Objaśnienia jak pod rys. 1. / Explanatory notes as under Fig. 1.

Rys. 3. Przeżywalność bakterii *Lactobacillus brevis*: A) LOCK 0944, B) LOCK 0980, C) LOCK 0992, D) MG451814 w obecności 10 % chlorku sodu

Fig. 3. Survival of *Lactobacillus brevis* bacteria: A) LOCK 0944, B) LOCK 0980, C) LOCK 0992, D) MG451814 in the presence of 10 % sodium chloride

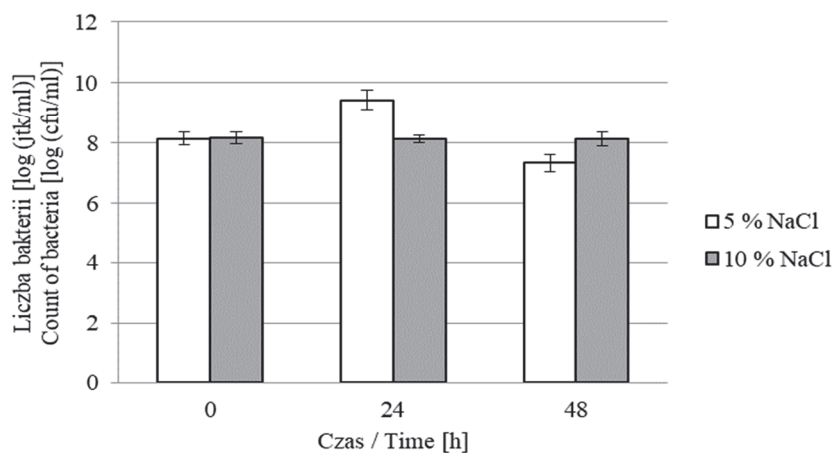
Przeżywalność badanych bakterii fermentacji mlekowej w obecności 10 % chlorku sodu przedstawiono na rys. 3. Po 24-godzinnej inkubacji stwierdzono obniżenie liczby bakterii *Lactobacillus brevis* o ok. 2 jednostki logarytmiczne w przypadku wszystkich badanych szczepów (różnice statystycznie istotne). Zatem dodatek 10 % chlorku sodu wpływał negatywnie na przeżywalność badanych bakterii fermentacji mlekowej. Wykazano również, że dodatek alg *Chlorella vulgaris* działał ochronnie na bakterie z gatunku *Lactobacillus brevis* przed procesem obumierania. Po porównaniu w 24 godzinie hodowli próbek z dodatkiem 10 % chlorku sodu w hodowlach z dodatkiem alg zaobserwowano nieznaczny wzrost liczby badanych bakterii. W przypadku szczepu *Lactobacillus brevis* LOCK 0980 różnice te były statystycznie istotne, co dowodzi, że dodatek *Chlorella vulgaris* do środowiska wzrostowego bakterii nie tylko zabezpieczał komórki przed obumieraniem w obecności 10 % chlorku sodu, ale również umożliwiał ich namnażanie. W przypadku szczepów *Lactobacillus brevis* LOCK 0944 oraz LOCK 0992 w 48 godzinie inkubacji nie zaobserwowano różnic statystycznie istotnych pomiędzy próbą kontrolną z *Chlorella vulgaris* a próbą z algami oraz

dotądkiem 10 % chlorku sodu. Uzyskane wyniki potwierdziły korzystne działanie alg *Chlorella vulgaris*, których dodatek zredukował niekorzystne działanie 10 % chlorku sodu, a tym samym zabezpieczył komórki bakterii przed obumieraniem.

Badane bakterie z rodzaju *Lactobacillus brevis* pochodzące z kiszonek roślinnych wykazywały znaczącą tolerancję na stres osmotyczny wywołany dodatkiem zarówno 5 %, jak i 10 % chlorku sodu. Olszewska i wsp. [9], którzy zbadali wpływ chlorku sodu w zakresie 0,5 ÷ 2,5 % na aktywność fizjologiczną komórek bakterii fermentacji mlekowej, również stwierdzili, że szczep *Lactobacillus brevis* wyizolowany z kiszonej kapusty wykazał tolerancję na działanie NaCl w badanym zakresie.

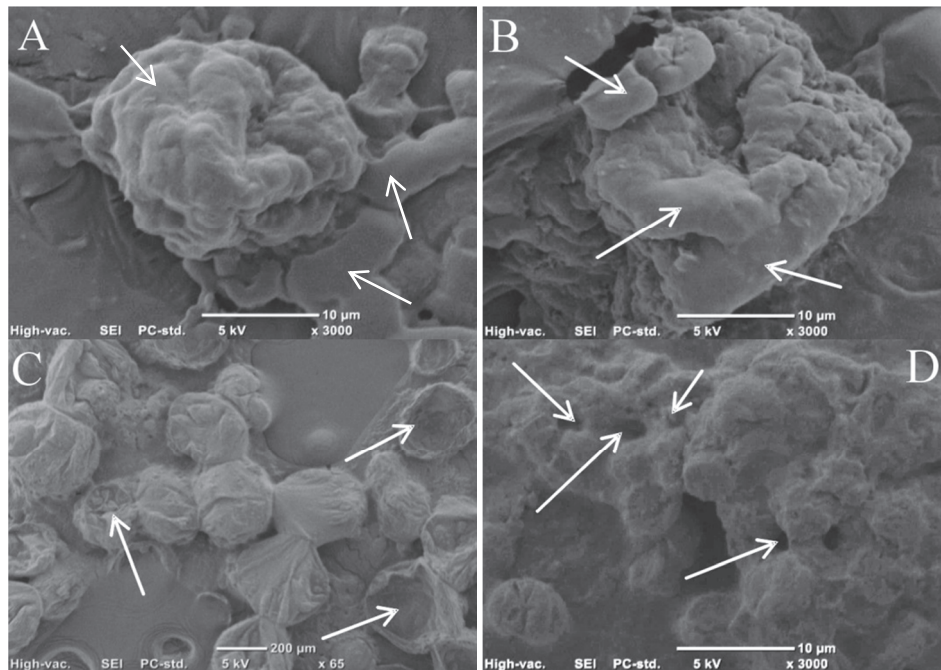
Na podstawie uzyskanych wyników wykazano, że algi *Chlorella vulgaris* dodane do hodowli bakterii *Lactobacillus brevis* (0944, 0980, 0992, MG451814) działają ochronnie w obecności dużych stężeń chlorku sodu, a nawet w zależności od szczepu mogą stymulować wzrost tych bakterii. Dzięki temu mogą znaleźć zastosowanie w projektowaniu fermentowanego produktu funkcjonalnego, a także w przemysłowych procesach produkcyjnych o zwiększonym udziale soli oraz utrwalaniu żywności metodą osmoaktywną.

Z porównania danych na rys. 1. i 3. wynika, że w 48 godzinie inkubacji przeżywalność bakterii fermentacji mlekowej hodowanych w obecności alg *Chlorella vulgaris* i w obecności 5 % chlorku sodu była niższa niż w przypadku hodowli z 10 % chlorku sodu. Przykładowe zestawienie wyników dotyczące szczepu *Lactobacillus brevis* ŁOCK 0992 zamieszczono na rys. 4.



Rys. 4. Wzrost *Lactobacillus brevis* ŁOCK 0992 hodowanego w obecności alg *Chlorella vulgaris* z dodatkiem 5 oraz 10 % chlorku sodu w 48 godzinie inkubacji

Fig. 4. Growth of *Lactobacillus brevis* ŁOCK 0992 cultured in the presence of *Chlorella vulgaris* algae in 5 and 10 % sodium chloride at 48<sup>th</sup> hour of incubation



Fot. 1. Obraz SEM A) i B) alg *Chlorella vulgaris* (próbka kontrolna), C) i D) alg *Chlorella vulgaris* inkubowanych przez 48 h w obecności 10 % chlorku sodu (próbka badana)

Photo 1. SEM image: A and B) of *Chlorella vulgaris* algae (control), C and D) of *Chlorella vulgaris* algae incubated for 48 h in the presence of 10 % sodium chloride (test sample)

Przeprowadzono analizę preparatu alg *Chlorella vulgaris* za pomocą elektronicznego mikroskopu skaningowego JEOL JFC 1200 fine coater manual. Porównano próbę kontrolną zawierającą *Chlorella vulgaris* z próbą badaną, w której algi inkubowano w obecności 10 % chlorku sodu przez 48 h (fot. 1). W próbach kontrolnych (fot. 1A i 1B) widoczne były gładkie skupiska, jakby pokryte substancją polimeryzującą. Natomiast w próbce badanej z dodatkiem 10 % chlorku sodu powierzchnia była wyraźnie porowata, przypominająca kraterę (fot. 1D). Agregaty komórek *Chlorella vulgaris* były małe i nieliczne, zdecydowanie nie uwidoczniło polimeru powierzchniowego. Ponadto zaobserwowano pojedyncze komórki, z których pod wpływem działania 10 % chlorku sodu została uwolniona treść komórki alg (fot. 1C). Ze względu na bogaty skład chemiczny alg można przypuszczać, że uwolniona treść komórki *Chlorella vulgaris* sprzyjała namnażaniu bakterii fermentacji mlekowej.

## Wnioski

1. Obecność w środowisku hodowlanym 5 i 10 % chlorku sodu powoduje obniżenie liczby badanych bakterii fermentacji mlekowej o 1 do 2 jednostek logarytmicznych.
2. Algi *Chlorella vulgaris* obecne w środowisku bakterii *Lactobacillus brevis* stanowią czynnik ochronny dla badanych bakterii w warunkach niekorzystnych, wynikających z obecności dużych stężeń chlorku sodu.
3. Dodatek *Chlorella vulgaris* do hodowli bakterii *Lactobacillus brevis* ŁOCK 0944 oraz ŁOCK 0992 w warunkach o zmiennych parametrach stresu osmotycznego (10 % NaCl) chroni komórki bakterii przed stresem, co uwidocznione jest jako stabilna żywotność bakterii w 48 godzinie hodowli.

*Podziękowanie: Autorki dziękują Panu Jarosławowi Akusińskiemu za techniczną pomoc przy analizie SEM.*

## Literatura

- [1] Borowitzka M.A.: High-value products from microalgae-their development and commercialisation. *J. Appl. Phycol.*, 2013, 25 (3), 743-756.
- [2] Charoensiddhi S., Lorbeer A.J., Franco C.M.M., Su P., Conlon M.A., Zhang W.: Process and economic feasibility for the production of functional food from the brown alga *Ecklonia radiata*. *Algal Res.*, 2018, 29, 80-91.
- [3] Cofrades S., Serdaroğlu M., Jiménez-Colmenero F.: Design of healthier foods and beverages containing whole algae. In: *Functional Ingredients from Algae for Foods and Nutraceuticals*. Ed. H. Dominguez. Woodhead Publishing Ltd., Cambridge 2013, pp. 609-633.
- [4] Heo J.-Y., Shin H.-J., Oh D.-H., Cho S.-K., Yang C.-J., Kong I.-K., Lee S.-S., Choi K.-S., Choi S.-H., Kim S.-C., Choi H.-Y., Bae I.: Quality properties of Appenzeller cheese added with *Chlorella*. *Korean J. Food Sci. Anim. Resour.*, 2006, 26 (4), 525-531.
- [5] Jeon J.-K.: Effect of *Chlorella* addition on the quality of processed cheese. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 2006, 35 (3), 373-377.
- [6] Loveday S.M.: Food proteins: Technological, nutritional, and sustainability attributes of traditional and emerging proteins. *Ann. Rev. Food Sci. Technol.*, 2019, 10 (1), 311-339.
- [7] Mohsenpour S.F., Willoughby N.: Luminescent photobioreactor design for improved algal growth and photosynthetic pigment production through spectral conversion of light. *Bioresour. Technol.*, 2013, 142, 147-153.
- [8] Oliver J.D.: The viable but nonculturable state in bacteria. *J. Microbiol.*, 2005, 43, 93-100.
- [9] Olszewska M.A., Kocot A., Gryn M., Łaniewska-Trokenheim Ł.: Odpowiedź komórek *Lactobacillus brevis* na stres osmotyczny zbadana metodą cytometrii przepływowej. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2015, 3 (100), 53-63.
- [10] Piasecka E., Uczciwek M., Klewicki R.: Odwadnianie osmotyczne owoców w roztworach zawierających fruktoolisacharydy. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2009, 2 (63), 138-153.
- [11] Qiu L., Zhang M., Tang J., Adhikari B., Cao P.: Innovative technologies for producing and preserving intermediate moisture foods: A review. *Food Res. Int.*, 2019, 116, 90-102.



- [12] Ścieszka S., Klewicka E.: Algae in food: A general review. Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 2019, 59 (21), 3538-3547.

**EFFECT OF ALGAE *CHLORELLA VULGARIS* ON SURVIVAL OF BACTERIA  
*LACTOBACILLUS BREVIS* AT HIGH CONCENTRATIONS OF SODIUM CHLORIDE**

S u m m a r y

The combination of algae and fermented products rich in lactic acid bacteria brings many health benefits and makes it possible to design a brand new segment of fermented food. One of the effective food preservation methods is the use of osmotic dehydration process consisting in adding a substance (e.g. sodium chloride) to reduce water activity in the product.

The objective of this research study was to determine the effect of *Chlorella vulgaris* on the survival of *Lactobacillus brevis* under adverse environmental conditions (high concentrations of sodium chloride) using a plate and turbidimetric method. The content of 5 and 10 % sodium chloride in the bacterial growth environment significantly reduced the count of lactic acid bacteria tested. However, adding the *Chlorella vulgaris* algae caused the tested *Lactobacillus brevis* strains to be protected from dying. Moreover, in the case of *Lactobacillus brevis* LOCK 0944 and LOCK 0992 no statistically significant differences were reported between the control sample containing bacteria plus *Chlorella vulgaris* and the tested sample with bacteria, algae and 10 % sodium chloride added in the 48<sup>th</sup> hour of incubation. Therefore, the algae introduced into the growth environment of lactic acid bacteria reduced the adverse effect of 10 % sodium chloride. It was found that the survival of all the tested *Lactobacillus brevis* strains cultured in the presence of *Chlorella vulgaris* after 48 h of incubation was higher in the presence of 10 % sodium chloride than in the case of 5 % NaCl. Using a scanning electron microscopy (SEM), it was found that this was probably owing to the release of additional content of algae cells.

**Key words:** *Chlorella vulgaris*, *Lactobacillus brevis*, adverse environmental conditions, sodium chloride

