

К.В. Беспоместных, А.Г. Галстян, Е.В. Короткая**ИССЛЕДОВАНИЕ БИОХИМИЧЕСКИХ И МОРФОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ШТАММОВ БАКТЕРИЙ РОДА *LACTOBACILLUS****

Приведены результаты исследования биохимических и морфологических свойств штаммов бактерий рода *Lactobacillus bulgaricus*. Показана возможность использования дисков с углеводами для определения видовой принадлежности изучаемых штаммов болгарской палочки по их способности ферментировать дисахариды. Исследование морфологии выделенных штаммов в фазово-контрастном микроскопе показало, что культура представлена грамположительными палочками, собранными в пары или расположенными поодиночке. Подобран оптимальный качественный и количественный состав селективных питательных сред для культивирования молочнокислых бактерий. При исследовании сахаролитических свойств штаммов болгарской палочки было установлено, что бактерии в полной мере ферментируют лактозу, а некоторые из штаммов способны усваивать сахарозу, мальтозу, маннозу.

Штаммы, молочнокислые бактерии *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*, биохимическая идентификация, морфологические свойства, культивирование, питательная среда.

Введение

В настоящее время вопрос изучения таксономии и биохимических свойств лактобацилл является актуальным. Созданы классификации этих микроорганизмов, основанные на различных признаках, и методики для их идентификации на основе биохимических признаков. Тем не менее развитие биотехнологии и промышленной микробиологии требует разработки удобной и быстрой методики для индикации и идентификации лактобацилл.

Для идентификации молочнокислых бактерий изучают их морфологические, культуральные и физиолого-биохимические свойства штаммов. Перспективно также использование серологического метода, позволяющего с довольно высокой достоверностью определить видовую принадлежность молочнокислых бактерий. Обычно этот метод применяют как дополнительный. Основной же подбор штаммов по производственно-ценным показателям ведется на основании биохимических и физиологических исследований [6, 8].

Для успешного культивирования того или иного микроорганизма питательные среды по своим свойствам должны быть приближены к естественным условиям его обитания. Для культивирования бактерий рода *Lactobacillus* используются среды, богатые питательными веществами (дрожжевой экстракт, гидролизат обезжиренного молока, пептон, твин-80), различными солями, в том числе ацетатом натрия и др., и имеющие низкий уровень pH (4,5–6,2).

Бактерии рода *Lactobacillus* относятся к микроорганизмам, имеющим сложные питательные потребности. Для их активного развития требуется наличие веществ, необходимых для построения бакте-

риальной клетки (нуклеиновых кислот, полисахаридов, аминокислот и т.д.) [6]. Так, для роста большинства молочнокислых палочек необходимы органические формы азота, которые они сами не синтезируют. Многим видам лактобацилл для развития необходимы витамины. Этим объясняется значительное влияние на их рост добавок к питательной среде различных экстрактов (например, дрожжевого, кукурузного), а также других соединений. Результаты исследований свидетельствуют, что для роста болгарской палочки требуется никотиновая кислота (B5), пантотенат (B3) и рибофлавин (B2) [2, 3]. Присутствие в среде микромагния и марганца также существенно влияет на развитие болгарской палочки. Марганец препятствует автолизу клеток и необходим для нормальных процессов жирового обмена. Наличие солей железа в питательной среде оказывает благоприятное действие на рост культур болгарской палочки, причем установлено, что они практически не растут при отсутствии марганца и/или железа [6]. Таким образом, питательная среда должна удовлетворять потребности *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* в источниках энергии, содержать компоненты, необходимые для конструктивного метаболизма [4].

Традиционно молочнокислые микроорганизмы культивируются и поддерживаются в стерильном молоке, однако при создании технологии сухого бактериального концентрата использование стерильного молока как среды культивирования неприемлемо с технологической точки зрения. Из многочисленных питательных сред, применяемых при культивировании молочнокис-

* Работа выполнена в рамках Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы, государственный контракт П-423.

лых микроорганизмов, пригодны сбалансированные по азотному, углеводному и витаминному составу среды, которые содержат все необходимые питательные и стимулирующие вещества, находящиеся в форме, которая легко усваивается микроорганизмами.

В качестве источника азота большинство молочнокислых микроорганизмов используют его органические формы. При недостатке органического азота лактобактерии для синтеза ряда органических соединений могут использовать минеральные соединения азота. Рост некоторых молочнокислых бактерий в сложных по составу питательных средах стимулируют аммонийные соли. Для нормального роста и развития *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* необходима среда со сложными органическими формами азота, которые являются источниками пептидов, поскольку они стимулируют рост клеток более эффективно, чем свободные аминокислоты. Пептиды представляют аминокислоты клетке в легкоусвояемой и при этом защищенной от разрушения форме [5].

Из специальных питательных сред наиболее широко распространение получила среда МРС. Среда богата питательными веществами и ростовыми факторами; содержит дрожжевой и мясной экстракты, глюкозу, пептон, ацетат натрия, цитрат аммония и твин-80 – источник жирных кислот, необходимых для метаболизма лактобактерий. Кислотность среды 6,2–6,4. Среда МРС может применяться как для работы с пробиотическими лактобациллами, так и для выделения этих микроорганизмов из продуктов питания и природных биотопов [7].

При выделении лактобацилл из внешней среды, молочных продуктов и других источников возникает необходимость дифференциации их друг от друга и других бактерий. Для решения подобных задач созданы селективные среды, основной особенностью которых был низкий уровень pH (<5,4) и высокая концентрация ионов ацетата, который является ингибитором многих микроорганизмов.

Материалы и методы исследований

Для выращивания культур бактерий рода *Lactobacillus* использовали модифицированные питательные среды МРС: полужидкую, содержащую 0,15 % агара (МРС-2), и плотную, содержащую 2 % агара (МРС-4). Состав питательной среды МРС, г/л: пептон – 10,0; дрожжевой экстракт – 20,0; глюкоза – 20,0; твин-80 – 1,0; дикалия гидрофосфат – 2,0; натрия ацетат – 5,0; триаммония цитрат – 2,0; магния сульфат – 0,2; марганца сульфат ($MnSO_4 \cdot 4H_2O$) – 0,05; мясная вода – до 1 л; pH 6,2±0,1 [7].

Определение принадлежности выделенных бактерий к роду *Lactobacillus* проводили по ГОСТ 10444.11-89 «Продукты пищевые. Методы обнаружения молочнокислых микроорганизмов» по отношению к окраске по Граму, подвижности, наличию каталазы. К бактериям рода *Lactobacillus* относили микроаэрофильные, грамположительные, палочковидные, неподвижные, неспорообразующие, не обладающие каталазой микроорганизмы.

Микроскопирование препаратов культур бактерий проводили, используя микроскоп фирмы Rathenow [1].

Определение ферментации углеводов проводили с использованием дисков с углеводами и бульона с бромкрезоловым пурпурным производством HiMedia Laboratories Pvt. Limited, Индия. Бульон с бромкрезоловым пурпурным разливали по 5 мл в пробирки с поплавками и стерилизовали автоклавированием при 1,1 атм. в течение 10 мин.

Лиофильно высушенные штаммы разводили в 1 мл стерильного физиологического раствора и 0,1–0,15 мл высевали на жидкую среду МРС-2. Инкубацию проводили двое суток при 37 °С. Затем выполняли разведения от 10^{-1} до 10^{-8} в стерильном физиологическом растворе и высевали на чашки с плотной средой МРС-4. Рассев выполняли с каждого разведения. Инкубировали в течение 2–3 суток при 37 °С в анаэробных условиях с использованием анаэростатов и газогенерирующих пакетов GasPack (BD BBL, США). Изолированные колонии, типичные для лактобацилл, пересеивали на полужидкую среду МРС-2. Через двое суток инкубации из всех пробирок выполняли контрольные мазки, после чего культуры использовали для постановки пестрого ряда.

В состав пестрого ряда входили 14 субстратов (сахаров и многоатомных спиртов): арабиноза, целлобиоза, галактоза, лактоза, мальтоза, маннит, манноза, мелибиоза, раффиноза, салицин, сахароза, трегалоза, ксилоза, сорбит.

Бульон с бромкрезоловым пурпурным засеивали двумя каплями 48-часовой культуры со среды МРС-2 с последующим встряхиванием пробирки для лучшего размешивания.

После посева испытуемого микроорганизма в каждую пробирку асептически помещали по одному диску с соответствующим углеводом. Посевы инкубировали в течение 18–48 часов при 35–37 °С. Результаты учитывали через 18 и 48 часов. При выращивании на бульоне с бромкрезоловым пурпурным образующая кислота способствует окрашиванию среды в желтый цвет, а газ скапливается в поплавке [10].

Результаты и их обсуждение

Изучение биохимических свойств лактобацилл, в частности способности ферментировать углеводы, является основой для видовой идентификации этих бактерий. В работе использовали пять штаммов бактерий рода *Lactobacillus*, представленных ФГУП ГосНИИ «Генетика» (Москва): *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* ВКПМ В-3141, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* ВКПМ В-6543, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* ВКПМ В-3964, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* ВКПМ В-6515, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* ВКПМ В-6516. Необходимо отметить, что первичное установление способности ферментировать сахара, многоатомные спирты и гидролизовать глюкозиды и видовой идентификации этих микроорганизмов были проведены в 1990 году при их выделении с использованием доступных и актуальных на тот момент тест-систем и питательных основ. Нашей задачей является расширенное изучение биохимических свойств этих штаммов с использованием коммерческих стандартизированных тест-систем фирмы HiMedia.

На первом этапе проводили изучение культурально-морфологических признаков исследуемых штаммов *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*. Выращивание предварительно разведенных в 1 мл стерильного физиологического раствора лиофильно высушенных штаммов проводили в модифицированных питательных средах МРС: полужидкой, содержащей 0,15 % агара (МРС-2), и плотной, содержащей 2 % агара (МРС-4). Идентификацию бактерий проводили согласно ГОСТ 10444.11-89 [1].

Приготовление клеточных препаратов штаммов молочнокислых термофильных бактерий разного происхождения с последующим их микроскопированием показало, что все выделенные штаммы из различных источников являются грамположительными палочками, одиночными либо расположенными цепочками (табл. 1).

Следующим этапом работы явилось исследование биохимических признаков штаммов, а именно сахаролитических свойств.

Микроорганизмы вида *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* относятся к группе гомоферментативных лактобацилл [9]. Метаболизм сахаров у штаммов бактерий этой группы происходит по гликолитическому пути Эмбдена-Мейергофа-Парнаса. Гомоферментативные лактобациллы, как правило, не способны сбраживать пентозы, что подтверждено нашими исследованиями (табл. 2).

Классическая микробиологическая схема идентификации этих видов основана на изучении метаболизма сахаров и представляет собой «пестрый ряд», состоящий из 14 субстратов. В результате работы нами был изучен спектр утилизируемых субстратов: углеводов, в том числе олигосахарид раффиноза, метаболизм которого вновь выделенными штаммами

не был изучен ранее, многоатомных спиртов (сорбит, маннит) и глюкозидов (салицин, эскулин).

Из табл. 2 видно, что гомоферментативные лактобациллы вида *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* не способны сбраживать пентозы, так как ферментация происходит по гликолитическому пути.

Таблица 1

Культурально-морфологические признаки штаммов лактобацилл

| Название штамма | Культурально-морфологические признаки штамма |
|---|---|
| <i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i> ВКПМ В-3141 | Длинные палочки, на MRS-агаре образует кремовые полупрозрачные матовые колонии неправильной формы 1–2 мм в диаметре |
| <i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i> ВКПМ В-6545 | Грамположительные палочки, расположены отдельно и в цепочках. Образует на MRS-агаре гладкие колонии |
| <i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i> ВКПМ В-3964 | Грамположительные неподвижные палочки, располагаются поодиночке и цепочками. Образует матовые колонии величиной 2–3 мм в диаметре |
| <i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i> ВКПМ В-6515 | Грамположительные палочки. Образует гладкие колонии неправильной формы 1–2 мм в диаметре |
| <i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i> ВКПМ В-6516 | Грамположительные палочки. Образует гладкие колонии |

Таблица 2

Способность вновь выделенных штаммов *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* к ферментации сахаров, многоатомных спиртов и гидролизу глюкозидов

| Вид | Номер штамма | Целлобиоза | Галактоза | Лактоза | Мальтоза | Маннит | Манноза | Меллибиоза | Раффиноза | Салицин | Сахароза | Трегалоза | Арабиноза | Сорбит | Ксилоза | Эскулин |
|---|--------------|------------|-----------|---------|----------|--------|---------|------------|-----------|---------|----------|-----------|-----------|--------|---------|---------|
| <i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i> | ВКПМ В-3141 | – | – | + | + | – | – | – | – | – | + | – | – | – | – | – |
| <i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i> | ВКПМ В-6545 | – | – | + | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – |
| <i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i> | ВКПМ В-3964 | – | – | + | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – |
| <i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i> | ВКПМ В-6515 | – | – | + | – | – | + | – | – | – | – | – | – | – | – | – |
| <i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i> | ВКПМ В-6516 | – | – | + | + | – | + | – | – | – | – | – | – | – | – | – |

Практический и научный интерес представляет изучение способности лактобацилл к утилизации раффинозы. Этот углевод относится к группе фосфолигосахаридов (ФОС), используется в составе пробиотических препаратов в качестве пребиотического компонента. Способность к утилизации этого олигосахаридов зависит от наличия или отсутствия специфических гликозилгидролаз. Утилизации раф-

финозы у штаммов бактерий вида *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* не наблюдалось. Из табл. 2 видно, что все исследуемые штаммы лактобактерий хорошо ферментируют лактозу. Один штамм *Lactobacillus bulgaricus* ферментирует сахарозу, два штамма ферментируют мальтозу, остальные два штамма – маннозу. Таким образом, по своим свойствам изучаемые штаммы неоднородны. Из литера-

турных данных известно, что наиболее важным источником энергии для молочнокислых бактерий являются моно- и дисахариды: глюкоза, лактоза, сахароза, мальтоза. Основным конечным продуктом расщепления глюкозы является D(-)-молочная кислота (до 2 %) [9].

Анализируя полученные результаты по ферментации штаммов болгарской палочки, можно сделать вывод, что подобранный состав питательной среды вызывает изменение сахаролитических свойств данных культур в процессе культивирования, по видимому, за счет изменения активной кислотности. Однако при культивировании изменение активной кислотности идет быстрее, т.е. среда в большей мере обеспечивает развитие исследуемых культур. Следует также отметить, что при достижении определенного значения pH скорость ферментации отдельных штаммов значительно уменьшается, что свиде-

тельствует о торможении развития культур, которое может быть вызвано как недостатком нутриентов в среде, так и ингибированием продуктами метаболизма, в частности избытком молочной кислоты.

Исследованы морфологические и сахаролитические свойства штаммов *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*. Исследование морфологии выделенных штаммов в фазово-контрастном микроскопе показало, что культура представлена грамположительными палочками, собранными в пары или расположенными поодиночке. При исследовании сахаролитических свойств штаммов болгарской палочки было установлено, что бактерии в полной мере ферментируют лактозу, а некоторые из штаммов способны усваивать сахарозу, мальтозу, маннозу. В заключение можно сказать, что сбраживание углеводов и спиртов является важным диагностическим признаком молочнокислых палочек.

Список литературы

1. ГОСТ 10444.11-89. Продукты пищевые. Методы определения молочнокислых микроорганизмов. – М., 1990. – 18 с.
2. Банникова, Л.А. Микробиологические основы молочного производства / Л.А. Банникова, Н.С. Королева, В.Ф. Семенихина. – М.: Агропромиздат, 1987. – 400 с.
3. Банникова, Л.А. Селекция молочнокислых бактерий и их применение в молочной промышленности / Л.А. Банникова. – М.: Пищевая промышленность, 1975. – 256 с.
4. Борунова, С.Б. Подбор компонентного состава питательной среды для получения бактериального концентрата болгарской палочки / С.Б. Борунова, Н.Н. Фурик, Н.В. Дудко // Пищевая промышленность: Наука и технология. – 2009. – № 1 (3). – С. 9–14.
5. Квасников, У.И. Молочнокислые бактерии и пути их использования / У.И. Квасников, О.А. Нестеренко. – М.: Наука, 1975. – 389 с.
6. Королева, Н.С. Симбиотические закваски термофильных бактерий в производстве кисломолочных продуктов / Н.С. Королева, М.С. Кондратенко. – М.: Пищевая промышленность, 1978. – 168 с.
7. Питательные среды для микробиологического контроля качества лекарственных средств и пищевых продуктов: справочник / В.А. Галынкин, Н.А. Заикина, В.И. Кочеровец, И.З. Курбанова; под ред. В.А. Галынкина и В.И. Кочеровца. – СПб.: Проспект науки, 2006. – 336 с.
8. Селекция молочнокислых бактерий и их применение в молочной промышленности / Л.А. Банникова. – М.: Пищевая промышленность, 1975. – 256 с.
9. Степаненко, П.П. Микробиология молока и молочных продуктов / П.П. Степаненко. – М., 1999. – 412 с.
10. Точилина, А.Г. Биохимическая и молекулярно-генетическая идентификация бактерий рода *Lactobacillus*: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.04, 03.00.07: защищена 19.12.2009 / Точилина Анна Георгиевна. – Н. Новгород, 2009. – 25 с.

ГОУ ВПО «Кемеровский технологический институт
пищевой промышленности»,
650056, Россия, г. Кемерово, б-р Строителей, 47.
Тел./факс: (3842) 73-40-40
e-mail: office@kemtipp.ru

SUMMARY

K.V. Bepomestnykh, A.G. Galstyan, E.V. Korotkaya

Study of biochemical and morphological properties of strains of bacteria genus *Lactobacillus*

The results of the study of biochemical and morphological properties of strains of bacteria of the genus *Lactobacillus bulgaricus* are presented. The possibility of using disks with carbohydrates to determine the species of the studied strains of the *Lactobacillus bulgaricus* in their ability to ferment disaccharides is shown. The study of isolated strain morphology by means of a phase-contrast microscope has shown that the culture is represented by gram-positive rods assembled in pairs or arranged separately. The optimal qualitative and quantitative composition of selective nutrient media for lactic acid bacteria culturing has been chosen. Studying the properties of the saccharolytic strains of the *Lactobacillus bulgaricus* it has been found that bacteria ferment lactose completely, and some strains are able to assimilate sucrose, maltose, and mannose.

Strains, lactic acid bacteria, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*, biochemical identification, morphological properties, cultivation, growth medium.

Kemerovo Institute of Food Science and Technology
47, Boulevard Stroiteley, Kemerovo, 650056, Russia
Phone/Fax: +7(3842) 73-40-40
e-mail: office@kemtipp.ru

