

УДК 637.04:637.146.34:579.864.1

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА ИЗМЕНЕНИЕ БИОХИМИЧЕСКИХ И МОРФОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ШТАММОВ ЛАКТОБАЦИЛЛ

Беспоместных К.В.

ФГБОУ ВПО «Кемеровский Государственный сельскохозяйственный институт», Кемерово, Россия (650056, Кемерово, ул. Марковцева, 5), e-mail: kbespmestnykh@rambler.ru

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. Выявлено, что состав питательной среды вызывает изменение сахаролитических свойств данных культур в процессе культивирования.

Ключевые слова: штаммы, молочнокислые бактерии *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, биохимическая идентификация, морфологические свойства, культивирование, питательная среда МРС.

STUDY OF THE INFLUENCE OF THE NUTRIENT MEDIUM ON CHANGES IN BIOCHEMICAL AND MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF LACTOBACILLI STRAINS

Bespomestnykh K.V.

Kemerovo State Institute of Agriculture, Kemerovo, Russia (650056, Kemerovo, Str. Markovtseva, 5), e-mail: kbespmestnykh@rambler.ru

The results of the study of biochemical and morphological properties of strains of bacteria of *Lactobacillus bulgaricus*. The possibility of using disks with carbohydrates to determine the species of *Lactobacillus bulgaricus* strains studied for their ability to ferment disaccharides. Morphology of isolated strains in phase-contrast microscopy showed that the culture represented Gram-positive rods, assembled in pairs or individually arranged. Choose the optimal qualitative and quantitative composition of selective growth media for culturing lactic acid bacteria. When studying the properties of saccharolytic strains *Lactobacillus bulgaricus* was found that bacteria fully ferment lactose and some strains can assimilate sucrose, maltose, mannose. Revealed the composition of the culture medium causes a change saccharolytic properties of these crops during cultivation.

Keywords: strains of lactic acid bacteria *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, biochemical identification, morphological properties, cultivation, growing medium MRS.

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 [7, 9].

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 бактериальной клетки (нуклеиновых кислот, полисахаридов, аминокислот и т.д.) [7]. 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 в отсутствии марганца и/или железа [7]. Таким образом, питательная среда должна удовлетворять потребности *Lactobacillus (L.) 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 молочнокислых 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 поставляют аминокислоты клетке в легкоусвояемой и при этом защищенной от разрушения форме [6].

Из специальных питательных сред наиболее широкое 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 [8, 10].

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.

Цель исследования

Изучить биохимические и морфологические свойства штаммов бактерий рода *Lactobacillus bulgaricus* с использованием коммерческих стандартизированных тест-систем фирмы «HiMedia»; подобрать оптимальный качественный и количественный состав селективной питательной среды для культивирования молочнокислых бактерий при исследовании сахаролитических свойств штаммов *Lactobacillus bulgaricus*.

Материал 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 [8].

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 [2].

Микроскопирование препаратов культур бактерий проводили, используя микроскоп фирмы «Rathenow».

Определение ферментации углеводов проводили с использованием дисков с углеводами и бульона с бромкрезоловым пурпурным производства «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 анаэроостатов 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 образующаяся кислота способствует окрашиванию среды в желтый цвет, а газ скапливается в поплавке [11].

Результаты исследования 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*, предоставленных 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 видовая идентификация этих микроорганизмов была проведена 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».

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).

На первом этапе исследования 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).

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

Таблица 1

Культурально-морфологические признаки штаммов лактобацилл

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

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

Микроорганизмы вида *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* относятся к группе гомоферментативных лактобацилл. Метаболизм сахаров у штаммов бактерий этой группы происходит по гликолитическому пути Эмбдена-Мейергофа-Парнаса. Гомоферментативные лактобациллы, как правило, неспособны 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, манит) и глюкозидов (салицин, эскулин).

Гомоферментативные лактобациллы вида *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* неспособны сбраживать пентозы, так как ферментация происходит по гликолитическому пути.

Таблица 2

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

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

Практический и научный интерес представляет изучение способности лактобацилл к утилизации раффинозы. Этот углевод относится к группе фосфоолигосахаридов (ФОС), используется в составе пробиотических препаратов в качестве пребиотического компонента. Способность к утилизации этого олигосахарид зависит от наличия или отсутствия

специфических гликозилгидролаз. Утилизации раффинозы у штаммов бактерий вида *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* не наблюдалось. Из таблицы 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 литературных 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 %) [4].

Выводы

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, то есть среда в большей мере обеспечивает развитие исследуемых культур. Следует также отметить, что при достижении определенного значения рН скорость ферментации отдельных штаммов значительно уменьшается, что свидетельствует 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. – Москва: Агропромиздат. – 1987. – 400 с.

3. Банникова Л.А. Селекция молочнокислых бактерий и их применение в молочной промышленности / Л.А. Банникова. – Москва: Пищевая промышленность, 1975. – 256 с.
4. Беспоместных К.В. Исследование биохимических и морфологических свойств штаммов бактерий рода *Lactobacillus* / К.В. Беспоместных, А.Г. Галстян, Е.В. Короткая // Техника и технология пищевых производств. – 2011. – № 2. – С. 94-98.
5. 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.
6. Квасников У.И. Молочнокислые бактерии и пути их использования / У.И. Квасников, О.А. Нестеренко. – Москва: Наука, 1975. – 389 с.
7. Королева Н.С. Симбиотические закваски термофильных бактерий в производстве кисломолочных продуктов / Н.С. Королева, М.С. Кондратенко. – М.: Пищевая промышленность, 1978. – 168 с.
8. 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 редакцией В.А. Галынкина и В.И. Кочерова. – СПб.: Проспект науки, 2006. – 336 с.
9. Селекция молочнокислых бактерий и их применение в молочной промышленности / Л.А. Банникова. – Москва: Пищевая промышленность, 1975. – 256 с.
10. Степаненко П.П. Микробиология молока и молочных продуктов / П.П. Степаненко. – М.: 1999. – 412 с.
11. Точилина А.Г. Биохимическая и молекулярно-генетическая идентификация бактерий рода *Lactobacillus*: Автореф. дис. канд. биол. наук. – Нижний Новгород, 2009. – 25 с.

Рецензенты:

Лавряшина М.Б., д.б.н., доцент, профессор кафедры Генетики, ФГБОУ ВПО «Кемеровский государственный университет», г. Кемерово;

Гореликова Г.А., д.т.н., профессор кафедры Товароведение и управление качеством, ФГБОУ ВПО «Кемеровский технологический институт пищевой промышленности», г. Кемерово.