

А. Е. Кротович, аспирант; Н. А. Белясова, доцент;
М. А. Овсянникова, студентка; Н. В. Гриц, доцент

РАЗРАБОТКА СХЕМ ВЫДЕЛЕНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИИ БАКТЕРИЙ РОДА *LACTOCOCCUS*

Circuits of picking and identification of lactic-acid bacteria with various fermentable activity are developed. Employment these circuits permit us to pick out from on environment 50 lactic-acid stains, from which 20 concern to genus *Lactococcus*.

Бактерии рода *Lactococcus* представляют собой одну из широко распространенных в природе групп микроорганизмов, играющих важную роль во многих отраслях хозяйственной деятельности человека. Особое значение эти бактерии имеют в молочной промышленности при производстве творога, сметаны, ряженки, кефира, сыров, маргарина, кисломолочного масла [1]. Все перечисленные производства имеют экономическую целесообразность лишь при условии, что в процессах ферментации задействованы высокоактивные штаммы молочнокислых бактерий. Такие штаммы в Республике Беларусь традиционно получают методом выделения из окружающей среды активных сквашивателей молока. При этом основным критерием отбора природных культур является способность сквашивать молоко за короткий период времени, а схемы идентификации отобранных бактерий основываются почти целиком на органолептических показателях полученных кисломолочных продуктов.

В то же время, в странах Европы в аналогичных процессах используют сконструированные методами генетической инженерии бактерии, которые обладают рядом преимуществ перед природными изолятами. Известно, что некоторые молочные комбинаты Беларуси уже закупают подобные закваски и бакконцентраты в Австрии, Бельгии и других странах, что обходится недешево.

При конструировании высокопродуктивных штаммов молочнокислых бактерий требуются редкие репликоны (служат основой для создания клонирующих векторов) и гены, которых может не оказаться в составе отбираемых по признаку быстрой сквашивающей активности изолятов. Поэтому актуальной становится процедура создания коллекций молочнокислых бактерий с самыми разнообразными свойствами и генетическими детерминантами, которые могут наследоваться в том числе медленно сквашивающими молоко бактериями. Понятно, что при отборе таких культур из окружающей среды уже нельзя использовать те методы выделения и критерии идентификации, которые применяются в настоящее время. Это предопределяет необходимость разработки новых схем выделения и иден-

тификации молочнокислых бактерий, что послужило целью настоящего исследования.

На первом этапе была разработана схема выделения молочнокислых бактерий, представленная на рисунке. Схема позволяет выделять молочнокислые бактерии из различных источников окружающей среды, не используя питательные среды, в состав которых входит молоко, что является условием, позволяющим минимизировать утрату и перестройку плазмидных ДНК.

Реализация этапов, представленных на рисунке, позволила выделить с поверхности хвои сосны и ели, плодов яблок, листьев магнолии 50 бактериальных штаммов, представленных грамположительными кокками, способными сквашивать молоко в течение 7–48 ч. При этом бактерии пассировались на питательных средах, не содержащих молоко.

Согласно современной системе классификации прокариот, к числу молочнокислых кокков относится восемь родов. При этом в состав заквасок для приготовления молочнокислых продуктов входят представители только одного рода – *Lactococcus* (редко включают бактерий рода *Leuconostoc*). Таким образом, задачей следующего этапа исследования являлась дифференцировка выделенных бактерий.

Путем анализа и сопоставления известных свойств представителей всех родов молочнокислых кокков установили признаки, которые отличают бактерий рода *Lactococcus* от представителей остальных родов молочнокислых кокков (табл. 1).

Из данных, представленных в табл. 1, видно, что возможность присутствия среди отобранных культур представителей родов *Pediococcus* и *Leuconostoc* можно исключить еще на стадии выделения, ограничив период сквашивания молока, поскольку известно, что данные бактерии сквашивают молоко очень медленно (примерно 6 суток).

Присутствие среди отобранных бактерий представителей родов *Peptococcus*, *Peptostreptococcus* и *Coprococcus* также исключается на стадии выделения, поскольку они являются облигатными анаэробами и не формируют колонии на поверхности агаризованных сред – один из этапов схемы на рисунке.

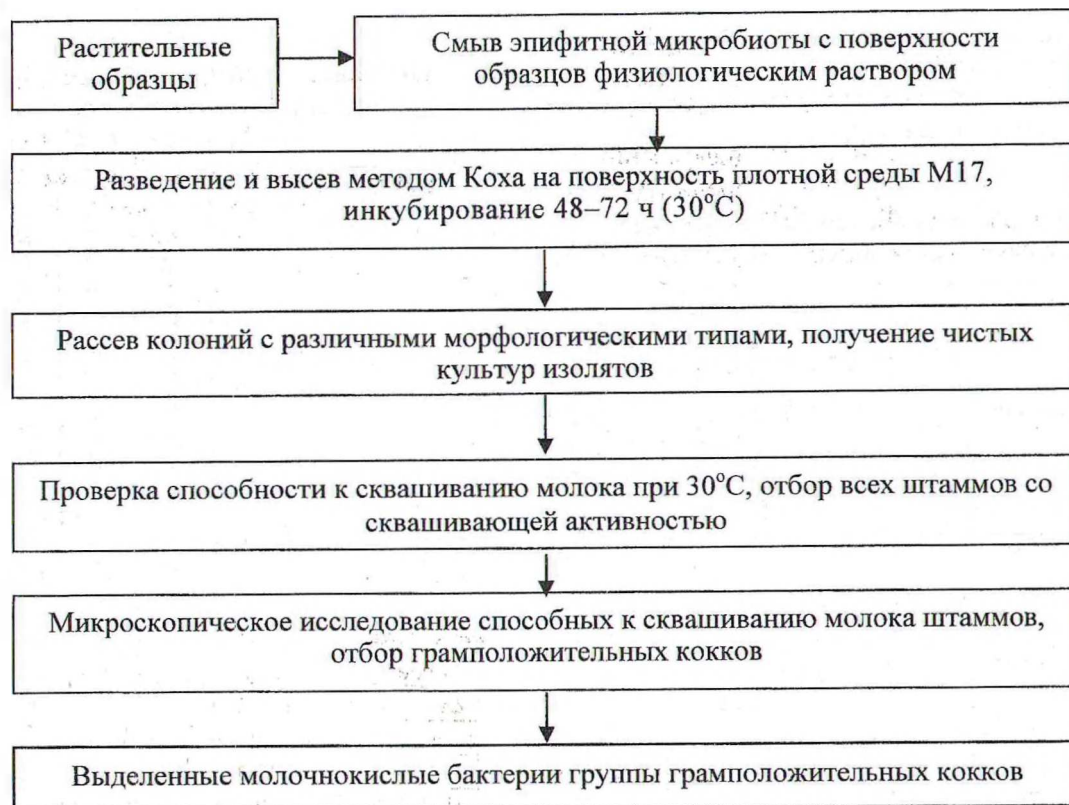


Рисунок. Схема выделения молочнокислых бактерий

Таким образом, согласно разработанной схеме, в числе анализируемых культур остаются грамположительные бактерии сферической формы, которыми могут являться представители трех родов: *Lactococcus*, *Enterococcus* и *Streptococcus*. Среди них только энтерококки способны расти при pH 9,6. По этому признаку предполагалось их последующее исключение из числа анализируемых культур после соответствующего теста.

Для дифференцировки представителей родов *Lactococcus* и *Streptococcus* можно воспользоваться способностью всех лактококков и только некоторых из стрептококков расти при температуре +10°C (см. табл. 1). Этот признак дает возможность исключить из числа исследуемых культур большинство видов стрептококков. В результате в составе недифференцированной микробиоты должно остаться пять видов бакте-

рий рода *Lactococcus*: *L. lactis* subsp. *cremoris*, *L. lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *hordnia*, *L. raffinolactis*, *L. plantarum*, *L. piscium*, *L. garvieae* и четыре вида бактерий рода *Streptococcus*: *S. iniae*, *S. oralis*, *S. agalanticas*, *S. uberis*. В состав заквасок включают только один вид лактококков *L. lactis* и два его подвида: *L. lactis* subsp. *cremoris*, *L. lactis* subsp. *lactis*.

Осуществив тест на способность к росту при +40°C, перечисленные бактерии можно разделить на две группы, каждая из которых диагностируется по отдельности:

– не способные к росту при +40°C: *L. lactis* subsp. *cremoris*, *L. lactis* subsp. *lactis* (≈ 80% штаммов), *L. lactis* subsp. *hordnia*, *L. raffinolactis*, *L. plantarum*, *L. piscium*;

– способные к росту при +40°C: *L. lactis* subsp. *lactis* (≈ 20% штаммов), *L. garvieae*, *S. iniae*, *S. oralis*, *S. agalanticas*, *S. uberis*.

Таблица 1

Дифференцирующие свойства молочнокислых бактерий

Род	Свойства				
	Факультативные аэробы, или микроаэрофилы	Облигатные анаэробы	Сквашивание молока (96 ч)	Рост при pH 9,6	Рост при 10°C
<i>Lactococcus</i>	+	–	+	–	+
<i>Pediococcus</i>	+	–	–	–	–
<i>Leuconostoc</i>	+	–	–	–	–
<i>Peptococcus</i>	–	+	+	–	–
<i>Peptostreptococcus</i>	–	+	+	–	–
<i>Coprococcus</i>	–	+	+	–	–
<i>Streptococcus</i>	+	–	+	–	(–)
<i>Enterococcus</i>	+	–	+	+	+

Примечание. (–) – 5–7% представителей имеют положительную реакцию.

В табл. 2 и 3 перечислены дифференцирующие свойства, позволяющие среди оставшихся бактерий выявить используемые в составе заквасок подвиды.

Таблица 2
Основные свойства бактерий рода *Lactococcus*, не способных к росту при +40°C

Вид, подвид	Рост при 40°C	Рост с 4% NaCl	Образование кислоты из лактозы	Гидролиз аргинина	Образование кислоты из раффинозы
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	-	-	+	-	-
<i>L. lactis</i> subsp. <i>hordnia</i>	-	-	-	+	-
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	-/+	+	+	+	-
<i>L. piscium</i>	-	-	+	-	+
<i>L. plantarum</i>	-	+	-	-	-
<i>L. raffinolactis</i>	-	-	+	-/+	+

Примечание. (-/+) – 60% штаммов имеют отрицательную реакцию.

Использование представленных схем выделения и идентификации позволило из 50 штаммов грамположительных кокков, не способных к росту при температуре +40°C, выявить 13 штаммов *L. lactis* subsp. *lactis*, причем два из них являются активными сквашивателями (сквашивают молоко за 7–9 ч), а четыре – слабосквашивающими (время сквашивания восстановленного молока бактериями составляло не менее 24 ч). В ходе эксперимента также выявлено 11 штаммов энтерококков, 8 – стрептококков, 5 выделенных штаммов относятся к *L. piscium* и *L. plantarum*.

Бактерии восьми исследуемых штаммов проявили способность к росту при температуре +40°C, причем три из них активно сквашивают молоко (за 7–9 ч). Можно считать, что это представители рода *L. lactis*, поскольку среди других видов группы бактерий, способных к росту при температуре +40°C, активных сквашивателей нет.

Таблица 3
Основные свойства молочнокислых кокков, способных к росту при температуре +40°C

Вид, подвид	Рост при 40% желчи	Способность к α-гемолизу	Образование кислоты из маннитола	Пирролидонилариламидаза
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	+	+	(-)	(-)
<i>L. garvieae</i>	?	?	(+)	+
<i>S. iniae</i>	-	+	+	-
<i>S. agalactiae</i>	d	-	-	-
<i>S. uberis</i>	d	d	+	-
<i>S. oralis</i>	-	+	-	?

Примечание. (+) – 80–89% штаммов имеют положительную реакцию; (-) – 11–20% штаммов имеют отрицательную реакцию; d – 21–79% штаммов имеют положительную реакцию; ? – отсутствуют необходимые данные.

Таким образом, следует констатировать, что использование разработанных схем позволило выделить из окружающей среды девять штаммов бактерий *L. lactis*, не способных к росту при температуре +40°C, причем из них четыре штамма, т. е. почти половина, медленно сквашивают молоко. При осуществлении ныне действующих схем выделения и идентификации лактококков данные бактерии не могли бы быть обнаружены. В то же время, в их клетках могут содержаться редкие для лактококков генетические детерминанты и репликоны, пригодные для использования в манипуляциях по генетической инженерии заквасочных бактерий.

Литература

1. Квасников Е. И., Нестеренко О. А. Молочнокислые бактерии и пути их использования. – М.: Наука, 1975. – 389 с.