

Н.А. Белясова, доцент; А.Е. Кротович, аспирант; О.И. Лапаник, студентка;
Н.В. Гриц, доцент

АНАЛИЗ НАСЛЕДОВАНИЯ ПЛАЗМИД БАКТЕРИЯМИ РОДА *LACTOCOCCUS*

The plasmid composition of two starter strains of Lactococci and their morphological segregants was investigated. Some properties of unstable plasmids, which may be spontaneously lost from cells under long cultivation in milk were revealed. There were isolated from environment 46 strains epiphytic bacteria of genus Lactococcus. This bacteria can be used for investigation of plasmid inheritance character under different cultivation conditions.

Молочнокислые бактерии представляют собой широко используемые в биотехнологии объекты: с их помощью получают все кисломолочные продукты, они являются продуцентами многих распространенных консервантов (в первую очередь, молочной кислоты, низина, лактококцинов) [1, 2]. Наконец, молочнокислые бактерии служат основой популярных на сегодняшний день средств профилактики и лечения кишечных заболеваний – пробиотиков [3].

Производственные штаммы молочнокислых бактерий получают разными способами: в европейских странах методами генетической инженерии [4]; в нашей стране – путем селекции активных сквашивателей молока среди эпифитной микробиоты, обитающей на поверхности зеленых частей растений, плодах. Следует отметить, что работа по получению новых штаммов молочнокислых бактерий ведется постоянно, поскольку существует необходимость непрерывной ротации производственных штаммов, что обусловлено нестабильностью наследования важных для процесса сквашивания молока и формирования продукта признаков. Проблема состоит в том, что большинство ценных свойств молочнокислых бактерий детерминируется генами, расположенными на нехромосомных факторах наследственности — плаزمидах [5]. При определенных условиях бактерии могут утрачивать плазмиды, а вместе с ними и соответствующие свойства.

Для подтверждения предположения о том, что утрата свойств может быть обусловлена элиминацией плазмид, осуществляли длительное культивирование (85 сут) бактерий восьми штаммов *L. lactis* ssp. *lactis* в молоке без их пассирования на плотных средах. Затем производили высеv клеток на плотную среду, обеспечивающую рост бактерий всех типов, и осуществляли визуальный учет морфологии колоний. При этом замечено, что два исследованных штамма образуют на плотной среде колонии различного размера: *L. lactis* ssp. *lactis* 550/6 формируют крупные, средние и мелкие колонии, а *L. lactis* var. *diacetilactis* 540/4 — крупные и мелкие. Клоны каждого типа подвергали трехкратному рассеву до изолированных колоний, добиваясь стойкого наследования отличительных признаков. Затем извлекали плазмидную ДНК из клеток каждого морфологического типа и осуществляли ее визуализацию.

Оказалось, что клетки каждого из штаммов, формирующие мелкие (м) колонии, не наследуют по одному типу плазмид из полного спектра, присущего клеткам крупных (к) и средних (ср) колоний (рисунок). Согласно приведенным на рисунке данным, можно констатировать, что сегреганты *L. lactis* 550/6 м (формируют мелкие колонии) утратили плазмиду с молекулярной массой 32,2 МДа, а сегреганты *L. lactis* var. *diacetilactis* 540/4 м — плазмиду с молекулярной массой 28,3 МДа.

Чтобы определить фенотипические свойства утраченных плазмид, осуществляли анализ тех признаков лактококков, которые обычно детерминируются плазмидными генами (табл. 1).

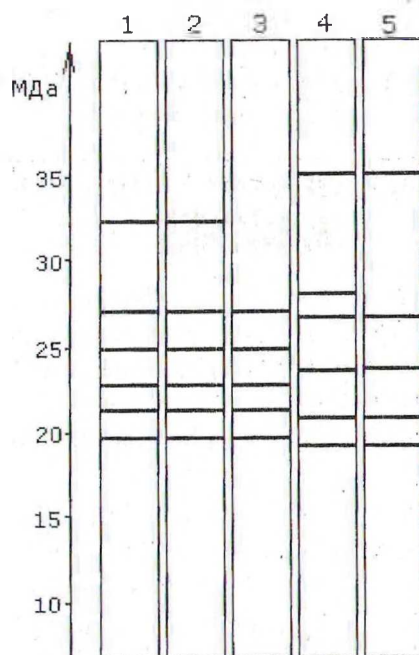


Рис. Плазмидный состав морфологических сегрегантов бактерий *L. lactis*:
 1 – *L. lactis* 550/6 к; 2 – *L. lactis* 550/6 ср; 3 – *L. lactis* 550/6 м;
 4 – *L. lactis* var. *diacetylactis* 540/4 к; 5 – *L. lactis* var. *diacetylactis* 540/4 м

Таблица 1

Характеристика свойств морфологических сегрегантов бактерий *L. lactis*

Бактерии	Сбраживание лактозы	Образование диацетила, ацетона	Сквашивание молока
<i>L. lactis</i> :			
550/6к	Способны	Не способны	Способны
550/6ср	Способны	Не способны	Способны
550/6м	Не способны	Не способны	Не способны
<i>L. lactis</i> var. <i>diacetylactis</i> :			
540/4к	Способны	Способны	Способны
540/4м	Способны	Не способны	Способны

Как следует из представленных в табл. 1 данных, формирующие мелкие колонии бактерии *L. lactis* 550/6 м не обладают способностью к сбраживанию лактозы и сквашиванию молока, а бактерии *L. lactis* var. *diacetylactis* 540/4 м не образуют характерные для данной разновидности продукты – ацетон и диацетил, обуславливающие особый аромат сквашенного молока.

Таким образом, можно связать утрату перечисленных признаков с утратой соответствующих плазмид и констатировать, что плазида молекулярной массой 32,2 МДа в клетках *L. lactis* 0/6 содержит гены, ответственные за утилизацию лактозы, а плазида с молекулярной массой 28,3 МДа в клетках *L. lactis* var. *diacetylactis* 540/4 м – гены, ответственные за ароматобразование (синтез ацетона и диацетила). Эти плазмиды, как следует из приведенных результатов, характеризуются высокой степенью нестабильности и утрачиваются из части клеточной популяции даже без каких-либо воздействий при длительном культивировании или хранении в молоке. При этом следует учесть, что такой способ хранения заквасочных культур распространен на всех молочных комбинатах Республики Беларусь. Это объясняет причину нестабильности свойств заквасочных бактерий и возникновение производственных ситуаций, связанных с изменением свойств продукта или появлению брака в технологическом процессе.

Одной из рекомендаций для устранения подобных явлений может служить обязательная стадия пассирования бактерий на плотной среде. Это необходимо для выявления типичных клонов популяции, отбор которых позволит ограничить увеличение числа бесплазмидных вариантов.

Выявленная нестабильность наследования плазмид лактококками может приводить к тому, что их спектр в клетках существенно меняется в зависимости от условий культивирования. Не исключено, что длительное пассирование бактерий в молоке (богатой всеми факторами роста среде) приводит к элиминации групп плазмид из клеточных популяций или их существенным перестройкам. Для подтверждения этого предположения требуется исследовать плазмидные профили у эпифитных молочнокислых бактерий и в клетках их вариантов после длительного инкубирования в молоке.

Выделение эпифитных штаммов производили с сосновой и еловой хвои, образцы которой отбирали в разных областях Республики Беларусь. Всего выделено 46 штаммов бактерий, обладающих способностью сквашивать молоко. Характеристика отличительных признаков этих представителей позволяет отнести их к роду *Lactococcus*. Поскольку задачей данного этапа исследования является определение плазмидного состава бактерий дикого типа, их выделение производили не классическим методом (путем внесения образца в молоко с последующим высевом из проб, в которых наблюдается образование молочного сгустка определенного типа), а методом смыва и высевом на плотную пептонно-дрожжевую среду. Интересно отметить, что оба метода приводят примерно к одинаковым результатам по количеству отобранных штаммов лактококков, что продемонстрировано в табл. 2 для образцов, отобранных в трех районах.

Таблица 2

Сопоставительная характеристика методов выделения эпифитных лактококков

Область, район, источник выделения	Выделенные бактериальные штаммы в методе	
	Смыв, высев	Сквашивание молока, высев
Гродненская обл., Дятловский р-н		
– хвоя сосны	21, 22, 23, 24*, 25	37, 38*, 39, 40
– хвоя ели	26, 27, 28, 29	41, 42, 43*, 44
Минская обл., Несвижский р-н		
– хвоя сосны	30*, 31, 32*	45, 46*, 47
– хвоя ели	33, 34, 35, 36*	48, 49, 50*
Минская обл., Жодинский р-н		
– хвоя сосны	15/1, 15/2, 16, 17*	07/1*, 08*, 20/1, 20/2*
– хвоя ели	18/1, 18/2*, 19, 20	01/1, 01/2*, 02

Примечание. Символом (*) обозначены номера штаммов с признаками бактерий рода *Lactococcus lactis*.

Таким образом, подтверждена возможность выделения бактерий рода *Lactococcus* из внешней среды методом, при котором клетки инкубируются на питательных средах, не содержащих молоко. Это позволяет производить анализ изменения спектра наследуемых эпифитными бактериями плазмид при хранении и пассировании в молоке – особой среде, богатой разнообразными факторами роста. Подобный анализ должен пролить свет на процессы перестройки геномов важных с хозяйственной точки зрения бактерий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Калинина А.А., Молотова Н.О., Галинина В.И., Суходолец В.В. Изучение фагоустойчивости и плазмидных профилей штаммов молочнокислых бактерий, используемых в составе заквасок при производстве творога и сметаны // Биотехнология. – 1991. – С. 33–35.

2. Калинина Н.А., Галинина В.И., Суходолец И.И. Плазмидный состав и контроль ароматообразования у производственных штаммов лактококков // Биотехнология. – 1994. – С. 7–10.
3. Fuller, R. Probiotics in human medicine // Gut, 1991, № 32, p. 439–442.
4. Boucher I., Parrot M.. Novel Food-Grade Plasmid Vector Based on Melibiose Fermentation for the Genetic Engineering of Lactococcus lactis // Applied and Environmental microbiology, Desember 2002, Vol. 68, № 12, p. 6152–6161.
5. Галинина В.И., Шалыгина А.М., Горина Т.А., Калинина Н.А., Суходолец В.В. Перспективы использования генетических методов в прогнозировании биотехнологических свойств молочнокислых бактерий // Известия вузов. Пищевая технология. – М. – 1997. – № 4–5. – С. 19–21.