КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Институт фундаментальной медицины и биологии

Кафедра микробиологии

Д.Р. Яруллина, Р.Ф. Фахруллин

БАКТЕРИИ РОДА *LACTOBACILLUS*: ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И МЕТОДЫ РАБОТЫ С НИМИ

Учебно-методическое пособие



КАЗАНЬ 2014 Печатается по решению Редакционно-издательского совета ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

Учебно-методической комиссии Института фундаментальной медицины и биологии $K\Phi V$ Протокол №2 от 04.02.2014

Заседания кафедры микробиологии Протокол №7 от 19.12.2013

Авторы-составители канд. биол. наук, ст. преп. Д.Р. Яруллина, д-р биол. наук, доц. Р.Ф. Фахруллин

Научный редактор д-р биол. наук, проф., академик АН РТ О.Н. Ильинская

Рецензент канд. биол. наук, доц. В.И. Вершинина

Бактерии рода *Lactobacillus*: общая характеристика и методы работы с ними: Учебно-методическое пособие / Д.Р. Яруллина, Р.Ф. Фахруллин. – Казань: Казанский университет, 2014. – 51 с.

В пособии изложены современные сведения о систематике, морфологических, культуральных, биохимических и физиологических свойствах, экологии лактобацилл, а также их роли в пищевой отрасли и медицине. Во втором разделе даны методические подходы к выделению лактобацилл из различных источников. Пособие хорошо иллюстрировано.

Данное пособие предназначено для студентов высших учебных заведений, аспирантов и научных работников, специализирующихся в области пищевой, сельскохозяйственной и медицинской микробиологии.

© Казанский федеральный университет, 2014 © Яруллина Д.Р., Фахруллин Р.Ф., 2014

СОДЕРЖАНИЕ

I. Общая характеристика бактерий рода Lactobacillus	4
1.1 Таксономия и номенклатура лактобацилл	4
1.2 Морфология лактобацилл	6
1.3 Культуральные свойства лактобацилл	10
1.4 Физиолого-биохимические свойства лактобацилл	12
1.5 Экология лактобацилл	17
1.6 Практическое использование лактобацилл	20
 Применение лактобацилл для приготовления пищевых 	20
продуктов	
 Применение лактобацилл для приготовления силоса 	21
 Лактобациллы как пробиотики 	21
 Получение молочной кислоты 	23
 Отрицательная роль лактобацилл 	23
II. Основные методы работы с бактериями рода Lactobacillus	32
Питательные среды	32
Рецепты растворов	37
Выделение и идентификация бактерий рода Lactobacillus	38
1 этап: получение накопительной культуры	39
2 этап: получение чистой культуры	39
1) Последовательные разведения	40
а) метод поверхностного посева	40
б) метод глубинного посева	42
2) Посев истощающим штрихом	42
Методы культивирования анаэробных и микроаэрофильных	43
микроорганизмов	
3 этап: Определение принадлежности выделенных бактерий к	44
роду Lactobacillus	
Микроскопия	45
Определение каталазной активности	46
Определение количества молочной кислоты методом титрования	47
Хранение культур лактобацилл	47
Список источников рисунков	48
Рекомендуемая литература по теме «Бактерии рода Lactobacillus»	48
Приложение	49

І ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРИЙ РОДА LACTOBACILLUS

1.1 Таксономия и номенклатура лактобацилл

Род Lactobacillus принадлежит к филе Firmicutes, классу Bacilli, порядку Lactobacillales, семейству Lactobacillaceae.

Домен *Bacteria*Фила XIII. *Firmicutes*Class I. *Bacilli*

Порядок II. Lactobacillales

Семейство I. Lactobacillaceae

Род I. Lactobacillus

Род II. Paralactobacillus

Род III. Pediococcus

Вопросы номенклатуры и таксономии бактерий рода *Lactobacillus* до настоящего времени окончательно не решены и подвержены пересмотру. В настоящее время род объединяет более 100 видов и представляет самую большую группу в порядке *Lactobacillales*. Ряд видов включает два и более подвидов. (Перечень видов и подвидов доступен в Приложении и на сайте http://www.bacterio.cict.fr/l/lactobacillus.html).

Согласно филогенетической систематике, род разделен на группы, количество которых варьирует у разных авторов (Hammes & Hertel, 2003; Dellaglio & Felis, 2005; Felis & Dellaglio, 2007; Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2009).

В отечественных трудах по технической микробиологии вместо родового лактобациллы (*Lactobacillus*) онжом термин названия встретить (Lactobacterium), лактобактерии использованный впервые обозначения Н.А. Красильниковым ДЛЯ бактерий этой группы «Определителе бактерий и актиномицетов» (1949 г.). Справедливости ради отметим, что поскольку бактерии этой группы спор не образуют, то правильнее называть их бактериями, а не бациллами, но Международным 1971 комитетом номенклатуре бактерий В ПО Γ. принято название Lactobacillus.

В медицинской литературе иногда используется термин палочка Дедерлейна (A. Doderlein, 1860-1941, нем. гинеколог), которым обозначают виды лактобацилл, обнаруживаемые во влагалище и представляющие основной компонент его нормальной микрофлоры (*L. acidophilus, L. casei, L. fermentum, L. cellobiosum* и др.).

Говоря о систематическом положении лактобацилл, часто используется термин «молочнокислые бактерии» (МКБ; lactic acid bacteria, LAB). Однако группа МКБ не является систематической и объединяет представителей различных таксономических групп (Табл. 1), относящихся к порядку Lactobacillales, на основании главного признака — способности образовывать молочную кислоту в качестве конечного метаболита.

Полный перечень признаков группы МКБ включает:

- грамположительные;
- не образуют спор;
- каталазоотрицательные;
- лишены цитохромов;
- аэро- и кислототолерантные;
- требовательные к источникам питания;
- образуют молочную кислоту в качестве основного конечного продукта углеводного метаболизма.

Таблица 1 – Состав группы МКБ

N_{2}	Род	Таксономия рода
1	Lactobacillus	Домен Bacteria
2	Pediococcus	Фила XIII. Firmicutes
		Class I. <i>Bacilli</i>
		Порядок II. Lactobacillales
		Семейство I. Lactobacillaceae
3	Aerococcus	Семейство II. Aerococcaceae
4	Carnobacterium	Семейство III. Carnobacteriaceae
5	Enterococcus	Семейство IV. Enterococcaceae
6	Tetragenococcus	
7	Vagococcus	
8	Oenococcus	Семейство V. Leuconostocaceae
9	Leuconostoc	
10	Weissella	
11	Lactococcus	Семейство VI. Streptococcaceae
12	Streptococcus	

Бактерии, относящиеся к родам Lactobacillus, Lactococcus, Streptococcus, Pediococcus и Leuconostoc, формируют ядро группы МКБ. Иногда из-за сходства в метаболизме углеводов и их роли в пищевой промышленности в одной группе с МКБ рассматривают представителей рода Bifidobacterium (Домен Bacteria; фила XVII. Actinobacteria; класс Actinobacteria; подкласс

Actinobacteridae; порядок Bifidobacteriales; семейство Bifidobacteriaceae) и рода Sporolactobacillus (Домен Bacteria; фила XIII. Firmicutes; класс Bacilli; порядок Bacillales; семейство Sporolactobacillaceae).

1.2 Морфология лактобацилл

Внутри Lactobacillus встречаются бактерии рода различной морфологией. Большинство представителей рода имеют форму прямых палочек с закругленными концами, собранных в цепочки различной длины, либо расположенные одиночно или попарно (Рис. 1-3). Среди лактобацилл встречаются короткие кокковидные и извитые формы, а также длинные, нитевидные палочки длиной от 0.7-1.1 до 3.0-8.0 мкм, расположенные единично или собранные в цепочки. Так, изогнутая форма клеток присуща L. curvatus (Рис. 4); у L. coryniformis клетки имеют форму изогнутых грушевидных палочек. Длина палочек и величина изгиба обычно зависят от условий роста: состава питательной среды, температурного режима, аэрации, а также возраста культуры. У некоторых видов (например, L. fermentum, L. brevis) культура всегда представлена смесью коротких и длинных палочек. Лактобациллы не образуют эндоспор. По Граму окрашиваются положительно (Рис. 1), становятся грамотрицательными с возрастом и при повышении кислотности. При окраске по Граму или метиленовым синим у некоторых выявляются биполярные тельца, линейная зернистость Для исчерченность цитоплазмы. некоторых видов, например, L. delbrueckii subsp. bulgaricus И L. delbrueckii subsp. lactis, характерно наличие включений зерен волютина (метахроматина, полифосфатных гранул).

Большинство лактобацилл неподвижны. Подвижность наблюдается лишь у представителей некоторых видов (а именно: *L. agilis, L. aquaticus, L. capillatus, L. ghanensis, L. mali, L. nagelii, L. oeni, L. ruminis, L. satsumensis, L. sucicola, L. uvarum, L. vini* [6]), при этом они передвигаются с помощью перитрихиальных жгутиков (Рис. 5). Интересно отметить, что перемещаться могут не только отдельные клетки, но и цепочки из 2-5 клеток. Подвижность в значительной степени зависит от питательной среды и возраста культуры; часто она обнаруживается только при выделении лактобацилл и утрачивается после нескольких пересевов.

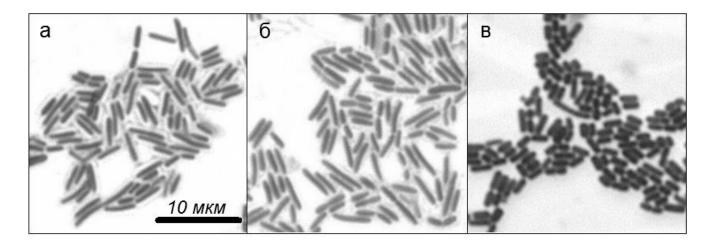


Рисунок 1 - Световая микроскопия *L. acidophilus* N.V. EP 317/402 (a), *L. bulgaricus* 51 (б) и *Lactobacillus sp.*, выделенных из фекалий детей (в). Окраска по Граму.

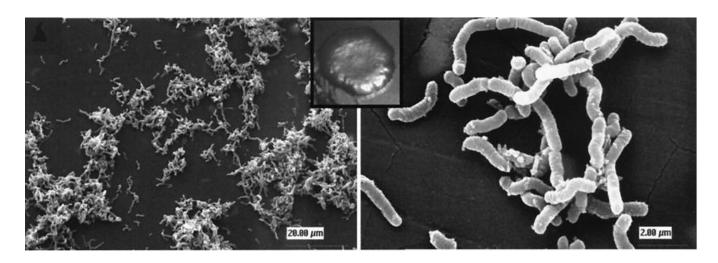


Рисунок 2 — Сканирующая электронная микроскопия клеток *L. gasseri* 4B2. В центре — морфология колонии на MRS-агаре [5].

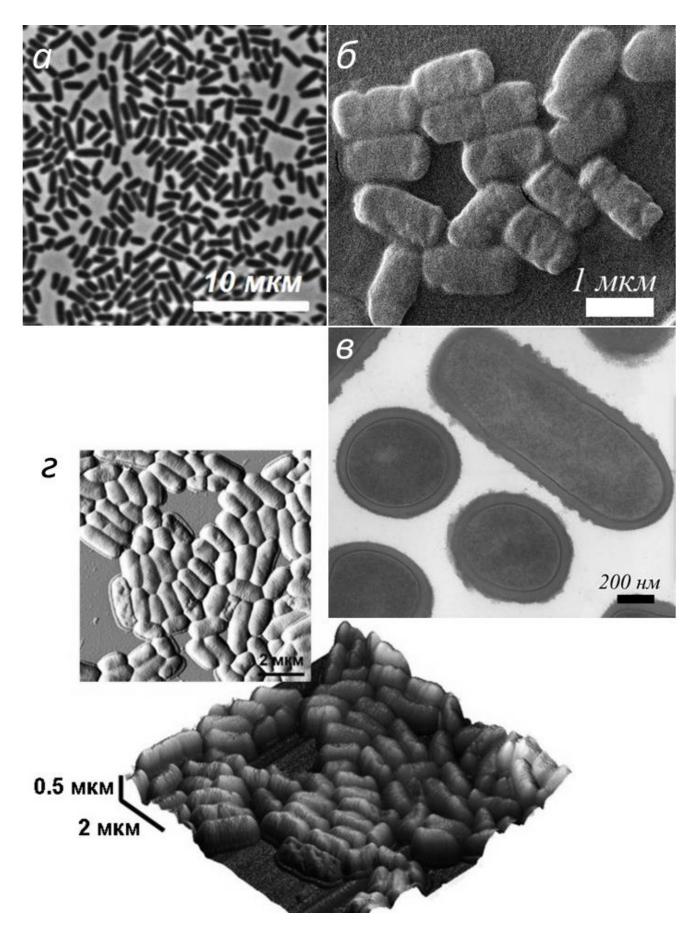


Рисунок 3 - Фазово-контрастная (а), сканирующая электронная (б) и трансмиссионная электронная (в), атомно-силовая (г) микроскопия клеток $L.\ plantarum.$

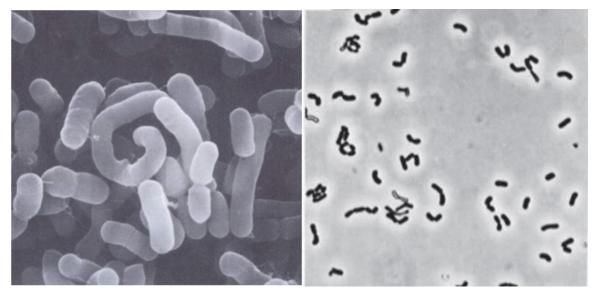


Рисунок 4 — Сканирующая электронная (слева) и световая (справа) микроскопия клеток *L. curvatus* [3, 8].

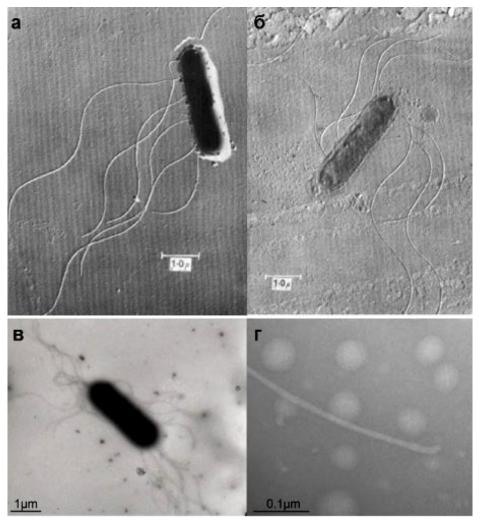


Рисунок 5 — Электронная микроскопия жгутиков лактобацилл. а, б - Сканирующая электронная микроскопия подвижных лактобацилл, выделенных из силоса [4]; в, г — трансмиссионная электронная микроскопия *L. ruminis* ATCC27782, выделенных из рубца коровы. На рисунке г виден крюк жгутика [6].

Многие лактобациллы образуют экзополисахариды (extacellular polysaccharides, EPS), которые бывают двух видов (Табл. 2). Иногда EPS лактобацилл представлены капсулой. Так, капсула диаметром 1.5-3 мкм обнаружена у бактерий *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, выделенных из йогурта и *L. kefiranofaciens*, выделенных из кефирного зерна. Благодаря способности образовывать EPS *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* применяются в производстве йогурта, они обеспечивают необходимую текстуру этого пищевого продукта. EPS *L. kefiranofaciens* образуют матрикс, называемый «кефирным зерном», который служит экологической нишей для микробного сообщества дрожжей и лактобацилл.

Таблица 2 – Экзополисахариды лактобацилл

	Внеклеточные гомополисахариды	Внеклеточные гетерополисахариды
Строение	Чаще всего декстран, глюкан, леван	Молекулярная масса: $4 \times 10^4 - 6 \times 10^6$ Могут содержать регулярно повторяющиеся единицы
Особенности биосинтеза	Синтез индуцируется добавлением сахарозы в среду	Синтезируются в небольших количествах (0.1–1.5 г/л) из нуклеотид-активируемых предшественников
Представители	Гетероферментативные: L. pontis, L. frumenti, L. sanfranciscensis, L. reuteri	Гомоферментативные и факультативно гетероферментативные: L. kefiranofaciens, L. delbrueckii subsp. bulgaricus, L. paracasei, L. rhamnosus, L. helveticus, L. sakei
Местообитание	Злаковые	Молочные продукты, мясо

1.3 Культуральные свойства лактобацилл

На плотных питательных средах лактобациллы формируют колонии сферические, часто чечевицеобразные, гладкие, непрозрачные, иногда блестящие, выпуклые, с ровными четкими контурами (Рис. 6). Обычно колонии мелкие, но у некоторых видов их размер может превышать 4 мм в диаметре. Колонии как правило не пигментированные, белые или слегка

кремового цвета, иногда — желтоватые или красноватые. Некоторые виды образуют шероховатые (rough) колонии. На средах с белками или липидами зоны просветления вокруг колоний обычно не образуются. Тем не менее, большинство лактобацилл обладают слабой протеолитической активностью (за счет секретируемых и связанных с клеточной стенкой протеаз и пептидаз) и слабой липолитической активностью (благодаря внутриклеточным липазам). Амилолитическая активность на агаризованных средах с крахмалом обнаруживается только у некоторых видов: *L. amylolyticus*, *L. amylophilus*, *L. amylovorus*, *L. fermentum*. Отдельные виды лактобацилл (*L. plantarum*, *L. delbrueckii*, *L. casei*) способны образовывать внеклеточные нуклеазы при выращивании на агаре, содержащем ДНК или РНК.

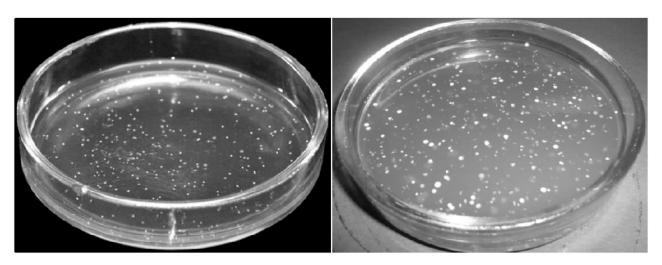


Рисунок 6 – Колонии *L. plantarum* на агаризованной среде MRS.

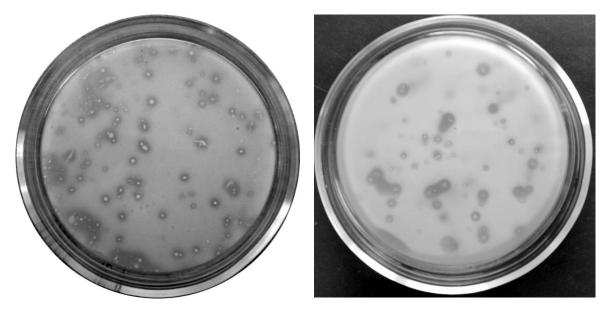


Рисунок 7 — Колонии лактобацилл на капустном агаре. Вокруг колоний видны зоны растворения содержащегося в питательной среде мела вследствие накопления молочной кислоты.

При глубинном посеве на твердую питательную среду образуются плотные колонии в виде правильных линз (чечевицеобразные), треугольной и неправильной формы или нежные, напоминающие снежинку или комочек ваты. Если в среду был добавлен мел, то вокруг колоний вследствие накопления молочной кислоты образуется зона растворения мела (Рис. 7).

Хороший рост наблюдается В полужидкой питательной среде, содержащей 0.15-0.75% агара. Небольшие концентрации агара обеспечивают окислительно-восстановительный потенциал среды микроаэрофильные условия. По благоприятные характеру полужидкой среде выделяют пять вариантов: (1) рост шариками, (2) в виде продольной полосатости, (3) придонный, (4) поверхностный, (5) равномерное помутнение среды.

При росте на жидких питательных средах лактобациллы чаще всего вызывают равномерное помутнение, вскоре после прекращения роста осаждаясь в виде ровного гомогенного, реже хлопьевидного осадка, никогда не образуя пленок на поверхности среды.

1.4 Физиолого-биохимические свойства лактобацилл

Лактобациллы чрезвычайно разнообразны по своим биохимическим и физиологическим свойствам. Однако они все имеют метаболизм бродильного типа, при этом по меньшей мере половина углерода конечных продуктов брожений приходится на лактат. В зависимости от того, какие продукты образуются в результате брожения, молочнокислые бактерии принято подразделять на 2 группы: гомоферментативные и гетероферментативные (Рис. 8).

<u>Гомоферментативные</u> виды образуют в результате брожения преимущественно молочную кислоту (85% и более) и крайне небольшие количества фумаровой и янтарной, летучих кислот, этилового спирта и углекислого газа. Они используют путь Эмбдена-Мейергофа-Парнаса (гликолиз) для образования 2 молей лактата из каждого моля глюкозы. При этом синтезируется 2 молекулы АТФ.

Оптическая активность образуемого лактата отличается у разных видов и зависит от стереоспецифичности *лактата от дактаты* (фермента, катализирующего восстановление пирувата до лактата), а также от того, содержит ли клетка *лактата рацемазу*, превращающую D-лактат в L-форму (Табл. 3).

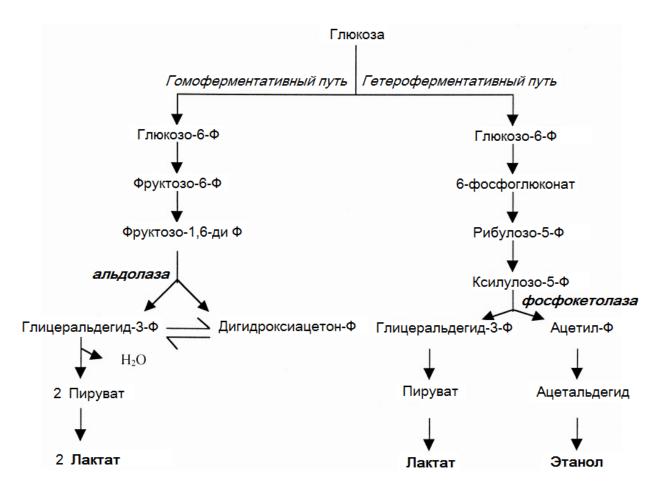


Рисунок 8 – Схема сбраживания глюкозы лактобациллами [2].

Таблица 3 – Энантиомеры лактата – продукта гомоферментативного молочнокислого брожения у лактобацилл

Энантиомер лактата	Виды лактобацилл
D -лактат	L. delbrueckii subsp. bulgaricus
	L. delbrueckii subsp. lactis
	L. delbrueckii
	L. jensenii
DL-лактат	L. acidophilus
	L. curvatus
	L. helveticus
L-лактат, следы D-лактата	L. salivarius subsp. salivarius
L -лактат	L. casei subsp. casei
	L. rhamnosus
	L. paracasei subsp. paracasei
	L. paracasei subsp. tolerans

Гетероферментативные виды образуют из 1 моля глюкозы помимо 1 моля молочной кислоты, 1 моль этилового спирта (или уксусной кислоты) и 1 моль углекислого газа, используя окислительный пентозофосфатный (синонимы: гексозомонофосфатный, фосфокетолазный, 6-фосфоглюконатный) путь расщепления глюкозы. Энергетический выход составляет 1 молекулу АТФ на 1 моль израсходованной глюкозы, однако некоторые гетероферментативные виды переводят ацетилфосфат частично или полностью в уксусную кислоту, что сопровождается образованием еще одной молекулы АТФ.

Ha ферментативном уровне ключевое отличие между гомогетероферментативными видами состоит наличии первых (альдолазы), гидролитических ферментов гликолиза y фосфокетолазы. Соответственно, гомоферментативные виды не способны сбраживать пентозы. Однако из этого правила есть исключения. У L. brevis обнаружена способность сбраживать фруктозу гомоферментативному пути с помощью индуцируемой фруктозой альдолазы. А у *L. acidophilus* обнаружена фосфокетолаза и способность расти на рибозе.

Кроме того, тип сбраживания существенно зависит от вида субстрата. Факультативно гетероферментативные бактерии L. plantarum, L. casei и др. сбраживают глюкозу по гомоферментативному пути, а рибозу превращают в ацетат и лактат гетероферментативным путем. Рибоза индуцирует у них синтез фосфокетолазы. Даже если клетки, выросшие на среде с рибозой, отмыть, они будут сбраживать глюкозу как гетероферментативные бактерии. Интересно отметить, что способность сбраживать пентозы не гарантирует рост на средах, содержащих эти углеводы, поскольку гексозы необходимы метаболизма конструктивного клетки (B частности, ДЛЯ синтеза пептидогликана).

филогенетического До утверждения подхода (основанного на 16S рРНК) в качестве основного последовательности в систематике лактобацилл, предпринимались попытки построить систематику лактобацилл на основе типа сбраживания сахаров (Orla Jensen, 1919; Kandler & Weiss, 1986). Учитывалась также морфология клеток, температурный интервал роста (рост при 15°C и 45°C), пищевые потребности. На основании этих признаков 3 физиологические группы: облигатно гомоферментативные факультативно лактобациллы (Thermobacterium), гетероферментативные (Streptobacterium), облигатно гетероферментативные (Betabacterium) (Табл. 4).

Если принять во внимание известную вариабельность физиологических и биохимических свойств лактобацилл, очевидны проблемные моменты этой систематики. Тем не менее, иногда ее используют и сегодня.

Таблица 4 – Физиологические группы лактобацилл

	Облигатно гомо- ферментативные	Факультативно гетероферментативные	Облигатно гетеро- ферментативные
Orla Jensen, 1919	Thermobacterium	Streptobacterium	Betabacterium
Рост при 45°C	+	_	±
Рост при 15°C	_	+	+
Сбраживание рибозы	_	+	+
Образование газа из глюконата	_	+	+
Альдолаза	+	+	_
Фосфокетолаза	_	Индуцибельная	Конститутивная
Примеры	L. acidophilus, L. delbrueckii subsp. delbrueckii, L. delbrueckii subsp. bulgaricus, L. delbrueckii subsp. lactis L. helveticus L. salivarius subsp. salivarius, L. jensenii	L. casei, L. paracasei subsp. paracasei, L. plantrum, L. rhamnosus, L. curvatus, L. sakei	L. kefir, L. brevis, L. fermentum, L. reuteri, L. buchneri, L. pontis

Латобациллы — хемоорганогетеротрофы. Очень требовательны к источникам питания, нуждаются в богатых сложных средах. Из углеводов они преимущественно сбраживают гексозы (глюкозу, фруктозу, маннозу, галактозу) и дисахариды (лактозу, мальтозу, сахарозу), и только гетероферментативные виды, например, некоторые штаммы *L. plantarum*, сбраживают пентозы (рибозу, ксилозу, арабинозу). Лактоза — дисахарид, поэтому прежде чем вступить на путь катаболизма, она должна быть расщеплена ферментом галактозидазой до глюкозы и галактозы. Галактоза затем фосфорилируется с образованием глюкозо-6-фосфата.

Помимо углеводов, лактобактерии нуждаются для своего развития в факторах роста: аминокислотах, витаминах, различных нуклеотидах. Рибофлавин, пантотеновая и никотиновая кислоты являются наиболее большинства необходимыми ДЛЯ жизнедеятельности видов, необходим преимущественно гетероферментативным лактобациллам, биотин и витамин В12 - только некоторым штаммам. Потребность в фолиевой кислоте, рибофлавине, пиридоксальфосфате и пара-аминобензойной кислоте различаются у разных видов.

Иногда лактобациллы называют «метаболическими инвалидами», поскольку они утратили способность к синтезу ряда метаболитов, вероятно, в результате своей специализации (рост в молоке и других средах, богатых питательными и ростовыми веществами). Так, они не способны образовывать порфирины, в частности, гем. Однако, некоторые лактобациллы способны использовать порфирины окружающей среды (например, при росте на средах с кровью) и благодаря этому демонстрировать каталазную и нитритредуктазную активность и даже образовывать цитохромы.

Почти все лактобациллы – мезофилы. Температурный оптимум развития лежит в пределах 30-40°С. Верхней температурной границей (максимумом) для них является 40°С, однако встречаются термофильные виды, которые хорошо растут и имеют активный метаболизм при температуре около 45°С. Психрофильные виды также встречаются. Температурный диапазон роста 2-53°С.

Лактобактерии - факультативные анаэробы, иногда - микроаэрофилы. Хотя большинство штаммов аэротолерантны, оптимальными для роста являются анаэробные и микроаэрофильные условия. Лактобациллы обычно слабо растут на воздухе, лучше — при пониженном содержании кислорода. Повышенная концентрация углекислого газа ($\approx 5\%$) может стимулировать рост; в строго аэробных условиях, как правило, рост замедляется. Некоторые виды являются строгими анаэробами.

Лактобациллы не содержат порфиринов, в частности, гем, поэтому они лишены таких гемопротеинов, как цитохромы и каталаза. Несмотря на это, для них характерны достаточно разнообразные механизмы защиты от токсического действия активных форм кислорода (АФК): (1) фермент супероксиддисмутаза, катализирующий реакцию дисмутации супероксидных радикалов с образованием перекиси водорода и кислорода); (2) высокие внутриклеточные концентрации ионов Mn²⁺ (до 30 мM), который способен эффективно устранять супероксидные ионы; (3) псевдокаталаза (у L. mali); (4) механизм ускорения гликолитического разложения глюкозы в аэробных условиях (в аэробных условиях водород с $HAД-H_2$ прямо передается на O_2 , освобождая часть пирувата от его акцепторной функции в молочнокислом брожении. Пируват до ацетил-КоА, окисляется последующее метаболизирование которого до ацетата приводит к синтезу молекулы АТФ).

Пигменты образуют очень редко, желтого, оранжевого или красного оттенка.

Физиологической особенностью лактобактерий является их кислотоустойчивость. Для роста лактобацилл наиболее благоприятны слегка подкисленные среды с начальным рН 5.4-6.4, причем рост культуры замедляется при достижении рН 3.6-4.0 в зависимости от вида и штамма. *L. suebicus, L. casei* и *L. plantarum* охраняют способность к росту даже при рН 2.8. В щелочных и нейтральных средах рост лактобацилл как правило замедляется.

Еще одна отличительная особенность данной группы микроорганизмов - это их спиртоустойчивость. Они способны развиваться в питательных субстратах при высоких концентрациях этилового спирта (18-24% об.).

Восстановление нитрата для лактобацилл не характерно, кроме условий, когда конечный рН поддерживается 6.0 и/или гем содержится в среде. Желатину не разжижают. Казеин не расщепляют, но большинство штаммов образуют небольшие количества растворимого азота. Индол и сероводород не образуют.

Содержание гуанина и цитозина в ДНК составляет 32-55 мол. %.

1.5 Экология лактобацилл

Лактобациллы широко распространены в природе. Как правило, они встречаются в условиях избытка углеводов, например, в пищевых продуктах (молочных продуктах, ферментированном мясе, хлебобулочных изделиях) и субстратах растительного происхождения. Кроме того, они занимают многие ниши внутри и на поверхности тела человека: в респираторном, желудочно-

кишечном и урогенитальном тракте. Эти бактерии почти никогда не обнаруживаются в почве или водоемах.

Растения и разлагающиеся растительные остатки

Лактобациллы обнаруживаются на всей поверхности растений, в ризосфере и в прикорневой зоне. В больших количествах они присутствуют в разлагающихся растительных остатках, особенно на гниющих фруктах. растений Известно, что обсемененность лактобациллами детерминирована условиями их произрастания. Бактерии L. plantarum наиболее часто высеваются с растений. На растениях были обнаружены представители видов L. fermentum, L. brevis, L. casei, L. salivarius, L. buchneri, L. coryniformis, L. paracasei, L. curvatus, L. sakei и L. fermentum. Согласно теории Т. Хига, лактобациллы входят в число так называемых «эффективных микроорганизмов» (EM, Effective Microorganisms), которые оказывают положительное воздействие на растения и способствуют более высоким урожаям. Лактобациллы действительно эффективны против биотических стрессоров благодаря своей высокой антагонистической активности в отношении растительных патогенов, лактобациллы защищают растения от биотических стрессов.

Лактобациллы присутствуют в ферментированных пищевых продуктах растительного происхождения (кислой капусте, соленых огурцах и др.) и напитках (пиве, вине, соках) (Табл. 6).

МКБ, а именно бактерии родов Lactobacillus, Pediococcus, Streptococcus, Leuconostoc, играют ключевую роль в получении силоса, причем на последних стадиях созревания (после снижения рН ниже 5.5) лактобациллы доминируют в силосной микрофлоре. Обнаружено, что процесс силосования начинается гомоферментативными лактобациллами, такими как L. plantarum и L. curvatus, а к концу 75-95% лактобацилл представлены гетероферментативными видами, преимущественно L. buchneri и L. brevis. Это объясняется тем, что гетероферментативные лактобациллы более устойчивы к уксусной кислоте.

Молоко и молочные продукты

Молоко не содержит лактобацилл, когда покидает вымя, но они быстро попадают в него из воздуха, с инструмента и др. Стрептококки опережают лактобациллы по скорости роста, поэтому титр лактобацилл низкий даже в скисшем молоке. Но со временем лактобациллы начинают преобладать из-за большей устойчивости к кислой среде.

Лактобациллы содержатся в различных кисломолочных продуктах (сыре, йогурте, кефире и др.), куда их обычно добавляют специально при изготовлении пищевого продукта (Табл. 6). Также они способны вызывать

порчу пищевых продуктов: *L. buchneri* продуцируют биогенные амины, а *L. bifermentans* вызывают растрескивание эдемского сыра.

Некоторые кисломолочные продукты являются примерами специализированных экологических ниш отдельных видов лактобацилл: эти виды стабильно выделяются из них в течение сотен лет, но практически не обнаруживаются в других источниках. Например, *L. delbrueckii* subsp. bulgaricus относится к микрофлоре йогурта, *L. delbrueckii* subsp. indicus — индийского домашнего йогурта «дахи» (dahi), *L. kefiri, L. parakefiri, L. kefiranofaciens* subsp. kefiranofaciens subsp. kefirgranum — кавказского кефира.

Желудочно-кишечный и урогенитальный тракт человека

Лактобациллы являются важным компонентом микрофлоры организма человека: они выделяются из урогенитального тракта женщин, их удается обнаружить в грудном молоке человека. Но основной средой обитания лактобацилл в организме являются различные отделы желудочно-кишечного тракта, начиная с ротовой полости и завершая прямой кишкой, при этом максимальное их содержание наблюдается в толстом кишечнике (Табл. 5). В ротовой полости содержание лактобацилл составляет менее 10³-10⁴ КОЕ/г, желудке - 10^2 - 10^3 КОЕ/мл желудочного сока, в тонкой кишке - до 10^3 - 10^4 KOE/мл кишечного сока, в толстой (в зависимости от возраста) – до $10^9~KOE/г$ фекалий. В двенадцатиперстной и тощей кишке лактобациллы вместе с энтерококками относятся к доминирующей микрофлоре. В подвздошной кишке и толстом кишечнике лактобактерии в количественном отношении уступают другим обитателям кишечника (бифидобактериям, энтеробактериям и др.), но их метаболические функции делают особенно значимой эту Лактобациллы обладают антагонистической активностью в отношении патогенных микроорганизмов И выполняют иммуномодулирующую функцию. В целом, большинство видов лактобацилл в кишечнике человека относится к транзиторной микрофлоре, следовательно, их состав и численность в значительной мере зависят от питания.

Во влагалище лактобациллы поддерживают низкий рН 3.5-4.5 и препятствуют колонизации его патогенными и условно-патогенными микроорганизмами. Количественный и качественный (видовой и даже штаммовый) состав лактобацилл часто индивидуален.

1.6 Практическое использование лактобацилл

Применение лактобацилл для приготовления пищевых продуктов

Лактобациллы, cостальными молочнокислыми наряду микроорганизмами, широко применяются В пищевой индустрии производстве ферментированных пищевых продуктов. Лактобациллы присутствуют практически во всех ферментированных пищевых продуктах, в основном, в молочных продуктах, таких как йогурт и его национальные варианты, сырах, сквашенном молоке. Они используются в ферментации овощей и мяса (в колбасном производстве); играют важную роль в приготовлении теста, пива, вина, сидра, кофе, какао и многих других (Табл. И напитков 6). Они продуктов питания придают оригинальный вкус, запах (аромат), цвет и консистенцию, при этом угнетают развитие патогенных и нежелательных микроорганизмов, предотвращая порчу и увеличивая срок хранения продуктов. Стерилизующее консервирующее действие лактобацилл обусловлено тем, продуцируют органические кислоты (прежде всего молочную, а также уксусную), этанол, ароматические соединения, перекись водорода, бактериоцины, экзополисахариды и некоторые ферменты.

Ферментация может происходить за счет развития естественной микрофлоры продукта, которую ЭТОМ случае откнисп называть «нестартерные молочнокислые бактерии» (nonstarter lactic acid bacteria, NSLAB). Этот подход известен с древних времен, но до сих пор используется при получении кислой капусты и хлеба на закваске (sourdough), некоторых сыров (чеддер, пармезан Parmigiano Reggiano), а также в производстве продуктов, для которых неизвестны точный состав микрофлоры и роль микробной сукцессии в получении готового продукта (например, некоторые национальные продукты в африканских и азиатских странах). Лактобацилл обычно более устойчивы к кислой среде по сравнению с остальными МКБ, что позволяет им вести заключительные стадии молочнокислой ферментации продуктов.

крупномасштабном производстве ферментированных пищевых продуктов в сырье добавляют стартерную культуру (закваску) – микробный препарат, содержащий большое количество клеток одного или нескольких микроорганизмов, который при добавлении в сырой материал приводит к получению из него ферментированного пищевого продукта. Основное культур преимущество применения стартерных перед спонтанной ферментацией – это возможность контролировать процесс ферментации, регулировать его скорость, стандартизировать конечный продукт.

При изготовлении сыров лактобациллы могут выполнять две функции. При приготовлении творога и немецких мягких/кисломолочных сыров, например, гарцского и майнцского, они используются для свертывания казеина в составе закваски на основе *Streptococcus lactis* и *Streptococcus thermophilus*. При изготовлении твердых сыров для свертывания казеина используют сычужный фермент, а МКБ, в том числе лактобациллы, участвуют лишь на стадии созревания сыров.

последние годы все большее распространение получают стартерные «функциональные культуры» закваски, несущие дополнительные функции, например, они могут предотвращать порчу продукта, придавать ему органолептические свойства, повышать питательную ценность или быть полезными для здоровья. С их помощью производители пытаются заменить химические пищевые добавки и сделать свои продукты более привлекательными для потребителей.

Применение лактобацилл для приготовления силоса

Молочнокислые бактерии, обитающие на растениях, играют большую роль при запасании впрок кормов для скота. Для приготовления силоса используют листья сахарной свеклы, кукурузу, картофель, травы и люцерну. Растительную массу прессуют и прибавляют к ней мелассу (кормовую патоку, отход свеклосахарного производства), чтобы повысить отношение С/N, и муравьиную или какую-либо неорганическую кислоту, чтобы заранее обеспечить преимущественный рост лактобацилл и стрептококков. В таких условиях происходит контролируемое молочнокислое брожение.

Лактобациллы как пробиотики

Благотворные эффекты лактобацилл нормальной микрофлоры кишечника на здоровье человека обусловили их широкое использование в *пробиотиках*.

Пробиотики (или эубиотики) — это живые микроорганизмы, которые при употреблении в достаточных количествах оказывают положительное влияние на макроорганизм. В состав пробиотиков могут входить дрожжевые грибы Saccharomyces boulardii, термофильные стрептококки Streptococcus thermophilus, индигенные штаммы Escherichia coli (E.coli M-17), энтерококки Enterococcus faecium, споровые аэробные бациллы (Bacillus subtilis и Bacillus cereus) и др. Не преуменьшая значение этих групп микроорганизмов, следует отметить, что позитивные эффекты нормальной микрофлоры кишечника и пробиотиков обусловлены в основном бифидо- и лактобактериями.

В пробиотикотерапии чаще всего используются следующие виды Lactobacillus: L. acidophilus, L. rhamnosus, L plantarum, L. fermentum, L. delbrueckii subsp. lactis, L. delbrueckii subsp. bulgaricus, L. reuteri, L. casei.

Большинство из известных в настоящий момент пробиотических штаммов микроорганизмов являются частью нормальной микрофлоры организма человека или присутствуют в пищевых продуктах, потребляемых уже несколькими поколениями людей во всем мире.

Пробиотики реализуют свое положительное действие на макроорганизм через целый арсенал механизмов, из которых еще не все полностью К числу расшифрованы. достаточно хорошо изученных относят антагонистическую активность отношении патогенных В патогенных микроорганизмов. Угнетение роста нежелательных микробов происходит, во-первых, благодаря продукции пробиотиками субстанций с выраженной антагонистической активностью: лизоцима, бактериоцинов, органических кислот (прежде всего молочной, а также уксусной, янтарной, муравьиной), перекиси водорода, веществ с антибиотической активностью. Так, образование лактобациллами молочной кислоты приводит к снижению рН внутрикишечного содержимого до рН 4.0-5.8 и, как следствие, сдерживанию роста и размножения гнилостных микроорганизмов. Во-вторых, пробиотики обладают адгезивной активностью к эпителиальным клеткам кишечника и могут успешно конкурировать с патогенными и условнопатогенными микробами за сайты адгезии на кишечной стенке, и, как следствие, за лимитируемые нутриенты, что в итоге также ведет к угнетению роста нежелательной микрофлоры.

Кишечной микрофлоре принадлежит важная роль в поддержании иммунологической реактивности и толерантности организма. Микрофлора кишечника активирует индукцию иммуноглобулинов, γ-интерферона и некоторых других цитокинов, повышает фагоцитарную активность макрофагов, нейтрофилов, моноцитов и других лейкоцитов.

Антагонистическая активность и взаимодействие с иммунной системой детерминируют наиболее важное свойство пробиотических микроорганизмов - обеспечение т. н. колонизационной резистентности, под которой понимают защиту кишечной стенки от проникновения во внутреннюю среду организма бактерий, токсинов и токсических продуктов различного происхождения.

Защитная функция пробиотиков выражается также в их антимутагенной Этим свойством пробиотиков активности. объясняются ИХ противоопухолевые и антиаллергенные эффекты. Пробиотики участвуют в метаболизма канцерогенных продуктов белков, гидролизе липидов, инактивации гистамина, ксенобиотиков и проканцерогенных углеводов, веществ, осуществляют деконъюгацию гидроксилирование желчных И жирных кислот.

Пробиотики усиливают пищеварительную и моторную функции ЖКТ. Участвуя в ферментативных процессах расщепления пищевых компонентов, например, брожении, нормальная микрофлора выполняет пищеварительную функцию в организме, что особенно важно при лактазной недостаточности у детей. В результате жизнедеятельности пробиотических микроорганизмов в кишечнике создаются благоприятные условия для всасывания железа, витамина Однако, участие кишечной микрофлоры метаболизме витаминов не ограничивается только усилением их всасывания. Пробиотики участвуют в синтезе витаминов В₁, В₂, В₃, РР, К и Е, а также фолиевой и аскорбиновой кислот. Нормальная микрофлора полностью обеспечивает потребности человека в витаминах В и Н (биотине); витамин ${\bf B}_{12}$ в природе синтезируют только микроорганизмы. Кроме витаминов, микроорганизмы пищеварительного тракта человека синтезируют такие биологически активные соединения, как гистидин, гистамин, холестерин, кислоту, аминогликозиды, у-аминомасляную антибиотики, некоторые токсины, участвуют в продукции ароматических соединений (индола и скатола) и аминокислот (аргинина, триптофана, тирозина). Участвуя в продукции углекислого газа, водорода, сероводорода, аммиака и метана, микрофлора регулирует газовый состав в кишечнике.

Получение молочной кислоты

Микробиологический способ получения молочной кислоты основан на культивировании термофильных штаммов лактобацилл, преимущественно *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* при температуре 48-50°C с последующим выделением образующейся молочной кислоты из ферментационной среды. Сырьем служит смесь тростникового сахара-сырца, рафинадной патоки и свекловичной мелассы. Источником необходимых факторов роста также служит солод.

Отрицательная роль лактобацилл

GRAS-статус лактобацилл и риски использования пробиотиков

ВОЗ, Управление по контролю над пищевыми продуктами и лекарственными препаратами США (FDA) и Организация по продуктам питания и сельскому хозяйству ООН (FAO) заключают, что лактобациллы и пробиотики в целом считаются безопасными и имеют *GRAS*-статус (Generally Regarded As Safe). Это означает, что они могут использоваться без ограничения в пищевой и фармацевтической промышленности.

Тем не менее не утихают споры о безопасности пробиотиков, в том числе и созданных на основе бактерий рода *Lactobacillus*. Риски использования лактобацилл как пробиотиков связывают прежде всего: а) с развитием

инвазивных, в том числе оппортунистических, инфекций, б) аллергической стороны макроорганизма; в) передачей них co от пробиотических бактерий антибиотикоустойчивости бактериям. Два последних предположения беспочвенны, поскольку известно, что пробиотики не приводят к появлению у патогенных и условнопатогенных бактерий генов антибиотикоустойчивости и не вызывают негативного иммунологического, токсического и метаболического эффекта со стороны ЖКТ и других систем органов организма человека. Пробиотики могут вызывать инвазивные инфекции, а в исследованиях in vitro и на животных обнаруживалась их способность к транслокации из кишечника. Показано участие лактобацилл в возникновении таких заболеваний человека, как кариес (см. далее), ревматические поражения сосудов, септицемия и инфекционный эндокардит. В случаях бактериемии, вызванной лактобациллами (lactobacillemia), чаще всего выделяются L. rhamnosus, L. paracasei, L. plantarum, значительно реже: L. brevis, L. delbrueckii, L. gasseri, L. jensenii, L. johnsonii, L. salivarius, и, вероятно, L acidophilus, L. casei и L. fermentum. Для лактобацилл не описаны факторы патогенности. К нежелательным свойствам относят их способность вызывать агрегацию тромбоцитов человека и связываться с коллагеном, фибриногеном и фибронектином, однако не удается выявить более частое обнаружение этих признаков у изолятов от инфицированных пациентов.

Пробиотики не должны назначаться детям с синдромом короткой кишки (из-за риска развития D-лактат-ацидоза), должны применяться с осторожностью лицами с нарушениями строения слизистого барьера ЖКТ. Также следует опасаться пробиотиков лицам с центральным венозным катетером, с сильно ослабленным иммунитетом, тяжело больным людям в палатах интенсивной терапии. В целом, принимая во внимание большое число потребителей пробиотиков и лишь небольшое число лиц, у которых обнаружено негативное действие пробиотиков, можно заключить, что пробиотики безопасны для большинства людей.

Порча пива

Более половины всех случаев бактериальной порчи пива связаны с деятельностью бактерий *L. brevis*, 15-25% случаев – с *L. lindneri*, которые обладают чрезвычайно высокой устойчивостью к хмелю. В значительно меньшей степени порчу пива связывают с лактобациллами видов *L. buchneri*, *L. casei*, *L. coryneformis*, *L. curvatus L. plantarum*, *L. paraplantarum*, *L. paracollinoides* и *L. collinoides*. Производство сортов пива, отличающихся низким содержанием хмеля и присутствием молочной кислоты, например, бельгийского Rodenbach

и Gueuze, немецкого Berliner Weisse и бантусского maheu, напротив, требует использования лактобацилл для придания алкогольному напитку кислого привкуса.

Порча вина

Присутствие лактобацилл в сусле или готовом вине нежелательно, эти бактерии вызывают его порчу: скисание, помутнение, изменение цвета и запаха. Бактерии L. kunkeei и L. nageli замедляют спиртовое брожение виноградного муста. При нарушении технологического режима производства и хранения вина существенный вред виноделию могут приносить лактобациллы L. delbrueckii, L. mali, L. casei, которые, развиваясь в винах, сбраживают сахар и вызывают превращение лимонной, винной кислот и глицерина в молочную, уксусную кислоты и углекислый газ. При восстановлении этими бактериями фруктозы в маннит, вино приобретает неприятный кисло-сладкий вкус. Лактобациллы могут образовывать вредные для здоровья человека вещества: L. higardii и L. buchneri продуцируют биогенные амины, а гетероферментативные виды, например, L. buchneri, синтезировать аргинина предшественник этилкарбамата ИЗ (карбамилфосфат). L. fructivorans и L. hilgardii развиваются даже в крепленом вине, также вызывая его порчу.

Порча пищевых продуктов

Лактобациллы могут вызывать порчу пищевых продуктов, в которых они находятся, изменяя их запах, консистенцию и цвет, вызывая помутнение и ослизнение, образуя биогенные амины.

Кариес

Представителям рода *Lactobacillus* отводится двоякая роль в патогенезе кариеса: с одной стороны, они обвиняются в развитии кариеса, поскольку постоянно обнаруживаются в ротовой полости и способны образовывать молочную кислоту, разрушающую эмаль зубов; с другой стороны, проявляют антагонистическую активность по отношению к известным возбудителям кариеса: *Streptococcus mutans*, *S. sanguis*, *S. salivarius*.

Таблица 5 – Распределение лактобацилл в организме человека

Ротовая полость	Желудок	Тонкий кишечник	Фекалии	Эпителий толстого кишечника	Влагалище
L. paracasei L. rhamnosus L. fermentum L. plantarum L. gasseri	L. gasseri L. reuteri L. ruminis	L. gasseri L. reuteri L. rhamnosus	L. gasseri L. paracasei L. ruminis L. reuteri L. plantarum L. salivarius L. sakei	L. plantarum L. rhamnosus L. paracasei	L. jensenii L. gasseri L. crispatus L. iners

Таблица 6 – Пищевые продукты и напитки, производимые с помощью брожения, и микроорганизмы, ведущие ферментацию

Продукты и напитки, получаемые с	Лактобациллы	Другие микроорганизмы
помощью брожения		
1	2	3
Кисломолочные продукты		
- Сыр	L. delbrueckii subsp. lactis,	Lactococcus lactis,
	L. delbrueckii subsp. bulgaricus,	Streptococcus thermophilus,
	L. helveticus,	Leuconostoc cremoris,
	L. casei (только в некоторых сортах)	Brevibacterium sp.,
		Propionibacterium sp.,
		Penicillium sp.(в зависимости от сорта сыра)
- Йогурт	L. delbrueckii subsp. bulgaricus	Streptococcus thermophilus
- Снежок		
- Мечниковская простокваша		
- Ряженка	L. delbrueckii subsp. bulgaricus	Streptococcus thermophilus
	(не всегда)	
- Ацидофилин	L. acidophilus	Lactococcus sp.,
		«кефирные грибки»
- Кефир	«Кефирные грибки», в т.ч.:	«Кефирные грибки», в т.ч.:
	L. kefir, L. kefiranofacies, L. brevis	Lactococcus lactis, Saccharomyces sp.
- Кумыс	L. delbrueckii subsp. bulgaricus,	Дрожжи
	L. acidophilus	
- Айран	L. delbrueckii subsp. bulgaricus	Streptococcus thermophilus
- Тан		Saccharomyces sp.

1	2	3
Ферментированные мясные продукты		
- Ферментированные сосиски (Европа);	L. sakei,	МКБ (Pediococcus sp., Leuconostoc sp.,
summer sausage (колбаса, которая не	L. curvatus,	Enterococcus sp.);
требует хранения в холодильнике),	L. plantarum	Коагулаза-отрицательные кокки
пепперони,		(в основном Kocuria varians,
салями		Staphylococcus carnosus, S. xylosus)
		Дрожжи и/или плесневые грибы
Ферментированная рыба		
- Ngari (ферментированная рыба в	L. fructosus, L. amylophilus,	Lactococcus lactis subsp. cremoris,
северо-восточной Индии)	L. coryniformis subsp. torquens,	Lactococcus plantarum,
	L. plantarum	Enterococcus faecium
- Plaa-som (ферментированный рыбный	L. ferment,	Lactococcus garvieae,
продукт в тайской кухне)	L. plantarum,	Streptococcus bovis,
	L. reuter	Weissella cibaria,
		Pediococcus pentosaceus
Ферментированные овощи		
- Квашеная капуста	Сукцессия:	Leuconostoc mesenteroides,
	L. sakei, L. curvatus, L. plantarum,	Pediococcus sp.,
	$L. brevis \rightarrow$	не всегда Lactococcus lactis
	Облигатно гетероферментативные:	
	L. brevis, L. buchneri \rightarrow	
	Гомоферментативные: L. plantarum,	
	L. curvatus, L. sakei	
- Соленые огурцы	L. plantarum, L. brevis,	Leuconostoc mesenteroides,
	L. pentosus	Pediococcus sp.

Продолжение

1	2	3
- Ферментированные оливки	L. plantarum, L. brevis	
- Квашеные овощи	L. fermentum	
- Кимчи (капуста по-корейски)	L. plantarum, L. curvatus, L. brevis, L. sakei	Leuconostoc mesenteroides
Ферментированные злаковые		
- Хлеб из теста на закваске/	Около 30 видов лактобацилл:	Weissella sp.,
Закваска для хлеба	L. acidifarinae, L. acidophilus, L. alimentarius,	Pediococcus sp.,
	L. amylovorus, L. brevis, L. delbrueckii subsp. lactis,	Leuconostoc sp.,
	L. delbrueckii, L. farciminis, L. fermentum,	Дрожжи (Candida humolis,
	L. fructivorans, L. frumenti, L. gasseri, L. hammesii,	Saccharomyces cerevisiae)
	L. hilgardii, L. homohiochii, L. johnsonii, L. mindensis,	
	L. mucosae, L. murinus, L. panis, L. parabuchneri,	
	L. plantarum, L. paralimentarius, L. pontis, L. reuteri,	
	L. sakei, L. sanfranciscensis, L. spicheri	
- Кисра (традиционные в Судане	Lactobacillus sp., L. brevis	
лепешки из сорго)		
- Тархана (традиционная турецкая	L. fermentum, L. plantarum,	Streptococcus thermophilus
пища из ферментированных злаков)	L. delbrueckii subsp. bulgaricus,	
	L. paraplantarum, L. casei	
- Kenkey (сброженная кукуруза,	L. casei, L. delbrueckii subsp. lactis,	Дрожжи
применяется в традиционной	L. plantarum, L. brevis,	
африканской кухне)	L. acidophilus, L. fermentum	
- Koko (каша или напиток из	L. fermentum	
сброженного проса в африканской	L. salivarius	
кухне)		

Продолжение

1	2	3
- Mawe (сброженная кукуруза, применяется в	L. fermentum,	Saccharomyces cerevisiae
традиционной африканской кухне)	L. brevis,	
	L. salivarius	
- Ogi (традиционная в Западной Африке каша	L. plantarum,	Leuconostoc mesenteroides,
из сброженной кукурузы, сорго или проса)	L. fermentum	Saccharomyces cerevisiae
- Dosa (индийская пища из риса и нута)	L. fermentum	Leuconostoc mesenteroides,
		Saccharomyces cerevisiae
Ферментированные др. растения		
- Agbelima (мука из маниоки в африканской	L. plantarum, L. brevis, L. fermentum	Leuconostoc mesenteroides
кухне)		
- Tempeh (темпе, популярный в Индонезии и	L. plantarum	МКБ
странах Юго-Восточной Азии		
ферментированный продукт питания из		
соевых бобов)		
- Соевый соус (изготавливается из	L. fermentum, L. plantarum, L. iners,	Aspergillus oryzae/soyae,
ферментированной сои и пшеницы)	L. farciminis, L. pentosus	Zygosaccharomyces rouxii,
		Weissella cibaria, W. confusa,
		W. kimchii, W. salipiscis,
		Streptococcus thermophilus,
		Staphylococcus gallinarum,
		S. xylosus, S. kloosii,
		Tetragenococcus halophilus,
		Candida etchellsii, C. nodaensis,
		C. versatilis, C. etchellsii

Продолжение

1	2	3
Напитки		
- Квас	Lactobacillus sp.	Saccharomyces cesevisiae
- Пиво (некоторые сорта, например, немецкое	L. delbrueckii,	Pediococcus damnosus,
Berliner Weisse, бельгийские Rodenbach и	L. delbrueckii subsp. lactis	Дрожжи (Brettanomyces,
Gueuze)	L. brevis,	Saccharomyces cerevisiae)
	L. acidophilus	
- Виски	L. fermentum, L. brevis, L. paracasei,	Saccharomyces cerevisiae
	L. plantarum, L. pentosus, L. mucosae,	
	L. ferintoshensis, L. suntoreyus,	
	L. sanfranciscensis-подобные бактерии	
- Боза (популярный в Турции, Албании,	L. plantarum,	Leuconostoc mesenteroides subsp.
Болгарии, Кыргызстане, Македонии, Боснии и	L. brevis,	dextranium
Герцеговине напиток из сброженного	L. rhamnosus,	
пшеничного, рисового, кукурузного и др.	L. fermentum	
хлеба		
- Mahewu (традиционный африканский	L. delbrueckii subsp. bulgaricus,	
напиток на основе сброженной кукурузы)	L. brevis	
- Maheu (бантусское пиво, традиционное в	L. delbrueckii subsp. delbrueckii	
странах Центральной, Восточной и Южной		
Африки)		

ІІ ОСНОВНЫЕ МЕТОДЫ РАБОТЫ С БАКТЕРИЯМИ РОДА *LACTOBACILLUS*

ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ

1. Питательная среда MRS (DeMan-Rogosa-Sharpe)

Предназначена для выделения и культивирования лактобацилл. Разработана De Man, Rogosa и Sharpe (1960).

На 1000 мл дистиллированной воды (г):

- дрожжевой экстракт	- 4.0
мясной экстракт	- 10.0
– гидролизат казеина	- 10.0
– глюкоза	- 20.0
 цитрат аммония (двузамещенный) 	- 2.0
– ацетат натрия	- 5.0
– твин 80	- 1.0
- K ₂ HPO ₄	- 2.0
– MgSO₄•7 H₂O	- 0.2
- MnSO ₄ •4 H ₂ O	- 0.05
Иногда также:	
- сорбиновая кислота	- 0.4
цистеин HCl	- 0.4

Для получения плотной среды добавить 20 г агара.

Компоненты растворить в воде, довести рН 6.2–6.5, проавтоклавировать при 0.5 атм. в течение 20-30 мин.

2. Среда Рогоза

Селективная среда для выделения и учета лактобацилл при контроле мяса, молока и других продуктов. Разработана Rogosa, Mitchell и Wisemann (1951).

На 1000 мл водопроводной воды (г):

– пептон	- 10.0
дрожжевой экстракт	- 10.0
- мясной экстракт	- 10.0
– гидролизат казеина	- 5.0
– глюкоза	- 20.0
 натрий уксуснокислый 	- 15.0
 аммоний лимоннокислый 	- 2.0
натрий лимоннокислый	- 2.8
- KH ₂ PO ₄	- 6.0
- MgSO ₄	- 0.575
- MnSO ₄	- 0.12
- FeSO ₄	- 0.034
– твин 80	- 1.0

Для получения плотной среды добавить 15-20 г агара.

Компоненты растворить в воде, довести рН 5.5 ледяной уксусной кислотой, проавтоклавировать при 3/4 атм. в течение 20 мин.

3. Питательная среда для культивирования лактобацилл с этанолом

Приготовить и простерилизовать отдельно, после чего смешать (мл):

- обезжиренное молоко 45
- 5% дрожжевой экстракт 5
- 2.5% агар50

Стерилизуют компоненты среды автоклавированием при 0.5-1 атм. в течение 20-30 мин. В полученные 100 мл среды добавить 4-8 % этилового спирта. Хранить не более двух суток, после чего спирт испаряется.

4. Молочная питательная среда для культивирования лактобацилл

На 1000 мл дистиллированной воды (г):

сухое обезжиренное молоко
натрий лимоннокислый
глюкоза
агар
100
1.5
20

Сухое обезжиренное молоко содержит жиры – 1%, белки – 36%, лактозу – 52%, минеральные вещества – 6%. Казеин молока образует буферную систему, связывая большое количество кислых метаболитов в казеинаты. Для предотвращения коагуляции казеина в молочную основу вводят раствор натрия лимоннокислого, который обладает сильными стабилизирующими и буферными свойствами. Повышению ростовых свойств питательной среды способствует содержание в ней лактозы и глюкозы.

5. Капустный агар

Для получения капустного отвара 200 г измельченной свежей капусты залить 1 л дистиллированной воды и кипятить в течение 30 мин. Отвар профильтровать через ватно-марлевый фильтр, после чего довести объем фильтрата водопроводной водой до 1 л.

На 1000 мл капустного отвара (г):

_	пептон	_	10.0
_	глюкоза	_	20.0
_	CaCO ₃	_	30.0
_	агар	_	20.0

Среду стерилизовать автоклавированием при 0.5 атм. в течение 20-30 мин.

Молочнокислые бактерии при росте на данной среде образуют вокруг колоний зоны просветления, обусловленные превращением нерастворимого углекислого кальция в растворимый лактат кальция.

6. Среда для выделения молочнокислых бактерий (по Нетрусову А.И. [1])

Для получения растительного отвара 100 г измельченной свежей капусты или моркови залить 1 л дистиллированной воды и кипятить в течение 30 мин. Отвар профильтровать через ватно-марлевый фильтр, после чего довести объем фильтрата водопроводной водой до 1 л.

На 1000 мл растительного отвара (г):

-	дрожжевой автолизат	_	10.0
_	пептон	_	10.0
_	глюкоза	_	20.0

Среду стерилизовать автоклавированием при 0.5 атм. в течение 20-30 мин. В инокулированную субстратом жидкую среду через 18-24 ч культивирования внести 8-16% этиловый спирт.

Чтобы приготовить плотную среду того же состава, добавить 2% агара и 4% измельченного мела и стерилизовать автоклавированием при 0.5 атм. в течение 20-30 мин. Спирт не добавлять.

Молочнокислые бактерии при росте на данной среде образуют вокруг колоний зоны просветления, обусловленные превращением нерастворимого углекислого кальция в растворимый лактат кальция.

7. Обрат (обезжиренное молоко)

Молоко содержит все питательные вещества, необходимые для развития гетеротрофных микроорганизмов: лактозы — около 4.5%, белков — 5%, минеральных соединений — 1%, витамины. В молоке без добавок содержится примерно 0.01% свободных аминокислот, что составляет менее, чем 20% аминокислот, которые содержатся в средах, обеспечивающих оптимальный рост бактерий. Для того, чтобы добиться нормального роста на среде с казеином молока в качестве основного источника азота, у организмов должна быть определенная способность к протеолизу.

Поскольку жир в молоке может неблагоприятно влиять на рост некоторых микроорганизмов, молоко обезжиривают. Для этого цельное молоко центрифугируют 15 мин при 700-1500 g, затем кипятят и отстаивают в

холодильнике в течение 2 сут., после чего стерилизуют автоклавированием при 0.5 атм. 30 мин. Перед стерилизацией кислотность обрата не должна превышать 22°T, иначе молоко свернется. При стерилизации в автоклаве иногда наблюдается побурение молока вследствие карамелизации лактозы и пептонизации казеина. При длительной стерилизации на дно выпадает осадок казеина, который может частично пептонизироваться. Перегретое побуревшее молоко как среду использовать нельзя.

Для роста молочнокислых микроорганизмов обрат можно разбавить водой в соотношении 2:1.

8. Глюкозо-пептонная среда (ГПС)

На 1000 мл водопроводной воды (г):

пептон
 глюкоза
 NaCl
 5.0
 10.0
 5.0

Для получения плотной среды — **глюкозо-пептонного агара (ГПА) (9)** - добавить 20 г агара.

Среду стерилизовать автоклавированием при 0.5 атм. 30 мин.

10. Среда Лоурия-Бертони (LB)

На 1000 мл дистиллированной воды (г):

триптон – 10.0
дрожжевой экстракт – 5.0
NaCl – 5.0

Для получения плотной среды – LA (11) - добавить 20 г агара.

Компоненты растворить в воде, довести рН 8.5, проавтоклавировать при 1 атм. в течение 20-30 мин.

РЕЦЕПТЫ РАСТВОРОВ

1. Физиологический раствор

0.85 г NaCl растворить в 100 мл дистиллированной воды. При необходимости простерилизовать 30 мин при 1 атм.

2. Фосфатный буфер (PBS, phosphate buffer saline)

На 800 мл дистиллированной воды (г):

NaCl
 KCl
 Na₂HPO₄
 KH₂PO₄
 0.2
 1.44
 0.24

Растворить в воде, довести рН до 7.4 с помощью HCl. Довести объем дистиллированной водой до 1000 мл. При необходимости простерилизовать 30 мин при 1 атм.

3. Сбалансированный солевой раствор Хэнкса (HBSS, Hanks' balanced salt solution)

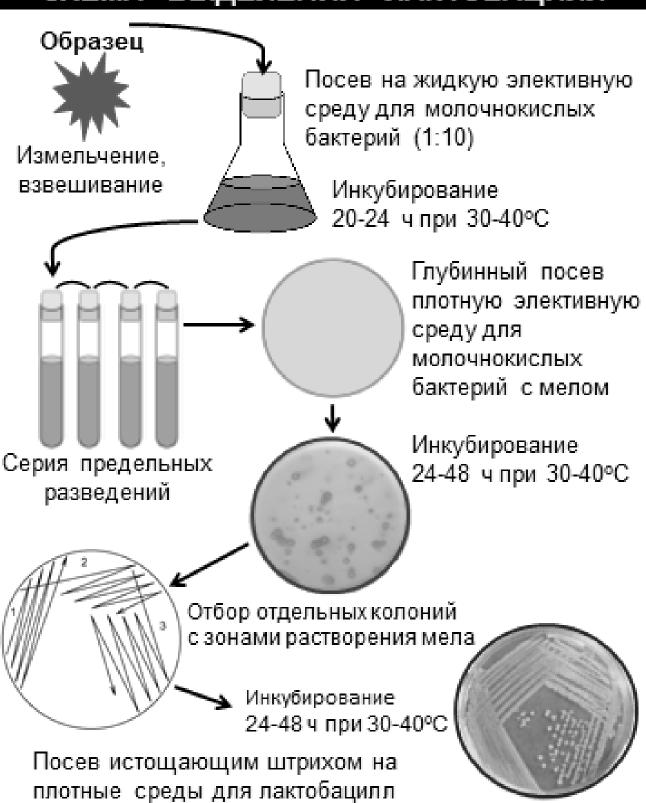
На 1000 мл дистиллированной воды (г):

- NaCl	- 8.00
- KCl	- 0.4
- CaCl ₂	- 0.14
– MgSO₄•7H2O	- 0.1
– MgCl₂•6H2O	- 0.1
– Na ₂ HPO ₄ •6H2O	- 0.1
– глюкоза	- 1.0
- NaHCO ₃	- 0.35
- KH ₂ PO ₄	- 0.06
– Феноловый красный, натриевая соль	- 0.01

HBSS может быть без Ca^{2+} и Mg^{2+} (CMF-HBSS) и без фенолового красного. Растворить в воде, довести рН до 7.4 с помощью 1М HCl или 1М NaOH. При необходимости простерилизовать 30 мин при 0.5 атм.

ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ БАКТЕРИЙ РОДА *LACTOBACILLUS*

СХЕМА ВЫДЕЛЕНИЯ ЛАКТОБАЦИЛЛ



Источниками для выделения лактобацилл служат силос и травы, пищевые (особенно кисломолочные) продукты, фекалии. Для определения присутствия и учета количества лактобацилл навеску исследуемого материала разводят в физиологическом растворе и высевают в жидкие накопительные среды или же сразу на твердые среды. Поскольку в природных субстратах лактобациллы не всегда занимают превалирующее положение, для их выделения используют элективные питательные среды, способствующие их росту и угнетающие рост сопутствующей микрофлоры. Таким образом, видовой идентификации лактобацилл предшествует сначала получение накопительной культуры молочнокислых бактерий, а затем — выделение чистой культуры микроорганизмов на плотных питательных средах (см. схему).

Накопительная культура – культура, в которой преобладают представители одной физиологической группы микроорганизмов.

Чистая (аксеническая) культура - культура, содержащая микроорганизмы одного вида.

1 этап: Получение накопительной культуры

Способ получения накопительной культуры – использование элективных (синонимы: селективных, накопительных) питательных сред, T.e. сред, способствуют питательных которые микроорганизмов росту определенной группы (в данном случае – молочнокислых бактерий), а для других являются неблагоприятными. Это среды с слабо кислым pH (MRS, Рогоза) или содержащие этанол (№ 3 и № 6).

Посев на жидкие элективные среды можно проводить непосредственно из образца, содержащего лактобациллы, либо из смыва с него. Второе чаще используют при выделении лактобацилл из растительного материала. Например, при выделении лактобацилл из силоса навеску силоса (5 г) помещают в колбу с 50 мл стерильной водопроводной воды и 3 г песка. Колбу помещают на качалку (180 об./мин) на 10 мин. Из полученной вытяжки делают высев на элективную среду.

2 этап: Получение чистой культуры

Чистую культуру получают с помощью плотных питательных сред. На них необходимо получить отдельные колонии культур, которые считают

результатом развития одной клетки. Путем пересева отдельных колоний удается выделить чистые культуры.

<u>Способы получения отдельных колоний</u> на плотной питательной среде:

1) Последовательные разведения (в стерильной водопроводной воде или физиологическом растворе) с таким расчетом, чтобы при посеве на питательную среду выросли изолированные колонии.

Для приготовления разведений стерильную водопроводную воду разлить по 9 мл в стерильные пробирки. Стерильной пипеткой/дозатором перенести в первую пробирку 1 мл исследуемой суспензии микроорганизмов — это будет первое разведение (1:10). Поменять наконечник дозатора и тщательно перемешать им полученное первое разведение (несколько раз вбирать в него и выпускать суспензию клеток). Этим же наконечником перенести 1 мл из первого разведения во вторую пробирку - это будет второе разведение ($1:10^2$). Повторить эти действия необходимое количество раз.

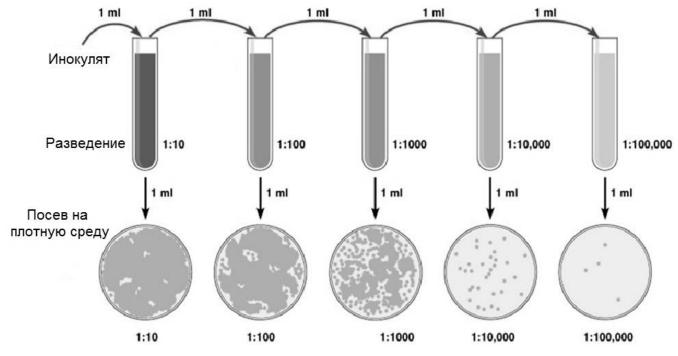


Рисунок 9 - Метод разведений [7].

Высев на плотные среды из пробирок с разведениями можно проводить двумя способами:

а) метод поверхностного посева (Рис. 10, справа)

Расплавленную и остуженную до 45-50°C плотную питательную среду разлить в стерильные чашки Петри в таком количестве, чтобы дно чашки

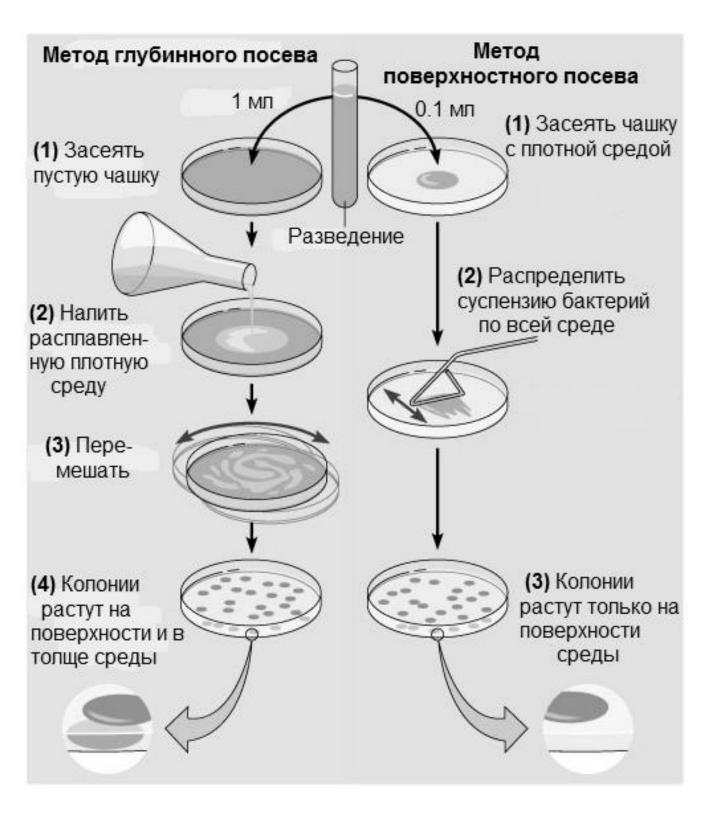


Рисунок 10 - Поверхностный и глубинный посев [7].

было полностью покрыто (15-20 мл). Чашку оставить на горизонтальной поверхности до тех пор, пока не застынет среда. Для посева приоткрыть крышку чашки Петри и на поверхность плотной среды нанести пипеткой/дозатором 100 мкл жидкой культуры. Быстро распределить каплю по поверхности среды с помощью стеклянного стерильного шпателя Дригальского.

б) метод глубинного посева (Рис. 10, слева)

В случае лактобацилл (поскольку они являются факультативными анаэробами и микроаэрофилами) этот способ предпочтителен.

В стерильную чашку Петри внести пипеткой/дозатором 1 мл жидкой культуры, после чего налить 15-20 мл расплавленной и остуженной до 45°C плотной питательной среды, аккуратно перемешать и оставить чашку на горизонтальной поверхности до тех пор, пока не застынет среда.

2) Посев истощающим штрихом

Культуру отбирают петлей и на поверхности плотной среды проводят штрихи (рис. 11a). Получить отдельные колонии можно несколькими способами:

- а) разделить чашку на 4 сектора и провести штрихи в каждом из секторов, как показано на рис. 11б.
- б) провести посев штрихом по всей поверхности чашки так, чтобы штрих был более частым в начале посева и более редким в конце (рис. 11в).

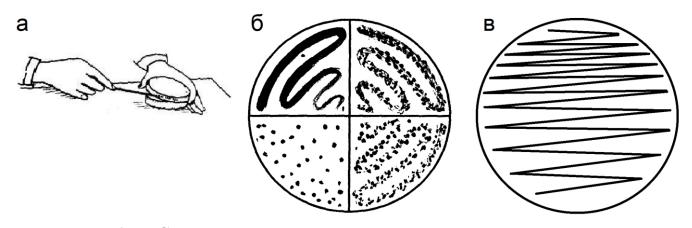


Рисунок 11 – Схема рассева культуры микроорганизмов на поверхность плотной среды петлей при посеве истощающим штрихом.

в) провести штрихи в порядке, указанном на рис. 12. **Перед каждым** новым штрихом петлю стерилизовать в пламени горелки.

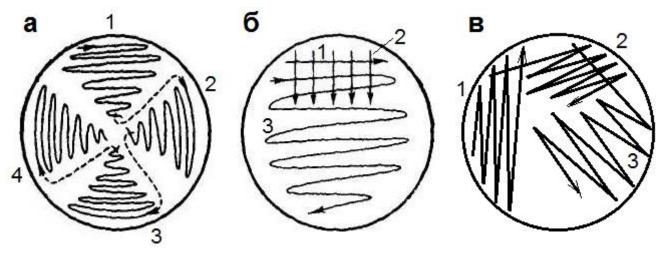


Рисунок 12 – Схема последовательности рассева культуры микроорганизмов на поверхность плотной среды петлей при посеве истощающим штрихом [1].

После посева чашки Петри помещают в термостат крышками вниз, чтобы конденсационная вода, образовавшаяся на крышке при застывании агара, не помешала получить изолированные колонии.

У микроаэрофильных и анаэробных лактобацилл может отсутствовать рост при посеве истощающим штрихом. В этих случаях необходимо использовать методы культивирования анаэробных и микроаэрофильных микроорганизмов; последовательность действий для получения чистой культуры будет следующей:

- 1) Отдельные колонии, имеющие зоны просветления на среде с мелом, пересеять на жидкую среду MRS или Рогоза и инкубировать при $30\text{-}40^{\circ}\text{C}$ в течение 48 ч.
- 2) Приготовить последовательные разведения и высеять глубинно на среду MRS или Рогоза. Инкубировать при 30-40°C в течение 48 ч.

Методы культивирования анаэробных и микроаэрофильных микроорганизмов

Соприкосновение клеток анаэробов и микроаэрофилов с кислородом воздуха должно быть сведено к минимуму или даже полностью исключено. Этого можно добиться, если использовать следующие приемы.

<u>Выращивание в высоком слое среды</u> — наиболее простой способ ограничения доступа воздуха к клеткам микроорганизмов. Жидкую среду наливают в сосуды для культивирования микроорганизмов высоким слоем. Поскольку нельзя стерилизовать среды, если они занимают более половины высоты сосуда, часть среды стерилизуют отдельно и стерильно доливают ее в сосуд для культивирования сразу после посева. Непосредственно перед посевом среду кипятят или прогревают на кипящей водяной бане 30-40 мин,

затем быстро охлаждают, чтобы в ней не успел раствориться кислород воздуха, и вносят на дно посевной материал.

<u>Культивирование в вязких средах.</u> Диффузия кислорода в жидкость уменьшается с увеличением ее вязкости. Вязкость сред можно увеличить добавлением к ним 0.2-0.3% агара. Также для создания анаэробных условий после посева наслаивают поверх жидкой среды стерильное вазелиновое масло.

<u>Выращивание в толще питательной среды</u> используют для получения изолированных колоний при выделении чистых культур или определения численности анаэробных микроорганизмов.

В крышку внести Посевной материал вносят в пробирку, содержащую 20-25 мл расплавленной и остуженной до 45°С плотной питательной среды, тщательно перемешивают и переливают в крышку стерильной чашки Петри. После того, как среда застынет, плотно прижимают к ее поверхности дно чашки. Зазор между стенками дна и крышки чашки, где среда соприкасается с воздухом, заливают стерильным парафином (рис. 15).

<u>Выращивание в стеклянном эксикаторе со свечой</u> позволяет создать микроаэрофильные условия (5% CO_2). Сосуды с посевами помещают в стеклянный эксикатор, туда же помещают зажженную свечу. Эксикатор плотно закрывают крышкой, края которой смазаны вазелином. Свеча потухнет, когда в эксикаторе не останется кислорода.



Рисунок 13. Культивирование анаэробных микроорганизмов в чашке Петри. 1 – агаризованная среда, 2 – парафин [1].

3 этап: Определение принадлежности выделенных бактерий к роду Lactobacillus

Определение принадлежности выделенных бактерий к роду *Lactobacillus* проводят по ГОСТ 10444.11-89 «Продукты пищевые. Методы обнаружения молочнокислых микроорганизмов»: по отношению к окраске по Граму, подвижности, наличию спорообразования и каталазы.

К лактобациллам, согласно ГОСТ 10444.11-89, относятся бактерии:

- грамположительные;
- неспорообразующие;
- палочковидные (от коротких, кокковидных до длинных);
- каталаза-отрицательные.

Отдельно отмечают форму, размер и цвет колоний на плотной питательной среде.

Микроскопия

<u>Подготовка предметных и покровных стекол</u> <u>для приготовления препаратов</u>

Предметные и покровные стекла считаются чистыми, когда капля воды растекается по их поверхности.

Новые стекла обычно кипятят в 1%-ном растворе соды, затем промывают дистиллированной водой, слабым раствором соляной кислоты и затем опять дистиллированной водой.

Стекла, бывшие в употреблении, кипятят в мыльной воде и затем не менее суток выдерживают в растворе хромовой смеси. От бихромата стекла отмывают дистиллированной водой.

Можно быстро обезжирить стекла, натерев их в сухом виде хозяйственным мылом и очистив затем чистой хлопчатобумажной тканью.

Хромовая смесь

6 г двухромовокислого калия растворяют в 100 мл воды, затем в раствор осторожно добавляют 100 мл серной кислоты.

После многократного употребления темно-оранжевый цвет хромовой смеси меняется на темно-зеленый. Такая смесь уже не обладает моющими свойствами.

Хромовая смесь разрушает растительные и животные ткани. При попадании на одежду или кожу, немедленно промыть большим количеством воды, затем разбавленным раствором аммиака или соды, а затем снова водой.

Окраска по Граму

По Граму рекомендуется окрашивать клетки молодых, лучше суточных, культур. На одном предметном стекле рекомендуется приготовить препараты трех культур: в центре — исследуемой, справа и слева — известных грамположительных (например, *Micrococcus luteus, Bacillus subtilis*) и грамотрицательных (например, *Escherichia coli*).

- 1) Приготовить фиксированный препарат: на обезжиренное предметное стекло нанести каплю исследуемой культуры, распределить на площади 4см² и высушить на воздухе. Провести фиксацию в пламени горелки.
- 2) Окрасить в течение 2 мин карболовым генциановым или кристаллическим фиолетовым. Краситель смыть, не промывая.
- 3) Нанести на мазок раствор Люголя на 2 мин, после чего раствор Люголя слить.
- 4) Нанести на мазок 96%-й этиловый спирт на 30-45 сек. Быстро промыть водой.
- 5) Окрасить мазок водным раствором фуксина в течение 2 мин. Краситель слить, препарат промыть водой и высушить.
- 6) Микроскопировать с иммерсионной системой. Грамположительные бактерии имеют сине-фиолетовый, грамотрицательные розово-красный цвет.

Определение каталазной активности

Для определения каталазной активности на предметное стекло наносят каплю 3%-й перекиси водорода, в ней суспендируют тестируемую культуру. Либо можно нанести раствор перекиси водорода на поверхность питательной среды в чашке Петри с выросшими на ней колониями бактерий.

Каталаза, продуцируемая бактериями, будет разлагать перекись водорода на воду и кислород, выделение которого в виде пузырьков регистрируется. Если бактерии обладают каталазной активностью, то наблюдается бурное газообразование через 1–5 мин после внесения бактерий, если нет – газ не выделяется.

Лактобациллы не имеют каталазы, следовательно, образование газа в пробе с перекисью водорода не наблюдается. В качестве положительного контроля можно взять каталаза-положительные бактерии *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Serratia marcescens*.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА МОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ МЕТОДОМ ТИТРОВАНИЯ

Титруемая кислотность среды (например, молока, обрата) или культуральной жидкости выражается в градусах Тернера (°T) или процентах молочной кислоты.

1°T соответствует 1 мл 0.1 Н раствора NaOH, пошедшему на нейтрализацию (титрование) 100 мл исследуемой среды, разбавленной водой (на 10 мл исследуемой среды 20 мл воды).

Для титрования берут 10 мл исследуемой среды, добавляют 20 мл дистиллированной воды, 1-2 капли фенолфталеина и титруют 0.1н раствором NaOH при постоянном взбалтывании до появления устойчивой слабо-розовой окраски.

ХРАНЕНИЕ КУЛЬТУР ЛАКТОБАЦИЛЛ

Лактобациллы не образуют эндоспоры, поэтому при хранении при $+4^{\circ}$ С культуры нуждаются в частых пересевах (не реже 1 раза в месяц).

Для хранения при -86° С необходимо посеять бактерии на жидкую среду, инкубировать 24-48 ч при 37° , отобрать часть культуры и смешать 1:1 с 50% раствором глицерина. Заморозить в жидком азоте, после чего, не размораживая, поместить образец в низкотемпературный холодильник, снабдив этикеткой, на которой указать штамм и дату.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ РИСУНКОВ

- 1. Нетрусов А.И., Егорова М.А., Захарчук Л.М. и др. **Практикум по микробиологии.** Нетрусов А.И. (ред.) М.: Издательский центр «Академия», 2005. 608 с.
- 2. Caplice E., Fitzgerald G.F. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation // Int. J. Food Microbiol. 1999. V. 50(1-2). P. 131-149.
- 3. De Vos P., Garrity G.M., Jones D., Krieg N.R., Ludwig W., Rainey F.A., Schleifer K.-H., Whitman W.B. (eds), **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, 2nd ed., Volume 3: The Firmicutes, Springer, New York, 2009, P. 465-511
- 4. Gemmell M., Hodgkiss W. The physiological characters and flagellar arrangement of motile homofermentative lactobacilli // J . gen. Microbiol. 1964. V. 35. P. 519-526.
- 5. Jankovic I., Ventural M., Meylan V., Rouvet M., Elli M., Zink R. Contribution of aggregation-promoting factor to maintenance of cell shape in *Lactobacillus gasseri* 4B2 // J. Bacteriol. 2003. V. 185(11). P. 3288-3296.
- 6. Neville B.A., Forde B.M., Claesson M.J., Darby T., Coghlan A., Nally K., Ross R.P., O'Toole P.W. Characterization of pro-inflammatory flagellin proteins produced by *Lactobacillus ruminis* and related motile Lactobacilli // PLoS One. 2012. V. 7(7). e40592.
- 7. Copyright © 2004 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.
- 8. Электронный ресурс: http://www.4shared.com.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА ПО ТЕМЕ «БАКТЕРИИ РОДА *LACTOBACILLUS*»

- 1. Axelsson L. (1998) Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: Lactic acid bacteria. Microbiology and functional aspects, 2nd ed., Salminen S., von Wright A (Eds.), Marcel Dekker Inc., New York, P. 1-72.
- 2. De Vos P., Garrity G.M., Jones D., Krieg N.R., Ludwig W., Rainey F.A., Schleifer K.-H., Whitman W.B. (eds), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd ed., Volume 3: The Firmicutes, Springer, New York, 2009, P. 465-511
- 3. Felis G.E., Dellaglio F. Taxonomy of Lactobacilli and Bifidobacteria // Curr. Issues Intest. Microbiol. 2007. V. 8(2). P. 44-61.
- 4. Hammes W.P., Hertel C. (2006). The Genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In: The Prokaryotes, Volume 4: Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria, Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.-H., Stackebrandt E. (eds.) Springer. P. 320-403
- 5. Hammes W.P., Vogel R.F. (1995) The genus *Lactobacillus*. In: The lactic acid bacteria, Volume 2: The genera of lactic acid bacteria, Wood B.J.B., Holzapfel W.H. (Eds.), Blackie Academic and Professional, Chapman & Hall, Glasgow, P. 19-54.
- 6. *Lactobacillus* molecular biology: from genomics to probiotics, Ljungh Å., Wadström T. (eds.). Caister Academic Press, Norfolk, UK, 2009, 206 p.
- 7. Tannock G.W. A special fondness for Lactobacilli // Appl. Environ. Microbiol. 2004. V. 70, N. 6. P. 3189–3194.

Приложение

Таблица 1 – Видовой состав рода Lactobacillus

1	
L. acetotolerans	L. delbrueckii subsp. indicus
L. acidifarinae	L. delbrueckii subsp. jakobsenii
L. acidipiscis	L. delbrueckii subsp. lactis
L. acidophilus	L. delbrueckii subsp. sunkii
L. agilis	L. dextrinicus
L. algidus	L. diolivorans
L. alimentarius	L. equi
L. amylolyticus	L. equicursoris
L. amylophilus	L. equigenerosi
L. amylotrophicus	L. fabifermentans
L. amylovorus	L. faecis
L. animalis	L. farciminis
L. apis	L. farraginis
L. antri	L. fermentum
L. apodemi	L. floricola
L. aquaticus	L. florum
L. aviarius subsp. araffinosus	L. fornicalis
L. aviarius subsp. aviarius	L. fructivorans
L. backii	L. frumenti
L. bifermentans	L. fuchuensis
L. brevis	L. futsaii
L. buchneri	L. gallinarum
L. cacaonum	L. gasseri
L. camelliae	L. gastricus
L. capillatus	L. ghanensis
L. casei	L. gigeriorum
L. ceti	L. graminis
L. coleohominis	L. hammesii
L. collinoides	L. hamsteri
L. composti	L. harbinensis
L. concavus	L. heilongjiangensis
L. coryniformis subsp. coryniformis	L. hayakitensis
L. coryniformis subsp. torquens	L. helveticus
L. crispatus	L. hilgardii
L. crustorum	L. hokkaidonensis
L. curieae	L. hominis
L. curvatus	L. homohiochii
L. delbrueckii subsp. bulgaricus	L. hordei
7 1 11 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	7 •

L. iners

L. delbrueckii subsp. delbrueckii

Таблица 1 – Видовой состав рода Lactobacillus (продолжение)

L. ingluvieiL. intestinalis

L. iwatensis L. jensenii

L. johnsonii

L. kalixensis

L. kefiranofaciens subsp. kefiranofaciens

L. kefiranofaciens subsp. kefirgranum

L. kefir

L. kimchicus L. kimchiensis

L. kimchii L. kisonensis

L. kitasatonis

L. koreensis L. kunkeei L. lindneri

L. malefermentans

L. mali

L. manihotivorans

L. mindensis L. mucosae L. murinus L. nagelii

L. namurensis L. nantensis

L. nasuensis

L. nenjiangensis L. nodensis

L. odoratitofui

L. oeni

L. oligofermentans

L. oris L. oryzae

L. otakiensis L. ozensis

L. panis

L. pantheris L. parabrevis

L. parabuchneri

L. paracasei subsp. paracasei

L. paracasei subsp. tolerans

L. paracollinoides L. parafarraginis

L. parakefiri

L. paralimentarius L. paraplantarum

L. pasteuriiL. paucivoransL. pentosus

L. perolens

L. plantarum subsp. plantarum

L. plantarum subsp. argentoratensis

L. pobuzihii L. pontis L. porcinae L. psittaci

L. rapiL. renniniL. reuteriL. rhamnosus

L. rogosae

L. rossii L. ruminis L. saerimneri

L. sakei subsp. carnosus L. sakei subsp. sakei

L. salivarius subsp. salivarius

L. sanfranciscensis

L. saniviri

L. satsumensis L. secaliphilus L. selangorensis

L. senioris L. senmaizukei L. sharpeae

L. shenzhenensis

L. silageiL. siliginisL. sobrius

Таблица 1 – Видовой состав рода Lactobacillus (продолжение)

- L. songhuajiangensis
- L. spicheri
- L. sucicola
- L. suebicus
- L. sunkii
- L. taiwanensis
- L. thailandensis
- L. tucceti
- L. uli
- L. ultunensis

- L. uvarum
- L. vaccinostercus
- L. vaginalis
- L. versmoldensis
- L. vini
- L. xiangfangensis
- L. yonginensis
- L. zeae
- L. zymae