

I 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 подвида. (Перечень видов и подвида 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 названия лактобациллы (*Lactobacillus*) можно встретить термин лактобактерии (*Lactobacterium*), впервые использованный Н.А. Красильниковым для обозначения бактерий этой группы в «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 комитетом по номенклатуре бактерий в 1971 г. 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

№	Род	Таксономия рода
1	<i>Lactobacillus</i>	Домен <i>Bacteria</i>
2	<i>Pediococcus</i>	Фила XIII. <i>Firmicutes</i> Class I. <i>Bacilli</i> Порядок II. <i>Lactobacillales</i> Семейство I. <i>Lactobacillaceae</i>
3	<i>Aerococcus</i>	Семейство II. <i>Aerococcaceae</i>
4	<i>Carnobacterium</i>	Семейство III. <i>Carnobacteriaceae</i>
5	<i>Enterococcus</i>	Семейство IV. <i>Enterococcaceae</i>
6	<i>Tetragenococcus</i>	
7	<i>Vagococcus</i>	
8	<i>Oenococcus</i>	Семейство V. <i>Leuconostocaceae</i>
9	<i>Leuconostoc</i>	
10	<i>Weissella</i>	
11	<i>Lactococcus</i>	Семейство VI. <i>Streptococcaceae</i>
12	<i>Streptococcus</i>	

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 рода *Lactobacillus* встречаются бактерии с 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 штаммов выявляются биполярные тельца, зернистость или линейная исчерченность цитоплазмы. Для 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.

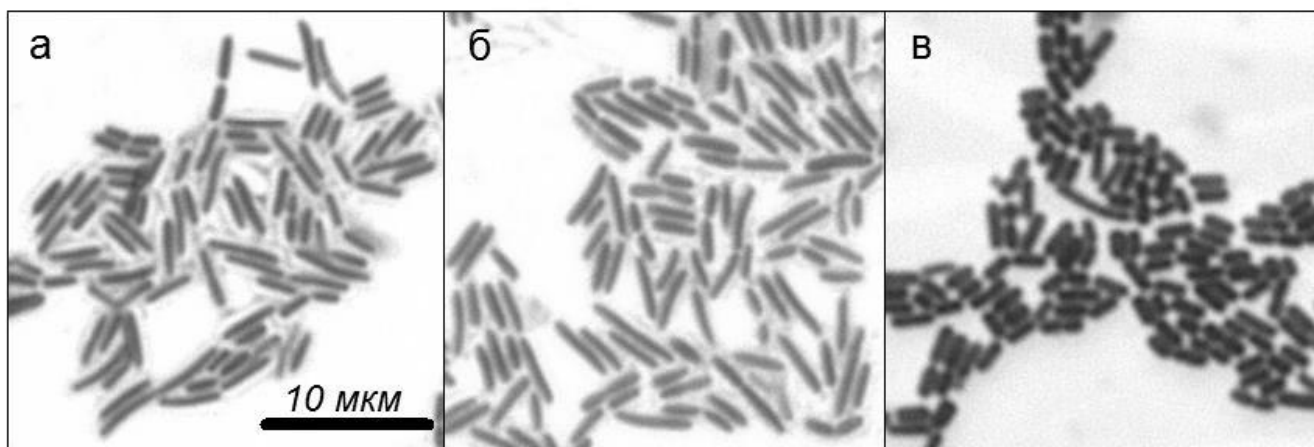


Рисунок 1 - Световая микроскопия *L. acidophilus* N.V. EP 317/402 (а), *L. bulgaricus* 51 (б) и *Lactobacillus* sp., выделенных из фекалий детей (в).
Окраска по Граму.

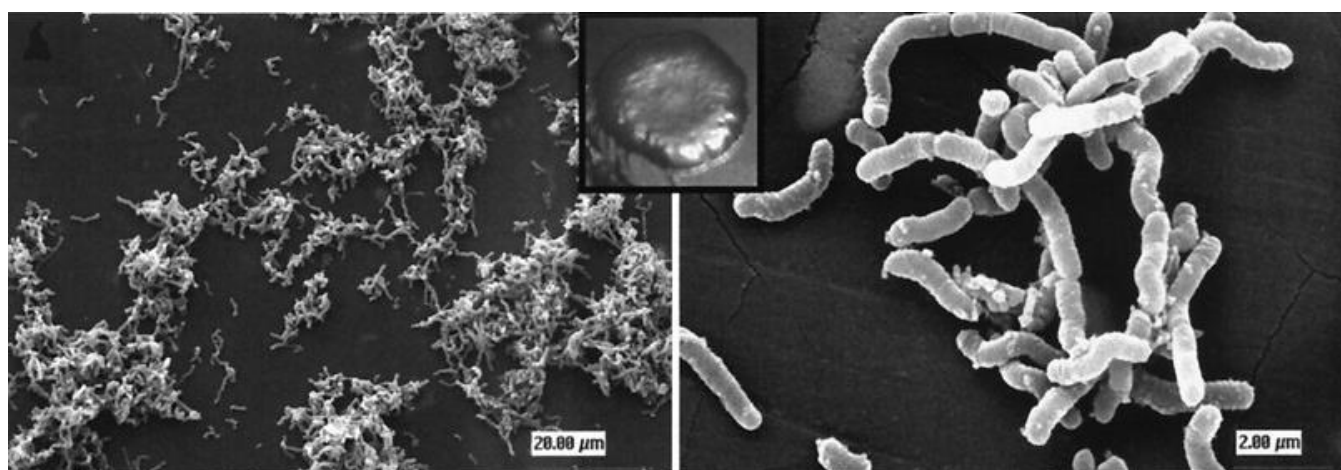


Рисунок 2 – Сканирующая электронная микроскопия клеток *L. gasseri* 4B2. В центре – морфология колонии на MRS-агаре [5].

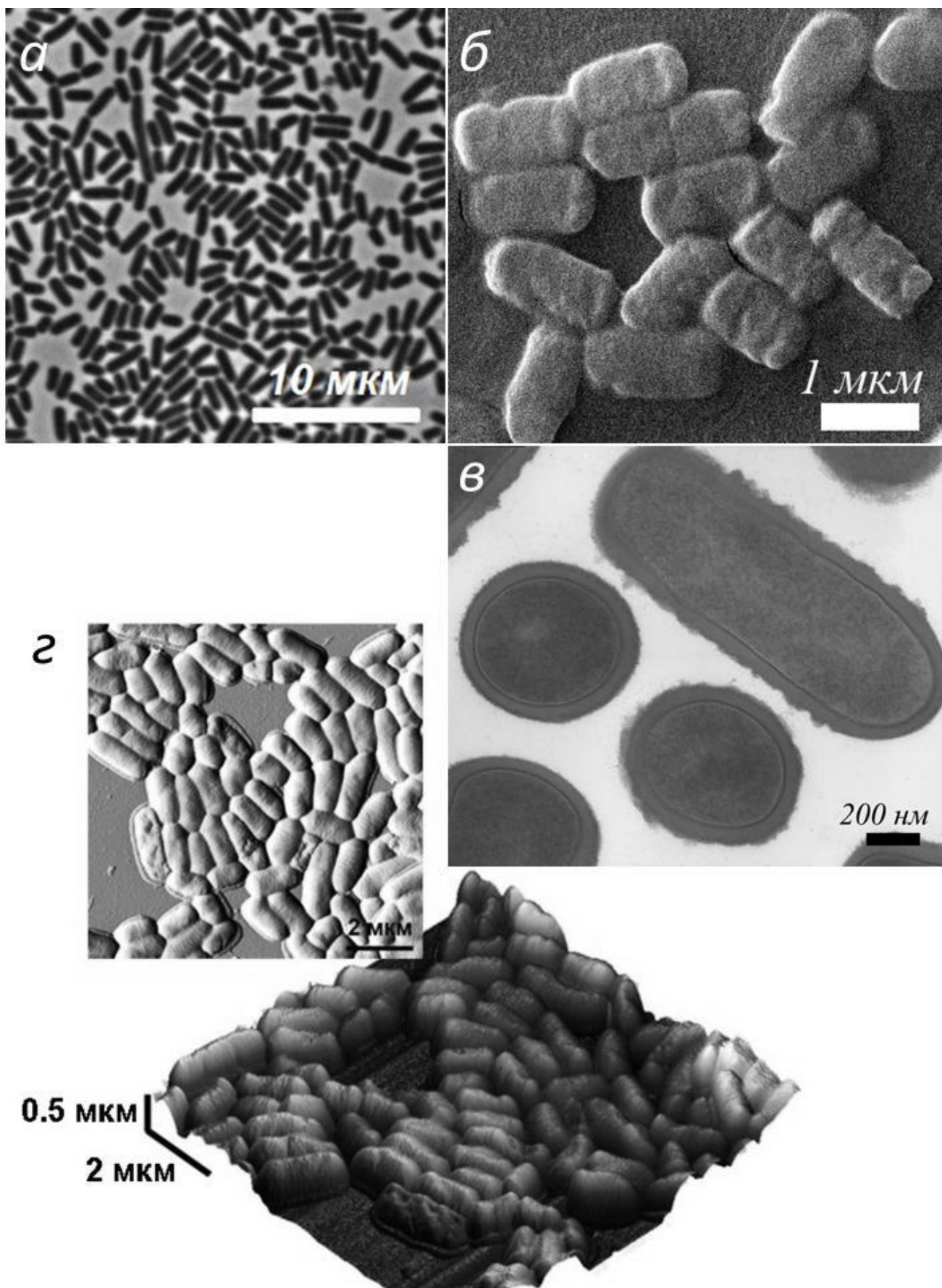


Рисунок 3 - Фазово-контрастная (а), сканирующая электронная (б) и трансмиссионная электронная (в), атомно-силовая (г) микроскопия клеток *L. plantarum*.

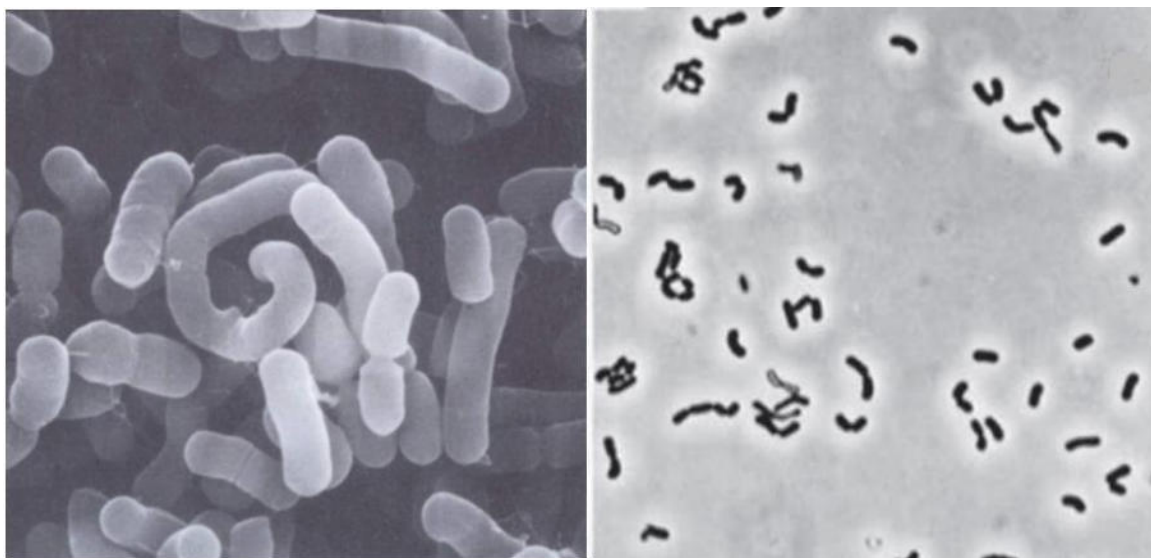


Рисунок 4 – Сканирующая электронная (слева) и световая (справа) микроскопия клеток *L. curvatus* [3, 8].

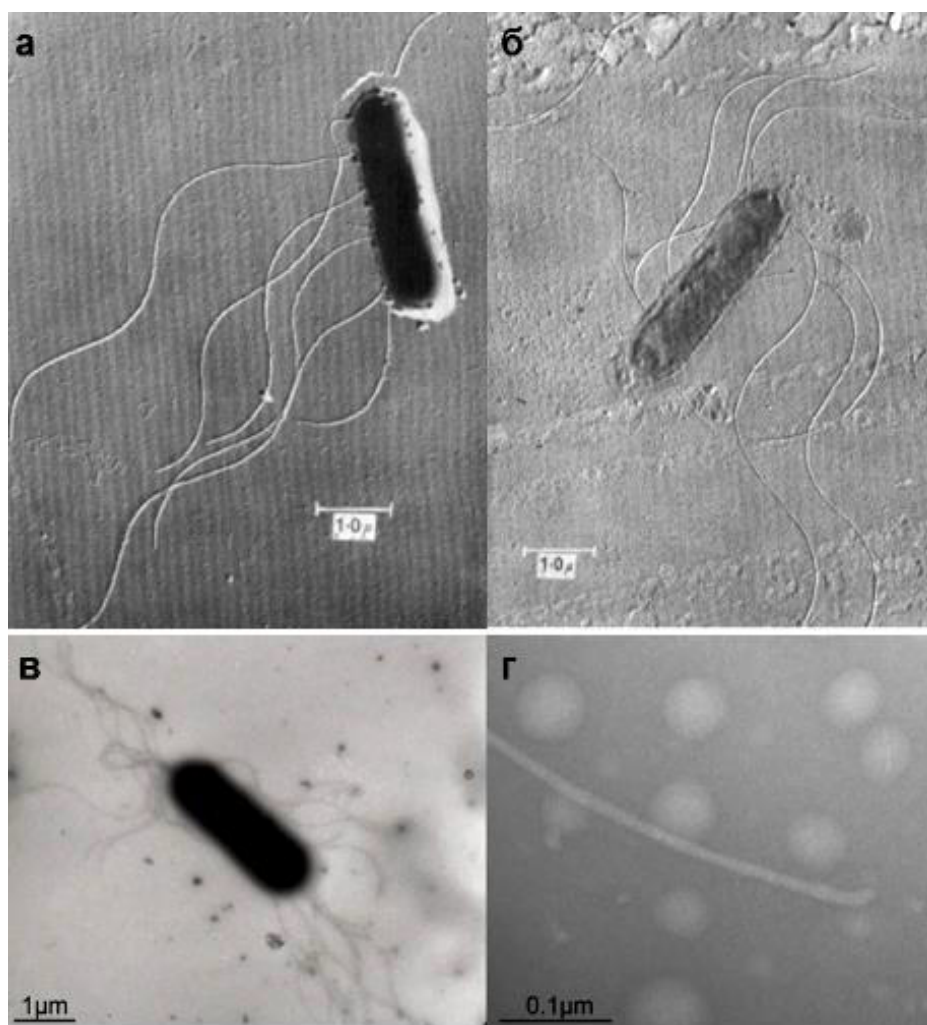


Рисунок 5 – Электронная микроскопия жгутиков лактобацилл.

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 (extracellular 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 – Экзопполисахариды 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: <i>L. pontis</i> , <i>L. frumenti</i> , <i>L. sanfranciscensis</i> , <i>L. reuteri</i>	Гомоферментативные и факультативно гетеро-ферментативные: <i>L. kefiranofaciens</i> , <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. sakei</i>
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.

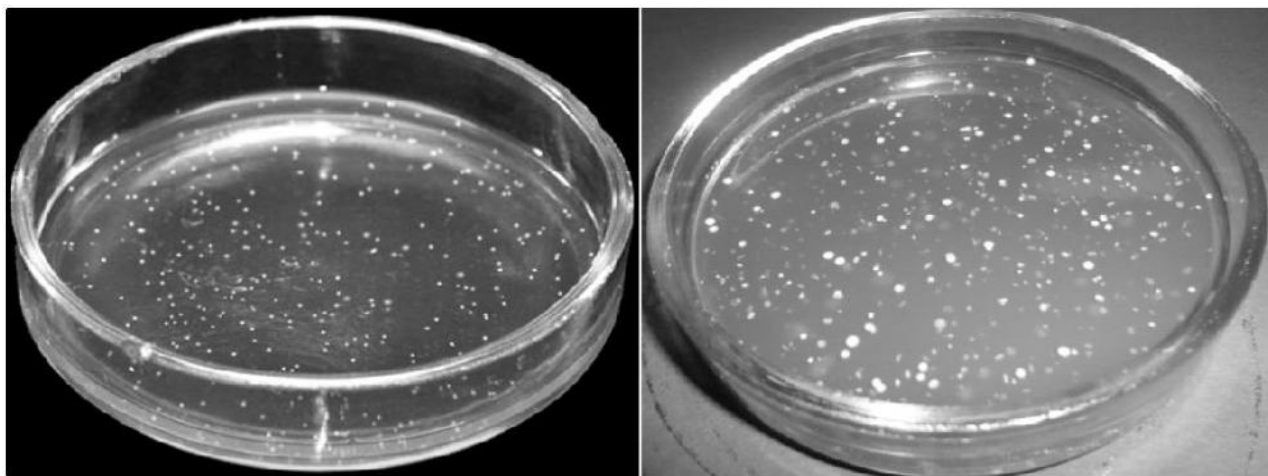


Рисунок 6 – Колонии *L. plantarum* на агаризованной среде MRS.

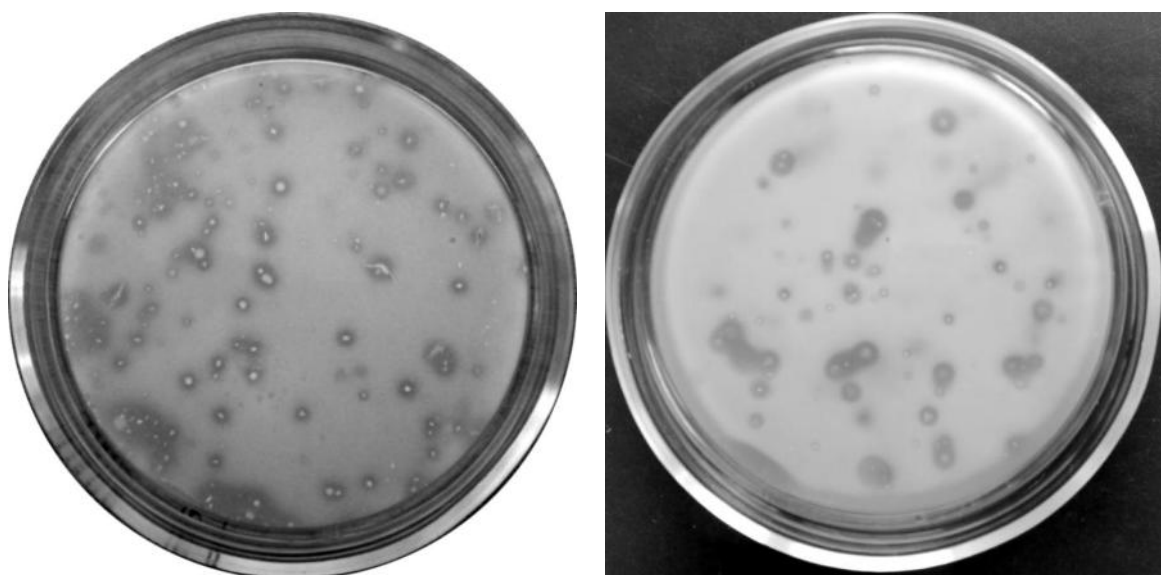


Рисунок 7 – Колонии лактобацилл на капустном агаре. Вокруг колоний видны зоны растворения содержащегося в питательной среде мела вследствие накопления молочной кислоты.

При глубинном посеве на твердую питательную среду образуются плотные колонии в виде правильных линз (чечевицеобразные), треугольной и неправильной формы или нежные, напоминающие снежинку или комочки 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 низкий окислительно-восстановительный потенциал среды и создают благоприятные микроаэрофильные условия. По характеру роста в 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 брожения 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).

Гомоферментативные 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 *лактатдегидрогеназы* (фермента, катализирующего восстановление пирувата до лактата), а также от того, содержит ли клетка *лактатрацемазу*, превращающую D-лактат в L-форму (Табл. 3).

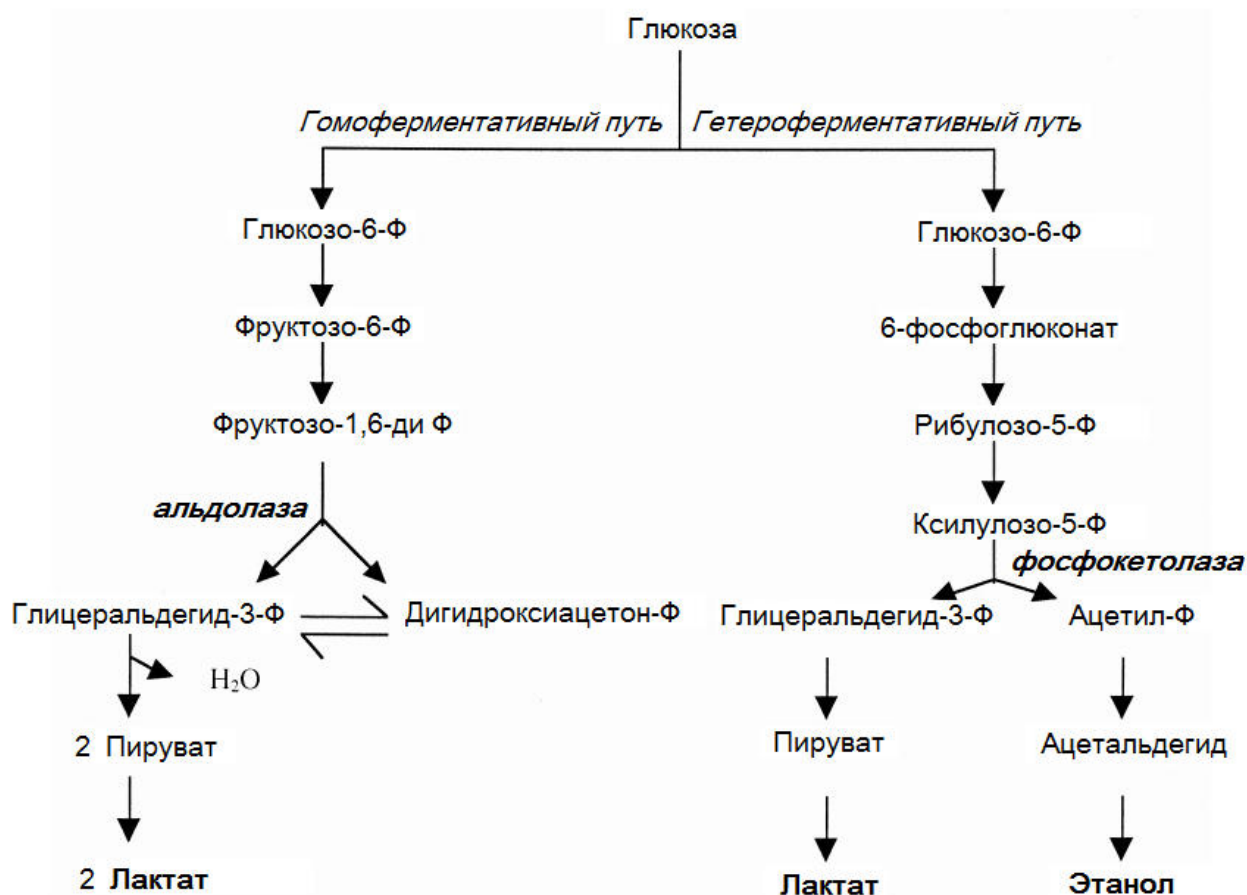


Рисунок 8 – Схема сбраживания глюкозы лактобациллами [2].

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

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

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.

На ферментативном уровне ключевое отличие между гомо- и гетероферментативными видами состоит в наличии у первых гидролитических ферментов гликолиза (*альдолазы*), а у вторых - *фосфокетолазы*. Соответственно, гомоферментативные виды не способны сбраживать пентозы. Однако из этого правила есть исключения. У *L. brevis* была обнаружена способность сбраживать фруктозу по 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 для конструктивного метаболизма клетки (в частности, синтеза пептидогликана).

До утверждения филогенетического подхода (основанного на последовательности 16S рРНК) в качестве основного 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 выделяли 3 физиологические группы: облигатно гомоферментативные лактобациллы (*Thermobacterium*), факультативно 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	<i>Thermobacterium</i>	<i>Streptobacterium</i>	<i>Betabacterium</i>
Рост при 45°C	+	—	±
Рост при 15°C	—	+	+
Сбраживание рибозы	—	+	+
Образование газа из глюконата	—	+	+
Альдолаза	+	+	—
Фосфокетолаза	—	Индукцибельная	Конститутивная
Примеры	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> , <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> <i>L. helveticus</i> <i>L. salivarius</i> subsp. <i>salivarius</i> , <i>L. jensenii</i>	<i>L. casei</i> , <i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>L. sakei</i>	<i>L. kefir</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. buchneri</i> , <i>L. pontis</i>

Лактобациллы – 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 различных факторах роста: аминокислотах, витаминах, нуклеотидах. Рибофлавин, пантотеновая и никотиновая кислоты являются наиболее необходимыми для жизнедеятельности большинства видов, тиамин необходим преимущественно гетероферментативным лактобациллам, биотин и витамин B12 – 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 нитрит-редуктазную активность и даже образовывать цитохромы.

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

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.