

# TULPINI DE BACTERII LACTICE AUTOHTONE NOI DIN SPECIA *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS*

DOI: 10.5281/zenodo.2906158  
CZU: 579.864:578.1+634.146:579.864

Doctor în biologie **Anatoli CARTAȘEV**

Institutul Științifico-Practic de Horticultură și Tehnologii Alimentare

## NOVEL INDIGENOUS LACTIC ACID BACTERIA STRAINS OF *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS*

**Summary.** New strains of *S. thermophilus* lactic acid bacteria with high biotechnological potential for the milk processing industry, isolated from milk and spontaneous fermentation dairy products from various parts of the Republic of Moldova were selected and described. New data have been collected on the biodiversity of native *S. thermophilus* strains in milk and spontaneous fermentation dairy products from different parts of the Republic of Moldova. The application of molecular biology techniques to identify strains studied by *S. thermophilus* demonstrated the relevance of PCR and FT-IR techniques for the identification of lactic bacteria species from natural sources.

**Keywords:** *Streptococcus thermophilus*, dairy products, technological properties, autochthonous strains.

**Rezumat.** Au fost selectate și descrise tulpini noi de bacterii lactice din specia *S. thermophilus* cu potențial biotehologic înalt pentru industria de procesare a laptelui, izolate din lapte și produse lactate de fermentare spontană colectate din diferite zone ale R. Moldova. Au fost acumulate date noi referitor la biodiversitatea tulpinilor autohtone de *S. thermophilus* din lapte și produsele lactate de fermentare spontană din diferite zone ale R. Moldova. Aplicarea tehnicilor de biologie moleculară pentru identificarea tulpinilor studiate de *S. thermophilus* au demonstrat relevanța tehnicilor PCR și FT-IR pentru identificarea speciilor de bacterii lactice din surse naturale.

**Cuvinte-cheie:** *Streptococcus thermophilus*, produse lactate fermentate, proprietăți tehnologice, tulpini autohtone.

## INTRODUCERE

Una dintre cele mai importante probleme ale industriei produselor lactate constă în selectarea de specii și tulpini bacteriene corespunzătoare cerințelor înaintate de diverse tehnologii de prelucrare a laptelui prin fermentare [1].

Bacteriile lactice reprezintă o grupă largă de microorganisme cu proprietăți fenotipice similare exprimate prin următoarele caracteristici: bacterii Gram pozitive, imobile, nu formează spori, facultativ anaerobe, principalul produs al fermentării carbohidraților fiind acidul lactic [2].

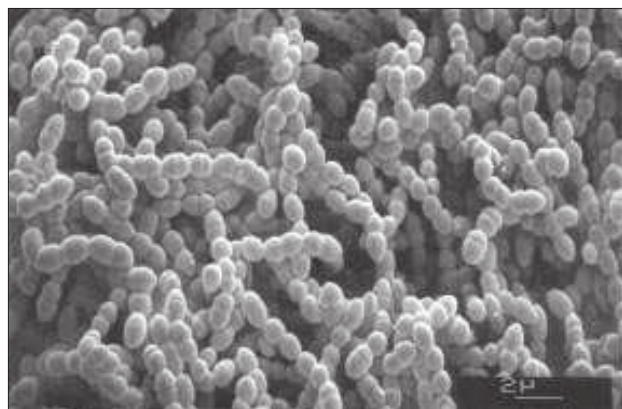
Bacteriile lactice sunt utilizate în diverse tehnologii de fabricare a produselor lactate (brânză proaspătă, smântână și lapte fermentat), rolul lor în aceste produse fiind complex și divers: acidularea, care permite coagularea laptelui și reduce riscul de dezvoltare a microbiotei nedorite; formarea compușilor aromatici menite să asigure calitatea organoleptică a produselor lactate; producerea agenților de îngroșare în scopul ameliorării proprietăților reologice ale laptelui fermentat [3].

Intrarea formală a streptococilor în istoria microbiologiei a avut loc în anul 1879, când Louis Pasteur a izolat aceste microorganisme. O descriere detalia-

tă a genului *Streptococcus* a fost realizată în 1884 de patologul german F. J. Rosenbach [4]. În anul 1903 H. Schottmüller face primele încercări pentru diferențierea reprezentanților genului *Streptococcus* după aspectul coloniilor pe mediul geloză-sânge – în tulpini β-hemolitice și nehemolitice [5]. Până în 1933 pentru identificarea streptococilor s-a utilizat doar analiza activității fermentative, în anul respectiv R. Lancefield propunând o metodă de depistare a grupului specific de antigene ce interacționează cu tulpinile β-hemolitice [6]. În 1937 J. Sherman a prezentat schema divizării streptococilor în patru grupuri după reacția hemolitică, antigenelor de suprafață și caracteristicile fenotipice [7]. Unul dintre cele patru grupuri a inclus streptococii lactici – bacterii nepatogene pentru organismul uman, utilizate în industria laptelui. Streptococii lactici s-au manifestat ca tulpini nehemolitice, incapabile să crească la temperatura de 10°C și capabile să se dezvolte la 45°C, nerezistente în mediul cu concentrația 6,5% NaCl.

Morfologia celulară a tulpinilor de bacterii lactice din specia *S. thermophilus* este prezentată în figura 1.

Statutul taxonomic al *S. thermophilus* a fluctuat începând cu anii '80 ai sec. al XX-lea datorită relației strânse dintre aceste microorganisme cu *Streptococcus*



**Figura 1.** Morfologia celulară a *S. thermophilus* în microscopia de scanare electronică [8].

*salivarius* și, drept urmare, a fost clasificat ca subspecie *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*. Însă *S. salivarius* nu se dezvoltă în mediul de lapte în prezența *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* și nu este potrivit pentru fabricarea iaurtului [9]. Iată de ce, în anul 1991 Schleifer a propus revenirea la statutul separat al speciei *Streptococcus thermophilus* în baza criteriilor genetice și fenotipice [7].

**Scopul** lucrării a constat în izolarea, identificarea și evaluarea caracteristicilor fiziologo-biochimice și biotehnologice ale unor tulpini noi de *S. thermophilus*, selectate în vederea elaborării culturilor starter autohtone și utilizării lor la fabricarea produselor lactate fermentate.

## MATERIALE ȘI METODE

Cercetările științifice destinate izolării, identificării și selectării bacteriilor lactice din specia *Streptococcus thermophilus* de interes biotehnologic au fost efectuate în Laboratorul de Biotehnologii Alimentare din cadrul Direcției „Tehnologii Alimentare” a Institutului Științifico-Practic de Horticultură și Tehnologii Alimentare (IȘPHTA) din Republica Moldova. Identificarea moleculară a bacteriilor lactice selectate a fost efectuată în Departamentul de microbiologie, biologie moleculară și biotehnologie a Institutului de Cercetare a Alimentelor din cadrul Centrului Național de Agricultură și Produse Alimentare din Bratislava, Slovacia.

În calitate de obiecte de cercetare au servit tulpini autohtone de bacterii lactice izolate din probe de lapte și produse lactate de fermentare spontană din Republica Moldova, precum și tulpini de referință depozitate în diverse colecții de microorganisme.

Tulpinile autohtone de *Streptococcus thermophilus* au fost izolate din habitatul natural – lapte crud și produse lactate de fermentare spontană, din diferite regiuni ale Republicii Moldova –, identificate și depozitate ulterior în Colecția Națională de Microorganisme

Nepatogene a Institutului de Microbiologie și Biotehnologie al AȘM și în Colecția Ramurală a Laboratorului de Biotehnologii Alimentare IȘPHTA. Izolarea culturilor pure de microorganisme lactice din specia *S. thermophilus* s-a efectuat prin inoculări periodice (de 10-15 ori) în lapte degresat steril până la formarea coagulului dens. Fiecare probă a fost însămânțată în șase eprubete, dintre care două au fost incubate în termostat la 30 °C, două – la 37 °C și două – la temperatura de 45 °C.

Pentru cultivarea bacteriilor lactice din specia *S. thermophilus* au fost utilizate mediile nutritive: laptele degresat sterilizat, lapte hidrolizat, mediul pentru determinarea fermentării hidraților de carbon, laptele turnesolat, mediul agarizat în bază de lapte hidrolizat. În lapte hidrolizat se adaugă 1,5-1,8% de agar-agar. Se lasă pentru 20-30 min să se înmoaie, apoi se topește la 1 atm timp de 15 min. Mediul obținut se distribuie în vasele cu volumul necesar și se sterilizează 10 min la 1 atm (121±2) °C [10].

Pentru realizarea lucrării au fost utilizate metode microbiologice, biochimice, fizico-chimice clasice de investigare a bacteriilor lactice. Produsele lactate fermentate obținute au fost caracterizate conform standardelor corespunzătoare. La fel, în scopul identificării tulpinilor noi selectate, au fost utilizate metode ale biologiei moleculare: izolarea, purificarea și cuantificarea ADN-ului; amplificarea fragmentelor ADNr 16S cu utilizarea reacției de polimerizare în lanț (PCR – Polymerase Chain Reaction) urmată de analiza electroforetică a produșilor de amplificare; determinarea variabilității genetice a tulpinilor selectate prin amplificarea secvențelor repetitive ale ADN-ului (tehnica PCR); spectroscopia în infraroșu cu transformanta Fourier (FT-IR). Pentru optimizarea mediilor de cultură au fost utilizate metode matematice de planificare, iar datele experimentale au fost prelucrate statistic.

## REZULTATE ȘI DISCUȚII

Calitatea și valoarea nutritivă a produselor lactate depind, în mare măsură, de activitatea biotehnologică a bacteriilor lactice, de selectarea corectă a consorțiilor pentru elaborarea culturilor starter și respectarea procesului tehnologic de producere [11]. Selectarea bacteriilor lactice pentru industria laptelui presupune izolarea culturilor din sursele naturale, evidențierea și cercetarea celor mai valoroase proprietăți ale acestor culturi sub aspect industrial.

Pentru izolarea bacteriilor lactice din specia *S. thermophilus* este necesar să se utilizeze mediul care satisface necesitățile lor nutriționale. Cât privește cerințele nutriționale, bacteriile lactice sunt printre cele

mai pretențioase organisme, caracterizându-se prin exigențe înalte față de componența mediilor de cultură utilizate pentru izolarea și studierea lor. Ele necesită pentru creștere și dezvoltare compuși azotați, glucide, vitamine, minerale ș. a. Bacteriile lactice termofile din specia *S. thermophilus*, conform Bergey, sunt capabile să se dezvolte la temperaturi cuprinse între 42-45 °C. Temperatura optimă de creștere se încadrează între 37-40 °C [12].

Laptele este mediul complet și cel mai indicat pentru selectarea culturilor de bacterii lactice. Atunci când se izolează bacteriile lactice este oportun de a folosi în calitate de mediu de cultură laptele degresat steril, care este mai favorabil dezvoltării microorganismelor lactice, comparativ cu cel gras. Astfel, are loc o selecție naturală a tipurilor de bacterii lactice care posedă o activitate biochimică înaltă.

Pentru izolarea culturilor pure de bacterii lactice din specia *S. thermophilus* au fost prelevate probe de lapte crud și produse lactate de fermentare spontană din 12 regiuni ale Republicii Moldova: Dondușeni, Edineț, Florești, Soroca, Ungheni, Orhei, Chișinău, Anenii Noi, Căușeni, Taraclia, Cahul, Vulcănești. Culturile s-au incubat la 37 °C, până la formarea coagulului. Cultivarea culturii îmbogățite a fost realizată în lapte steril degresat (0,1% de grăsime) până la formarea coagulului dens fără erupții. După fiecare însămânțare conținutul eprubetelor a fost testat la puritate de cultură. Culturi pure se obțin prin însămânțări zilnice (nu mai puțin de 10 ori).

Au fost studiate circa 300 de probe de lapte crud și produse lactate de fermentare spontană, dintre care au fost obținute șapte izolate bacteriene cu proprietăți caracteristice speciei *Streptococcus thermophilus*. Rezultatele sunt prezentate în tabelul 1.


Identificarea unui microorganism necunoscut constituie un proces succesiv de atribuire la un oarecare grup mare de bacterii ce posedă proprietăți comune, iar apoi de clasare într-o familie din cadrul grupului și comparat cu un microorganism ce face parte din această familie. La etapa finală de testare sunt comparate proprietățile morfologice, culturale, biochimice, patogene cu orice tip de bacterie din cadrul speciei [13].

Evaluarea inițială a morfologiei celulelor bacteriene este o etapă foarte importantă pentru identificarea finală. La determinarea proprietăților morfologice ale bacteriilor din specia *S. thermophilus*, au fost studiate următorii parametri: forma și localizarea celulelor, mobilitatea acestora, dimensiunea, caracteristica colorării după Gram. Studiul morfologiei celulelor tulpinilor de bacterii lactice se bazează pe evaluarea microscopică a preparatelor colorate și fixate.

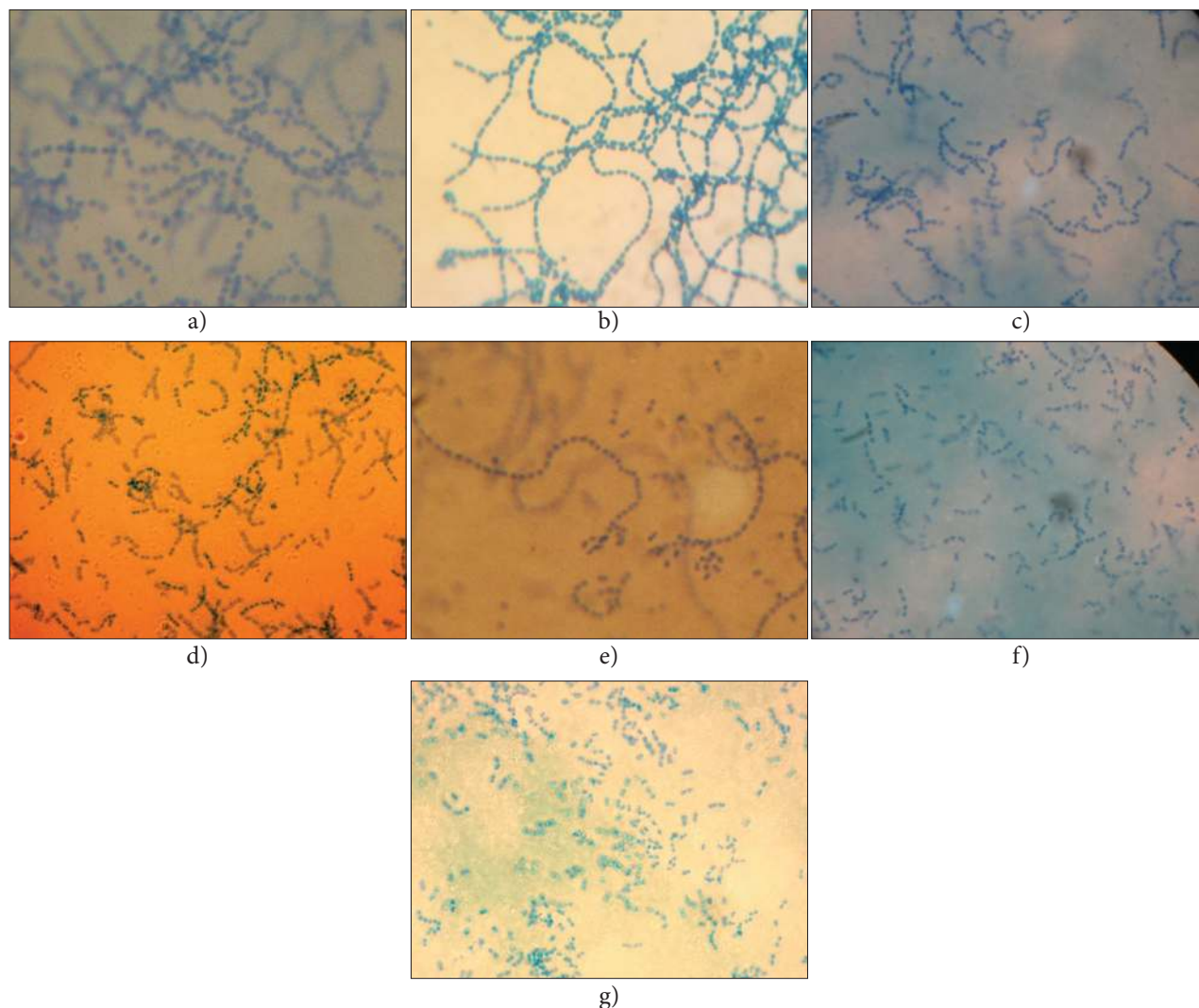
Se știe că de lungimea lanțurilor de streptococi lactici depinde viscozitatea coagulului format și capacitatea de reținere a apei [14]. De aceea la studierea proprietăților reologice ale culturilor starter trebuie să se ia în considerare impactul lor asupra formării structurii coagulului. În acest sens, tulpinile selectate au fost investigate microscopic. Rezultatele microscopiei cu obiectiv cu imersie (puterea de mărire 100x) sunt reprezentate în figura 2. Microscopia izolatelor de bacterii lactice termofile a arătat că toate tulpinile noi izolate din diferite regiuni ale Republicii Moldova sunt Gram pozitive, prezintă coci plasați în lanțuri de diferite lungimi, ceea ce este caracteristic speciei *S. thermophilus* [11]. Prevalarea în preparatele microscopice a *S. thermophilus* L65 și *S. thermophilus* L177 a lanțurilor lungi poate indica asupra unei capacități sporite de reținere a apei coagulului.

Tabelul 1  
Originea tulpinilor studiate

Nr. crt.	Codul tulpinii	Originea
1	L 12	mun. Chișinău
2	L 65	rn. Cahul
3	L 102	rn. Dondușeni
4	L 109	rn. Anenii Noi
5	L 177	rn. Taraclia
6	L 232	rn. Soroca
7	L 292	rn. Florești







**Figura 2.** Aspectul microscopic al tulpinilor: a) L12; b) L65; c) L102; d) L109; e) L177; f) L232; g) L292. (Autor foto A. Cartășev).

Studierea proprietăților fiziologice ale microorganismelor este necesară nu numai din punct de vedere al obținerii biomasei. Cunoașterea lor servește la identificarea caracteristicilor distinctive ale microorganismelor și posibilității utilizării practice a acestora. Parametrii respectivi stau la baza majorității proceselor biotehnologice microbiene. Toate acestea evidențiază importanța studierii proprietăților fiziologice și necesităților nutritive ale culturilor de microorganisme.

Principalele însușiri fiziologo-biochimice ale tulpinilor studiate sunt: rezultatul colorației Gram, producerea de CO<sub>2</sub>, activitatea catalazei, hidroliza argininei, rezistența la temperaturi ridicate, creșterea în mediul salin, alcalin și în mediul cu albastru de metilen (tabelul 2).

Datele din tabelul 2 indică asupra faptului că tulpinile de microorganisme testate sunt Gram pozitive, nu produc catalaza, rezistă la temperatura de 60 °C timp

de 30 min, dar la minutul 32 nu s-au mai înregistrat culturi viabile, nu cresc pe mediu de NaCl cu concentrația 4%, dar se dezvoltă la concentrația de 2% de clorură de sodiu, nu sunt rezistente la 0,1% albastru de metilen, nu cresc în mediul alcalin cu pH 9,2.

Determinarea capacității de fermentare a diferitor carbohidrați constituie o etapă crucială la identificarea bacteriilor lactice, ținând cont de faptul că fiecare tulpină poate asimila un număr limitat de surse de carbon [14].

Rezultatele cercetărilor efectuate sunt prezentate în tabelul 3. Analizând datele inserate în tabel, putem observa că tulpinile fermentează lactoza, glucoza și zaharoza. Toate tulpinile cercetate nu au fermentat esculina, ceea ce reprezintă un argument în plus în favoarea apartenenței tulpinilor studiate la specia *S. thermophilus* [15].

Pentru identificarea tulpinilor de microorganisme până nu demult se utilizau preponderent testele tradi-

Tabelul 2  
Proprietățile fiziologo-biochimice ale tulpinilor *S. thermophilus* (la 40 °C)

Numărul tulpinii	Caracteristici									
	Colorația Gram	Producerea CO <sub>2</sub> din glucoză	Producerea catalazei	Producerea amoniacului din arginină	Rezistența la încălzire 60°C timp de 30 min	Rezistența la NaCl, %		Creșterea în albastru de metilen, %		Creșterea în mediul alcalin, pH
						2,0	4,0	0,01	0,1	
L 12	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-
L 65	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-
L 102	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-
L 109	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-
L 177	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-
L 232	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-
L 292	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-

Notă: + reacție pozitivă; - reacție negativă

ționale fenotipice, bazate pe studiul particularităților morfologice, fiziologice și biochimice ale culturilor. Însă utilizarea exclusivă a tehnicilor tradiționale nu întotdeauna permite selectarea culturilor sigure și cu un potențial biotehnologic înalt de utilizare în calitate de culturi starter pentru fabricarea produselor lactate fermentate. Datorită faptului că bacteriile lactice au proprietăți similare, apar dificultăți în identificarea speciilor și diferențierea lor la nivel intraspecific [16].

În ultimii ani, pentru identificarea și studierea bacteriilor lactice izolate din ecosistemele alimenta-

re sunt aplicate tot mai larg tehnicile biologiei moleculare. Tipizarea genetică permite evaluarea și diferențierea rapidă a tulpinilor noi izolate. Compararea proprietăților fenotipice și genotipice ale tulpinilor *S. thermophilus* dezvoltate în lapte crud și-n produsele lactate fermentate permite obținerea tulpinilor valoroase care pot fi utilizate pe scară industrială la fabricarea produselor lactate.

Streptococii termofili, izolați din diverse surse naturale și produse lactate, în cele mai multe cazuri, sunt tulpini care aparțin genurilor *Streptococcus* și

Tabelul 3  
Fermentarea hidraților de carbon de către tulpinile izolate

Numărul tulpinii	Hidrocarburi										
	Glucoză	Lactoză	Zaharoză	Galactoză	Ramnoză	Maltoză	Rafinoză	Manoză	Sorbită	Glicerină	Esculină
L 12	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
L 65	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
L 102	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
L 109	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
L 177	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
L 232	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
L 292	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Notă: + fermentează; - nu fermentează

*Enterococcus*. Bacteriile lactice termofile din specia *Streptococcus thermophilus* sunt reprezentanții „utili” sub aspectul aplicării practice. Mulți savanți remarcă însă dificultăți în diferențierea și identificarea genurilor bacteriene *Streptococcus* și *Enterococcus* folosind doar metodele de clasificare fenotipice [13]. Autorii respectivi au descris necorespunderea caracteristicilor fenotipice clasice ale acestor genuri, cum ar fi intervalul temperaturilor de creștere tipice, rezistența la antibiotice, fermentarea carbohidraților, capacitatea de a crește pe un mediu ce conține esculină sau bilă, caracteristici ce pot fi uneori întâlnite la reprezentanții ambelor specii. Tulpinile de streptococi, ce nu pot fi identificate sigur din cauza asemănării caracteristicilor morfologice și biochimice cu cele ale enterococilor, sunt numite tulpini „atipice” de *S. thermophilus* [17].

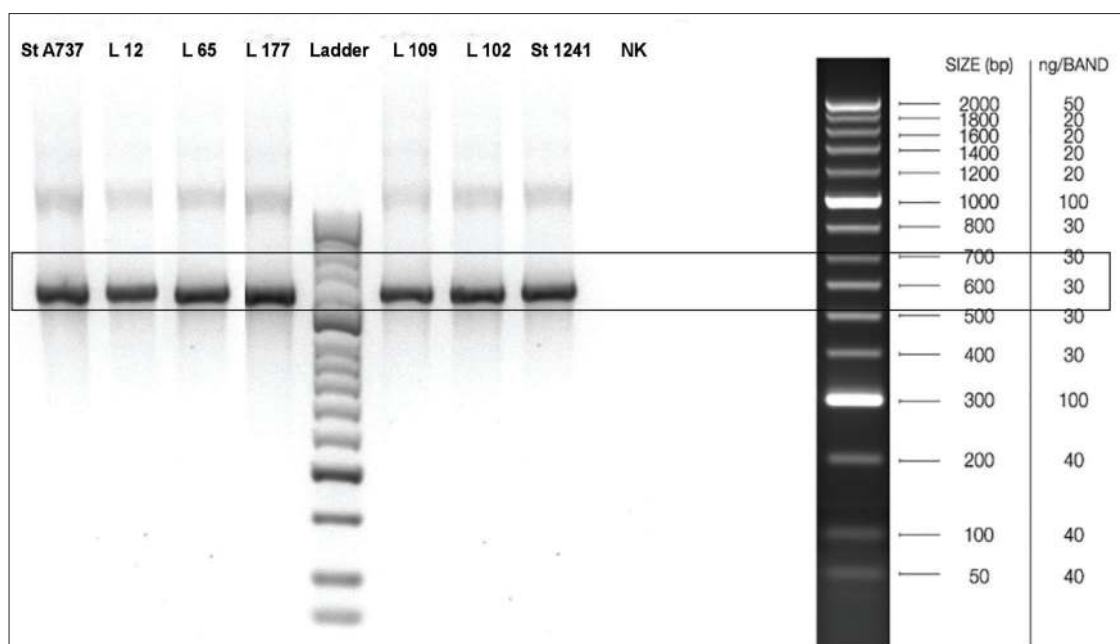
Prin urmare, clasificarea rapidă și specifică a bacteriilor este un obiectiv important al microbiologiei, care astăzi se realizează folosind, de rând cu metodele tradiționale, și metode ale biologiei moleculare ce oferă o caracterizare genetică destul de exactă a tulpinilor cercetate.

Reacția de amplificare PCR a regiunii intergenice 16S-23S permite tipizarea bacteriilor preponderent la nivel de specie și subspecie. Gena țintă cel mai frecvent utilizată pentru identificarea bacteriană este gena ADNr 16S, de aproximativ 1500 bp, care codifică o porțiune din subunitatea ribozomală 30S [18]. Analiza secvenței genelor ADNr 16S se utilizează pe scară largă ca instrument taxonomic și este recunoscută drept o metodă eficientă pentru identificarea bacteriilor [19].

Amplificarea secvenței genei ARNr 16S a fost efectuată cu ajutorul a doi primeri – 27f și 1492r. În calitate de tulpini de referință au fost utilizate *S. thermophilus* A737 din Colecția Cehă de Microorganisme, Brno, Republica Cehă și *S. thermophilus* 1241 din Colecția de Microorganisme a Departamentului de microbiologie, biologie moleculară și biotehnologie al Institutului de Cercetare a Alimentelor din Slovacia. Pentru evidențierea produșilor de amplificare a fost efectuată analiza electroforetică, rezultatele căreia sunt prezentate în figura 3.

Analiza profilurilor electroforetice permite să afirmăm că toate tulpinile au generat în gel o bandă comună de aproximativ 600 bp și că similaritatea secvențelor genelor ADNr 16S a celor 7 tulpini analizate constituie 99%. Deci, tulpinile de bacterii lactice, selectate și identificate anterior prin metode fenotipice ca aparținând speciei *S. thermophilus*, își confirmă acest statut taxonomic și după efectuarea analizei secvenței genei ADNr 16S. Rezultatele analizei filogenetice a reprezentanților tipici de *S. thermophilus* sunt în concordanță cu rezultatele altor studii, sugerând că tehnica de secvențiere a genei ADNr 16S este relevantă pentru identificarea speciilor de bacterii lactice din surse naturale [20].

Identificarea microorganismelor prin spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier se bazează pe compoziția chimică a materialului celular. Spectroscopia moleculară a fost introdusă drept o abordare posibilă de identificare cu succes limitat în anul 1950 [9]. Utilizarea pe larg a spectroscopiei vibraționale pentru identificarea bacteriilor nu s-a practicat din cauza po-



**Figura 3.** Profilul electroforetic obținut în urma amplificării PCR a secvenței genei ADNr 16S cu primeri specifici, la șapte tulpini de bacterii lactice. Ladder=markerul HipperLadder 50bp, NK=control negativ.

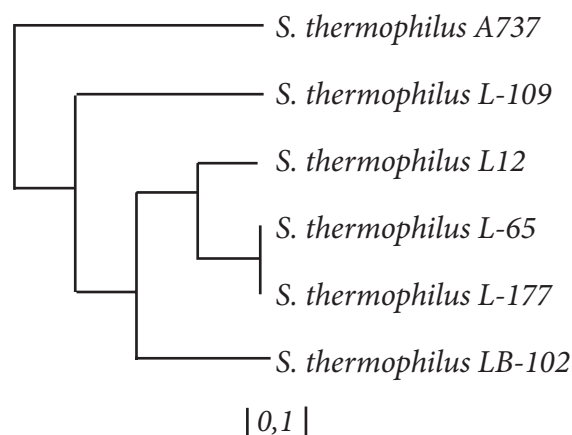
sibilităților tehnice limitate la acel moment. Odată cu apariția spectroscopiei în infraroșu cu transformată Fourier și posibilitatea de a analiza datele cu ajutorul calculatoarelor la sfârșitul anilor 1980–1990, Naumann și colaboratorii săi au reintrodus metoda FT-IR pentru analiza *in situ* a celulelor bacteriene și analiza spectrală complexă pentru a identifica, diferenția și clasifica bacteriile [21]. De atunci, spectroscopia FT-IR se aplică cu succes la detectarea, identificarea și clasificarea bacteriilor de diferite specii, în special patogene. [22].

Spectroscopia FT-IR nu este doar o metodă de identificare bacteriană, ea oferă de asemenea informații despre metabolismul bacterian, fazele de dezvoltare și rezistența la antibiotice [23]. Actualmente spectroscopia FTIR se utilizează pe larg în domeniul microbiologiei alimentare, caracterizându-se prin simplitatea pregătirii probelor analizate și viteza mare de analiză [24].

Spectroscopia FT-IR poate oferi informații suplimentare privind datele fenotipice și genotipice care pot ajuta la stabilirea unei clasificări taxonomice mai robuste. Rezultatele identificării depind de calitatea și volumul bazei de date, precum și de prelucrarea matematică adecvată. Spectrul FT-IR al celulelor microbiene intacte constituie o imagine a compoziției lor chimice generale, dar evident că componentele unor structuri (în principal membrana și peretele celular) au o influență decisivă asupra spectrului [25].

Scopul acestui studiu a fost caracterizarea bacteriilor lactice autohtone *S. thermophilus* prin spectroscopia FT-IR cultivate pe mediul M17 cu lactoză și agitare permanentă. Cercetările au fost efectuate în Departamentul de microbiologie, biologie moleculară și biotehnologie al Institutului de Cercetare a Alimentelor în cadrul Centrului Național de Agricultură și Produse Alimentare din Bratislava, Slovacia. În calitate de tulpină de referință a servit *S. thermophilus* A737 din Colecția Cehă de Microorganisme, Brno, Republica Cehă. Înregistrarea spectrelor a șase probe (cinci izolate bacteriene și o cultură de referință) s-a realizat în domeniul spectral cuprins între 500 și 4000  $\text{cm}^{-1}$ . Fiecare probă a fost scanată de 64 de ori în două reprize. Maxime de absorbantă au fost înregistrate la lungimile de undă de  $\sim 3300 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\sim 1600 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\sim 1400 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\sim 1200 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\sim 1100 \text{ cm}^{-1}$ .

Potrivit acestui studiu, s-a constatat corelarea tulpinilor autohtone cu cea de referință la nivel de 99%. Analiza comparativă a spectrelor de absorbție FT-IR, caracteristice tulpinilor *S. thermophilus*, a permis realizarea unei dendrograme (figura 4). Rezultatele obținute sugerează că metoda FT-IR propusă este adecvată pentru a identifica bacteriile lactice din specia *S. thermophilus* [26].



**Figura 4.** Dendrograma tulpinilor *S. thermophilus* autohtone conform spectroscopiei FT-IR.

Următoarea etapă a cercetării a fost consacrată determinării proprietăților tehnologice ale microorganismelor studiate.

Or, din sortimentul vast de produse alimentare consumatorii preferă produsele ce posedă calități suplimentare, cum ar fi autenticitatea, beneficiile adiacente pentru sănătate, valoarea nutritivă, gustul neobișnuit etc. De aceea o sarcină actuală a industriei laptelui este fabricarea produselor lactate de calitate înaltă care corespund cerințelor și necesităților consumatorilor.

Proprietățile organoleptice, fizico-chimice, microbiologice, reologice etc. ale produselor lactate depind de compoziția culturilor starter, de activitatea lor și, în mare măsură, de caracteristicile biochimice și tehnologice ale culturilor individuale care alcătuiesc culturile starter [15].

*Activitatea fermentativă a tulpinilor de bacterii lactice* (exprimată în timp, în care cultura este capabilă să aciduleze laptele) este cel mai important parametru tehnologic de apreciere a tulpinilor pentru utilizarea lor în producere [9]. Viteza de coagulare a laptelui are o importanță practică mare în procesul de fabricare a produselor lactate. Intensificarea procesului de fermentare a laptelui, accelerarea maturării și îmbunătățirea calității produselor lactate poate fi realizată numai atunci când sunt utilizate tulpini de bacterii lactice active din punct de vedere biochimic [15].

Este cunoscut faptul că activitatea înaltă de acidogeneză sporește eficiența economică a producerii. De aceea a fost necesar de a se stabili timpul pe durata căruia tulpinile de bacterii lactice autohtone selectate coagulează laptele. Rezultatele obținute privind determinarea vitezei de fermentare a laptelui de către tulpinile *S. thermophilus*, studiate la temperatura de incubare 40°C, demonstrează că tulpinile de *S. thermophilus* L 12 – 5,4±0,2 ore, L 65 – 3,6±0,1 ore, L 102 – 4,1±0,2 ore,



L 109 – 5,2±0,2 ore, L 117 – 4,0±0,2 ore au manifestat o viteză înaltă de acidulare a laptelui. Aceste tulpini răspund cerințelor pentru bacteriile lactice termofile, conform cărora activitatea fermentativă a tulpinilor nu trebuie să depășească șase ore. Pe când tulpinile L 232 – 6,5±0,3 ore și L 292 – 7,2±0,2 ore au fermentat laptele în 6,5±0,5 ore și 7,0±0,5 ore respectiv, astfel depășind limita rezervată pentru streptococii termofili în fabricarea produselor lactate fermentate [27, 28].

Tulpinile autohtone izolate au fost testate la capacitatea de a forma coagul în lapte (capacitatea de a fermenta) pentru o anumită perioadă de timp. Toate tulpinile studiate au fost capabile să se dezvolte și să formeze coagulul în eprubete cu lapte la temperaturi de incubare de la 42 °C până la 48 °C. Caracteristica dată indică adaptarea înaltă a bacteriilor la condițiile nefavorabile și competitivitatea lor în condițiile tehnologice, cum ar fi fabricarea produselor lactate fermentate și perspectiva utilizării lor în compoziția culturilor starter mixte [15].

Prin *acumularea acidului lactic* în laptele fermentat se poate deduce intensitatea dezvoltării bacteriilor lactice într-o anumită perioadă de timp. Rezultatele obținute privind evoluția în timp al acestui parametru sunt prezentate în tabelul 4. Analiza datelor arată că aciditatea laptelui a crescut în medie cu 8,7 °T pe oră. Este necesar de a sublinia că tulpinile L 102, L 65 și L 177 au efectuat acidularea laptelui rapid cu viteza de 7,6 °T pe oră, pe când la cultura L 292 viteza de acumulare a acidului lactic a fost de 8,4 °T pe oră.

Analiza comparativă a caracteristicilor tehnologice nu indică diferențe semnificative dintre tulpinile studiate.

În urma analizelor microbiologice ale probelor de lapte fermentat cu tulpini de bacterii lactice a fost determinat numărul de microorganisme în 1 ml de lapte steril degresat fermentat. Numărul de microorganisme UFC în 1 ml de lapte fermentat a fost determinat prin diluții zecimale. S-a stabilit că titrul de microor-

ganisme viabile a fost la nivelul de 10<sup>10</sup> UFC în 1 ml de lapte fermentat de tulpinile L 12, L 65, L 102, L 177 și 10<sup>9</sup> UFC·mL<sup>-1</sup> în cazul tulpinii L 109, ceea ce reprezintă valori înalte comparativ cu 10<sup>7</sup> UFC·mL<sup>-1</sup> pentru tulpina L 232, și 10<sup>6</sup> UFC·mL<sup>-1</sup> pentru tulpina L 292 – insuficient pentru utilizarea tulpinilor în calitate de culturi starter pentru obținerea produselor lactate.

Activitatea fermentativă joasă și titrul insuficient în laptele fermentat, manifestate de către tulpinile L 232 și L 292, caracterizează aceste izolate ca fiind culturi slabe pentru a fi utilizate la fabricarea produselor lactate fermentate și, în consecință, aceste tulpini au fost eliminate din studiile ulterioare.

Astfel, cele cinci tulpini autohtone de bacterii lactice termofile din specia *S. thermophilus* izolate din produse lactate autohtone de fermentare spontană corespund cerințelor tehnice pentru iaurt și pot servi drept alternativă pentru stabilizatorii utilizați în industria laptelui.

Cercetările efectuate dovedesc posibilitatea de selectare din sursele autohtone a tulpinilor de bacterii lactice cu potențial tehnologic natural (nemodificate genetic) și de utilizare a lor la fabricarea produselor lactate sigure pentru consum [29].

În baza investigațiilor efectuate și a rezultatelor obținute, cele mai valoroase tulpini selectate de bacterii din specia *S. thermophilus* au fost depozitate în Colecția Națională de Microorganisme Neapatogene cu atribuirea numerelor de colecție, după cum urmează:

- *Streptococcus thermophilus* L 177 depozitat cu numărul CNMN LB – 50;
- *Streptococcus thermophilus* L 65 depozitat cu numărul CNMN LB – 51;
- *Streptococcus thermophilus* L 12 depozitat cu numărul CNMN LB – 52;
- *Streptococcus thermophilus* L 102 depozitat cu numărul CNMN LB – 53;
- *Streptococcus thermophilus* L 109 depozitat cu numărul CNMN LB – 54.

Tabelul 4

## Formarea coagulului și acumularea acidului lactic sub acțiunea tulpinilor studiate

Codul tulpinii	Durata de cultivare, ore						
	Aciditatea titrabilă, °T						
	1	2	3	4	5	6	7
L 12	25,7±1,5	32,7±0,6	48,7±1,2	55,3±1,5	68,0±1,0*		
L 65	28,3±1,5	48,7±0,6	60,7±0,6	72,0±1,0*			
L 102	27,6±1,5	42,9±0,6	55,7±0,6	66,0±1,0*			
L 109	26,7±0,6	37,3±0,6	47,7±0,6	63,3±1,2	75,3±1,2*		
L 177	29,7±0,6	41,3±0,6	54,0±1,0	68,0±1,7*			
L 232	24,7±0,6	35,0±1,0	47,6±1,5	60,3±0,6	68,7±1,2	76,0±1,0*	
L 292	26,0±1,0	32,7±1,5	36,7±0,6	47,0±1,0	54,3±1,2	62,3±1,5	69,3±2,0*

Semnul \* indică formarea coagulului



## CONCLUZII

În urma cercetărilor a fost demonstrată posibilitatea de obținere din microflora laptelui crud și a produselor lactate de fermentare spontană a tulpinilor autohtone de bacterii lactice cu proprietăți biotehnologice valoroase, destinate utilizării în compoziția culturilor starter cu scopul fabricării produselor lactate fermentate.

Tulpinile selectate de bacterii lactice din specia *S. thermophilus* se caracterizează prin activitate intensă de acidulare a laptelui, timp de 3-4 ore dezvoltându-se o aciditate a laptelui la nivelul de 65-74 °T, formând un coagul omogen, compact, dens ce asigură consistența fermă a acestuia.

Tulpinile de *Streptococcus thermophilus*: CNMN-LB-50, CNMN-LB-51, CNMN-LB-52, CNMN-LB-53 și CNMN-LB-54, selectate pentru fabricarea produselor lactate fermentate, posedă caracteristici biotehnologice valoroase, dovedind o activitate intensă de acidulare a laptelui și de formare a unui coagul omogen, compact și dens, ceea ce asigură consistența fermă a produselor.

Tulpinile selectate conțin  $10^9$ - $10^{10}$  UFC în 1 g de lapte fermentat și produc acid lactic în cantități suficiente pentru a inhiba creșterea microorganismelor patogene, contribuind la prevenirea dezvoltării infecțiilor intestinale și a patogenilor în probele lactate fermentate și pot fi utilizate în procesul de fabricare a produselor lactate fermentate.

## BIBLIOGRAFIE

- Ramonova E. Vy'deleniye i identifikatsiya mestny'kh shtammov molochnokisly'kh mikroorganizmov i ikh ispol'zovaniye v kachestve probiotikov. Dissert. kand. biol. nauk. Vladikavkaz, 2011. 191 str.
- Reginensi S. M., González M. J., Bermúdez J. Phenotypic and genotypic characterization of lactic acid bacteria isolated from cow, ewe and goat dairy artisanal farmhouses. In: Brazilian Journal of Microbiology, 2013, vol. 44, nr. 2, p. 427-430. DOI:10.1590/S1517-83822013000200013.
- Rogov G. N. Razrabotka tekhnologii proizvodstva i sposobov primeneniya bakterial'nykh kontsentratov mezofil'nykh molochnokisly'kh bakteriy s tsel'yu uluchsheniya kachestva melkikh sychuzhnykh syrov. Avtoref. dis. kand. tekhn. nauk. Uglich, 1994. 24 s.
- Ferretti J, Köhler W. History of streptococcal research. In: Ferretti JJ, Stevens DL, Fischetti VA, editors. *Streptococcus Pyogenes: Basic Biology to Clinical Manifestations*. Oklahoma City (OK): University of Oklahoma Health Sciences Center, 2016.
- Facklam R. What happened to the Streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. In: Clinical Microbiology Reviews, 2002, vol. 15, nr. 4, p. 613-630.
- Lancefield R. A serological differentiation of human and other groups of streptococci. In: The Journal of Experimental Medicine, 1933, nr. 59, p. 441-158.
- Gorbatova K. K. Fiziko-khimicheskiye i biokhimicheskiye osnovy proizvodstva molochnykh produktov. Sankt Peterburg: GIFD, 2004. 352 s.
- Tamime A. Y., Robinson R. K. Tamime and Robinson's Yoghurt: Science and Technology. Third edition. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2007. 488 p.
- Aldrete-Tapia A., et al. High-throughput sequencing of microbial communities in Poro cheese, an artisanal Mexican cheese. In: Food Microbiology, 2014, vol. 44, p. 136-141.
- Sbornik instruktsiy po selektsii molochnokisly'kh bakteriy i bifidobakteriy i podboru zakvasok dlya kislo-molochnykh produktov. Moskva: VNIIMS, 1986, 100 s.
- Cartășev A., Bureș E. Culturi de *Streptococcus thermophilus* producătoare de exopolizaharide. În: Materialele Simpozionului Științific Internațional „Agricultura Modernă – Realizări și Perspective”, vol. 34, Chișinău, Moldova, 2013, p. 409-412.
- Yuksekdag Z. N., Aslim B. Influence of different carbon sources on exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (B3, G12) and *Streptococcus thermophilus* (W22). In: Brazilian Archives of Biology and Technology, 2008, vol. 51, nr. 3, p. 581-585.
- Kislenko V.N. Praktikum po veterinarnoy mikrobiologii i immunologii. Moskva: Kolos, 2005. 232 s.
- Bannikova L. A., Koroleva N. S., Semenikhina V. F. Mikrobiologicheskiye osnovy molochnogo proizvodstva. Moskva: Agropromizdat, 1987, s. 112-147.
- Cartășev A., Bureș E. Caracteristica tehnologică a tulpinilor autohtone de *Streptococcus thermophilus*. În: Conferința tehnico-științifică a colaboratorilor, doctoranzilor și studenților, vol. 2, Chișinău, Moldova, 15-17 noiembrie, 2012, p. 35-38.
- Moraes P. M., Perin L. M., Júnior A. S., Nero L. A. Comparison of phenotypic and molecular tests to identify lactic acid bacteria. In: Brazilian Journal of Microbiology, 2013, nr. 44, vol.1, p. 109-112.
- Stepanenko P. P. Mikrobiologiya moloka i molochnykh produktov: uchebnik dlya vuzov. Sergiyev Posad.: OOO «Vse dlya Vas-Podmoskov'ye», 1999. 415 c.
- Karen C. C., Robin P. Systems for identification of bacteria and fungi. Manual of clinical microbiology. 11-th edition. Washington: American Society for Microbiology, 2015. p. 29-43.
- Frederick S. N. Molecular microbiology. Manual of clinical microbiology. 11-th edition. Washington: American Society for Microbiology, 2015. p. 54-90.
- Umamaheswari T. et. al. *Streptococcus thermophilus* strains of plant origin as dairy starters: Isolation and characterization. In: International Journal of Dairy Technology, 2013, vol. 66, p. 1 - 6.
- Wenning M., Scherer S. Identification of microorganisms by FTIR spectroscopy: perspectives and limitations of the method. In: Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, vol. 97, p. 7111-7120.

22. Zhang L. et al. Effect of exopolysaccharide-producing starter cultures and post-fermentation mechanical treatment on textural properties and microstructure of low fat yoghurt. In: International Dairy Journal, 2016, nr. 53, p. 10-19.

23. Amiali N. M., Mulvey M. R., Berger-Bachi B., Sedman J., Simor A. E., Ismail A. A. Evaluation of Fourier transform infrared spectroscopy for the rapid identification of glycopeptide-intermediate *Staphylococcus aureus*. In: Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2008, vol. 61, p. 95-102.

24. Theophanies T. Infrared spectroscopy – materials science, engineering and technology. Rijeka: Intech. 2012. 511 p.

25. Mouwen D.J.M., et al. Applying Fourier-transform infrared spectroscopy and chemometrics to the characterization and identification of lactic acid bacteria. In: Vibrational Spectroscopy, 2011, vol. 56, p. 193-201.

26. Kartashev A. Identifikatsiya mestnykh shtammov *Streptococcus thermophilus* s ispol'zovaniyem infrakrasnoy spektroskopii s preobrazovaniyem Fur'ye. V: Sbornik tezisov III mezhdunarodnoy konferentsii molodykh uchenykh biotekhnologov, molekulyarnykh biotekhnologov i virusologov, Novosibirsk, Rossiya, 2017, s. 239-242.

27. Florea T., Costin G. Polizaharide. Chimia alimentelor. Galați: Academica, 2001, vol. II, p. 393-450.

28. Cartasev A., Rudic V. Effect of starter culture producing exopolysaccharide on yoghurt. In: Chemistry Journal of Moldova, 2017, nr. 12(2), p. 7-12.

29. Cartășev A., Bureș E. Culturi de bacterii lactice producătoare de exopolizaharide. În: Papers of the Sibiu Alma Mater University Conference "Challenges for Science and Research in the Crisis Era", sixth edition, vol. 2, Sibiu, România, 28-30 martie, 2013, p. 103-106.



Maria Saka-Răcilă. *Amintiri*, lână, bumbac, țesătură clasică, 3 piese, fiecare cu dimensiunea de 130 × 81 cm, 2001.