

О.В. Басюл, Г.В. Ямборко, В.О. Іваниця

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, e-mail: hbasiul@onu.edu.ua

БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ЛАКТОБАКТЕРІЙ — ПРЕДСТАВНИКІВ РЕЗИДЕНТНОЇ МІКРОБІОТИ ГЛИВИ ЗВИЧАЙНОЇ

Метою дослідження було виділення штамів лактобактерій зі свіжих та самоквасних плодів тїл гриби звичайної *Pleurotus ostreatus* та вивчення їхніх біологічних і біотехнологічних властивостей. **Методи.** Об'єктом дослідження були 50 штамів лактобактерій, виділених зі свіжих і самоквасних плодів тїл грибів гриба звичайна *Pleurotus ostreatus*. Родову та видову належність лактобактерій встановлювали за морфолого-культуральними, фізіолого-біохімічними властивостями, та підтверджували методом ПЦР з використанням праймерів до ділянок 16S PНК та *recA*. Ступінь кислотоутворення штамів лактобацил досліджували за інкубації у знежиреному молоці упродовж 1, 15 та 24 годин, граничну кислотність — за інкубації упродовж тижня, молочну кислоту — титрометричним методом. Антагоністичну активність лактобактерій визначали методом агарових блоків. **Результати.** Встановлено, що молочнокислі бактерії входять до складу мікробіоти плодів тїл гриба *Pleurotus ostreatus*. Ізольовані із свіжих та ферментованих грибів 8 штамів лактобактерій за морфологічними, культуральними та фізіолого-біохімічними ознаками віднесено до виду *Lactobacillus plantarum*, що підтверджено методом ПЛР. Досліджувані штами лактобацил за 15 год. продукують від $0,5 \pm 0,1$ до $1,4 \pm 0,2\%$ молочної кислоти, а гранична кислотність складає $144\text{--}300^\circ\text{T}$. **Висновок.** Штам *Lactobacillus plantarum* ONU315, ізольований з плодів тїл гриби звичайної є активним кислотоутворювачем з антагоністичною активністю високого та середнього ступенів щодо умовно патогенних бактерій, бактерій представників мікробіоти гриби, не проявляє антагонізму до молочнокислих бактерій інших видів.

Ключові слова: *Lactobacillus plantarum*, антагоністична активність, молочна кислота, гриба звичайна, ферментування.

Вибір бактерій роду *Lactobacillus* у якості заквашувальних культур для виробництва ферментованих продуктів харчування обумовлений здатністю лактобактерій перешкоджати розмноженню патогенних і умовно патогенних мікроорганізмів, підвищувати імунорезистентність макроорганізму та належністю їх до категорії безпечних мікроорганізмів (GRAS) [11].

Глива звичайна є цінним джерелом екологічно чистої харчової сировини, низькокалорійним продуктом, що швидко псується та потребує переробки, найбільш ефективним способом якої є ферментування [5]. На плодів тїлах гриби виявлено бактерій родів *Bacillus*, *Planococcus*, *Sporosarcina* та *Lactobacil-*



lus [9]. Процес самоквашування здійснюється переважно молочнокислими бактеріями, що входять до складу мікробіоти плодівих тіл, проте інформація про них практично відсутня.

Відсутність комерційних стартерних культур бактерій роду *Lactobacillus* з високими біотехнологічними показниками для ферментування грибів робить процес ферментації не прогнозованим, а кількість індигенних лактобактерій для домінування молочнокислого бродіння є недостатньою, внаслідок чого продукція втрачає безпечність, погіршуються її органолептичні властивості.

У зв'язку з цим метою дослідження було виділення штамів лактобактерій зі свіжих та самоквасних плодівих тіл гливи звичайної *Pleurotus ostreatus* та вивчення їхніх біологічних і біотехнологічних властивостей.

Матеріали та методи

Об'єктом дослідження були 50 штамів лактобактерій, виділених зі свіжих і самоквасних плодівих тіл грибів глива звичайна *Pleurotus ostreatus*.

Лактобактерії виділяли шляхом висіву на агаризоване середовище MRS змивів з плодівих тіл свіжої та некомерційної самоквасної гливи звичайної, культивували за температури 36 °С впродовж 2 діб та визначали приналежність до роду *Lactobacillus* за тінкторіальними, морфолого-культуральними і фізіолого-біохімічними ознаками: забарвленням за Грамом, формою та розміром клітин, рухливістю, наявністю каталази, здатністю відновлювати нітрати в нітрити та рости за температур 4–50 °С [8]. Видову приналежність бактерій роду *Lactobacillus* визначали за ферментацією спектру вуглеводів та цукроспиртів з використанням тест-системи Api 50 Chl Medium. Відношення до гомо- та гетероферментативних лактобактерій виявляли методом Gibson та Ab-el-Malek з використанням томатно-глюкозного агару [8].

Родову та видову приналежність лактобактерій підтверджували методом полімеразної ланцюгової реакції з використанням праймерів (табл. 1) до ділянки 16S РНК, наявної у всіх видів роду *Lactobacillus* і до ділянки *recA*, притаманної для представників виду *Lactobacillus plantarum*.

ДНК бактерій виділяли методом теплового лізису бактеріальних клітин за модифікованою методикою Szegedi and Bottka [10, 12].

Ступінь кислотоутворення визначали за інкубації у знежиреному молоці упродовж 1, 15 та 24 годин, граничну кислотність – за інкубації упродовж тижня, молочну кислоту – титрометричним методом [1, 3].

Антагоністичну активність лактобактерій відносно умовно патогенних та патогенних мікроорганізмів визначали методом агарових блоків [6]. Індикаторними мікроорганізмами були штами умовно патогенних бактерій та штами бактерій-представників мікробіоти, ізольовані нами з плодівих тіл гливи.

Статистичну обробку результатів здійснювали шляхом розрахунку середніх значень показників (\bar{X}) та їх стандартної похибки ($S_{\bar{X}}$). Вірогідність відмінностей між середніми значеннями визначали за критерієм Ст'юдента, оцінюючи вірогідність отриманих результатів за рівнем значимості не менше 95% ($p \leq 0,05$).



Таблиця 1

Праймери до ділянок 16S РНК та *recA*

Table 1

Primers to 16S rRNA and *recA* sites

Праймер	Послідовність	Розмір ампліконів, п.о.	Примітка
LbLMA-1	5'-CTC AAA ACT AAA CAA AGT TTC-3'	250	Спільний для бактерій роду <i>Lactobacillus</i>
R-161	5'-CTT GTA CAC ACC GCC CGT TCA-3'	250	
planF	5'-CCG TTT ATG CGG AAC ACC TA-3'	318	Специфічний для бактерій виду <i>L. plantarum</i>
pREV	5'-TCG GGA TTA CCA AAC ATC AC-3'	318	

Результати та їх обговорення

З гливи звичайної було виділено 50 ізолятів молочнокислих бактерій, з яких для дослідження відібрано 8 штамів, які мали високу швидкість росту. Ізольовані штами лактобактерій представлені грампозитивними паличками правильної форми, з тенденцією до ланцюгоутворення, каталазонегативні і нездатні до відновлення нітратів, що дозволило віднести їх до роду *Lactobacillus*.

Встановлено, що відібрані штами лактобактерій утилізують L-арабінозу, D-галактозу, D-глюкозу, D та L-ксилозу, D-лактозу, D-маніт, D-рафінозу, D-сорбіт, D-фруктозу, D-целобіозу, D-цукрозу та не утилізують L-рамнозу. Усі культури не продукують газ із глюкози і ростуть за температури 15 °С. Ці ознаки характеризують їх як факультативно-гетероферментативні молочнокислі бактерії, що відносяться до виду *Lactobacillus plantarum*.

Як видно з таблиці 1, у результаті проведення ПЛР з ДНК виділених штамів бактерій з родоспецифічними праймерами LbLMA-1 та R-161 отримано амплікони розміром 250 п. о., що вказують на наявність ділянок 16S рРНК, характерних для бактерій роду *Lactobacillus*. Полімеразна ланцюгова реакція з видоспецифічними праймерами planF та pREV до ділянки гену *recA* підтвердила належність відібраних штамів до виду *Lactobacillus plantarum*, на що вказувала присутність ампліконів розміром 318 п. о.

Таким чином, встановлення генетичних послідовностей ДНК лактобактерій підтвердило родову та видову належність штамів, визначену за морфолого-культуральними та фізіолого-біохімічними властивостями. Електронно-мікроскопічні знімки деяких з досліджуваних штамів наведено на рис. 1.

Штам молочнокислих бактерій вважається активним і може застосовуватися для ферментації, якщо за 15 годин культивування на середовищі він утворює 0,5% молочної кислоти [3]. З огляду на це, було досліджено активність кислотоутворення ізольованих штамів лактобактерій.



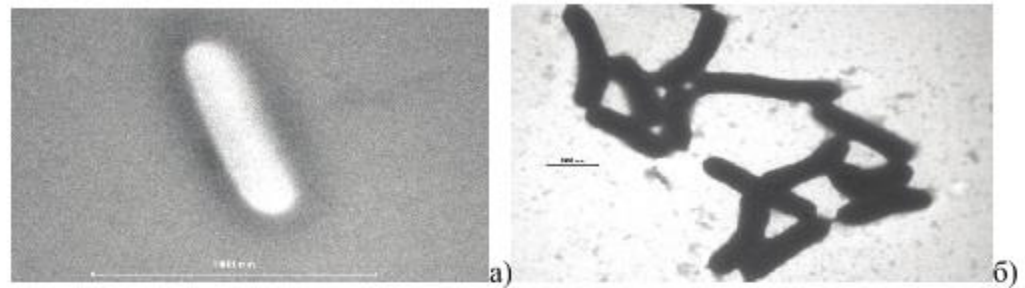


Рис. 1. Електронно-мікроскопічні знімки молочнокислих бактерій

a) *Lactobacillus plantarum* ONU 314 (x11000);

b) *Lactobacillus plantarum* ONU 315 (x3800)

Fig. 1. Lactic acid bacteria electron microscopic images

a) *Lactobacillus plantarum* ONU 314 (x11000);

b) *Lactobacillus plantarum* ONU 315 (x3800)

Як видно з табл. 2 досліджувані штами лактобацил за 15 год продукують від $0,5 \pm 0,1$ до $1,4 \pm 0,2\%$ молочної кислоти.

Встановлено, що найбільше молочної кислоти за 15 годин культивування продукують бактерії штаму *L. plantarum* ONU 315 ($1,4 \pm 0,2\%$).

Найвищими показниками кислотоутворення за добу характеризувалися лактобактерії штамів *L. plantarum* ONU 314 і *L. plantarum* ONU 315, відповідно $145 \pm 5,1$ °T і $170 \pm 4,2$ °T.

Відомо, що процес ферментації грибів триває залежно від умов ферментації до чотирьох тижнів і більше, при цьому рН знижується [4, 5]. Враховуючи це, доцільним було визначити показники граничної кислотності, що накопичується досліджуваними штамами лактобацил. Виявилось, що найвищими показниками граничної кислотності – $240 \pm 5,2$ і $300 \pm 9,1$ °T характеризувалися штами *L. plantarum* ONU 314 та *L. plantarum* ONU 315, відповідно, які були відібрані для подальших досліджень.

В подальшому встановлено, що досліджувані штами *L. plantarum* ONU 314 та *L. plantarum* ONU 315 ростуть за температур 4–50 °C і значень рН 3–7, що є важливим критерієм за відбору стартерних культур бактерій, оскільки дозволяє їхнє використання при широких діапазонах температур та кислотності середовища [7].

Відомо, що антимікробна активність лактобацил по відношенню до патогенних та умовно патогенних мікроорганізмів пояснюється продукцією органічних кислот, переважно молочної, перекису водню, антибіотиків, лізоциму та бактеріоцинів. Спектр сполук з антибактеріальною активністю, що утворюються лактобацилами, залежить від виду та штаму мікроорганізму, умов росту популяції. Штами з антибіотичною активністю, як правило, є одночасно і активними кислотоутворювачами [2, 7].

Таблиця 2

Показники кислотоутворення досліджуваних лактобактерій

Table 2

Studied lactobacilli lactic acid production indicators

Штам	Кислоти			Гранична кислотність, °Т
	органічні		молочна	
	°Т/1год	°Т/24 год	%/15 год	
<i>L. plantarum</i> ONU 314	40,5 ± 1,2	145,0 ± 5,1	1,0 ± 0,2	240,0 ± 5,2
<i>L. plantarum</i> ONU 315	50,7 ± 1,1 *	170,0 ± 4,2 *	1,4 ± 0,2 *	300,0 ± 9,1 *
<i>L. plantarum</i> ONU 316	38,5 ± 1,4	140,0 ± 4,5	0,7 ± 0,03	232,0 ± 6,7
<i>L. plantarum</i> ONU 411	36,2 ± 1,2	135,0 ± 5,3	0,7 ± 0,01	220,0 ± 5,5
<i>L. plantarum</i> ONU 412	32,0 ± 1,4	120,0 ± 5,3	0,6 ± 0,01	161,0 ± 4,7
<i>L. plantarum</i> ONU 413	31,4 ± 1,4	115,0 ± 7,3	0,5 ± 0,04	158,0 ± 4,4
<i>L. plantarum</i> ONU 414	30,2 ± 1,4	104,0 ± 5,4	0,5 ± 0,03	149,0 ± 4,7
<i>L. plantarum</i> ONU 415	30,0 ± 1,2	100,0 ± 9,6	0,5 ± 0,03	144,0 ± 4,8

Примітка: * – різниця достовірна у порівнянні з іншими штамми.

Note: * – significant difference in compare with other strains.

У результаті проведеного дослідження встановлена антагоністична активність штамів *L. plantarum* ONU 314 і *L. plantarum* ONU 315 по відношенню до умовно патогенних бактерій та ізольованих представників мікробіоти гливи звичайної (табл. 3).

Проведені дослідження показали, що нейтралізація рН культурального середовища карбонатом кальцію призводить до значного зниження антагоністичної активності досліджуваних штамів лактобактерій, що вказує на те, що антимікробний ефект їх в основному обумовлений дією молочної кислоти, і лише частково – метаболітами іншої природи.

У ході подальших досліджень показано, що штами лактобактерій *L. plantarum* ONU 314 і *L. plantarum* ONU 315 не виявляють антагоністичної активності по відношенню до 60 штамів лактобацил з колекції культур мікроорганізмів ОНУ імені І.І. Мечникова, що належать до видів: *Lactobacillus plantarum*, *L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. casei*, *L. curvatus*, *L. delbrueckii subs. delbrueckii*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus*.



Антагоністична активність досліджуваних лактобактерій

Studied lactobacilli antagonistic activity

Індикаторний мікроорганізм	Діаметр зони затримки росту індикаторних мікроорганізмів, мм	
	<i>L. plantarum</i> ONU 314	<i>L. plantarum</i> ONU 315
<i>Micrococcus luteus</i> ONU 199	30,2 ± 1,4	32,1 ± 1,3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ONU 211	24,1 ± 1,2	34,3 ± 1,1
<i>Escherichia coli</i> ONU 90	35,1 ± 1,3	34,2 ± 1,3
<i>Staphylococcus aureus</i> ONU 229	30,2 ± 1,4	32,1 ± 1,3
<i>Proteus vulgaris</i> ONU 91	25,3 ± 1,5	27,3 ± 1,4
<i>Bacillus thuringiensis</i> ONU 431	28,4 ± 1,1	29,4 ± 1,0
<i>Lysinibacillus sphaericus</i> ONU434	29,2 ± 1,3	29,3 ± 1,2
<i>Planococcus citreus</i> ONU 421	30,1 ± 1,2	31,2 ± 1,0
<i>Sporosarcina ureae</i> ONU 422	29,2 ± 1,1	30,1 ± 1,1
<i>Sporosarcina halophila</i> ONU 423	35,2 ± 1,1	36,3 ± 1,0

Примітка: діаметр зони затримки росту із врахуванням діаметру блоку (16 мм) < 23 мм – мікроорганізми малочутливі; 23–33 мм – чутливі; > 33 мм – високочутливі.

Note: stunted growth zone diameter, with block diameter (16 mm) <23 mm – tolerant microorganisms; 23–33 mm – sensitive; > 33 mm – highly sensitive.

Таким чином, встановлено, що молочнокислі бактерії входять до складу мікробіоти плодівих тіл *Pleurotus ostreatus*. Ізольовані із свіжих та ферментованих грибів 8 штамів лактобактерій за морфологічними, культуральними та фізіолого-біохімічними ознаками віднесено до виду *Lactobacillus plantarum*. За найвищими показниками кислотоутворювальної та антагоністичної активностей штам *L. plantarum* ONU 315 може бути перспективним для ферментування гливи звичайної, що забезпечить досягнення мікробіологічної безпеки, зберігання готового продукту тривалішим, а процес ферментації більш прогнозованим.



Е.В. Басюл, А.В. Ямборко, В.О. Иваньця

Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина, e-mail: helenbasiul@onu.edu.ua

БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЛАКТОБАКТЕРИЙ – ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РЕЗИДЕНТНОЙ МИКРОБИОТЫ ВЕШЕНКИ ОБЫКНОВЕННОЙ

Реферат

Целью исследования было выделение штаммов лактобактерий из свежих и самоквасных плодовых тел вешенки обыкновенной *Pleurotus ostreatus* и изучение их биологических и биотехнологических свойств. **Методы.** Объектом исследования были 50 штаммов лактобактерий, выделенных из свежих и самоквасных плодовых тел вешенки обыкновенной *Pleurotus ostreatus*. Родовую и видовую принадлежность лактобактерий устанавливали по морфолого-культуральным, физиолого-биохимическим свойствам, и подтверждали методом ПЦР с использованием праймеров к участкам *16S rDNA* и *recA*. Степень кислотообразования штаммов лактобацилл исследовали при инкубации в обезжиренном молоке на протяжении 1, 15 и 24 часов, предельную кислотность – при инкубации на протяжении недели, молочную кислоту – титриметрическим методом. Антагонистическую активность лактобактерий определяли методом агаровых блоков. **Результаты.** Установлено, что молочнокислые бактерии входят в состав микробиоты плодовых тел гриба *Pleurotus ostreatus*. Выделенные со свежих и ферментированных грибов 8 штаммов лактобактерий по морфологическим, культуральным и физиолого-биохимическим признакам отнесены к виду *Lactobacillus plantarum*, что подтверждено методом ПЦР. Исследуемые штаммы лактобацилл за 15 часов продуцируют от $0,5 \pm 0,1$ до $1,4 \pm 0,2\%$ молочной кислоты, а предельная кислотность составляет 144–300 °Т. **Вывод.** Штамм *Lactobacillus plantarum* ONU315, выделенный из плодовых тел вешенки обыкновенной является активным кислотообразователем с антагонистической активностью высокой и средней степени по отношению к условно патогенным бактериям, бактериям представителям микробиоты вешенки, не проявляет антагонизма к молочнокислым бактериям других видов.

Ключевые слова: *Lactobacillus plantarum*, антагонистическая активность, молочная кислота, вешенка обыкновенная, ферментация.



O.V. Basiul, G.V. Yamborko, V.O. Ivanytsia

Odesa I.I. Mechnykov National University, 2, Dvorianska str, Odesa, 65082, Ukraine,
e-mail: hbasiul@onu.edu.ua

**BIOLOGICAL PROPERTIES OF LACTOBACILLI –
OYSTER MUSHROOM RESIDENTIAL MICROBIOTA
REPRESENTATIVES**

Summary

The **aim** of the investigation was lactobacilli strains isolation from *Pleurotus ostreatus* oyster mushroom fresh and fermented fruiting bodies and study of their biological and biotechnological properties. **Methods.** Investigation objects were 50 lactobacilli strains isolated from *Pleurotus ostreatus* oyster mushroom fresh and fermented fruiting bodies. Lactobacilli genus and species belonging were determined by morphological, cultural, physiological, biochemical properties and confirmed by PCR method with primers to 16S *PHK* and *recA*. **Lactobacilli strains acid producing degree was investigated** by incubation in skimmed milk for 1, 15 and 24 hours, limit acidity – by week incubation, lactic acid percentage – by titration method. Lactobacilli antagonism was determined by agar blocks method. **Results.** Lactic acid bacteria are considered to be a part of *Pleurotus ostreatus* fruiting bodies microbiota. 8 lactobacilli strains, isolated from fresh and fermented mushrooms, were identified by morphological, cultural and physiology-biochemical properties as the *Lactobacillus plantarum* species, that was confirmed by PCR method. Investigated lactobacilli strains produce from 0.5 ± 0.1 to $1.4 \pm 0.2\%$ of lactic acid for 15 hours, and acidity is 144–300 °T. **Conclusion.** Strain *L. plantarum* ONU315, isolated from *Pleurotus ostreatus* oyster mushroom fresh and fermented fruiting bodies, is active acid producer with high and medium level antagonistic activity to opportunistic bacteria, bacteria – oyster mushroom representatives, do not show antagonism to other species lactic acid bacteria.

Key words: *Lactobacillus plantarum*, antagonistic activity, lactic acid, oyster mushroom, fermentation.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ:

1. ГОСТ 8764-73. Консервы молочные. Методы испытаний. – М.: Изд-во стандартов, 1983. – 31с.
2. Донцова Т.А., Швець Г.В., Іваниця В.О. Антагоністичні властивості бактерій роду *Lactobacillus* // Вісник Одеського держ. ун-ту. – О., 2000. – Т. 5. – 1. – С. 146–150.
3. Дышкантюк О. В. Биотехнология получения молочной кислоты и ее солей на основе продуктов вторичной переработки зерна: Автореф. дис. канд. техн. наук 03. 00. 20. – О, 2000. – 185 с.



4. Крайнюк Л.Н., Мячикова Н.И. Технология переработки культивируемых грибов вешенка обыкновенная в кулинарную продукцию длительного хранения // Материалы II Международной конференции «Методологические основы познания биологических особенностей грибов – продуцентов физиологически активных соединений и пищевых продуктов». – Д., 2002. – 205 с.
5. Матюхина З.П., Королькова Э.П. Квашеные (соленые) овощи и грибы // Товароведение пищевых продуктов. – М., 2000. – С. 91–94.
6. Червинец Ю. В. Бактериоциногенные высокоантагонистические штаммы лактобацилл // ЖМЭИ. – 2006. – № 7. – С. 78–82.
7. Aguilar A. Biotechnology of lactic acid bacteria: An European perspective // Food Biotechnology – 1991. – P. 323–330.
8. Axelsson L.T. Lactic acid bacteria: classification and physiology // In S. Salminen and A. Von Wright, Lactic acid bacteria. Marcel Dekker, Inc., New York, 1993. – 21 p.
9. Basiul O.V. *Pleurotus ostreatus* residential microbiota and its role in mushrooms fermentation / Сборник тезисов Международная виртуальная интернет-конференция «Биотехнология. Взгляд в будущее». – Казань, 2012. – С. 306–310.
10. Dubernet S., Desmasures N., Gueguen M. A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level // FEMS Microbiology Letters. – 2002. – 10. – № 214 (2). – P. 271–275.
11. Kruger C., Hu Y., Pan Q. Single chain producing lactobacilli: a new tool for in situ delivery of passive immunity // Nature Biotechnology – 2002. – 20. – P. 702–706.
12. Torriani Sandra, Felis Giovanna E., Franco Dellaglio. Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by *recA* Gene Sequence Analysis and Multiplex PCR Assay with *recA* Gene-Derived Primers // Applied and Environmental Microbiology. – 2001. – 67. – № 8 – P. 3450–3454.

Стаття надійшла до редакції 01.06.2014 р.

