

І.В. Страшнова, І.О. Ковтун, Н.В. Коротаєва

Одеський національний університет імені І. І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна,
e-mail: fabiyanska@ukr.net

ХАРАКТЕРИСТИКА МОЛОЧНОКИСЛИХ БАКТЕРІЙ ГУБОК ЧОРНОГО МОРЯ

Мета. Виділити молочнокислі бактерії з губок Чорного моря та дослідити їх основні біологічні властивості. **Методи.** Виділення штамів лактобацил та визначення їх чисельності у губках проводили, використовуючи середовища MRS і GYPB. Морфологію колоній та клітин, тінкторіальні властивості, каталазну та оксидазну активності, здатність до утворення індолу, сірководню, нітратредукції, окиснення/ферментації глюкози вивчали за загальноприйнятими методиками. Виділення метилових ефірів жирних кислот проводили відповідно до стандартного протоколу Sherlock Microbial Identification System. Ідентифікацію штамів за жирнокислотним складом проводили методом газової хроматографії з використанням автоматичної системи ідентифікації мікроорганізмів MIDI Sherlock (база даних бібліотеки RTSBA 6 версія 6.2). Стійкість до морської солі визначали за інтенсивністю росту у MRS-бульйоні. Кислотоутворення визначали за активною і титрованою кислотністю у молоці. **Результати.** Кількість представників молочнокислих бактерій в досліджених чорноморських губках коливалася від $1,87 \times 10^5$ до $1,4 \times 10^9$ КУО/г залежно від губки. Серед жирних кислот бактерій, віднесених до видів *Lactobacillus vaccinoferus*, *L. parabuchneri* та *L. bifertentans*, переважали гексадеканова, нондеценна і 9-октадеценна кислоти. Оптимуми концентрації морської солі для росту досліджених штамів визначені у межах 2,5–5,0%. Через 24 год культивування титрована кислотність 74,5% штамів становила 26–46 °Т, а через 48 год 6,4% штамів демонстрували кислотність від 20 до 30 °Т, 78,6% – від 30 до 90 °Т, а 15,0% – більш, ніж 90 °Т. Більшість штамів закислювали середовище до рН 4,0–4,5. **Висновки.** При дослідженні молочнокислих бактерій чорноморських губок *Haliclona* sp. виявлено наявність в них представників роду *Lactobacillus*: *L. vaccinoferus*, *L. parabuchneri* і *L. bifertentans* та вивчено основні біологічні характеристики виділених бактерій.

Ключові слова: *Lactobacillus*, біологічні властивості, губки Чорного моря.

Молочнокислі бактерії (МКБ) дуже поширені в природі і, незважаючи на складні харчові потреби, особливості метаболізму, труднощі в їх адаптації і культивуванні в лабораторних умовах, виділити їх можна з багатьох природних джерел, зокрема як з хребетних, так і безхребетних тварин в різних еколого-географічних нішах. Однак, як їхня кількість, так і видовий склад, варіюють у дуже широких межах. Вони визначаються видом і віком тварини, місцем його мешкання, сезоном року і особливо характером харчування [9, 10].



На початку 21 століття увага багатьох дослідників прикута до морських молочнокислих бактерій [9]. Дослідження морського середовища на наявність молочнокислих бактерій обмежуються, в основному, промисловими об'єктами (рибою, креветками) або мікробіотою з води в небагатьох водних акваторіях [13]. Також в літературі майже відсутні систематизовані дані про знаходження молочнокислих бактерій у водних організмів з Чорного моря, що вказує на дуже низький рівень вивчення цих мікроорганізмів з водного середовища. Окрім цього повною мірою не досліджено біотехнологічний потенціал цих бактерій для розвитку марікультури та їх роль в раціональному використанні морських природних ресурсів, що робить актуальним вивчення МКБ Одеського узбережжя Чорного моря.

Метою роботи було виділити молочнокислі бактерії з губок Чорного моря та дослідити їх основні біологічні властивості.

Матеріали та методи

Матеріалом дослідження були морські губки *Haliclona* sp., зібрані за допомогою легковолодазних методів в Одеській затоці Чорного моря восени 2017 р. Мікробіологічні дослідження губок проводились не пізніше 2-х годин після збору.

Для визначення чисельності МКБ кожену губку подрібнювали на фрагменти розмірами приблизно 0,5 см, по 10 г яких поміщали у колби об'ємом 250 см³ і вносили 50 см³ стерильної дистильованої води. Дослідні проби перемішували в шейкері (фірми New Brunswick; при 250 RPM) при 25 °С протягом 3 год. Після цього робили серію 10-ти кратних послідовних розведень до такого ступеню, щоб можна було визначити передбачувану кількість мікроорганізмів в 1 г досліджуваної проби [4]. На поверхню чашок Петрі з живильними середовищами: стандартним середовищем MRS (de Man, Rogosa, Sharpe) [8] і спеціальним для морських молочнокислих бактерій середовищем GYPB (Glucose Yeast Polypeptone Beef) [13] висівали по 0,1 см³ відповідних розведень. Посіви інкубували при 25, 37 °С протягом 24–48 год. Після чого проводили кількісний облік [4].

Для виявлення видового різноманіття подрібнені губки поміщали у пробірки з середовищами накопичення: MRS- і GYPB-бульйони [8, 13] та культивували при 25 та 37 °С протягом 48–72 годин. Виділення проводили, використовуючи MRS- і GYPB-агари.

Після отримання чистих культур вивчали основні біологічні властивості: морфологію колоній на MRS- і GYPB-агарах, характер росту в MRS- і GYPB-бульйонах, морфологію клітин та їх розташування в препаратах, тінкторіальні властивості, каталазну та оксидазну активності, здатність до утворення індолу, сірководню, нітратредукції, окиснення/ферментації глюкози [4, 11].

Профілі жирних кислот досліджували за [5]. Для аналізу жирнокислотного складу кожен штаб виділених бактерій культивували на середовищі MRS (Merck, Німеччина) при 37 °С протягом 48 год. Метиллові ефіри жирних кислот виділяли відповідно до стандартного протоколу Sherlock Microbial Identification System [14, 15]. Для цього в реакційну віалу поміщали 50 мг біо-



маси та додавали концентрований розчин NaOH. Суспензію змішували, поміщали на водяну баню і витримували 5 хв при 95–100 °С. Після чого змішування повторювали і витримували 25 хв на водяній бані при 95–100 °С для повного руйнування бактеріальних клітин та омилення ліпідів. До охолодженої суспензії додавали розчин підкисленого метанолу та витримували 10 хв на водяній бані при 80 °С для отримання метилових ефірів жирних кислот, які в подальшому екстрагували гексаном. Отриманий екстракт нейтралізували 0,3 М розчином NaOH та аналізували методом газової хроматографії з використанням автоматичної системи ідентифікації мікроорганізмів MIDI Sherlock на базі газового хроматографа з полум'яно-йонізаційним детектором Agilent 7890 (Agilent Technologies, США). Колонка капілярна 25мм×0,2мм×0,33мкм Ultra 2, швидкість потоку 3 мл/хв, газ-носії водень, градієнт температури від 150 °С до 300 °С впродовж 6 хв [7]. Кількість кожної жирної кислоти було виражено у вигляді відсотка від загальної кількості клітинних жирних кислот, які присутні в концентрації більше ніж на 0,2%. Для ідентифікації досліджуваних штамів за їх жирнокислотним профілем використали програмне забезпечення MIDI Sherlock 4.5 та бібліотеку жирнокислотних профілів мікроорганізмів RSTBA 6 версії 6.2 [14, 15].

Для встановлення солестійкості штамів лактобацил готували живильне середовище MRS-бульйон з різним вмістом морської солі: 2,5%, 5%, 7,5%, 10%, 12,5% та 15%. Посівна доза – 5% добової бульйонної культури кожного штаму до об'єму середовища. Інтенсивність росту оцінювали через 48 год за 5-ти бальною шкалою, де 5 балів – виражений ріст в усьому об'ємі середовища, значне помутніння середовища; 4 бали – ріст в усьому об'ємі середовища, помутніння спостерігається у 2/3 частині середовища; 3 бали – середня інтенсивність росту з помутнінням у 1/3 частині середовища; 2 бали – інтенсивність росту низька, осад на дні пробірки; 1 бал – ріст майже відсутній, незначний осад; 0 балів – росту немає [8].

Кислотоутворення штамів оцінювали за активною і титрованою кислотністю при культивуванні в стерильному знежиреному молоці через 24–48 год. Для цього добові культури досліджуваних штамів засівали в стерильне молоко з розрахунку 3–5% посівного матеріалу до об'єму молока, поміщали в термостат та інкубували 24–48 год при температурі 37 °С. Під час обліку результатів враховували здатність культури сквашувати молоко та утворювати згусток [3].

Експерименти здійснювали в трьох повторах. Результати дослідження опрацьовували статистично з використанням програми Microsoft Office Excel 2003 [6].

Результати дослідження та їх обговорення

При проведенні досліджень на наявність МКБ у губках *Haliclona* sp., зібраних в Одеській затоці Чорного моря, ізольовано 63 штами бактерій, які за морфологічними, тінкторіальними, культуральними і фізіолого-біохімічними характеристиками були віднесені до роду *Lactobacillus*.

Усі виділені штами на MRS- і GYPB-агарах утворювали слизові, білі або напівпрозорі сферичні колонії. Встановлено, що усі виділені штами пред-



ставлені грампозитивними бактеріями. Клітини виділених штамів мали різну морфологію. Вони були від дуже коротких, що нагадували кокобацили до довгих, розташовувались поодинокі, попарно або утворювали ланцюги, клітини не утворювали спори, цисти і капсули (рис. 1).

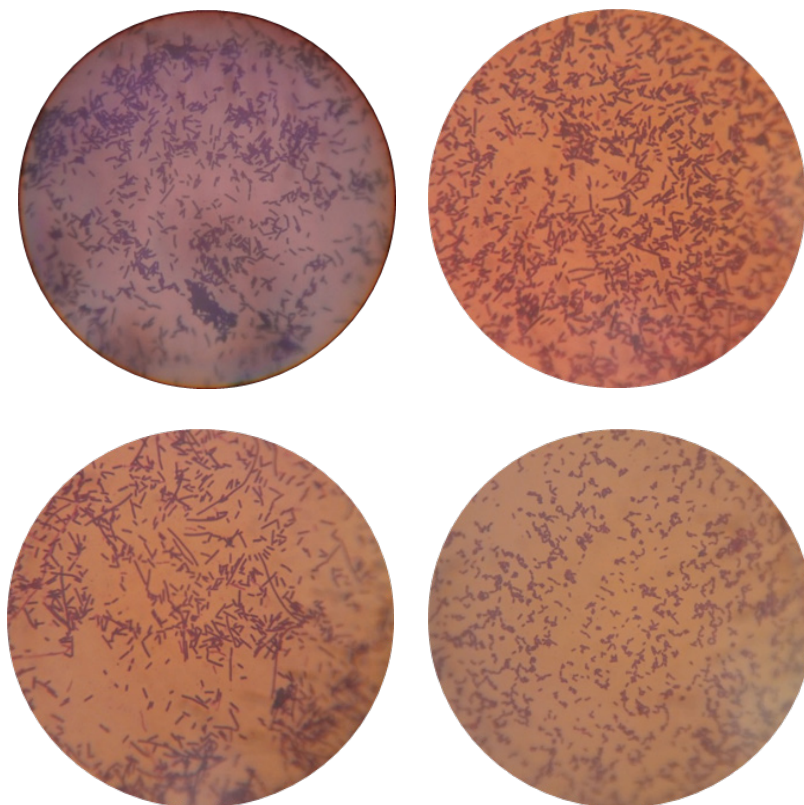


Рис. 1. Морфологія бактерій *Lactobacillus*, виділених з губок ($\times 1000$)

Fig.1. Morphology of *Lactobacillus* isolated from sponges ($\times 1000$)

Із літературних джерел відомо, що МКБ роду *Lactobacillus* характеризуються значним морфологічним поліморфізмом [1, 11]. Окрім того, довжина клітин у різних культур одних і тих самих видів бактерій залежить певною мірою від віку культури, складу середовища, способу інкубації. Тенденція до утворення ланцюжків змінюється у залежності від фази росту і рН середовища [11]. Суттєво на форму клітин впливають й інші фактори. Так, наприклад, при недостатчі вітаміну B_{12} , при опроміненні γ -променями, впливі магнітних полів, антибіотиків, лізоциму, рибонуклеази, відбувається гальмування поділу, що сприяє утворенню довгих, ниткоподібних клітин [1, 2]. Видовження клітин і фрагментація спостерігається на середовищах з високою кислотністю (рН 3,7), при значному вмісті хлориду натрію (до 6%), при температурі, що значно відрізняється від оптимальної, інколи, при високому вмісті етилового спирту [1].

Визначення характеру росту у середовищах MRS- і GYPB-бульйонах показало, що у процесі культивування лактобацили росли в усьому об'ємі середовища, з плином часу культури утворювали значне помутніння і осад.

Усі досліджені штами були каталазо- і цитохромоксидазонегативними; не відновлювали нітрати; споживали глюкозу в аеробних і анаеробних умовах; не утворювали індол і сірководень.

Таким чином, на підставі вивчення основних біологічних властивостей виділені культури віднесли до роду *Lactobacillus* [11].

Штами лактобацил виявлені в 10 із 17 досліджених губок *Haliclonas*. Їх кількість варіювала від $1,87 \times 10^5$ до $1,4 \times 10^9$ КУО/г залежно від губки (рис. 2).

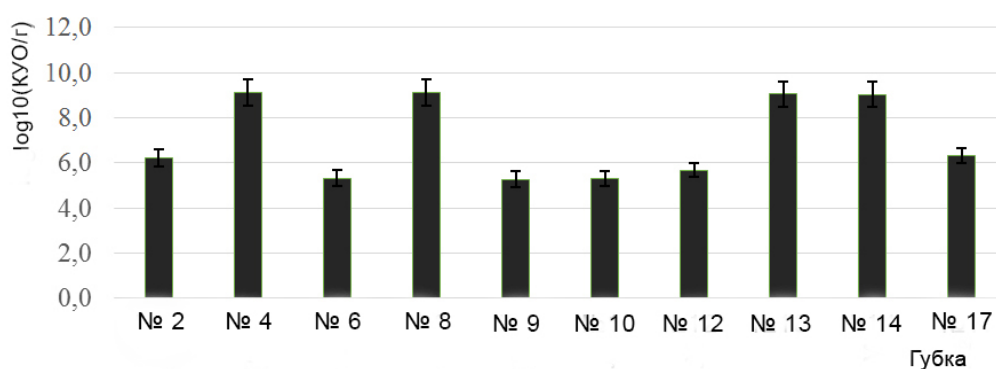


Рис. 2. Чисельність бактерій роду *Lactobacillus* в чорноморських губках

Fig. 2. The quantity of bacteria of the genus *Lactobacillus* in the Black Sea sponges

Максимальну кількість молочнокислих бактерій було ізольовано з губки № 4 – $1,4 \times 10^9$ КУО/г. Значна кількість лактобацил ($1,33 \times 10^9$ КУО/г; 17×10^9 КУО/г та $1,05 \times 10^9$ КУО/г) виявлена в губках № 8, 13 та 14, відповідно, а мінімальна – в губці № 9 – $1,87 \times 10^5$ КУО/г. Практично такою ж була кількість МКБ в губках № 6 і 10 – $2,13 \times 10^5$ КУО/г (рис. 2).

Для видової ідентифікації проведено аналіз жирнокислотного складу за допомогою газового хроматографу з використанням програмного забезпечення MIDI Sherlock 4.5 та бібліотеки жирнокислотних профілів мікроорганізмів RSTBA 6 версії 6.2 [14, 15], згідно чого виділені штами були віднесені до 3 видів: *Lactobacillus vaccinoferus*, *L. parabuchneri* та *L. bifermentans*. В залежності від губки кількість і відсоткове співвідношення видів лактобацил було різним (рис. 3).

У найменшій кількості із губок були виділені штами виду *L. vaccinoferus* (лише 5 штамів із 63 ізольованих, що склало 7,9%) (рис. 4).

У більшій кількості виділені представники видів *L. bifermentans* (36,5% штамів від усіх ізольованих) і *L. parabuchneri* (55,6% штамів).

З даних літератури відомо, що *Lactobacillus* sp. у логарифмічній та стаціонарній фазах містять основні жирні кислоти такі, як тетрадеканова, гексадеканова та октадеканова кислоти [18]. Hilmi H. T. A. And al. (2007) встановили,

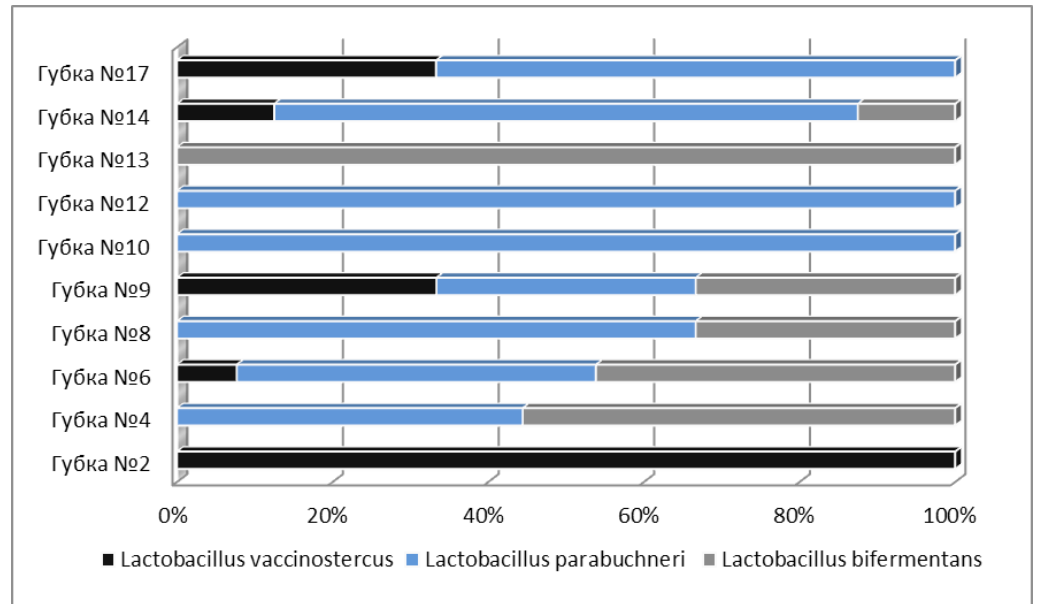


Рис. 3. Вміст представників різних видів роду *Lactobacillus* в чорноморських губках

Fig. 3. Content of representatives of different species of the genus *Lactobacillus* in the Black Sea sponges

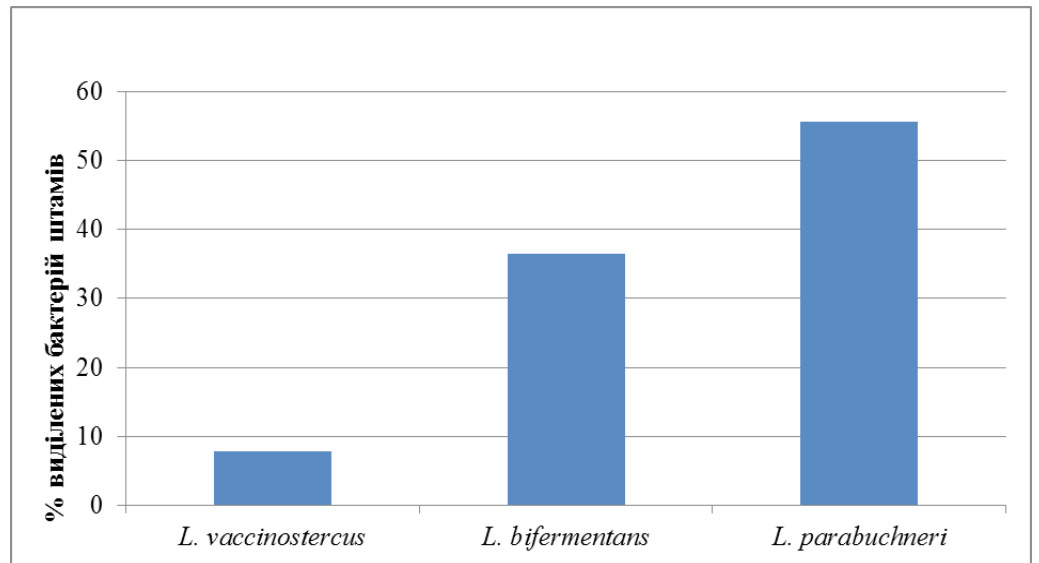


Рис. 4. Видова належність бактерій роду *Lactobacillus*, виділених із чорноморських губок

Fig. 4. Species belonging to bacteria of the genus *Lactobacillus* isolated from Black Sea sponges



що у ізолятів *L. reuteri* переважали ізомери 18:2; 18:1; 16:0 та 3-гідроксидекаанової кислоти [12].

В жирнокислотних профілях досліджених бактерій виявлено ізомери жирних кислот із довжиною вуглецевого ланцюга від 12 до 20 атомів вуглецю. Переважали ізомери гексадеканової й октадеканової кислот.

У профілях виділених МКБ встановлено в основному 10 жирних кислот, але відсоткове співвідношення цих кислот визначалося видовою приналежністю штамів (табл. 1–3).

Для виду *L. bifermentans* характерним було переважання нондеценаної (37,36%) і гексадеканової (26,03%) кислоти у жирнокислотному профілі. У табл. 1 наведено склад жирних кислот штаму *L. bifermentans* 19, а на рис. 5 хроматограму спектру ефірів жирних кислот бактерій цього штаму.

Для виду *L. vaccinostercus* нондеценанова кислота також превалювала, але на другому місці за поширеністю була октадеценанова кислота, а не гексадеканова, як у випадку *L. bifermentans*. Склад жирних кислот бактерій штаму *L. vaccinostercus* 22 наведено у табл. 2; хроматограму спектру ефірів жирних кислот бактерій цього штаму – на рис. 6.

Характерною особливістю бактерій виду *L. parabuchneri* є переважаюча кількість гексадеканової кислоти (36,15%). У табл. 3 і на рис. 7 наведено дані для бактерій штаму *L. parabuchneri* 39, відсоток гексадеканової кислоти у якого склав 36,15%, нондеценаної – 19,96%, октадеценаної – 16,27%.

Індекси подібності ізолятів коливались для *L. vaccinostercus* від 0,598 до 0,313, для *L. parabuchneri* від 0,756 до 0,382, а для *L. bifermentans* від 0,738 до 0,407, що вважається прийнятним показником подібності до штамів представлених в бібліотеці. Загалом, відмінності у складі жирних кислот були невеликими, що закономірно для бактерій штамів одного роду.

Отже, у результаті проведених досліджень із чорноморських губок виділені МКБ роду *Lactobacillus*: *Lactobacillus vaccinostercus*, *L. parabuchneri* та *L. bifermentans*.

У публікаціях іноземних фахівців з дослідження мікробіоти губок Червоного, Середземного, Японського морів описуються мікроорганізми, що належать більш ніж до 25 порядків. Деякі з них є представниками нових родів і видів, асоційовані саме з даними гідробіонтами [19, 20]. Але дотепер існує вкрай мало даних щодо МКБ, які населяють губки. У 2003 р. Ishikawa et al. виділили з губок Японського моря МКБ, віднесені до нового виду *Marinilactibacillus psychrotolerans* [13], а у 2005 р. Toffin L. et al. – *M. piezotolerans* [17].

Оскільки досліджувані бактерії було виділено з Чорного моря, для якого характерна сезонна зміна концентрації солі у воді і в середньому становить приблизно 14–15%, визначали здатність лактобацил до росту при концентраціях морської солі від 2,5 до 15,0%. Встановлено, що виділені штами при зазначених концентраціях солі мали різну інтенсивність росту. Бактерії усіх штамів добре росли при 2,5% і 5,0%, утворюючи значну кількість біомаси. При збільшенні концентрації солі спостерігали як зменшення кількості штамів, що росли, так і зниження інтенсивності їх росту.

Таблиця 1

Склад жирних кислот бактерій штаму *L. bifermantans* 19 (%)

Table 1

Fatty acid composition of bacterial strain *L. bifermantans* 19 (%)

Назва жирної кислоти	Відсоток
19:1 w7c/19:1 w6c/ нондеценава кислота	37,36
16:0/ гексадеканава кислота	26,03
18:1 w9c/ 9-октадеценава кислота	17,95
18:1 w7c/ вакценава кислота	8,83
16:1 w7c/16:1 w6c/ гексадеценава кислота	3,36
14:0/ тетрадеканава кислота	2,89
18:0/ октадеканава кислота	1,68
19:0 ізо/ 18-метил нондеканава кислота	0,67
17:0 2ОН/ 2-гідрокси-гептадеканава кислота	0,66
12:0/ додеканава кислота	0,58

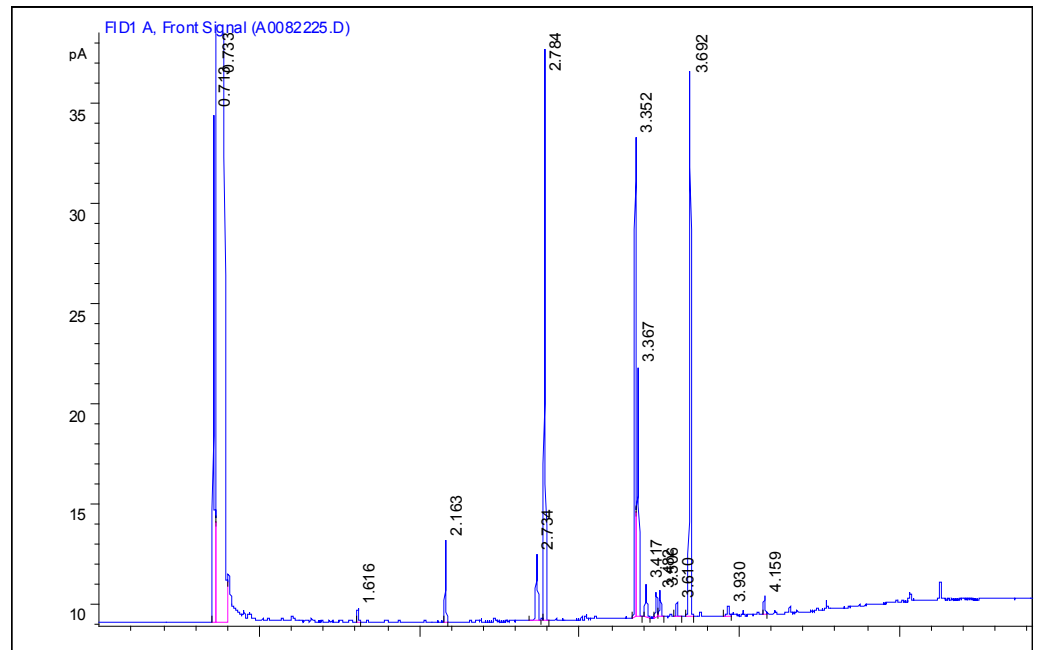


Рис. 5. Хроматограма спектру ефірів жирних кислот бактерій штаму *L. bifermantans* 19

Fig. 5. Chromatogram of the spectrum of esters of fatty acids of bacterial strain *L. bifermantans* 19



Таблиця 2

Склад жирних кислот бактерій штаму *L. vaccinostercus* 22 (%)

Table 2

Fatty acid composition of bacterial strain *L. vaccinostercus* 22 (%)

Назва жирної кислоти	Відсоток
19:1 w7c/19:1 w6c/ нондецена кислота	32,80
18:1 w9c/ 9-октадецена кислота	26,03
16:0/ гексадеканова кислота	24,22
18:1 w7c/ вакцена кислота	4,54
14:0/ тетрадеканова кислота	4,28
16:1 w7c/16:1 w6c/ гексадецена кислота	3,35
18:0/ октадеканова кислота	1,68
12:0/ додеканова кислота	0,97
17:0 2ОН/ 2-гідрокси-гептадеканова кислота	0,74
19:0 ізо/ 18-метил нондеканова кислота	0,53

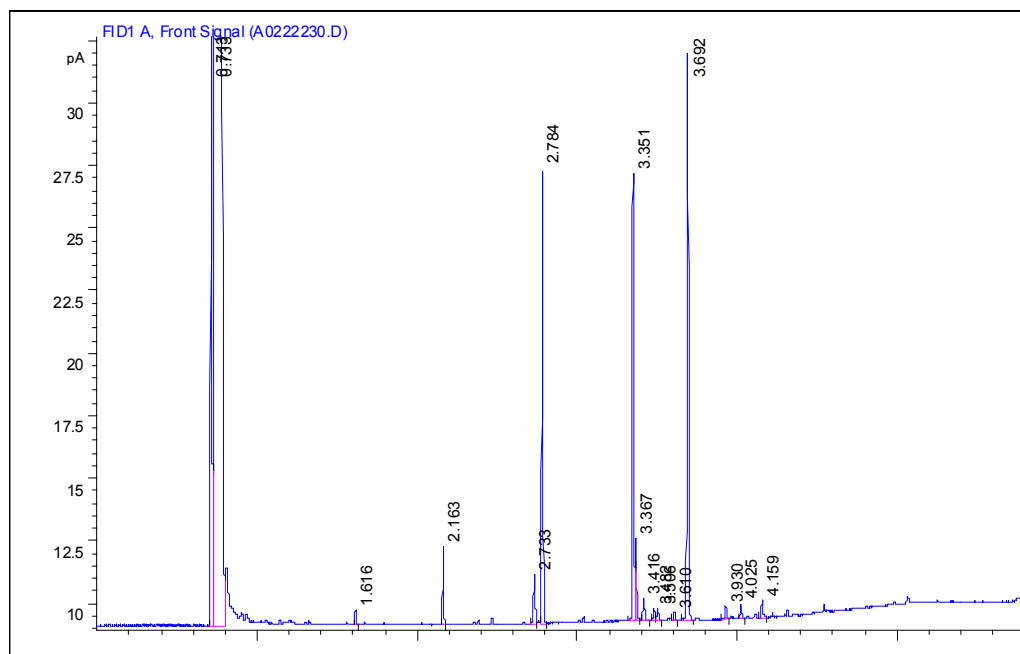


Рис. 6. Хроматограма спектру ефірів жирних кислот бактерій штаму *L. vaccinostercus* 22

Fig. 6. Chromatogram of the spectrum of esters of fatty acids of bacterial strain *L. vaccinostercus* 22

Таблиця 3

Склад жирних кислот бактерій штаму *L. parabuchneri* 39 (%)

Table 3

Fatty acid composition of bacterial strain of *L. parabuchneri* 39 (%)

Назва жирної кислоти	Відсоток
16:0/ гексадеканова кислота	36,15
19:1 w7c/19:1 w6c/ нондеценева кислота	19,96
18:1 w9c/ 9-октадеценева кислота	16,27
18:1 w7c/ вакценева кислота	15,12
16:1 w7c/16:1 w6c/ гексадеценева кислота	4,27
14:0/ тетрадеканова кислота	3,68
18:0/ октадеканова кислота	2,42
12:0/ додеканова кислота	0,78
17:0 2OH/ 2-гідрокси-гептадеканова кислота	0,71
19:0 ізо/ 18-метил нондеканова кислота	0,64

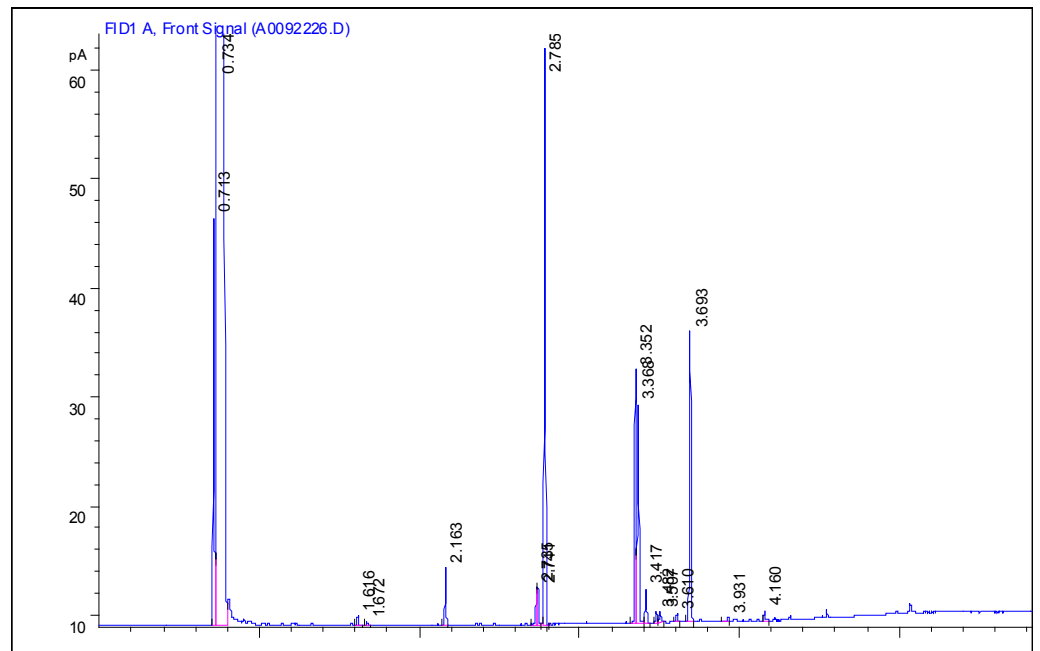


Рис. 7. Хроматограма спектру ефірів жирних кислот бактерій штаму *L. parabuchneri* 39

Fig.7. Chromatogram of the spectrum of esters of fatty acids of bacterial strain *L. parabuchneri* 39



Через 48 год 96,2% бактерій росли дуже інтенсивно на середовищі з вмістом солі 2,5%. Інтенсивний ріст, але на середовищі із 5,0% солі, показали також 53,8% лактобацил (рис. 8).

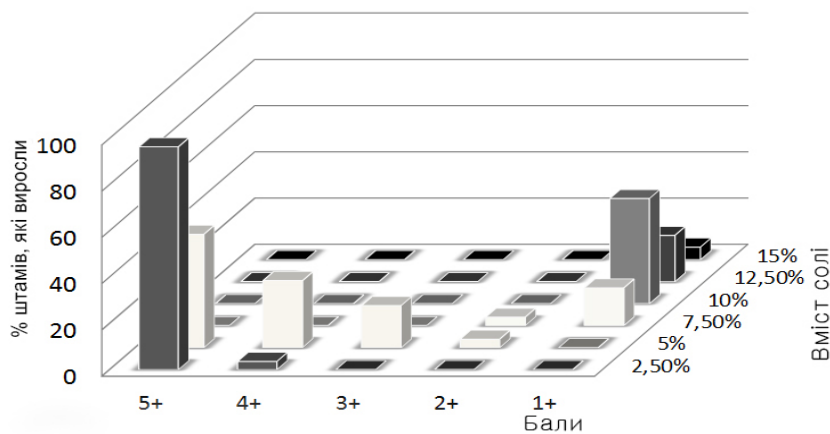


Рис. 8. Ріст лактобацил за різних концентрацій морської солі

Fig. 8. Growth of lactobacilli at different concentrations of sea salt

При більш високих концентраціях солі у середовищі переважна більшість бактерій не росла, а інтенсивність тих, що вирости, оцінена на «2» бали (3,9% штамів) і «1» бал (15,4% штамів). У середовищі з вмістом солі 10,0% незначний ріст відмічено для 40,4% бактерій, а 59,6% лактобацил взагалі не росли. При збільшенні концентрації солі у середовищі до 12,5% лише 28,8% штамів росли, але інтенсивність їх росту була низькою.

Більшість виділених із губок молочнокислих бактерій проявили стійкість до морської солі у концентраціях 2,5 і 5,0%, що співпадає з даними з інших досліджень по солестійкості штамів *Lactobacillus*, ізольованих з інших джерел, зокрема автоферментованих овочів, м'ясної сировини тощо [7].

Для визначення активності кислотоутворення використовували стерильне знежирене молоко. Результати, отримані через 24 год, показали, що лише 74,5% бактерій ферментували молоко (титрована кислотність визначена у межах 26–46 °Т). Молоко при цьому стало густіше, з'явився характерний кисломолочний запах. Бактерії інших штамів не сквасили молоко – згусток був відсутній, колір та консистенція молока не змінилася. Визначення активної кислотності показало, що через 24 год показник рН дорівнював 5,5–6,5 (для більшості штамів). Деякі бактерії закислювали молоко до рН 4,0–4,5.

Через 48 год рН більшості зразків досягав 4,0–4,5 та лише деякі штами не показали високої здатності до кислотоутворення (рН зразків дорівнював 5,0–5,5). Титрована кислотність для більшості штамів (78,6%) визначена у межах від 30 до 90 °Т, для 15,0% – більш, ніж 90 °Т і лише 6,4% характеризувалися незначною титрованою кислотністю (від 20 до 30 °Т).

Як відомо з літературних джерел, активність кислотоутворення у представників роду *Lactobacillus* варіює у широких межах і залежить від виду,

штаму, джерела виділення, складу живильних середовищ, умов культивування [1, 2]. У проведених дослідженнях показники титрованої кислотності бактерій більшості штамів не перевищували 90 °Т.

Таким чином, проведені дослідження показали, що молочнокисла мікробіота чорноморських губок представлена 3 видами: *L. vaccinofermentus*, *L. parabuchneri* та *L. bifementans*, кількість і відсоткове співвідношення яких варіювали у широких межах і визначалися, перш за все господарем. Визначення жирнокислотного профілю бактерій виділених штамів МКБ показало переважання ізомерів гексадеканової, нондеценнової і 9-октадеценнової кислот. Переважна більшість штамів активно росли при 2,5–5,0% вмісті солі у середовищі культивування та були здатними ферментувати молоко через 48 год, активність кислотоутворення при цьому визначена у межах 30–90 °Т.

Отримані результати є передумовою проведення подальших досліджень біотехнологічних властивостей штамів з метою їх застосування у марикультурі.

I.V. Strashnova, I.O. Kovtun, N.V. Korotaieva

Odesa National I. I. Mechnykov University,
2, Dvoryanska str., Odesa, 65082, Ukraine,
e-mail: fabiyanska@ukr.net

CHARACTERISTICS OF LACTIC ACID BACTERIA FROM THE BLACK SEASPONGES

Summary

The **aim** of the work was to isolate the lactic acid bacteria from the Black Sea sponges and to investigate some of their biological properties. **Methods.** Isolation of lactobacilli strains and determination of their abundance in sponges was performed using MRS and GYPB media. Colony and cell morphology, tinctorial properties, catalase and oxidase activity, ability to form indole, hydrogen sulfide, nitrate reduction, glucose oxidation/fermentation were studied using standard methods. Fatty acid methyl esters was carried out according to the standard Sherlock Microbial Identification System protocol. The identification of strains by fatty acid composition was performed by gas chromatography using an automatic MIDI Sherlock microorganism identification system (RTSBA 6 library version 6.2). Sea salt resistance was determined by the growth rate in MRS broth. The acid production was determined by the active and titrated acidity in milk. **Results.** The number of representatives of lactic acid bacteria in the tested Black Sea sponges ranged from 1.87×10^5 to 1.4×10^9 CFU/g depending on the sponge. Among the fatty acids of bacteria belonging to the species *Lactobacillus vaccinofermentus*, *L. parabuchneri* and *L. bifementans*, hexadecanoic, nondecenoic and 9-octadecenoic acids prevailed. The optimal concentration of sea salt for the growth of the studied strains was determined in the range of 2.5–5.0%. After 24 h of cultivation, the titrated acidity of 74.5% of the strains was 26–46 °T, and after 48 h, 6.4% of the strains showed acidity from 20 to 30 °T, 78.6% – from 30 to 90 °T, and 15.0% – more than 90 °T. The acidification of the medium by most strains occurred at pH 4.0–4.5. **Conclusions.** In the study of the lactic acid bacteria of the Black Sea sponges *Haliclona* sp. the presence of representatives of the genus *Lactobacillus*:



L. vaccinostercus, *L. parabuchneri*, and *L. bifementans* were determined and the basic biological characteristics of the isolated bacteria were investigated.

Key words: *Lactobacillus*, biological properties, Black Sea sponges.

И.В. Страшнова, И.О. Ковтун, Н.В. Коротаяева

Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина,
e-mail: fabiyanska@ukr.net

ХАРАКТЕРИСТИКА МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ ГУБОК ЧЕРНОГО МОРЯ

Реферат

Целью работы было выделить молочнокислые бактерии из губок Черного моря и исследовать их основные биологические свойства. **Методы.** Выделение штаммов лактобацилл и определения их численности в губках проводили, используя среды MRS и GYPB. Морфологию колоний и клеток, тинкториальные свойства, каталазную и оксидазную активности, способность к образованию индола, сероводорода, к нитратредукции, к окислению/ферментации глюкозы изучали по общепринятым методикам. Выделение метиловых эфиров жирных кислот проводили в соответствии со стандартным протоколом Sherlock Microbial Identification System. Идентификацию штаммов по жирнокислотному составу проводили методом газовой хроматографии с использованием автоматической системы идентификации микроорганизмов MIDI Sherlock (база данных библиотеки RTSBA 6 версия 6.2). Устойчивость к морской соли определяли по интенсивности роста в MRS-бульоне. Кислообразование определяли по активной и титруемой кислотности в молоке. **Результаты.** Количество представителей молочнокислых бактерий в исследованных черноморских губках колебалось от $1,87 \times 10^5$ до $1,4 \times 10^9$ КОЕ/г в зависимости от губки. Среди жирных кислот бактерий, отнесенных к видам *Lactobacillus vaccinostercus*, *L. parabuchneri* и *L. bifementans*, преобладали гексадекановая, нондеценная и 9-октадеценная кислоты. Оптимумы концентрации морской соли для роста исследованных штаммов определены в пределах 2,5–5,0%. Через 24 ч культивирования титруемая кислотность 74,5% штаммов составляла 26–46 °T, а через 48 ч 6,4% штаммов демонстрировали кислотность от 20 до 30 °T, 78,6% – от 30 до 90 °T, а 15,0% – более 90 °T. Большинство штаммов окисляли среду до pH 4,0–4,5. **Выводы.** При исследовании молочнокислых бактерий черноморских губок *Haliciona* sp. выявлено наличие в них представителей рода *Lactobacillus*: *L. vaccinostercus*, *L. parabuchneri* и *L. bifementans*, изучены основные биологические характеристики выделенных бактерий.

Ключевые слова: *Lactobacillus*, биологические свойства, губки Черного моря.



СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Глушанова Н.А. Биологические свойства лактобацилл // Боллетень сибирской медицины. – 2003. – № 4. – С. 50–58.
2. Киселев Д.А., Корнеева О.С., Мотина Е.А., Шуваев П.В. Регулирование и контроль процессов биосинтеза молочнокислых бактерий // Фундаментальные исследования. – 2012. – № 4 (часть 2) – С. 391–395.
3. Крусъ Г.Н., Шалыгина А.М., Волокитина З.В. Методы исследования молока и молочных продуктов. – М.: Колос, 2000. – 386 с.
4. Нетрусов А.И., Егорова М.А., Захарчук Л.М., Колотилова Н.Н. и др. Практикум по микробиологии: учебное пособие для студентов высших учебных заведений. – М.: Академия, 2005. – 608 с.
5. Остапчук А.М. Молекулярно-біологічна характеристика і ідентифікація штаму *Vacillus sp.* ONU14 з ентомопатогенною активністю // Мікробіологія і біотехнологія. – 2015. – № 1. – С. 6–13.
doi: 10.18524/2307-4663.2015.1(29).48011.
6. Сиделев С.И. Математические методы в биологии и экологии: введение в элементарную биометрию: Учебное пособие. – Ярославль: ЯрГУ, 2012. – 140 с.
7. Страшнова І.В., Ямборко Г.В., Васильєва Н.Ю. Стійкість штамів лактобацил, виділених з різних джерел, до деяких чинників травного тракту // Журнал мікробіологія і біотехнологія. – 2019. – № 2 (46). – С. 38–50.
doi: [http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2019.2\(46\).173176](http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2019.2(46).173176) -
8. Фабіянська І.В. Розробка технології препаратів лактобацил і їх використання для виготовлення сировокопчених ковбас: Автореф. дис... канд. техн. наук. Одеса, 2008. – 21 с.
9. Alonso S., Carmen Castro M., Berdasco M., de la Banda I.G., Moreno-Ventas X., de Rojas A. H. Isolation and partial characterization of lactic acid bacteria from the gut microbiota of marine fishes for potential application as probiotics in aquaculture // Probiotics Antimicrob Proteins. – 2018.
doi: 10.1007/s12602-018-9439-2.
10. Angelakis E., Bachar D., Yasir M., Musso D., Djossou F., Melenotte C., Robert C., Davoust B., Gaborit B., Azhar E.I., Bibi F., Dutour A., Raoult D. Comparison of the gut microbiota of obese individuals from different geographic origins // New Microbes and New Infections. – 2019. – Vol. 27. – P. 40–47.
11. de Vos P. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The Firmicutes / Ed. P. de Vos, G. Garrity, D. Jones, N. Krieg, W. Ludwig, F. Rainey, K.-H. Schleifer, W. Whitma - 2nd ed. – New York: Springer, 2009. – V. 3. – P. 1–1450.
12. Hilmi H.T.A., Surakka A., Apajalahti J., Saris P.E.J. Identification of the most abundant *Lactobacillus* species in the crop of 1- and 5-Week-Old broiler chickens // Applied and environmental microbiology. – 2007. – V. 73, No. 24. – P. 7867–7873.
13. Ishikawa M., Nakajima K., Yanagi M., Yamamoto Y., Yamasato K. *Marinilactibacillus psychrotolerans* gen. nov., sp. nov., a halophilic and alkaliphilic marine lactic acid bacterium isolated from marine organisms in temperate and subtropical areas of Japan // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2003. – V. 53. – P. 711–720.
14. MIS Operation Manual. www.midi-inc.com. September 2012 Newark.



15. Sasser M. Bacterial identification by gas chromatographic analysis of fatty acid methyl esters (GC-FAME). – Technical Note 101. – Newark, DE: MIDI; 2006.

16. Tabla R., Gómez A., Rebollo J.E., Roa I. Salt influence on surface microorganisms and ripening of soft ewe cheese // J. Dairy Res. – 2015. – No. 82 (2). – P. 215–221.

17. Toffin L., Zink K., Kato C., Pignet P., Bidault A., ge Bienvenu N. et al. *Marinilactibacillus piezotolerans* sp. nov., a novel marine lactic acid bacterium isolated from deepsub-seafloor sediment of the Nankai Trough // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2005. – 55. – C. 345–351. doi: 10.1099/ij.s.0.63236-0.

18. Veerkamp J.H. Fatty acid composition of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* strains // Journal of bacteriology. – 1971. – 108 (2). – P. 861–867.

19. Versluis D., Rodriguez de Evgrafov M., Sommer M.O., Sipkema D., Smidt H., van Passel M.W. Sponge microbiota are a reservoir of functional antibiotic resistance genes // Front Microbiol. – 2016. – 17 (7). – P. 1848. doi: 10.3389/fmicb.2016.01848.

20. Versluis D., McPherson K., van Passel M.W.J., Smidt H., Sipkema D. Recovery of previously uncultured bacterial genera from three Mediterranean sponges // Mar Biotechnol. – 2017. – Vol. 19 (5). – P. 454–468.

References

1. Glushanova NA. Biological properties of lactobacillus. Bulletin sibirskoy medicine. 2003; (4): 50-58.

2. Kiselev DA, Korneeva OS, Motina EA, Shuvaev PV. Lactic acid bacteria biosynthesis regulation and control. Fundamental research. 2012; (4/2): 391-395.

3. Krus' GN, Shaligina AM, Volokitina ZV. Research methods for milk and dairy products. Moskva, Kolos, 2000: 386.

4. Netrusov AI, Egorova MA, Zaharchuk LM, Kolotilova NN et al. Workshop on Microbiology: a textbook for students of higher educational institutions. Moskva, Akademiya, 2005: 608.

5. Ostapchuk AM. Molecular-biological characteristics and identification of *Bacillus* sp. ONU14 strain with entomopathogenic activity. Microbiology and Biotechnology. 2015; 1: 6-13. doi: 10.18524/2307-4663.2015.1(29).48011.

6. Sidelev S.I. Mathematical Methods in Biology and Ecology: Introduction to Elementary Biometry: A Training Manual. Yaroslavl, YarGU, 2012: 140

7. Strashnova IV, Yamborko GV, Vasylieva NYu. The resistance of strains of lactobacilli isolated from different sources to some factors of the digestive tract. Microbiology and Biotechnology. 2019; (2(46)): 38-50. doi: [http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2019.2\(46\).173176](http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2019.2(46).173176)

8. Fabiyanska I.V. Creation of lactobacilli preparations technology and their using for the production of fermented sausages. PhD thesis, Odesa National Academy of Food Technologies, 2008: 21.

9. Alonso S, Carmen Castro M, Berdasco M, de la Banda IG, Moreno-Ventas X, de Rojas AH. Isolation and partial characterization of lactic acid bacteria from the gut microbiota of marine fishes for potential application as probiotics in aqua-



- culture. Probiotics Antimicrob Proteins. 2018. doi: 10.1007/s12602-018-9439-2.
10. Angelakis E., Bachar D., Yasir M., Musso D., Djossou F., Melenotte C., Robert C., Davoust B., Gaborit B., Azhar E.I., Bibi F., Dutour A., Raoult D. Comparison of the gut microbiota of obese individuals from different geographic origins. *New Microbes and New Infections*. 2019; (27): 40-47.
 11. de Vos P. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The Firmicutes* / Ed. P de Vos, G Garrity, D Jones, N Krieg, W Ludwig, F Rainey, K-H Schleifer, W Whitma. 2nd ed. New York, Springer, 2009; (3): 1-1450.
 12. Hilmi HTA, Surakka A, Apajalahti J, Saris PEJ. Identification of the most abundant *Lactobacillus* species in the crop of 1- and 5-Week-Old broiler chickens. *Applied and environmental microbiology*. 2007; (73(24)): 7867-7873.
 13. Ishikawa M, Nakajima K, Yanagi M, Yamamoto Y, Yamasato K *Marinilactibacillus psychrotolerans* gen. nov., sp. nov., a halophilic and alkaliphilic marine lactic acid bacterium isolated from marine organisms in temperate and subtropical areas of Japan. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2003; (53): 711-720.
 14. MIS Operation Manual. www.midi-inc.com. September 2012 Newark.
 15. Sasser M. Bacterial identification by gas chromatographic analysis of fatty acid methyl esters (GC-FAME). Technical Note 101. Newark, DE: MIDI; 2006.
 16. Tabla R, Gómez A, Rebollo JE, Roa I. Salt influence on surface microorganisms and ripening of soft ewe cheese. *J. Dairy Res.* 2015; (82(2)): 215-221.
 17. Toffin L, Zink K, Kato C, Pignet P, Bidault A, ge Bienvenu N et al. *Marinilactibacillus piezotolerans* sp. nov., a novel marine lactic acid bacterium isolated from deepsub-seafloor sediment of the Nankai Trough. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2005; (55): 345-351. doi: 10.1099/ijs.0.63236-0.
 18. Veerkamp JH Fatty acid composition of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* strains. *Journal of bacteriology*. 1971; (108(2)): 861-867.
 19. Versluis D, Rodriguez de Evgrafov M, Sommer MO, Sipkema D, Smidt H, van Passel MW Sponge microbiota are a reservoir of functional antibiotic resistance genes. *Front Microbiol.* 2016; (17(7)): 18-48. doi: 10.3389/fmicb.2016.01848.
 20. Versluis D, McPherson K, van Passel MWJ, Smidt H, Sipkema D. Recovery of previously uncultured bacterial genera from three Mediterranean sponges. *Mar Biotechnol.* 2017; (19(5)): 454-468.

Стаття надійшла до редакції 12.04.2020 р.

