

УДК 579.864.1:616.331

Г. В. Ямборко, канд. техн. наук, доц., М. Г. Толпіна, студ.
Одеський національний університет ім. І. І. Мечникова,
кафедра мікробіології і вірусології,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65 026, Україна

ВИДІЛЕННЯ БАКТЕРІЙ РОДУ *LACTOBACILLUS* ВІД ГІДРОБІОНТІВ ЧОРНОГО МОРЯ ТА ЇХ ІДЕНТИФІКАЦІЯ

З шлунково-кишкового тракту та шкіри деяких гідробіонтів Чорного моря (дельфінів, морського окуня, скумбрії та тріски) ізольовано 18 штамів бактерій роду *Lactobacillus*, які було ідентифіковано як види *L. agilis*, *L. coriniformis subsp. coriniformis*, *L. pentosus*, *L. buchneri*, *L. plantarum*, *L. fermentum*. Наведено, що найбільшою кількістю штамів представлений вид *L. coryniformis subsp. coryniformis*, який відноситься до факультативно-гетероферментативної групи.

Ключові слова: лактобацили, гідробіонти, ідентифікація.

Існують багаточисельні дані про розповсюдження бактерій роду *Lactobacillus* у різних природних субстратах, однак ряд місць існування цих мікроорганізмів до цього часу не було досліджено (морська вода шельфів, філосфера водоростей, морські губки, молюски, іхтіофауна та морські ссавці). Вважається, що специфічні умови морського середовища повинні позначатися на видовому складі молочнокислих бактерій мікроекосистем гідробіонтів [1, 2]. Крім того, в літературі відсутні систематизовані дані про закономірності розповсюдження, кількість, особливості видового складу та біологічні властивості бактерій роду *Lactobacillus*, які входять до складу мікробіоти організмів з різним філогенетичним рівнем розвитку.

Метою даної роботи було виділення та ідентифікація штамів лактобактерій із шлунково-кишкового тракту та шкіри деяких гідробіонтів Чорного моря — дельфінів, морського окуня, скумбрії та тріски).

Матеріали та методи

Матеріалом досліджень були 15 штамів лактобацил, виділених зі шкіри та кишкового тракту морських ссавців (дельфінів-афалін *Tursiops truncatus*), та 3 штами, отриманих із вмісту кишечника морських риб (морського окуня *Perca fluviatilis*, скумбрії *Scomber scomber* та тріски *Gadus morhua morhua*).

Проби фекалій досліджуваних тварин відбирали в дворазовій повторності. Зразки епідермісу у виді зіскобів брали з ділянки шкіри дельфінів площею 25 см² і суспендували в 9 мл стерильної морської води. У досліджуваних пробах визначали загальну кіль-

кість мікроорганізмів без одержання накопичувальної культури. Готували ряд серійних розведень досліджуваного матеріалу у фізіологічному розчині і по 0,1 мл кожного висівали на середовище Ендо для виділення ентеробактерій, на середовище МРС — лактобактерій, на молочно-жовточно-сольовий агар — стафілококів, на 5%-ний кров'яний агар — загальної кількості гемолізуючих мікроорганізмів, на середовище Сабуро-дріжджеподібних грибів роду *Candida*, у конденсаційну воду за Шукевичем — протекі [3, 4]. Висіви культивували в термостаті при 28–30°C протягом 1–3 діб для бактерій і 5–7 діб для грибів. Для одержання чистих культур лактобацил як середовище накопичення використовували знежирене молоко. Виділені культури віднесли до роду *Lactobacillus* на підставі їхнього росту на селективному середовищі МРС, фарбування за методом Грама, клітинній морфології і здатності до утворення каталази при обробці колоній 3%-ним розчином перексиду водню.

Для видової ідентифікації лактобактерій використовували наступні діагностичні тести: здатність до росту при 15 і 45°C, утилізації вуглеводів і багатоатомних спиртів, а також гідролізу ескуліна й аргініна [5].

Результати досліджень

Численні дослідження, проведені в різних еколого-географічних нішах з великою кількістю видів як хребетних, так і безхребетних тварин, показали, що в них завжди виявляються молочнокислі бактерії. Однак, як їхня кількість, так і видовий склад, варіюють у дуже широких межах. Одні визначаються видом і віком тварини, місцем його мешкання, сезоном року і особливо характером харчування [6].

Першим етапом дійсних досліджень було виявлення і визначення чисельності лактобактерій у кишковому тракті досліджуваних хребетних тварин. Загальна кількість мікроорганізмів в усередненій пробі вмісту кишечника деяких хребетних наведена в табл. 1.

У процесі дослідження мікробіоти травного тракту чорноморських дельфінів-афалін, які утримуються в умовах Державного океанаріуму (м. Севастополь), так і виловлених у морі, нами було виявлено, що кількість бактерій роду *Lactobacillus* в 1 г фекалій складає $2,5 \times 10^6$ КУО.

При дослідженні морських риб (морського окуня, скумбрії та тріски) було ізольовано 3 штами бактерій роду *Lactobacillus*. Вважаємо, що ці молочнокислі бактерії не є нормальними компонентами мікробіоти риб, а були занесені шляхом повторної інфекції. Рядом авторів встановлено, що молочнокислі бактерії входять до складу нормальної мікробіоти травного тракту різних видів риб прісних водойм. Однак, у літературі відсутні систематизовані дані

Таблиця 1

Вміст мікроорганізмів в усередненій пробі вмісту кишечника деяких хребетних (КУО/см³)

Об'єкт	Лакто- бацили	Стреп- тококи	Стафі- лококи	Ентеро- коки	БГКП	Дріжджі
Дельфін	$2,5 \times 10^6$	$0,9 \times 10^2$	$1,8 \times 10^4$	10^2-10^3	$4,6 \times 10^4$	-
Морський окунь	$0,3 \times 10^2$	$0,6 \times 10^2$	$3,9 \times 10^2$	-	$1,6 \times 10^6$	-
Скумбрія	$1,4 \times 10^2$	$0,2 \times 10^2$	$1,8 \times 10^2$	-	$1,6 \times 10^6$	-
Тріска	$0,5 \times 10^2$	1×10^2	1×10^3	-	$1,6 \times 10^6$	-

про закономірності розповсюдження, кількість, особливості видового складу та біологічні властивості бактерій роду *Lactobacillus*, які входять до складу мікробіоти морських риб та ссавців.

В наших дослідженнях встановлено підвищення загальної кількості мікрорганізмів на ушкоджених ділянках шкіри дельфінів у порівнянні зі здоровими покривами. При дерматомікозах зі шкірних уражень виділялися дріжджеподібні гриби, що належать до роду *Candida*. Обстежені дельфіни страждали дерматомікозами різного ступеня важкості. Однак кров цих тварин була стерильна, що свідчить про відсутність системних уражень грибами. Дріжджеподібні гриби роду *Candida* виділялися в асоціації з бактеріями роду *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Proteus*. Слід зазначити, що відбір проб здійснювався влітку, коли спостерігалось підвищення рівня загального обсіменіння поверхні шкіри внаслідок частого контакту з людьми, додатково контамінуючими середовище мешкання дельфінів. Лактобацили виділялися з поверхні шкіри тільки клінічно здорових тварин. Кількість лактобактерій, що були виявлені на шкірі здорових афалін, була незначною ($2 - 3 \times 10^2$ КУО/см²) і залежала від складу мікроорганізмів води в акваторії і від функціонального стану макроорганізму [7].

Виділення й одержання чистих культур бактерій роду *Lactobacillus* здійснювали традиційним методом розсіву на щільні поживні середовища. Більшість штамів давали досить яскравий ріст на середовищі МРС. Однак, було зареєстровано, що деякі культури припиняли свій ріст після 3-4 пасажів. Для виділення і наступного культивування їх пересівали в рідкі та щільні поживні середовища різного складу, що не завжди виявлялося ефективним.

Клітини виділених штамів лактобацил були представлені грам-позитивними, неспороутворюючими паличками правильної форми, по розмірах варіюючих від довгих (довжина 5–6 мкм, ширина 0,5–0,9 мкм) до коротких (довжина 1–3 мкм, ширина 0,6–0,8 мкм) з тенденцією до ланцюгоутворення [5].

Культуральні властивості виділених штамів були вивчені на елективному щільному поживному середовищі МРС [4]. Виявлено, що ізольовані штами лактобацил мають невисоку інтенсивність росту, утворюють дрібні (до 2–3 мм у діаметрі) безбарвні, білі чи жовтуваті, напівпрозорі, гладкі, опуклі, блискучі колонії.

Всебічне вивчення ізольованих нами штамів лактобацил дозволило здійснити їх ідентифікацію за допомогою ряду біохімічних та фізіологічних тестів. Усього було ідентифіковано 6 видів бактерій роду *Lactobacillus*: *L. agilis*, *L. coriniformis* subsp. *coriniformis*, *L. pentosus*, *L. buchneri*, *L. plantarum*, *L. fermentum* (табл. 2).

Таблиця 2

Видова належність бактерій роду *Lactobacillus*, отриманих від досліджуваних тварин

Вид	Всього штамів	% від загальної кількості	Матеріал	
			морські риби	морські ссавці
<i>L. fermentum</i>	4	22,2	1	3
<i>L. plantarum</i>	4	22,2	1	3
<i>L. coryniformis</i> subsp. <i>coryniformis</i>	5	27,7	-	5
<i>L. pentosus</i>	3	16,6	-	3
<i>L. agilis</i>	1	5,5	-	1
<i>L. buchneri</i>	1	5,5	1	-

При дослідженні травного тракту деяких хребетних тварин і шкіри морських ссавців було виявлено, що найбільшою кількістю штамів представлений вид *L. coryniformis* subsp. *coryniformis* (27,7% від загальної кількості виділених лактобактерій).

Згідно традиційним уявленням, характерною рисою представників роду *Lactobacillus* є висока сахаролітична активність з обов'язковим утворенням в якості кінцевого продукту бродіння молочної кислоти [5]. У залежності від метаболічного шляху бродіння вуглеводів і характеру кінцевих продуктів бактерії роду *Lactobacillus* підрозділяються на 3 групи: I — облігатні гомоферментативні, II — факультативні гетероферментативні та III — облігатні гетероферментативні.

На підставі результатів ідентифікації і літературних даних про кінцеві продукти бродіння визначених видів ізольовані штами лактобактерій можна віднести до представників тільки двох груп, що характеризують молочнокисле бродіння. До факультативних гетероферментативних були віднесені види *L. plantarum*, *L. pentosus*,

L. agilis, *L. coryniformis* subsp *coryniformis*; до облигатних гетероферментативних — *L. fermentum* і *L. buchneri*.

Більшість ізолюваних штамів лактобактерій (72,2% від загальної кількості досліджуваних) були віднесені до видів факультативно-гетероферментативної групи, що ферментували гексози з утворенням молочної кислоти, а також, у меншій мірі, пентози з утворенням молочної і оцтової кислот.

Таким чином, була поповнена колекція кафедри мікробіології та вірусології ОНУ штамів бактерій роду *Lactobacillus*, ізолюваних з різних екологічних ніш. В майбутньому планується розширити спектр досліджуваних тварин — потенційних джерел біологічно активних штамів лактобактерій.

Висновки

1. Представники роду *Lactobacillus* є домінуючою мікробіотою у пробах фекалій морських ссавців (дельфінів-афалін). У досліджуваних пробах вмісту кишечника морських риб (морського окуня, скумбрії та тріски) лактобактерії виявляються в незначних кількостях.

2. Кількість лактобактерій, що виявляються на шкірі клінічно здорових дельфінів-афалін, була незначною ($2 - 3 \times 10^3$ КУО/см²), залежала від складу мікроорганізмів води в акваторії і від функціонального стану макроорганізму.

3. У травному тракті та шкірі деяких морських гідробіонтів ідентифіковано 6 видів бактерій роду *Lactobacillus*; найбільшою кількістю штамів представлений вид *L. coryniformis* subsp *coryniformis*, який відноситься до факультативно-гетероферментативної групи.

Література

1. Квасников Е. И. Место и значение молочнокислых бактерий в биосфере // Микробиол. журн. — 1992. — Т. 54, № 5. — С. 3-10.
2. Коваленко Н. К. Экологические типы молочнокислых бактерий // Медицинские аспекты микробной экологии. — М.: МНИИЭМ, 1993/1994. — Вып. 7/8. — С. 88-92.
3. Приказ № 535 "Об унификации микробиологических методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях в лечебно-профилактических учреждениях". — М.: МЗ СССР, 1985. — 121 с.
4. De Man J. C., Rogosa M., Sharpe M. E. A medium for the cultivation of Lactobacilli // J. Appl. Bacteriol. — 1960. — Vol. 23. — P. 130-138.
5. Bergey's Manual of systematic bacteriology. — 9th ed. The Williams and Wilkins Co., Baltimore — 1986. — Vol. 2. — P. 1208-1260.
6. Подгорский В. С. Систематическое положение, экологические аспекты и физиолого-биохимические особенности микроорганизмов, имеющих промышленное значение // Микробиол. журн. — 1998. — Т. 60, № 5. — С. 27-46.
7. Ушакова Н. А., Абрамова О. Ю. Количество и состав бактерий на коже морских млекопитающих — индикатор физиологического состояния животных // Микробиология. — 1989. — Т. 58, № 5. — С. 864-871.

А. В. Ямборко, М. Г. Толпина

Одесский национальный университет им. И. И. Мечникова,
кафедра микробиологии и вирусологии,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65026, Украина

**ВЫДЕЛЕНИЕ БАКТЕРИЙ РОДА *LACTOBACILLUS* ОТ
ГИДРОБИОНТОВ ЧЕРНОГО МОРЯ И ИХ ИДЕНТИФИКАЦИЯ**

Резюме

Из желудочно-кишечного тракта и кожи некоторых гидробионтов Черного моря изолированы 18 штаммов бактерий рода *Lactobacillus*, которые были идентифицированы как виды *L. agilis*, *L. coriniformis subsp. coriniformis*, *L. pentosus*, *L. buchneri*, *L. plantarum*, *L. fermentum*. Показано, что большинством штаммов представлен вид *L. coryniformis subsp. coryniformis*, относящийся к факультативно-гетероферментативной группе.

Ключевые слова: лактобациллы, гидробионты, идентификация.

G. V. Yamborko, M. G. Tolpina

I. I. Mechnikov Odessa National University,
Microbiology and Virology Department,
Dvoryanskaya St., 2, Odessa, 65026, Ukraine

**ISOLATION *LACTOBACILLUS* STRAINS FROM GIDROBIONTS
OF THE BLACK SEA AND THEIR IDENTIFICATION**

Summary

18 strains of lactobacteria were isolated from the gastric-intestinal tract and skin of some hydrobionts of the Black Sea. The isolated strains were identified as species *L. agilis*, *L. coriniformis subsp. coriniformis*, *L. pentosus*, *L. buchneri*, *L. plantarum*, *L. fermentum*. It has been shown that most of them were represented by facultative heterofermentative species *L. coryniformis subsp. coryniformis*.

Keywords: lactobacilli, hydrobionts, identification.