

ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ імені І. І. МЕЧНИКОВА
Біологічний факультет
Кафедра мікробіології, вірусології та біотехнології

**Дипломна робота
бакалавра**

на тему: «**Антагоністичні властивості лактобактерій, виділених в різних
регіонах**»

«The antagonistic properties of lactobacilli isolated in different regions»

Виконала: студентка денної форми
навчання
напряму 6.040102 Біологія
Матковська Анастасія Ігорівна

Науковий керівник:
кандидат технічних наук, доцент
Ямборко Ганна Валентинівна

Рецензент:
кандидат біологічних наук, доцент
Федорко Наталя Леонідівна

Рекомендовано до захисту:
Протокол засідання кафедри
№ _____ від «___» _____ р.

Завідувач кафедри
_____ Філіпова Т. О.
(підпис)

Захищено на засіданні ЕК № 1
Протокол № _____ від «___» _____ р.
Оцінка _____ / _____ / _____
(за національною шкалою, шкалою ECTS, бал)

Голова ЕК
_____ Стойловський В.П.
(підпис)

Одеса – 2017

АНОТАЦІЯ

У роботі проведено визначення антагоністичної активності 34 штамів бактерій роду *Lactobacillus*, виділених з різних біотопів, та п'яти колекційних штамів лактобактерій. Визначення ступеню антагоністичної активності проводили лунково-дифузійним методом по відношенню до *C. albicans*, *E.coli*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa* та *S. aureus*.

Серед усіх досліджуваних штамів 79,5 % лактобактерій проявили антагоністичні властивості по відношенню до мінімум однієї з тест-культур. Найбільш активними виявились штами лактобактерій, виділені з самоквасних баклажанів (Одеський регіон).

Роботу викладено на 42 сторінках комп'ютерного тексту, вона містить 6 таблиць та 6 рисунків. Наведено посилання на 47 джерел літератури (16 кирилицею та 31 латиницею).

Ключові слова: антагоністична активність, *Lactobacillus spp.*, лунково-дифузійним метод.

Antagonistic activity of *Lactobacillus* has been tested for 34 strains isolated from different ecological niches and five collection strains. Agar-well diffusion method was used to test the antagonistic effect. Test cultures were *C. albicans*, *E.coli*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa* та *S. aureus*.

Among all investigated strains of *Lactobacillus* 79,5 % showed antagonistic activity of at least one of the test cultures. The most antagonistic active were strains of *Lactobacillus* isolated from pickled eggplants (Odessa region).

Diploma thesis is expounded on 43 pages, it contains 6 tables and 6 figures. It provides links to 47 references (16 cyrillic and 31 latinic).

Key words: antagonistic effect, *Lactobacillus spp*, agar-well diffusion method

ЗМІСТ

ВСТУП.....	5
1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	7
1.1. Систематичне положення бактерій роду <i>Lactobacillus</i>	7
1.2. Біологічні властивості лактобактерій.....	8
1.2.1. Морфологічні та культуральні властивості.....	8
1.2.2. Фізіолого-біохімічні властивості.....	10
1.2.3. Антагоністичні властивості.....	12
1.3. Методи визначення антагоністичної активності.....	14
1.4. Екологія бактерій роду <i>Lactobacillus</i>	16
2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	19
3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	23
3.1. Антагоністична активність бактерій роду <i>Lactobacillus</i> , виділених з різних біотопів та регіонів.....	23
3.2. Ступінь антагоністичної активності лактобактерій.....	28
УЗАГАЛЬНЕННЯ.....	34
ВИСНОВКИ.....	36
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ.....	37

ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ ТА АБРЕВІАТУР

АДФ	Аденозиндифосфат
АТФ	Аденозинтрифосфат
КУО	Колонієутворюючі одиниці
МПА	М'ясо-пептонний агар
МПБ	М'ясо-пептонний бульйон
ПС	Поживне середовище
pPHK	Рибосомальна рибонуклеїнова кислота
ШКТ	Шлунково-кишковий тракт
MRS	Середовище de Man, Rogosa, Sharp

ВСТУП

З кінця XIX століття й до теперішнього часу представники роду *Lactobacillus* є об'єктом наукових досліджень, оскільки ще з давніх часів вони використовувалися для виробництва кисломолочних продуктів, ферментації різних продуктів рослинного походження та в багатьох інших галузях [13].

В наш час лактобактерії широко застосовуються в різних галузях біотехнології та харчової промисловості. Один із напрямів їх використання – виробництво кисломолочних продуктів, збагачення різних продуктів харчування, а також розробка та створення нових лікарських препаратів і біологічно активних добавок.

Бактеріям роду *Lactobacillus* притаманні антагоністичні властивості, завдяки чому вони пригнічують ріст небажаної мікробіоти під час виробництва та в готовій продукції, а також корегують дисбіотичні порушення.

Лактобактерії є стартовими культурами для створення добавок та біопрепаратів, що використовуються в різних галузях промисловості. Такі препарати доцільно застосовувати для покращення властивостей вихідної сировини та задля скорочення технологічного процесу виробництва ферментованих виробів.

Саме тому пошук нових штамів бактерій роду *Lactobacillus*, які виявляють високий рівень антагоністичної активності, для отримання біопрепаратів є важливим та перспективним напрямком мікробіологічних та біотехнологічних досліджень.

Метою даної роботи було визначити антагоністичну активність бактерій роду *Lactobacillus*, виділених із різних джерел.

Для досягнення вказаної мети були поставлені наступні завдання:

1. Дослідити здатність до антагонізму лактобактерій шлунково-кишкового тракту (ШКТ) новонароджених, м'ясної сировини та самоквасних овочів, виділених з різних регіонів.
2. З'ясувати ступінь антагоністичної активності досліджуваних лактобактерій.
3. Визначити найактивніші штами-антагоністи бактерій роду *Lactobacillus*.
4. Порівняти антагоністичну активність лактобактерій, виділених в різних регіонах.

Об'єкт дослідження – антагоністичні властивості бактерій роду *Lactobacillus*.

Предмет дослідження – антимікробна активність лактобактерій з різних природних джерел щодо тест-культур про- та еукаріотичних мікроорганізмів.

УЗАГАЛЬНЕННЯ

Характерною ознакою бактерій роду *Lactobacillus* є здатність до антагонізму по відношенню до багатьох мікроорганізмів.

Антагоністичні властивості лактобактерій обумовлені продукцією органічних кислот (молочної, оцтової та ін.), перекису водню та утворенням бактеріоцинів. На думку багатьох дослідників, саме утворення органічних кислот є причиною зниження рН середовища, що пригнічує розвиток інших мікроорганізмів [15].

Здатність лактобактерій пригнічувати ріст небажаної мікробіоти під час виробництва та в готовій продукції обумовлює доцільність їх використання в різних галузях промисловості.

Пошук нових штамів лактобактерій, яким притаманний високий рівень антагоністичної активності є своєчасним та перспективним завданням мікробіологічних досліджень. У проведених дослідженнях визначено антагоністичну активність 39 штамів лактобакетрій по відношенню до п'яти тест-культур (*C. albicans*, *E. coli*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa* та *S. aureus*).

Відсутність антагоністичних властивостей по відношенню до всіх тест-культур притаманна 20,5 % штамів бактерій роду *Lactobacillus*. Решта штамів проявила антагоністичну активність по відношенню мінімум до однієї з тест-культур.

Більшості штамів, що проявили антагоністичну активність, притаманний середній та високий ступінь антагонізму.

Найбільш чутливими тест-культурами по відношенню до лактобактерій були *E. coli* та *P. aeruginosa*, високий ступінь антагонізму характерний для 46,2 % та 43,7 % штамів лактобактерій відповідно.

Менш чутливими тест-культурами були *B. subtilis* та *S. aureus*. Відсутність антагонізму по відношенню до *B. subtilis* спостерігалася у 46,2 % досліджуваних штамів, а до *S. aureus* – 51,3 %. Проте середній ступінь антагоністичної активності по відношенню до *B. subtilis* характерний для

38,4 % лактобактерій, а до *S. aureus* – 33,3 %. Відсоток високого ступеню антагоністичної активності по відношенню до даних культур становив лише 10,3 % та 7,7 % відповідно.

Найменш чутливою тест-культурою була – *C. albicans* (97,4 % лактобактерій не проявили антагоністичних властивостей).

Найбільш антагоністично активними виявились штами бактерій роду *Lactobacillus*, виділені з самоквасних баклажанів (Одеський регіон).

Найменшу активність проявили штами бактерій роду *Lactobacillus*, виділені з в'єтнамських самоквасних овочів. Можна припустити, що існує залежність наявності антагоністичної активності від регіону виділення лактобактерій. За даними літератури, лактобактерії, зазвичай, проявляють більшу антагоністичну активність саме в регіоні їх виділення [12, 17, 25].

Менша антагоністична активність штамів лактобактерій, що були виділені з джерел, які знаходились на віддаленій території порівняно з місцем проведення дослідів (виділені з в'єтнамських самоквасних овочів та шведських самоквасних огірків), може бути пов'язана з транспортуванням ізолятів, з яких були виділені дані штами та пристосуванням штамів до інших умов існування.

Таким чином, під час проведення даного дослідження вдалося визначити притаманність антагоністичних властивостей 39 штамам лактобактерій, з яких п'ять штамів (*Lactobacillus sp.* Б1, Б3, Б4, Б5 та Б6), що виділені з самоквасних баклажанів, є найбільш активними антагоністами по відношенню до прокаріотичних мікроорганізмів: *E. coli*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa* та *S. aureus*.

Дані штами доцільно використовувати під час проведення подальших досліджень, які будуть спрямовані на природи антагонізму лактобактерій, при сумісному культивуванні декількох штамів лактобактерій, а також під час дії різних хімічних та фізичних факторів.

ВИСНОВКИ

1. 79,5 % досліджених штамів лактобактерій проявили антагоністичну активність по відношенню мінімум до однієї з тест-культур.
2. Для більшості штамів лактобактетрій характерний середній та високий ступінь антагонізму.
3. При дослідженні антагоністичних властивостей 34 штамів бактерій роду *Lactobacillus*, виділених із різних регіонів, виявлено, що найбільш активні антагоністи по відношенню до тест-культур – штами, виділені з самоквасних баклажанів (Одеський регіон).
4. 5 штамів (*Lactobacillus sp.* Б1, Б3, Б4, Б5 та Б6), виділених з самоквасних баклажанів, володіють найбільшою антагоністичною активністю та є перспективними для подальших досліджень.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ботина С. Г., Червинец Ю. В., Климина К. М., Коробан Н. В и др. Генетическая идентификация антагонистически активных штаммов лактобацилл, выделенных из полости рта здоровых людей // Клиническая лабораторная диагностика. – 2010. – № 11. – С. 43 – 46.
2. Ботина С. Г., Коробан Н. В., Климина К. М., Глазова А. А. и др. Генетическое разнообразие бактерий рода *Lactobacillus* из гастроинтестинальной микробиомы людей // Генетика. – 2010. – Т. 46, № 12. – С. 148 – 159.
3. Глушанова Н.А. Биологические свойства лактобацилл // Бюллетень сибирской медицины. – 2003. – № 4. – С. 50 – 58.
4. Дисбиоз кишечника. Руководство по диагностике и лечению / Под ред. проф. Е. И. Ткаченко, проф. А. Н. Суворова // СПб.: Спец. Лит., 2007. – 238 с.
5. Доронин А.Ф., Шендеров Б.А. Функциональное питание. – М. : Грантъ, 2002. – 296 с.
6. Иркитова А. И., Качан Я. Р., Соколова Г. Г. Сравнительный анализ методов определения антагонистической активности молочнокислых бактерий // Известия Алтайского государственного университета. – 2012. – Т. 3, № 1. – С. 41 – 44.
7. Ленцнер А.А., Ленцнер Х.П., Микельсаар М.Э. Лактофлора и колонизационная резистентность // Антибиотики и медицинская биотехнология. – 1987. – Т. 32, № 3. – С. 173 – 179.
8. Метаболизм бактерий / Под ред. Е. Н. Кондратьевой // М. : Мир, 1982. – С. 193 – 199.
9. Методы длительного хранения коллекционных культур микроорганизмов и тенденции развития / В. Д. Похиленко, А. М. Баранов, К. В. Детушев // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки. – 2009. – № 4 (12). – С. 101 – 108.

10. *Определитель* бактерий Берджи: в 2 – х т. – Т. 2 / Под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита, Дж. Стейли, С. Уилльямса. – М. : Мир, 1997. – С. 538 – 582.
11. *Практикум* по микробиологии. Учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений / Нетрусов А. И., Егорова М. А., Захарчук Л. М. – М.: Академия, 2005. – С. 467 – 478.
12. *Прокопенко К. М., Кнышова Л. П.* Антагонистическая активность пробиотических штаммов по отношению к условно – патогенным и лакто- и бифидобактериям // Актуальны е проблемы гуманитарных и естественных наук. – 2015. – № 6 – С. 148 – 152.
13. *Промышленная* микробиология / Безбородов А. М., Блохина И. Н., Воробьева Л. И. ; под ред. Егорова Н. С. // М. : Высшая школа, 1989. – С. 438 – 458.
14. *Ржевская В.С., Отурина И.П., Теплицкая Л.М.* Изучение биологических свойств штаммов молочнокислых бактерий // Ученые записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского – 2014. – Т 27, № 1 – С. 145 – 160.
15. *Соловьева И.В., Точилина А.Г., Новикова Н. А. и др.* Изучение биологических свойств новых штаммов рода *Lactobacillus* // Вестник Нижегородского университета им. Н. И. Лобачевского – 2010. – № 2 – С. 462 – 468.
16. *Фенотаксономия* и геносистематика лактобацилл / Леванова Г. Ф., Ефимов Е. И.; под ред. проф. Г. И. Григорьевой // Н. Новгород : изд. Ю. А. Николаев, 2009. – 248 с.
17. *Al-Madboly L.A., Abdullah A.K.* Potent antagonistic activity of Egyptian *L. plantarum* against multiresistant and virulent food-associated pathogens // Front. Microbiol. – 2015. – Vol. 6. – Art. 347.

18. *American type culture collection methods: 1. Laboratory manual on preservation. Freezing and freeze-drying as applied to algae, bacteria, fungi and protozoa.* – Rockville (Maryland) : ATCC. – 1980. – 51 p.
19. *Balciunas E.M., Castillo Martinez F.A., Todorov S. D., Oliveira R.P. at al.* Novel biotechnological applications of bacteriocins: a review // *J. Food Control.* – 2013. – Vol. 32. – P. 134 – 142.
20. *Coenye T., Gevers D., Van de Peer Y., Vandamme P.* Towards a prokaryotic genomic taxonomy // *FEMS Microbiol.* – 2005. – Rev. 29. – P. 147–167.
21. *Dickson-Spillmann M., Siegrist M., Keller C.* Attitudes toward chemicals are associated with preference for natural food // *J. Food Qual. Pref.* – 2011. – Vol. 22. – P. 149 – 156.
22. *Elli, M., Zink R., Rytz A., Reniero R. at al.* Iron requirement of *Lactobacillus* spp. in completely chemically defined growth media // *J. Appl. Microbiol.* – 2000. – Vol. 88. – P. 695–703.
23. *Ganzle M. G., Holtzel A., Walter J., Jung G. at al.* Characterization of reutericyclin produced by *Lactobacillus reuteri* LTH2584 // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2000. – Vol. 66. – P. 4325 – 4333.
24. *Ganzle M. G., Vogel R. F.* Contribution of reutericyclin production to the stable persistence of *Lactobacillus reuteri* in an industrial sourdough fermentation // *Int. J. Food Microbiol.* – 2003. – Vol. 80. – P. 31 – 45.
25. *Georgieva R., Yocheva L., Tserovska L.* Antimicrobial activity and antibiotic susceptibility of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* spp intended for use as starter and probiotic cultures // *Biotechnology, Biotechnological equipment.* – 2015. – Vol. 29. – P. 84 – 91.
26. *Hammes W. P., Tichaczek P. S.* The potential of lactic acid bacteria for the production of safe and wholesome food // *Z. Lebensm. Unters Forsch.* – 1994. – Vol. 198. – P. 193 – 201.

27. *Holzapfel W. H., Haberer P., Geisen R.* Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition // *Am. J. Clin. Nutr.* – 2001. – Vol. 73. – P. 365 – 373.
28. *Karapetsas A., Vavoulidis E., Galanis A., Sandaltzopoulos R. et al.* Rapid detection and identification of probiotic *Lactobacillus casei* ATCC 393 by multiplex PCR // *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* – 2010. – Vol. 18, № 3. – P. 156 – 161.
29. *Klaenhammer T. R.* Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria // *FEMS Microbiol.* – 1993. – Rev. 12. – P. 39 – 85.
30. *Klaenhammer T. R., Barrangou R., Buck B. L., Azcarate-Peril M. A. et al.* Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health // *FEMS Microbiol.* – 2005. – Rev. 29 – P. 393 – 409.
31. *Kleerebezem M.* Quorum sensing control of antibiotic production; nisin and subtilin autoregulate their own biosynthesis // *Peptides.* – 2004. – Vol. 25, № 9. – P. 1405 – 1414.
32. *Klein G.* Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria // *Klein G., Rack A., Bonaparte Ch.* // *Microbiol.* – 1998. – Vol. 41. – P. 103 – 125.
33. *Kwon H. S., Yang E. H., Yeon S. W.* Rapid identification of probiotic *Lactobacillus* species by multiplex PCR using species-specific primers based on the region extending from 16S rRNA through 23S rRNA // *FEMS Microbiology Letters.* – 2004. – Vol. 239. – P. 267 – 275.
34. *Lactobacillus. Molecular biology From Genomics to Probiotics* / Edited by Ljungh A., Wadstrom T. // UK : Causter Academic Press, 2009. – 205 p.
35. *Liu G., Griffiths M. W., Shang N., Chen S.* Applicability of bacteriocinogenic *Lactobacillus pentosus* 31 – 1 as a novel functional starter culture or coculture for fermented sausage manufacture // *J. Food Prot.* – 2010. – Vol. 73, № 2. – P. 292 – 298.

36. Mills S., Stanton C., Hill C., Ross R. P. New developments and applications of bacteriocins and peptides in foods // J. Ann. Rev. Food Sci. Technol. – 2011. – Vol. 2. – P. 299 – 329.
37. Nagendra P. Effects of salt concentration and pH on structural and functional properties of *Lactobacillus acidophilus*: FT – IR spectroscopic analysis // J. Food Microbiology. – 2014. – Vol. 173. – P. 41 – 47.
38. Nishie M., Nagao J.-I., Sonomoto K. Antibacterial peptides “Bacteriocins”: an overview of their diverse characteristics and applications // J. Biocontrol Sci. – 2012. – Vol. 17. – P. 1 – 16.
39. Ouwehand, A. C. Antimicrobial components from lactic acid bacteria; in alminen and von Wright (Editors). – Lactic Acid Bacteria. Marcel Dekker // Inc.: New York, 1998. – P. 139–159.
40. Paul De Vos, George M. Garrity, Dorothy Jones at al. Bergey’s manual of systematic bacteriology second edition, volume three: the Firmicutes // Springer New York Dordrecht Heidelberg London. Library of Congress Control Number : 2009933884, 2009. – P. 465 – 720.
41. Quadri L.E. Regulation of antimicrobial peptide production by autoinducer-mediated quorum sensing in lactic acid bacteria // Antonie Van Leeuwenhoek – 2002 – Vol. 82. – P. 133 – 145.
42. Schnürer J., Magnusson J. Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives // Trends Food Sci. Technol. – 2005. – Vol. 16. – P. 70 – 78.
43. Torriani S., Zapparoli G., Dellaglio F. Use of PCR-based methods for rapid differentiation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* // Appl. Environ. Microbiol. – 1999. – Vol. 65, № 10. – P. 4351 – 4356.
44. Twomey D., Ross R. P., Ryan M., Meaney B. at al. Lantibiotics produced by lactic acid bacteria: structure, function and applications // J. Antonie van Leeuwenhoek. – 2002. – Vol. 82. – P. 165 – 185.

45. *Uzunova-Doneva T., Donev T.* Anabiosis and conservation of microorganisms // Journal of culture collections. – 2005. – Vol. 4. – P. 17 – 28.

46. *Van de Castele S., Vanheuverzwijn T., Ruysen T.* Evaluation of culture media for selective enumeration of probiotic strains of lactobacilli and bifidobacteria in combination with yoghurt or cheese starter // Int. Dairy J. – 2006. – Vol. 16. – P. 1470 – 1476.

47. *Zwielehner J., Handschur M., Michaelsen A., Irez S. at al.* DGGE and real-time PCR analysis of lactic acid bacteria in bacterial communities of the phyllosphere of lettuce // Mol. Nutr. Food Res. – 2008. – Vol. 52, № 5. – P. 614 – 623.