

ПОШИРЕННЯ *LACTOBACILLUS PLANTARUM* У ФЕРМЕНТОВАНОМУ РОСЛИННОМУ МАТЕРІАЛІ З УКРАЇНИ І ФРАНЦІЇ

Н. Ліманська*, А. Мерліч, В. Іваниця

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова
вул. Дворянська, 2, Одеса 65082, Україна
e-mail: limanska@gmail.com

Проведено порівняння складу бактерій роду *Lactobacillus* у квашених овочах і суслі винограду з України та Франції. Ідентифікацію здійснено за біохімічними властивостями з використанням тест-системи API 50CHL (Biomerieux, Франція) та методом полімеразної ланцюгової реакції з родоспецифічними праймерами і праймерами до ділянок, притаманних бактеріям виду *Lactobacillus plantarum*. Бактерії роду *Lactobacillus* було виділено у 46,8–66,7 % тестованих зразків. У квашених овочах штами виду *L. plantarum* становили 20 % від загальної кількості виділених штамів лактобацил, у суслі винограду – 38,2–58,3 %. Виявлено відмінності у траплянні *L. plantarum* серед представників епіфітної мікробіоти винограду, що культивується в Україні та Франції. У зразках суслу винограду, вирощеного в Україні, *L. plantarum* виділяли на 20 % частіше, ніж у зразках, відібраних у Франції. Виділені штами *L. plantarum* можуть застосовуватися для подальшого вивчення як потенційні стартерні культури для яблучно-молочнокислого бродіння і ферментування овочів.

Ключові слова: молочнокислі бактерії, епіфітна мікробіота, *Lactobacillus*, полімеразна ланцюгова реакція.

Бактерії роду *Lactobacillus* займають лише 1 % від епіфітної мікробної популяції, але, незважаючи на незначну кількість, вони відіграють основну роль у ферментуванні рослинних продуктів [4]. При ферментуванні лактобацили значною мірою пригнічують розвиток сторонньої мікробіоти. Цю їхню властивість широко застосовують у харчовій промисловості й виробництві силосу [17].

Найбільш вивченим видом епіфітних лактобацил є *L. plantarum*. Яскраво виражену антагоністичну активність представників цього виду застосовують у розробках засобів захисту рослин і пробіотичних препаратів для покращення здоров'я людини і тварин [12, 22].

Разом з *Oenococcus oeni* і деякими іншими молочнокислими бактеріями *L. plantarum* здійснює яблучно-молочнокисле бродіння у вині, під час якого яблучна кислота перетворюється на молочну, що призводить до зменшення кислотності вина [2, 11]. На той час як неконтрольоване яблучно-молочнокисле бродіння може спричинити псування вина [3, 4, 18], контрольований процес із застосуванням стартерних культур підібраних штамів [20] використовують у виноробстві для покращення особливих органолептичних характеристик певних вин, надаючи їм м'якого аромату і смаку [3].

Кількість і видовий склад молочнокислих бактерій у ферментованих продуктах рослинного походження може змінюватися залежно від стадії ферментації [6], сезону дослідження [14] та місцевості вирощування рослин [15].

Метою дослідження було виявити бактерії *L. plantarum* у зразках ферментованих продуктів рослинного походження, виготовлених в Україні та Франції.

Матеріали та методи

Для виділення молочнокислих бактерій використовували ферментовані продукти, придбані на ринках півдня України (квашена капуста, огірки, томати, кавуни), та сусло

винограду, зібраного в Україні (Одеська обл.) та Франції (провінція Луар-Атлантик). Для отримання сусла виноград подрібнювали і залишали за кімнатної температури для процесу природного бродіння, проби відбирали на 5-й день. Усього було досліджено 68 зразків продуктів з України та 61 зразок із Франції.

Розсіл із квашених продуктів або сусло винограду висівали штрихом на чашки зі середовищем MRS [5] та інкубували упродовж доби при 37 °С. Бактерії з колоній із типовою для лактобацил морфологією спочатку забарвлювали за Грамом, досліджували на каталазну активність, а потім їх основні біохімічні властивості виявляли за допомогою тест-системи API 50CHL (Biomerieux, Франція). Виділені бактерії зберігали в бульйоні MRS з 20 % гліцерину за температури -20 °С.

Належність до роду *Lactobacillus* і виду *L. plantarum* підтверджували методом полімеразної ланцюгової реакції з використанням родоспецифічних праймерів LbLMA1-rev і R16-1 та видоспецифічних праймерів planF і pREV (табл. 1).

Таблиця 1

Послідовності праймерів, використані для ідентифікації лактобацил

Праймер	Розмір амплікону	Послідовність	Автор
LbLMA1-rev	250 п.н.	5'-CTC AAA ACT AAA CAAAGT TTC-3'	Dubernet, 2002 [7]
R16-1		5'-CTTGTA CAC ACC GCC CGT CA-3'	
planF	318 п.н.	5'-CCG TTT ATGCGG AAC ACC TA-3'	Torriani, 2001 [21]
pREV		5'-TCG GGA TTA CCA AAC ATCAC-3'	

Для виділення ДНК використовували методику Szegedi and Bottka (2002). До 225 мкл суспензії лактобактерій, приготовленої на деіонізованій воді, вносили 25 мкл розчину, який містить 10 % Тритона X-100 і 2,5 % азиду натрію. Суспензію прогрівали протягом 10 хв при 95 °С і центрифугували 5 хв при 5700 g [19]. Надосадову рідину, яка містить ДНК, в об'ємі 5 мкл вносили до реакційної суміші [8].

Реакційну суміш для проведення ПЛР готували згідно з модифікованою методикою J. Naas et al. (1995). Реакційна суміш (20 μl) містила праймери по 10 пмоль кожного, 2 мкл 200 мМ дезоксинуклеозидтрифосфатів у суміші, 2 Од Taq-полімерази (5 Од/мкл), 2 мкл 10x ПЛР буфера, що постачається з ферментом, 2,0 мМ MgSO₄ (усі реагенти фірми Fermentas, Литва) та 5 мкл надосадової рідини з прогрітої при 95 °С суспензії бактерій концентрацією 10⁸ КУО/мл [8].

Ампліфікацію здійснювали при 94 °С 3 хв, 30 циклів при 94 °С – 30 с, 56 °С – 10 с, 72 °С – 30 с, а потім витримували при 72 °С упродовж 5 хв [7, 21].

Продукти ПЛР аналізували методом електрофорезу в 1,5 % агарозному гелі у трисборатному буфері. Як стандарти молекулярної маси використовували маркери pUC19 DNA/MspI (HpaII) – 110, 147, 190, 242, 331, 404, 489, 501 п.н. та pBR322 DNA/AluI – 908, 659, 521, 403, 281, 257, 226 п.н. (Fermentas, Литва). Гелі фотографували за допомогою відеосистеми "GelDoc" (BioRad, США).

Результати і їхнє обговорення

Ідентифікація молочнокислих бактерій, виділених з ферментованого рослинного матеріалу, біохімічними методами та методом ПЛР показала присутність бактерій роду *Lactobacillus* у 46,8–66,7 % зразків (табл. 2).

Результати ідентифікації було підтверджено за наявності фрагмента 16S-23S спейсерного регіону 16S rDNA, характерного для представників роду *Lactobacillus* (рис. 1).

Отже, лактобацили брали участь у молочнокислому бродінні приблизно у половині досліджуваних зразків, причому це стосувалось як ферментованих овочів, так і сусла винограду. Ферментація слугує природним процесом збагачення популяції лактобацил. На-

приклад, у квашених овочах кількість молочнокислих бактерій зростала до 3×10^7 КУО/мл [16]. Під час прямого виділення навіть у вологому субтропічному кліматі лактобацили виділяються з рослин у значно меншій кількості, ніж інші представники епіфітної мікробіоти, і навіть у меншій кількості, ніж інші молочнокислі бактерії [13]. Саме тому інформацію про трапляння лактобацил на рослинних поверхнях зазвичай отримують після ферментації рослинного матеріалу, хоча такі дані й не відображають первинної кількості мікроорганізмів [9]. Отже, застосування використаної нами методології не дає змоги судити про первинну чисельність лактобацил на рослинних поверхнях, а лише виявити їхню наявність після збагачення мікробних культур.

Таблиця 2

Трапляння бактерій роду *Lactobacillus* у зразках ферментованого рослинного матеріалу

Кількість	Квашені продукти		Сусло винограду	
	Україна	Україна	Україна	Франція
Тестованих продуктів	32	36	61	
Зразків, що містили бактерії роду <i>Lactobacillus</i>	15 (46,8 %)	24 (66,7 %)	34 (55,7 %)	
Зразків, що містили бактерії <i>L. plantarum</i> , серед загальної кількості зразків	3 (9,4 %)	14 (38,8 %)	13 (21,3 %)	
Штамів серед виділених лактобацил, які виявилися <i>L. plantarum</i>	3 (20 %)	14 (58,3 %)	13 (38,2 %)	

1 2 3 4 5 6 7

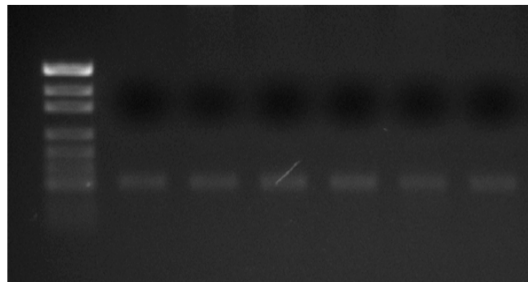


Рис. 1. Електрофореграма розділення ампліконів, отриманих у результаті ПЛП з родоспецифічними праймерами LbLMA1-rev/R16-1з ДНК ізольованих молочнокислих бактерій: 1 – маркери молекулярної маси pBR322 DNA/AluI – 908, 659, 521, 403, 281, 257, 226 п.н., 2–7 – наявність ампліконів довжини 250 п.о. вказує на належність досліджених штамів до роду *Lactobacillus*

Відомо, що кількість молочнокислих бактерій може змінюватися залежно від сезону: наприклад, лактобацили з конюшини, злакових культур і трави добре виявити у помірній кліматичній зоні на початку липня [14]. Ми проводили дослідження у період зі середини літа до середини осені для збільшення імовірності виявлення лактобацил.

Подальше виявлення серед виділених ізолятів *Lactobacillus* представників саме виду *L. plantarum* (рис. 2) дало змогу диференціювати ці екологічні ніші бактерій. А саме, у квашених овочах відсоток зразків, що містили *L. plantarum*, був у 2,3–4,1 разу менший від такого у зразках суслу винограду, відібраного у Франції та в Україні, відповідно (9,4 % порівняно з 21,3 % і 38,8 %) (табл. 2). Така ж тенденція стосується й відсотка штамів *L. plantarum* щодо кількості всіх виділених штамів *Lactobacillus*. Серед ізолятів лактобацил, виділених із квашених овочів, *L. plantarum* було ідентифіковано для 20 % штамів, а серед ізолятів лактобацил зі суслу винограду України та Франції – у 58,3 % і 38,2 %, відповідно (табл. 2).

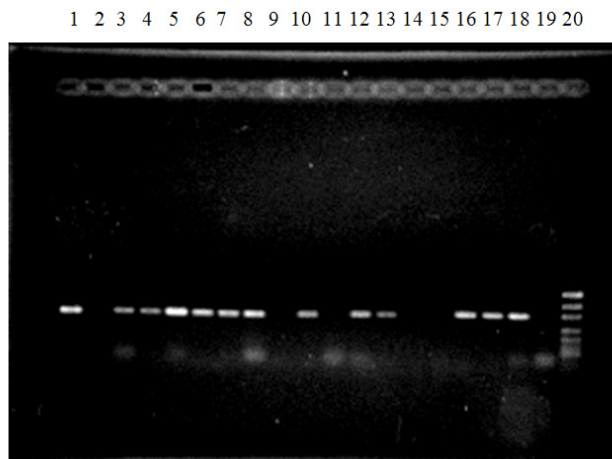


Рис 2. Електрофореграма розділення ампліконів, отриманих у результаті ПЛП з видоспецифічними праймерами *planF/pREV* з ДНК ізольованих *Lactobacillus*: 1, 3–8, 10, 12–13, 16–18 – наявність ампліконів довжини 318 п.о. вказує на належність досліджених штамів до виду *L. plantarum*; 20 – маркери молекулярної маси *pUC19 DNA/MspI* (*HpaII*) (110, 147, 190, 242, 331, 404, 489, 501 п.о.)

Решта виділених штамів лактобацил, імовірно, належать до інших видів, які часто трапляються на рослинних поверхнях. Так, у квашених овочах і фруктах, крім *L. plantarum*, було виявлено бактерії таких видів як *L. brevis*, *L. fermentum*, *L. pentosus* [10, 16]. Багато авторів вказує на *L. plantarum* як переважаючий вид у суслі винограду, але крім нього, було виявлено представників видів *L. graminis*, *L. hilgardii* [15], *L. mali*, *L. lindneri*, *L. kunzei* [1], *L. brevis* [20], *L. paracasei*, *L. vermiforme* [6].

З отриманих даних можна зробити висновок, що *L. plantarum* трапляються у суслі винограду значно частіше, ніж у квашених овочах, що, можливо, пояснюється більшою цукристістю ягід винограду.

Відсоток ізолятів *L. plantarum* із суслу винограду, вирощеного у Франції, був на 20 % менший за такий у суслі винограду з України. Ймовірно, у дослідженому географічному регіоні Франції на ягодах винограду переважають інші види лактобацил. Відмінності у траплянні *L. plantarum* як представників мікробіоти винограду, що вирощується в Україні та Франції, показані нами вперше.

Виділені нами штами *L. plantarum* можуть застосовуватися для подальшого вивчення як потенційні стартерні культури для яблучно-молочнокислого бродіння і ферментування овочів.

Роботу здійснювали у рамках держбюджетної теми ОНУ імені І.І. Мечникова №543 та у рамках проекту наукового співробітництва між Україною та Францією «Дніпро» (№М/117-2015). Автори висловлюють щире подяку доктору Томасу Ертеле (INRA, Франція) за допомогу у відборі зразків у Франції.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Bae S., Fleet G. H., Heard G. M. Lactic acid bacteria associated with wine grapes from several Australian vineyards // J. Appl. Microbiol. 2006. Vol. 4. N 100. P. 712–727.

2. Bauer R., Dicks L. M. T. Control of malolactic fermentation in wine. A review // S. Afr. J. Enol. Vitic. 2004. Vol. 2. 25 N 2. P. 74–88.
3. Beneduce L., Spano G., Vernile A. et al. Molecular characterization of lactic acid populations associated with wine spoilage // J. Basic Microbiol. 2004. Vol. 1. N 44. P. 10–16.
4. Daeschel M. A., Andersson R. E., Fleming H. P. Microbial ecology of fermenting plant materials // FEMS Microbiol. Rev. 1987. N 46. P. 357–367.
5. de Man J. C., Rogosa M., Sharpe M. E. A medium for the cultivation of lactobacilli // J. Appl. Bacteriol. 1960. N 23. P. 130–135.
6. du Plessis H. W., Dicks L. M., Pretorius I. S. et al. Identification of lactic acid bacteria isolated from South African brandy base wines // Int. J. Food Microbiol. 2004. Vol. 91. N 1. P. 19–29.
7. Dubernet S., Desmasures N., Guéguen M. A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level // FEMS Microbiol. Lett. 2002. Vol. 214. N 2. P. 271–275.
8. Haas J. H., Moore L. W., Ream W., Manulis S. Universal PCR primers for detection of phytopathogenic *Agrobacterium* strains // Appl. Environm. Microbiol. 1995. Vol. 61. N 8. P. 2879–2884.
9. Hammes W. P., Hertel C. The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium* / In: The Prokaryotes. 3th Ed. A Handbook on the Biology of Bacteria: *Firmicutes*, *Cyanobacteria* / Ed. by M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg et al. Springer, 2006. Vol. 4. P. 321–403.
10. Hurtado A., Requant C., Bordons A., Rozes N. Lactic acid bacteria from fermented table olives // Food Microbiol. 2012. Vol. 31. N 1. P. 1–8. doi:10.1016/j.fm.2012.01.006. Epub 2012 Feb 2.
11. Lonvaud-Funel A. Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine // Antonie van Leeuwenhoek. 1999. Vol. 76. N 1. P. 317–331.
12. Lutz M. P., Michel V., Martinez C., Camps C. Lactic acid bacteria as biocontrol agents of soil-born pathogens. Biological control of fungal and bacterial plant pathogens // IOBC-WPRS Bulletin. 2012. Vol. 78. P. 285–288.
13. Mundt J. O., Hammer J. L. Lactobacilli on plants // Appl. Microbiol. 1968. Vol. 16. N 9. P. 1326–1330.
14. Nilsson G., Nilsson P. E. The microflora on the surface of some fodder plants at different stages of maturity // Arch. Mikrobiol. 1956. Vol. 24. P. 412–422.
15. Nisitou A. A., Dourou D., Filippousi M.-E. et al. Genetic and technological characterization of vineyard- and winery-associated lactic acid bacteria // BioMed Res. Int. 2015. Vol. 2015. Article ID 508254, 8 pages, 2015. doi:10.1155/2015/508254.
16. Pundir R. K., Jain P. Change in microflora of sauerkraut during fermentation and storage // World J. Dairy Food Sci. 2010. Vol. 5. N 2. P. 221–225.
17. Singh A. K., Ramesh A. Succession of dominant and antagonistic lactic acid bacteria in fermented cucumber: insights from a PCR-based approach // Food Microbiol. 2008. Vol. 25. P. 278–287.
18. Spano G., Beneduce L., Tarantino D. et al. Characterization of *Lactobacillus plantarum* from wine must by PCR species-specific and RAPD-PCR // Lett Appl. Microbiol. 2002. Vol. 35. P. 370–374.
19. Szegedi E., Bottka S. Detection of *Agrobacterium vitis* by polymerase chain reaction in grapevine bleeding sap after isolation on a semiselective medium // Vitis. 2002. Vol. 41. N 1. P. 37–42.
20. Testa B., Lombardi S.J., Tremonte P. et al. 2014. Biodiversity of *Lactobacillus plantarum* from traditional Italian wines // J. Microbiol. Biotechnol. 2014. Vol. 30. N 8. P. 2299–2305.

21. Torriani S., Felis G.E., Dellaglio F. Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by *recA* gene sequence analysis and multiplex PCR assay with *recA* gene-derived primers // Appl. Environm. Microbiol. 2001. Vol. 67. N 8. P. 3450–3454.
22. Trias R., Bañeras L., Montesinos E., Badosa E. Lactic acid bacteria from fresh fruit and vegetables as biocontrol agents of phytopathogenic bacteria and fungi // Intern. Microbiol. 2008. Vol. 11. P. 231–236.

Стаття: надійшла до редакції 29.04.16

доопрацьована 29.06.16

прийнята до друку 11.07.16

THE SPREAD OF *LACTOBACILLUS PLANTARUM* IN THE FERMENTED PLANT MATERIAL FROM UKRAINE AND FRANCE

N. Limanska, A. Merlich, V. Ivanytsia

I.I. Mechnikov National University of Odessa
2, Dvorianska St., Odessa 65082, Ukraine
e-mail: limanska@gmail.com

The spread of bacteria from *Lactobacillus* genus in pickles and grape must from Ukraine and France has been compared. Identification by biochemical characteristics using test kit API 50CHL (Biomérieux, France) and by polymerase chain reaction with the genus specific primers and primers to the sequences unique for *Lactobacillus plantarum* species has been carried out. Bacteria of *Lactobacillus* genus were isolated in 46.8–66.7 % of the tested samples. In pickles the strains of *L. plantarum* represented 20 % of the total amount of *Lactobacillus* strains, in grape must – 38.2–58.3 %. The differences in spread of *L. plantarum* among the representatives of epiphytic microbiota of grape cultivated in Ukraine and France have been revealed. *L. plantarum* were found in must from the Ukrainian grape in 20 % more samples than in grape from France. The isolated *L. plantarum* strains could be used for the further study as the potential starter cultures for malolactic fermentation and the production of pickles.

Keywords: lactic acid bacteria, epiphytic microbiota, *Lactobacillus*, polymerase chain reaction.