

ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРІЙ АЕРОБНИХ СУБСТРАТІВ ПІД ЧАС ВИРОБНИЦТВА КСИЛОТРОФНИХ БАЗИДІОМІЦЕТІВ

*Н.А.Бісько, доктор біологічних наук
О.С. Мироничева, кандидат сільськогосподарських наук
І.І. Бандура, аспірант
Інститут Ботаніки ім. Холодного НАН
Таврійський державний агротехнологічний університет*

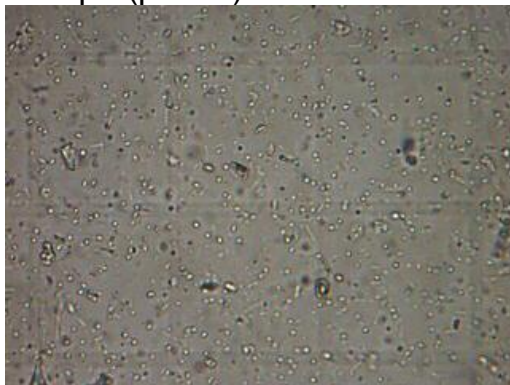
Досліджено видовий склад бактеріальної мікрофлори субстратів, виготовлених методом аеробної пастеризації для виробництва ксилотрофних базидіоміцетів.

Бактерії, аеробна пастеризація, субстрат, полімеразно-ланцюгова реакція (ПЛР).

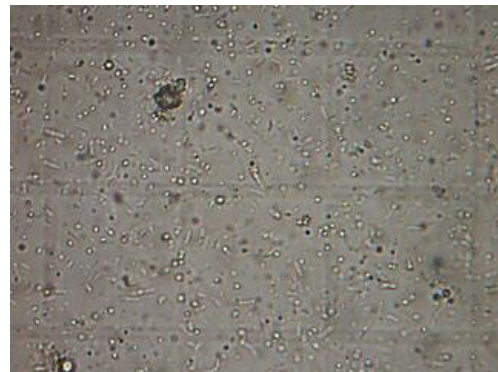
Промислове виробництво ксилотрофних базидіоміцетів в Україні, на відміну від розвинених країн з високою ціною на плодове тіла, потребує використання енергоощадних технологій для зниження собівартості продукції та розвитку конкурентоспроможних підприємств. Це можливо за термічної підготовки субстратів за рахунок використання енергії розвитку бактеріальної флори. За нашими попередніми дослідженнями, за аеробної ферментації іде розвиток термофільних мікроорганізмів.

У процесі діяльності цієї мікрофлори температура субстрату збільшується й відбувається зростання бактеріальних популяцій, які не тільки не конкурують із базидіоміцетами, але й на певних етапах розвитку вищих грибів можуть бути використані як доступний ресурс харчування [1]. Попередні наші дослідження показали, що за кількості цих термофільних бактерій у діапазоні $1,5 - 2,0 \times 10^6$ КУО/г біомаси та вище субстрат можна вважати елективним [1,2].

Аеробна ферментація субстратів може проводитися в класичному тунелі або в камері пастеризації, де підтримуються ідентичні теплові та повітряні параметри (рис. 1).



а) тунель



б) камера

Рис. 1. Кількість клітин мікроорганізмів методом прямого спостереження з об'єктивом 40 х у змивах субстратів, отриманих методом аеробної пастеризації

Мета дослідження – виділити та ідентифікувати видовий склад найбільш численних популяцій бактеріальної термофільної та мезофільної мікрофлори субстратів, отриманих методом аеробної ферментації в умовах тунелю та пастеризаційної камери.

Матеріали і методи дослідження. Бактеріальні ізоляти були відібрані з трьох фермерських господарств з виробництва субстратів для вирощування гливи звичайної з Південно-Східного регіону України (Донецьк, Мелітополь – пастеризаційні камери, Горлівка – тунель). Субстрати мали ідентичний склад (70 % соломи та 30 % лузги соняшника) та фізико-хімічні показники (вологість 73 %, рН 8,3, показник загального азоту 0,87 %). Змиви субстратів у розведенні 10^6 та 10^8 в об'ємі 1 мл додавали на тверде агарізоване середовище Nutrient Agar by Difco^R (з корегованим показником рН 8,0) у шестикратній повторності. Чашки Петрі щільно закривали стрічками парафілму й розміщували в термошафі на режимах двох варіантів культивування за температури 24 та 55 °С. Через добу проводили ізолювання окремих термофільних колоній платиновою бактеріальною петлею з варіантів розведення 10^8 , де мікроорганізми утворювали одиничні колонії. Мезофільні колонії (варіант культивування за температури 24 °С) на варіантах розведення 10^8 через добу не визначались, тому виділення проводили з варіантів розведення 10^6 .

Ідентифікацію кожного виду бактерій проводили методом для скринінгу окремих колоній бактерій для специфічної ДНК послідовностей за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) [3,4]. Стерильною мікробіологічною голкою частину колонії з одностенного ізоляту переносили в стерильну ПЛР пробірку з попередньо доданим мастер миксом. ПЛР проводили на програмованому ампліфікаторі.

Реакційна суміш (мастер микс) на 1 реакцію містила 5 μL GoTaq green (2X stock), що містить Таг ДНК полімерази, dNTPs, MgCl_2 та реакційний буфер в оптимальній концентрації для ефективно ампліфікації ДНК, 0.5 μL 30 μM прямого праймеру 530F та протилежного праймеру 1392R та 4 μL стерильної milliQ води. Після початкової денатурації протягом 5 хв. за температури 94 °С проводили 24 циклів ПЛР за наступних умов: денатурація 30 сек. температури 94 °С, відпалювання праймерів 30 сек. – 55 °С, синтез 1 хв. – 72 °С та фінальний синтез 5 хв. – 72 °С. Аналіз ПЛР-продуктів проводили в 2 % агарозному гелі, пофарбованому 1 % розчином бромистого етидію з наступним переглядом в ультрафіолетовому світлі трансілюмінатора, що проходить крізь шар гелю. Для оцінки молекулярної маси продуктів ампліфікації використовувався маркер молекулярного ваги DNA Ladder фірми "Біо Лінія "(США). Молекулярно-біологічне визначення проводилось на базі LTD Alohamedicinals, штат Невада та в Університеті штату Пенсільванія (США).

Результати дослідження. Після ізоляції нами було відібрано 9 найбільш поширених колоній (більше 75 % від загальної кількості). Методом ПЛР було ідентифіковано 3 види мікроорганізмів: мезофільна бактерія *Delftia lacustris/tsuruhatensis*, термофільні – *Bacillus licheniformis* та *Paenibacillus lactic*, які однаково зустрічались на субстратах, отриманих з різних ферм. Видовий склад бактерій не розрізнявся за місцем приготування субстрату. Співвідношення мезофільних та термофільних колоній склало 1/12000.

Мезофільна бактерія *Delftia lacustris/tsuruhatensis* поширена в озерах чи ставках. Грам-негативна, рухлива паличкоподібна ($2,3 \pm 0,7 \times 0,7 \pm 0,1 \mu\text{m}$). Росте за температури 3–37 °С, оптимальна температура 25 °С, а також за рН 5–10, оптимум рН 6–7. Має хітиназну й лізоцимну активність, що мають відношення до деградації пептидоглюкану та властивості утилізувати деякі моно- та дисахариди, аміно- та органічні кислоти. Ці бактерії зустрічаються в мезотрофних озерах та характеризуються як такі, що деградують позаклітинні пептидоглюкани, які звичайно зустрічаються в природних умовах [6].

Термофільна бактерія *Bacillus licheniformis* паличкоподібна, грам-позитивна бактерія. Має тенденцію до утворення спор у ґрунті, що робить її придатною для використання в промислових цілях, таких як виробництво ферментів, антибіотиків і малих метаболітів. Оптимальна температура росту 50 °С, але також може виживати за значно вищих температур. Оптимальна температура для секреції ферментів становить 37 °С. Ця бактерія може вижити в жорстких умовах, перетворюючись у спорові форми, коли умови стають благоприємними переходить у вегетативний стан. *B. licheniformis* виробляє протеази, які можуть вижити за високих рівнів рН. Ці протеази є бажаним компонентом миючих засобів через високотемпературні властивості, що перешкоджає усадці й вицвітання фарби [5]. *B. licheniformis* є одним з спороутворюючих організмів ґрунту, що сприяє кругообігу поживних речовин і володіє протигрибковою дією (штам SB3086) [7].

Термофільна бактерія *Paenibacillus lactic* відноситься до роду грам-позитивних, факультативно анаеробних, ендоспорових бактерій, спочатку включених до роду *Bacillus*, а потім класифіковані як окремий рід у 1993 році [5]. Бактерії, що належать до цього роду були виявлені в різних середовищах: ґрунт, вода, ризосферні рослинні матеріали, корми й личинки комах, а також у різних клінічних зразках [6]. Латинською *Paene* означає «практично», тому буквально *Paenibacilli* переводиться «Майже бацила». Ці бактерії є одним з спорових мікроорганізмів, що здатні до проростання й росту за низького рівня рН (рН між 3,8 і 3,9).

Аеробні ендоспороформуючі бактерії *Bacillus licheniformis* та *Paenibacillus lactic* розповсюджені в сільськогосподарських системах. Ці бактерії асоційовані з бактеріальними ендоспорами [7] та мають унікальні властивості для їхнього потенційного застосування в захисті проти хвороб.

Висновки. Вплив досліджуваних бактерій на розвиток, витривалість та показники урожайності гливи звичайної потребують детального вивчення, тому необхідне подальше дослідження можливостей використання цих бактерій у промисловому культивуванні різних видів їстівних та лікарських грибів.

Список літератури

1. Бисько Н.А. Биология и культивирование съедобных грибов рода вешенка / Н.А. Бисько, И.А. Дудка. – К.: Наукова думка, 1987. – 148 с.
2. Мироничева О.С. Порівняльна оцінка способів термічної обробки субстратів при виробництві ксилотрофних грибів [Електронний ресурс] / О.С. Мироничева, І.І. Бандура // Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України. – 2011. – Вип. 1.

(23). – Режим доступу: http://www.nbuuv.gov.ua/e-journals/nd/2011_1/11mospix.pdf.

3. Jorgensen, NOG. *Delftia lacustris* sp. nov., a peptidoglycandegrading bacterium from fresh water, and emended description of *Delftia tsuruhatensis* as a peptidoglycan–degrading bacterium / Brandt, K.K, Nybroe, O & Hansen, M. // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2009. – vol 59. – P. 2195–2199.
4. The complete genome sequence of *Bacillus licheniformis* DSM13, an organism with great industrial potential. / C. Herzberg, S. Steckel, J. Feesche et al. // J. Mol. Microbiol. Biotechnol. – 2004. – 7(4). – P. 204–211.
5. Ash C. Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. / Priest F.G., Collins M.D. // Proposal for the creation of a new genus *Paenibacillus*. Antonie Van Leeuwenhoek. – 1993 – 64. – P. 253–260.
6. McSpadden Gardener B.B. Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. in Agricultural Systems // Phytopathology. – 2004. – 94. – P. 1252–1258.
7. Ryan, R. P. Bacterial endophytes: recent developments and applications [Электронний ресурс] / K. Germaine, A. Franks, D. J. Ryan, and D. N. Dowling // FEMS Microbiology Letters. – 2008 – 278. – P. 1 – 9. Режим доступу: DOI: 10.1111/j.1574–6968.2007.00918.x.

Исследован видовой состав бактериальной микрофлоры, образующейся при подготовке субстратов методом аэробной пастеризации для производства ксилотрофных базидиомицетов.

Бактерии, аэробная пастеризация, субстрат, полимеразно-цепная реакция (ПЦР).

The composition of bacterial microflora in the substrates treatment by the method of aerobic pasteurization in the production of xylophilic basidiomycetes was examined.

Bacteria, aerobic pasteurization, substrate, polymerase chain reaction (PCR).