

УДК 637.136.3:66.095.261

¹Сливка І.М., аспірант, ¹Цісарик О.Й., д. с/г н., професор, ²Т. Боцер ©
slyvka.88@ukr.net, tsisaryk_o@yahoo.com¹Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького, м. Львів, Україна²Жешувський університет, м. Кольбушово, Польща

ІДЕНТИФІКАЦІЯ МОЛОЧНОКИСЛИХ БАКТЕРІЙ ІЗ ЗАСТОСУВАННЯМ КОМПЛЕКСУ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИХ МЕТОДІВ

Молочнокислі бактерії належать до групи мікроорганізмів, які є основою для створення пробіотичних препаратів, що позитивно впливають на здоров'я людини. Вони широко використовуються в харчовій промисловості, беручи участь в процесі виробництва і підтримці свіжості продукту та одночасно знижують потребу у використанні в штучних консервантів.

Метою роботи було диференціювати молочнокислі бактерії, виділені з овечого сиру, виготовленого в умовах високогірної полонини Путильського району Чернівецької області. Для досягнення цієї мети використано метод випадкової ампліфікації поліморфної ДНК (RAPD-PCR) та ампліфікацію регіону міжгенної ділянки 16S і 23S rRNA.

Аналіз результатів свідчить, що бактеріальна флора, яка бере участь у виробництві сиру досить різноманітна. Нам вдалося отримати 8 різних генетичних профілів, які вказують на існування восьми груп бактерій. Досліджувані МКБ не можуть бути віднесені до конкретного виду через відсутність схожих генетичних профілів референтних штамів.

Метод RAPD-PCR є доцільним при визначенні різноманітності МКБ в кількісному відношенні, але не достатнім з точки зору якісного аналізу. Оскільки, молочнокисла флора, яка ізольована із овечого сиру Карпатського регіону України, не вивчена, то використання методу RAPD-PCR є початковим етапом в її дослідженні.

Ключові слова: молочнокислі бактерії, молекулярно-генетичні методи, ідентифікація, полімеразна ланцюгова реакція, ампліфікація, гетерогенність.

УДК 637.136.3:66.095.261

¹И.Н. Сливка, аспирант, ¹О.И. Цисарык, д. с/г н., професор, ²Т. Боцер¹Львовский национальный университет ветеринарной медицины и биотехнологий имени С. З. Гжицкого, Украина²Жешувский университет, г. Кольбушово, Польша

ІДЕНТИФІКАЦІЯ МОЛОЧНОКИСЛИХ БАКТЕРІЙ С ПРИМЕНЕНИЕМ КОМПЛЕКСА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ

Молочнокислые бактерии относятся к группе микроорганизмов, которые являются основой для создания пробиотических препаратов, которые положительно влияют на здоровье человека. Они широко используются в пищевой промышленности, участвуя в процессе производства и поддержке

свежести продукта и одновременно снижают потребность в использовании искусственных консервантов.

Целью работы было дифференцировать молочнокислые бактерии, выделенные из овечьего сыра, изготовленного в условиях высокогорной долины Путильского района Черновицкой области. Для достижения этой цели использован метод случайной амплификации полиморфной ДНК (RAPD-PCR) и амплификации региона межгенного участка 16S и 23S rRNA.

Анализ результатов показывает, что бактериальная флора, которая участвует в производстве сыра весьма разнообразна. Нам удалось получить 8 различных генетических профилей, которые указывают на существование восьми групп бактерий. Исследования МКБ не могут быть отнесены к конкретному виду за отсутствия похожих генетических профилей референтных штаммов.

Метод RAPD-PCR является целесообразным при определении разнообразия МКБ в количественном отношении, но не достаточным с точки зрения анализа. Поскольку молочнокислая флора, которая изолирована с овечьего сыра Карпатского региона Украины, не изучена, то использование метода RAPD-PCR есть начальным этапом в ее исследовании.

Ключевые слова: молочнокислые бактерии, молекулярно-генетические методы, идентификация, полимеразная цепная реакция, амплификация, гетерогенность.

UDC 637.136.3:66.095.261

¹I.M. Slyvka, O.Y. ¹Tsinaryk, ²T. Bocer

¹Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies named after S. Z. Gzhytskyj, Lviv, Ukraine

²University of Rzeszow, Kolbuszowa, Poland

THE APPLICATION OF THE COMPLEX OF MOLECULAR-GENEIC METHOD FOR IDENTIFICATION OF LACTIC ACID BACTERIA

Lactic acid bacteria belong to the group of microorganisms, that are basis for creation of probiotic, that positively influence on a health man. They are widely used in food industry, participating in the of production and to support of freshness of product and also reduce a requirement in the use at artificial preservatives.

Our purpose was to identify LAB, isolated from ewe's cheese produced in the alpine mountain valley of Putyla district of Chernivtsi region. The random amplification of polymorphic DNA (RAPD-PCR) and amplification of region of intergenic area of 16S and 23S rRNA have been used to achieve this purpose.

The analysis of results testifies that bacterial flora that participates in the production of cheese various enough. 8 different genetic profiles that specify on existence of eight groups of bacteria we succeeded to get. Investigated LAB can not be attributed to a specific type because of the lack of similar genetic profiles of reference strains.

The method RAPD-PCR is appropriate in determining the diversity LAB quantitatively, but not sufficient in terms of qualitative analysis. Since lactic flora, which is isolated from ewe's cheese Carpathian region of Ukraine, has not been studied, the use of RAPD-PCR method is the first step in its study.

Key words: *lactic acid bacteria, molecular genetic methods, identification, polymerase chain reaction amplification, heterogeneity.*

Вступ. Молочнокислі бактерії (МКБ) все більше привертають велику увагу науковців створенням на їх основі пробіотичних препаратів з метою оздоровлення організму людини [1]. Питання виділення, селекції й удосконалення штамів МКБ, які продукують біологічно активні речовини, є актуальними в даний час [2].

Біохімічні та морфологічні властивості лактобактерій на сьогодні є основним і єдиним критерієм міжродової і видової приналежності цих мікроорганізмів. Проте численні дані, що стосуються особливостей їх біології, морфології та біохімії, все одно часто виявляються недостатніми, а іноді тільки ускладнюють визначення досліджуваних об'єктів, а саме встановлення їх таксономічного положення. Тому альтернативою класичній біохімічній ідентифікації є метод генотипування з використанням полімеразної ланцюгової реакції (*англ. Polymerase Chain Reaction*) [3].

Метою роботи є застосування комплексу генетично-молекулярних методів для вивчення генетичного різноманіття штамів МКБ, які були виділені традиційного харчового продукту українців – бринзи. Варто відзначити, що генетичний аналіз бактеріальної флори, виділеної з овечого сиру, виготовленого в домашніх умовах на теренах українських Карпат, буде зроблено вперше.

Для вивчення генетичного поліморфізму ДНК МКБ, використовували молекулярно-генетичний метод PCR з випадковими праймерами RAPD-PCR (*англ. Random Amplification of Polymorphic DNA*) та метод риботипування (ампліфікація регіону між генами 16S і 23S rRNA).

RAPD-PCR – це метод, який дозволяє проводити аналіз генома без точного знання його послідовностей, він заснований на PCR, що проводиться на геномній ДНК. На відміну від стандартної полімеразної ланцюгової реакції використовують один праймер, як правило, з довжиною від 10 до 20 пар основ. Залежно від способу диференціації можна застосовувати більше праймерів. Ці праймери з довільною послідовністю, як правило, ініціюють ампліфікацію фрагментів ДНК в різних областях генома одночасно [4].

Риботипування – один з методів генетичного типування. Метод полягає у розділенні мікроорганізмів завдяки високій гетерогенності генів і кодуєчих рибосомальних РНК (рРНК) малої і великої субодиниці прокаріотичної рибосоми. Ці гени вкладені в *оперон rrn*, який є характерним для всіх бактерійних мікроорганізмів. Між послідовностями, відповідальними за синтез 16S, 23S і 5S рРНК, є поліморфні ділянки різної послідовності і розміру. Вони є ідеальними для використання у філогенетичних дослідженнях [5].

Розробка нових та оптимізація відомих молекулярно-генетичних методів індикації і точної видової ідентифікації МКБ є актуальним і практично потрібним завданням, якому приділяється велика увага закоронних і вітчизняних дослідників [6].

Матеріали та методи дослідження. Матеріалом для досліджень був овечий сир буц (бринза, до моменту соління), виготовлений в умовах високогірної полонини Путильського району Чернівецької області. Об'єктом дослідження слугували мікроорганізми, ізольовані із овечого сиру. Предметом дослідження були морфолого-культуральні та гетерогенні властивості ізольованих МКБ. Із дослідного зразка сиру було ізольовано 28 чистих культур МКБ.

Визначення приналежності виділених бактерій до роду *Lactobacterium* проводили за ГОСТ 10444.11-89 «Продукти харчові. Методи виявлення молочнокислих мікрорганізмів».

Для ізоляції чистих культур МКБ використовували метод посіву десятикратних розведень досліджуваного матеріалу на тверді поживні середовища *MRS* та *M17*, що містили 2% агару. Поживні середовища були приготовані на основі дистильованої води і стерилізовані в автоклаві при температурі 121 °С, тиску 1 атм, протягом 15 хв. Метод виявлення молочнокислих паличок базувався на їх здатності розвиватися на поживному середовищі *MRS*. Для ізоляції лактококів використовували середовище *M17*. Інкубацію молочнокислих паличок здійснювали в анаеробних та мікроаерофільних умовах за температури +38 °С, інкубацію лактококів при температурі +25 °С та +42 °С. Після інкубування на твердих поживних середовищах окремі КУО МКБ переносили у рідке поживне середовище *MRS* та *M17* для нарощення біологічної маси для подальшої ізоляції геномної ДНК бактерій.

Ізоляцію геномної ДНК проводили, використовуючи набір *Genomic Mini* фірми *A&A Biotechnology* згідно з інструкцією виробника. Визначення концентрації і чистоти ізольованої ДНК проводили на спектрофотометрі *NanoDrop 2000* фірми *Thermo Scientific*.

Ампліфікацію ДНК виконано на основі PCR з використанням праймера *1254* (*Sigma-Aldrich*). Нуклеотидна секвенція стартера *1254*, який використаний для RAPD-PCR, була 5'- CCGCAGCCA -3'. PCR для ділянки 16S-23S рПНК проведено з використанням пари праймерів *16-1A* та *23-1B* (*Sigma-Aldrich*). Нуклеотидна послідовність для праймерів, що були використані для PCR-ITS (англ. *internal transcribed spacer PCR*): *16-1A* 5'- GTCGGAATCGCTAGTAATCG -3' та для *23-1B* 5'- GTCGGAATCGCTAGTAATCG -3'.

Реакційна суміш для RAPD-PCR та PCR-ITS складалась із дистильованої води, dNTP, буферу, полімерази Taq, стартерів *1254* (RAPD-PCR), *16-1A* та *23-1B* (PCR-ITS) та матриці ДНК.

Ампліфікацію виконували за допомогою термоциклера *Mastercycler Gradient* фірми *Eppendorf*, беручи до уваги температури плавлення праймерів і літературні дані щодо умов проведення RAPD-PCR та PCR-ITS [7].

Для проведення RAPD-PCR застосовано режими, що представлено в таблиці 1.

Електрофорез в агарозному гелі здійснено в апараті фірми *Bio-Rad*. Приготовлено 1,5% агарозний гель і розведення буферу 1xTBE (TrisHCl, H₃BO₃,

EDTA). Для візуалізації ДНК в агарозний гель додавали бромистий етидій (EtBr) у розрахунку 0,5 мг/мл. Фотографування виконували у транслюмінаторі *G-Box (Syngene)*. Кількість ампліфікованого ДНК визначали на основі маркера молекулярної маси *GeneRuler 1kb DNA Ladder* фірми *Fermentas* (рис 1).

Таблиця 1

Режими проведення RAPD-PCR

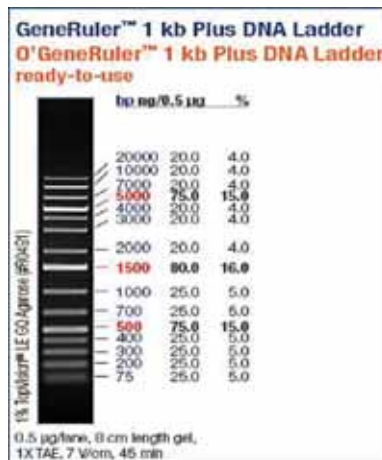
Етап	Температура (°C)	Час (хв.)	Кількість циклів
Денатурація	94	5	4
Приєднання стартера	36	5	
Елонгація	72	5	
Денатурація	94	1	30
Приєднання стартера	36	1	
Елонгація	72	2	
Кінцеве подовження	72	10	1

PCR-ITS проведено при режимах , що представлено в таблиці 2.

Таблиця 2

Режими проведення PCR-ITS

Етап	Температура (°C)	Час	Кількість циклів
Денатурація вступна	94	5 хв.	1
Денатурація	94	40 с.	35
Приєднання стартера	55	45 с.	
Елонгація	72	60 с.	
Кінцеве подовження	72	7 хв.	1

**Рис.1 Маркер величини ДНК GeneRuler 1kb DNA Ladder**

Для порівняльного аналізу ампліфікованих фрагментів ДНК використано референтні штами МКБ із колекції Katedry Mikrobiologii Przemysłowej i Żywności (промислової мікробіології і продовольства) Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego, Rzeczpospolita Polska). У роботі

використано 12 штамів МКБ: *Lactococcus lactis* spp. *lactis* 6; *Lactococcus lactis* spp. *cremoris*; *Lactococcus lactis* spp. *lactis* 1267; *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis*; *Lactobacillus plantarum* 295/1; *Lactobacillus brevis* 211; *Enterococcus faecalis*; *Lactobacillus plantarum* 21; *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*; *Lactobacillus acidophilus* 43/15; *Lactobacillus brevis* 32; *Leuconostoc mesenteroides* spp. *mesenteroides*.

Результати досліджень. Вперше проведено аналіз бактеріальної мікрофлори овечого сиру із застосуванням комплексу мікробіологічних та генетично-молекулярних методів RAPD-PCR та PCR-ITS.

За морфолого-культуральними властивостями МКБ відносилися до родин *Lactobacteriaceae* та *Streptococcaceae* та трьох родів *Lactobacterium*, *Lactococcus* і *Streptococcus*.

Ізоляцію геномної ДНК виконано із 28 чистих культур МКБ. Концентрацію та чистоту ізолюваної ДНК представлено у таблиці 3.

Таблиця 3

**Результати визначення ступеня чистоти і концентрації
ізолюваної геномної ДНК із досліджуваних культур МКБ**

№ ізоляту МКБ	Концентрація ДНК нг/мкл	Чистота ДНК A260/A280	№ ізоляту МКБ	Концентрація ДНК нг/мкл	Чистота ДНК A260/A280
1	84,7	1,81	15	93,7	1,69
2	83,6	1,80	16	185,4	1,63
3	72,4	1,81	17	87,3	1,78
4	113,4	1,82	18	145,2	1,69
5	96,6	1,66	19	53,6	1,73
6	87,5	1,78	20	122,2	1,62
7	77,0	1,78	21	189,7	1,60
8	94,4	1,80	22	134,0	1,62
9	84,3	1,76	23	103,8	1,75
10	164,1	1,61	24	78,9	1,83
11	79,5	1,76	25	87,6	1,67
12	86,8	1,81	26	107,3	1,78
13	95,6	1,77	27	73,4	1,86
14	76,6	1,81	28	82,6	1,68

Ампліфікацію гена 16S рРНК і ділянки між генами, що кодують 16S і 23S рРНК, проведено для підтвердження якості виділеної ДНК і подальшого її використання, як матриці для методу RAPD-PCR. Праймери, що використані в реакції були гомологічні висококонсервативній ділянці. Таким чином, при відсутності продукту ампліфікації потрібно автоматично дискваліфікувати даний зразок і виключити його із подальших досліджень. Після електрофоретичного аналізу, продукти ампліфікації були виявлені в кожному з аналізованих зразків (рис. 2, рис. 3). Тільки в одному випадку (ампліфікація гена 16S рРНК, зразок 15) вихід реакції не був найвищим. Але при проведенні

PCR-ITS, кількість ізольованої ДНК є достатньою і реакція відбувається позитивно.



Рис. 2. Електрофоретичне розділення продуктів ампліфікації гена 16S рРНК.

М- маркер молекулярної маси (*GeneRuler 1kb DNA Ladder*).

Доріжки №1-28 - досліджувані зразки МКБ.

Доріжка №15 - брак продукту PCR.

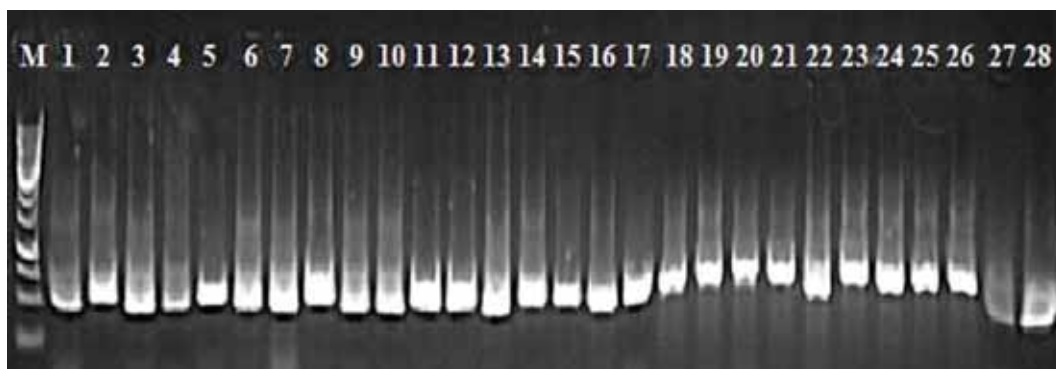


Рис. 3. Електрофоретичне розділення продуктів ампліфікації поліморфного регіону, що кодується 16S і 23S рРНК (PCR-ITS)

М- маркер молекулярної маси (*GeneRuler 1kb DNA Ladder*).

Доріжки №1-28 - досліджувані зразки МКБ.

Результати, отримані при проведенні RAPD-PCR дали можливість встановити значний ступінь гетерогенності всередині досліджуваних штамів МКБ. Оскільки, кожний окремий ізолят МКБ характеризувався різною кількістю ампліфікованого ДНК і відповідно різною кількістю їх молекулярної маси. Профілі ампліфікації ДНК досліджуваних ізолятів МКБ, що отримані під час розділення в електрофоретичному полі, представлено на рисунку 4.

На рисунку 5 представлені профілі ампліфікації ДНК референтних штамів МКБ отримані при електрофоретичному розділенні. Електрофорез референтних штамів МКБ проведено для порівняння із отриманими профілями ДНК досліджуваних штамів МКБ.

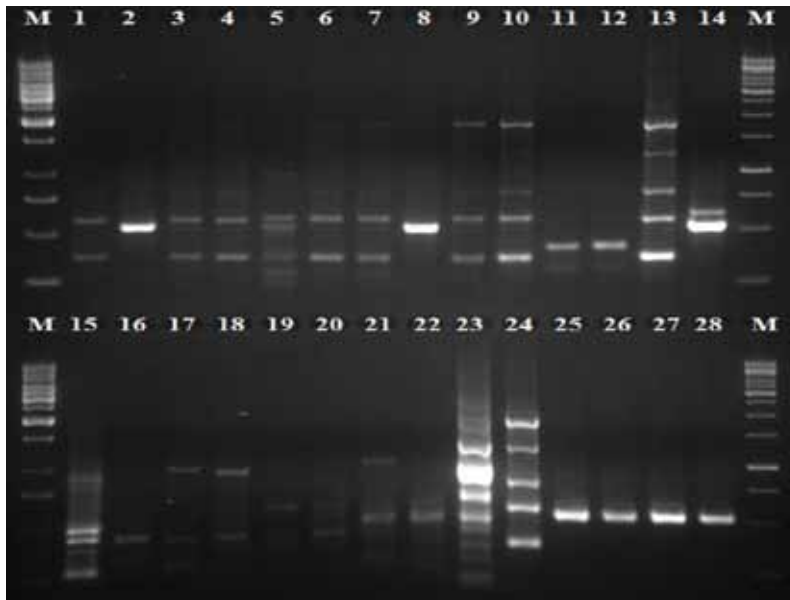


Рис. 4. Електрофоретичне розділення продуктів RAPD-PCR.
 М — маркер молекулярної маси (*GeneRuler 1kb DNA Ladder*).
 Доріжки № 1 – 28 досліджувані зразки МКБ

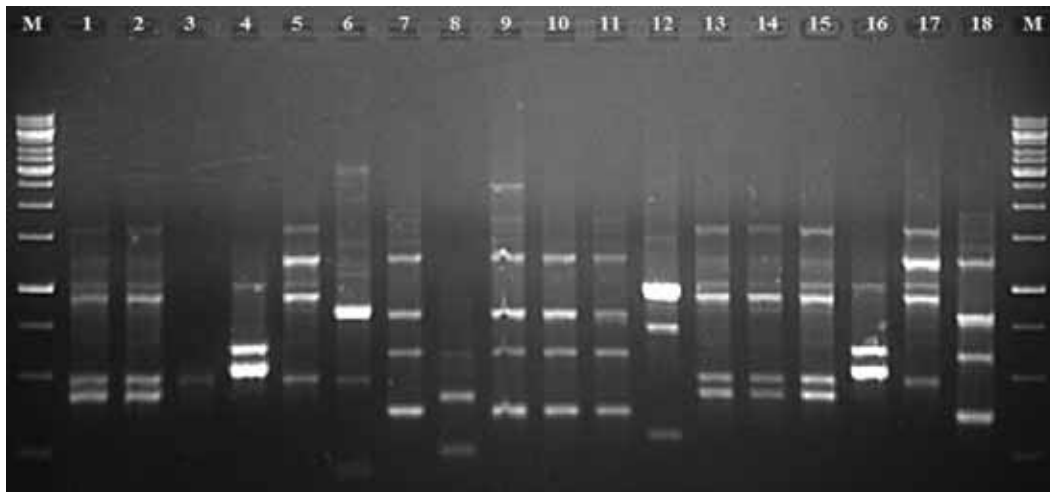


Рис. 5. Електрофоретичне розділення продуктів RAPD - PCR.
 М - маркер молекулярної маси (*GeneRuler 1kb DNA Ladder*).
 Доріжки № 1–12 референтні штами МКБ. 1 - *Lactococcus lactis* spp. *lactis*, 2 - *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, 3 - *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* 1267, 4 - *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis*, 5 - *Lactobacillus plantarum* 295/1, 6 - *Lactobacillus brevis* 211, 7 - *Enterococcus faecalis*, 8 - *Lactobacillus plantarum* 21, 9 - *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, 10 - *Lactobacillus acidophilus* 43/15, 11- *Lactobacillus brevis* 32, 12- *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides*.

При проведенні порівняльного аналізу профілів ампліфікації досліджуваних МКБ та референтних штамів МКБ після проведення RAPD-ПЛР не вдалося відшукати спільних електрофоретичних зразків. Що в свою чергу не дає нам можливості визначити, які МКБ беруть участь у процесі виробництва сиру. Але за схожістю електрофоретичних профілів між досліджуваними штамми МКБ, їх можна об'єднати у 8 груп, що вказує на існування восьми груп бактерій, які були ізольовані із сиру.

Досліджувані зразки МКБ, які віднесені до певних груп представлено в таблиці 4.

Таблиця 4

Групи досліджуваних зразків МКБ, що мають подібні генетичні профілі під час використання RAPD-PCR

Номер групи, що мають подібний генетичний профіль	Номери доріжок електрофоретичних знімків, що мають схожі генетичні профілі
I	1,3,4,6,7,9,10,13,14
II	2,8,14,21,22,25,26,27,28
III	11,12,16
IV	17,18
V	19,20
VI	5
VII	15
VIII	23

За результатами ампліфікації випадково поліморфної ДНК досліджуваних штамів МКБ можна встановити їх міжродинні зв'язки та стверджувати про їх гетерогенні властивості всередині родини *Lactobacteriaceae*. Встановлення родинних зв'язків кожного виду та ідентифікація на видовому і штамовому рівні вимагатиме застосування інших молекулярно-генетичних методів аналізу.

Висновки. Підсумовуючи проведену роботу, вважаємо застосування методу RAPD-PCR доцільним при визначенні різноманітності МКБ в кількісному відношенні, але не найкращим з точки зору якісного аналізу. Оскільки, молочнокисла флора, яка ізольована із овечого сиру Карпатського регіону України, не вивчена абсолютно, то використання методу RAPD-PCR є початковим етапом в її дослідженні. За аналізом електрофоретичних знімків, можемо стверджувати, що бактеріальна флора досліджуваного овечого сиру є різноманітна і володіє досить гетерогенними властивостями, оскільки її не вдалося порівняти із референтними штамми.

Перспективи подальших досліджень. Подальші дослідження будуть спрямовані на застосування додаткових методів дослідження. Одним із таких методів є аналіз поліморфізму довжин рестрикційних фрагментів (RFLP-PCR), який при співвставленні із уже отриманими результатами дасть можливість більш детально охарактеризувати ізольовану молочнокислу флору із овечого сиру. Однак, визначення остаточної приналежності ізолятів МКБ можливо

провести із застосуванням секвенування гена 16S рРНК або поліморфної ділянки між генами 16S і 23S рРНК.

Література

1. Bondarenko V.M. i drugie. Probiotyky i mehanizmy ih lechebnogo deystvija [Probiotics and their mechanisms of therapeutic action] *Еksperimentalna klinicheskaja gastroenterologija*, 2004. no. 3. pp. 83 – 87 (in Ukrainian).

2. Herich R., Levkutvet M., (2002) Lactic acid bacteria, probiotics and immune system. *Vet. Med. – Czech*, 47, (6): 169–180.

3. Kovalenko N.K., Lashevskyy V.V. Primeneniya metoda polymeraznoj tseпноj reaktsii (PCR) dlja identyfikatsij molochnyh bakterij [Application of the polymerase chain reaction (PCR) for identification of lactic acid bacteria]. *Molochna promyslovist' — Dairy Industry*, 2003 vol. 1, no 4, pp. 24–25 (in Ukrainian).

4. Tingej S.V., del Tufo J.P. Genetic analysis with random amplified polymorphic DNA markers *Plant Physiol*, 1993, 101, pp. 349–352.

5. Bouchet V., H. Huot, R. Goldstein (2008) Molecular genetic basis of ribotyping. *Clin. Microbiol. Rev.* April 2008 vol. 21 no. 2 262-273.

6. Точилина А.Г. Индикация и идентификация бактерий рода *Lactobacillus* с использованием полимеразной цепной реакции/ Точилина А.Г., Новикова Н.А., Соколова К.Я., Соловьева И.В., Белова И.В., Иванова Т.П. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2008, №3. – С. 69-73.

7. Mora D., Ricci G., Guglielmetti S., Daffonchio D., Fortina M. G. (2003) 16S–23S rRNA intergenic spacer region sequence variation in *Streptococcus thermophiles* and related dairy streptococci and development of a multiplex ITS-SSCP analysis for their identification. *Microbiology* 149, 807–813.

Рецензент – к.б.н., професор університету Гачак Ю.Р.