

УДК 579.672:578.81

**О. В. Дмитриева**, аспирант (БГТУ);  
**А. П. Райский**, кандидат биологических наук, ассистент (БГТУ);  
**Е. Н. Сахар**, студент (БГТУ);  
**Н. А. Белясова**, кандидат биологических наук, доцент (БГТУ)

### ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ТЕРМОФИЛЬНЫХ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ И СПЕЦИФИЧНЫХ К НИМ ФАГОВ

В работе приведены результаты исследования состава термофильной микробиоты образцов молочнокислых продуктов, произведенных на комбинатах Республики Беларусь. Из 10 образцов выделено в виде чистых культур 26 штаммов термофильных молочнокислых бактерий. Идентифицировано 8 штаммов энтерококков. Выделен и охарактеризован энтерококкофаг S02, который использовали для фаготипирования бактерий.

In work thermophilic lactic acid microbiota samples of products produced at the plant of the Republic of Belarus were studied. 26 strains of thermophilic lactic acid bacteria were isolated as pure cultures from the 10 samples. 8 strains of enterococci was identified. Enterococcus phage S02 was isolated, characterized and used for bacteria phage-typing.

**Введение.** Энтерококки являются грамположительными термофильными молочнокислыми бактериями. Экологические ниши, в которых они встречаются, разнообразны: поверхностные воды, растения, желудочно-кишечный тракт теплокровных животных и человека, а также пищевые продукты, предназначенные для людей. Энтерококки – типичные условно-патогенные микроорганизмы. В последние годы их считают одними из главных нозокомиальных (внутрибольничных) патогенов, вызывающих бактериемию, эндокардит, инфекции мочевыводящих путей, а также другие инфекции. Поскольку энтерококки полиантибиотикоустойчивы, их терапия представляет глобальную проблему общественного здравоохранения. В настоящее время в качестве возможной альтернативы для лечения инфекций, вызванных энтерококками, во всем мире используется терапия энтерококкофагами [1].

С другой стороны, будучи столь широко распространенными в природе и обладая способностью гидролизовать ряд сахаров, включая лактозу, энтерококки широко и с давних пор используются в производстве пищевых продуктов: в сыроварении, в процессах приготовления ряда мясных продуктов, ферментированных продуктов на основе сои и зерновых. Основной причиной, объясняющей столь широкое применение энтерококков в пищевой промышленности, помимо их высокой устойчивости к воздействию кислот, солей и высокой температуры, является их способность эффективно подавлять болезнетворные бактерии в самих пищевых продуктах. Полезные для человека свойства энтерококков (высокая антагонистическая активность в отношении патогенной микробиоты, участие в формировании и поддержании иммунитета, участие в нормальном

пищеварении, противовоспалительные свойства, витаминобразование) определили их частое использование в медицине в качестве пробиотиков – препаратов, содержащих живые бактерии, которые после попадания в человеческий организм оказывают на него благотворное воздействие.

Ключевым критерием для дифференцировки энтерококков и выявления среди них патогенных форм является наличие или отсутствие у штамма набора генов патогенности.

В нашей республике в состав заквасок в качестве термофильной микробиоты чаще включают *Streptococcus thermophilus*, которые непатогенны и обладают схожей морфологией с энтерококками. В настоящее время есть литературные данные, что многие штаммы термофильных молочнокислых бактерий, используемые в составе заквасок и рассматриваемые ранее как термофильные стрептококки, на самом деле относятся к энтерококкам. Причем иногда эти штаммы содержат гены патогенности [2].

Целью данного исследования служило выявление в молочных продуктах отечественного производства бактерий рода *Enterococcus* и их характеристика.

**Основная часть.** В задачи данного исследования входило выделение из разных кисломолочных продуктов, произведенных на предприятиях Республики Беларусь, термофильных молочнокислых бактерий и специфичных к ним фагов, их морфологическая и физиолого-биохимическая характеристика и идентификация изолятов.

**Материалы и методы.** Выделение и культивирование бактерий осуществляли на пептонно-дрожжевой среде М17 с глюкозой (0,5%) в качестве источника углерода. Способность бактерий сквашивать молоко определяли, инокулируя

суточными культурами (0,1 мл) восстановленное молоко (3,0 мл) и регистрируя образование сгустка после инкубирования инокулятов при 42°C в течение 72 ч. Выделение и культивирование фагов, выделение их ДНК и рестрикционный анализ описаны ранее [3]. Пробы для микроскопического исследования с помощью трансмиссионного электронного микроскопа готовили как описано в [4].

Фрагмент гена 16S кДНК получили амплификацией с помощью полимеразной цепной реакции, которую проводили в программируемом термоциклере «Терцик» (ДНК-технология, Россия) со специфическими праймерами A16S (5'- CGG CCC AGA CTC CTA CGG GAG GCA GCA -3') и B16S (5'- GCG TGG ACT ACC AGG GTA TCT AAT CC -3').

Выделение ДНК из геля проводили с помощью набора Silica Bead DNA Gel Extraction Kit производства «MBI Fermentas» (Литва).

Секвенировали ДНК с использованием набора BigDye Terminator 3.1 (США). Для каждого образца ДНК готовили смесь, содержащую BigDye Terminator 3.1 mix – 4 мкл; буфер для секвенирования – 2 мкл; праймер (2 мкМ) – 1,6 мкл; ДНК-матрицу – 150–300 нг; деионизированную воду – до 20 мкл. Смесь помещали в термоциклер и амплифицировали фрагменты ДНК в режиме: 3 мин при 94°C; 30 циклов по 30 с при 94°C, 30 с при 50°C и 45 с при 72°C.

По завершении программы вносили 5 мкл 125 мМ Трис и 60 мкл этилового спирта. Инкубировали 60 минут при –20°C. Центрифугировали при 13 000 g в течение 30 мин. Сливали супернатант, осадок высушивали и ресуспендировали в 10 мкл HiDi формамида. Денатурировали образ-

цы при 95°C в течение 2 мин и немедленно охлаждали на льду. Электрофорез проводили при 11 300 В и 50°C в ДНК анализаторе ABI PRISM 310 (Applied Biosystems, США) с соответствующим программным обеспечением. Результаты анализировали с использованием программного пакета Sequencing Analysis v5.3.0.

*Результаты и обсуждение.* В ходе исследования проанализировано 10 образцов различных кисломолочных продуктов, произведенных на комбинатах пяти областей Республики Беларусь. Из образцов выделены в виде чистых культур 26 штаммов термофильных молочнокислых бактерий, которые представлены в таблице.

Эти данные показывают, что термофильные бактерии довольно широко распространены в составе кисломолочных продуктов отечественного производства, причем наибольшее их разнообразие характерно для биопродукта кисломолочного «Mariusya».

Для определения видовой принадлежности выделенных бактерий исследовали морфологические особенности клеток при помощи световой микроскопии. Оказалось, что все изоляты представлены кокками, формирующими при росте в жидкой среде скопления разного типа: пары, короткие или длинные цепочки. Клетки всех 26 штаммов окрашиваются по Граму положительно.

Оптimum роста бактерий составляет 42°C; по отношению к молекулярному кислороду изоляты относятся к группе факультативных анаэробов; способны сквашивать восстановленное молоко в течении 1–3 сут.

Изученные признаки позволяют отнести выделенные бактерии к группе термофильных молочнокислых кокков, предположительно к роду *Streptococcus* или *Enterococcus*.

#### Распространение термофильных молочнокислых бактерий в молочных продуктах производства Республике Беларусь

Источник выделения		Предприятие изготовитель, область	Выделенные штаммы
Биопродукт кисломолочный «Mariusya»	1,5% жирности	ОАО «Берёзовский сыродельный комбинат», Бресткая	2а, 2б, 2в 1а, 1б, 1в, 1д
Бифитат	3,2% жирности	ОАО «Молочный Мир», Гродненская	1.1а
Напиток кисломолочный	3,2% жирности	ОАО «Минский гормолзавод № 2», Минская	2/1, 2/2
Ряженка «Нежность»	2,5% жирности	КУП «Городской молочный завод № 1», Минская	3а, 3б, 3в
Сметана	20% жирности	ОАО «Молочные горки», Могилевская	067.2
	15% жирности	ОАО «Молочные горки», Могилевская	3/1, 3/2
	12% жирности	ОАО «Борисовский молочный комбинат», Минская	310, 301, 302
	18% жирности	ОАО «Бабушкина крынка», Могилевская	201, 202, 210
	12% жирности	ОАО «Оршанский молочный комбинат», Витебская	501, 511
Продукт сметанный	15% жирности	ОАО «Молочный Мир», Гродненская	400, 410

Для видовой идентификации изолятов использовали самый точный метод генетического анализа – секвенирование фрагментов генов 16S-рРНК. В качестве модельного выбрали штамм 3/1, для которого подобрали условия проведения ПЦР, выделения фрагментов ДНК из геля и параметры сквенирующей реакции. Амплифицированный фрагмент ДНК по результатам секвенирования содержал 500 п. н. Сопоставление полученной последовательности нуклеотидов с известными последовательностями нуклеотидов в базе данных GenBank провели с помощью программы BLAST, что позволило идентифицировать бактерии штамма 3/1 как представителей рода *Enterococcus*, которые с равной вероятностью могут относиться к видам *E. faecium*, *E. hirae* или *E. durans* (степень гомологии секвенированной последовательности с соответствующими фрагментами этих бактерий составляет 99%).

В процессе исследования из биопродукта кисломолочного 1,7% жирности выделен бактериофаг S02, способный репродуцироваться в клетках бактерий 3/1, идентифицированных в ходе секвенирования. Поскольку между фагами и их хозяевами существует высокая степень специфичности, можно с большой долей вероятности предполагать, что данный бактериофаг относится к числу энтерококкофагов.

Использование трансмиссионной электронной микроскопии позволило установить морфологию вирионов энтерококкофага S02 (рис. 1) и отнести его к семейству *Siphoviridae* на основании изометрической формы головки и длинного несократимого отростка.

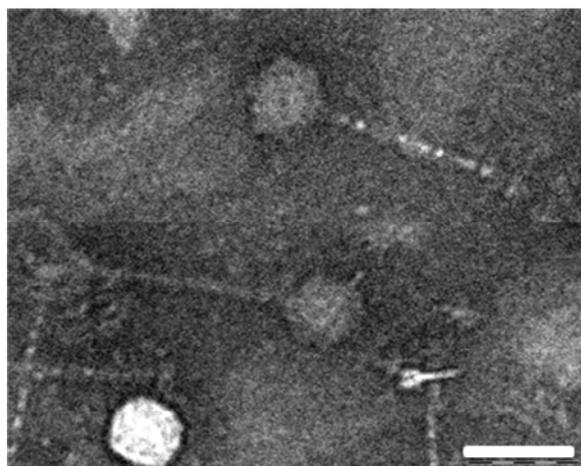


Рис. 1. Электронная микрофотография вирионов энтерококкофагов S02 (длина масштабной линии на фотографии соответствует 100 нм)

Можно видеть, что вирионы фага характеризуются следующими пропорциями: диаметр головки составляет 65 нм, а хвостовой отросток

имеет спиральный тип симметрии с близким расположением витков спирали друг к другу, поэтому характеризуется палочковидной (негибкой) формой. Длина отростков этих фагов составляет  $(185 \pm 5)$  нм. В настоящее время большинство описанных в литературе энтерококкофагов имеют хвостовые отростки и характеризуются сходной с фагом S02 структурой [5].

Отличие выделенного энтерококкофага от имеющихся в коллекции лактофагов подтверждают также результаты рестрикционного анализа, выполненные с использованием подобранных ранее эндонуклеаз рестрикции *HindIII*, *EcoRV* и *EcoRI*. На рис. 2 отражены рестрикционные профили ДНК двух изолятов лактофагов и энтерококкофага S02, из которых однозначно следует, что геном нового энтерококкофага существенно отличается по расположению и числу сайтов рестрикции для выбранных ферментов от геномов лактофагов.

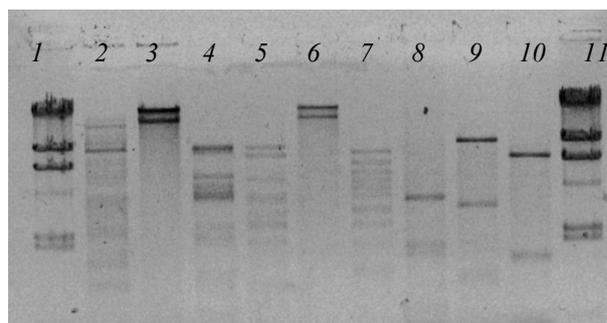


Рис. 2. Рестрикционные профили лактофагов G7, K1 и энтерококкофага S02:

1, 11 – маркер ДНК фага  $\lambda$ /*HindIII*; 2 – K1/*EcoRV*;  
3 – K1/*EcoRI*; 4 – K1/*HindIII*; 5 – G7/*EcoRV*;  
6 – G7/*EcoRI*; 7 – G7/*HindIII*; 8 – S02/*EcoRV*;  
9 – S02/*EcoRI*; 10 – S02/*HindIII*

Еще одним неоспоримым доказательством того, что новый бактериофаг не относится к группе лактофагов, являются результаты его титрования на коллекционных бактериях: ни один из 19 коллекционных штаммов *L. lactis* не обеспечивал репродукцию фагов штамма S02.

Поскольку бактериофаги в подавляющем большинстве случаев способны адсорбироваться и инфицировать клетки представителей только одного вида (гораздо реже рода), то выделенные энтерококкофаги S02 оказались хорошим инструментом для идентификации бактерий рода *Enterococcus*. При этом фаготипирование, по сравнению с процедурой секвенирования, является гораздо более простым и дешевым методом идентификации бактерий.

В ходе титрования энтерококкофагов S02 на газонах 26 выделенных термофильных молочнокислых кокков удалось зарегистрировать негативные колонии на 7 из них: 3/2, 2/1, 2/2, 301, 310, 400, 2б.

Полученные результаты указывают на относительно широкое распространение энтерококков в составе молочных продуктов, произведенных в Беларуси. Причиной данного обстоятельства может служить использование энтерококков в составе заквасок и бакконцентратов, что вполне возможно при отсутствии эффективных схем анализа и контроля видового разнообразия заквасок. В литературе встречаются данные об ошибочном включении в состав заквасок энтерококков вместо термофильных стрептококков [2]. При этом весьма вероятным обстоятельством может быть наследование этими бактериями генов патогенности, которые довольно часто встречаются у штаммов *Enterococcus sp.*

**Заключение.** Из молочных продуктов производства Республики Беларусь выделено и идентифицировано 8 штаммов энтерококков, которые составляют более 30% всех термофильных молочнокислых кокков, присутствующих в продуктах. Полученная выборка будет использована для изучения генов патогенности этих бактерий. Выделен и охарактеризован энтерококкофаг, который послужил удобным инструментом для фаготипирования бактерий.

## Литература

1. Mozzi, F. Biotechnology of Lactic Acid Bacteria. Novel Applications. / F. Mozzi, Raul R. Raya, Graciela M. Vignolo; ed. by F. Mozzi. – Iowa: Willey-Blackuell Publ., 2010. – 393 p.

2. Ботина, С. Г. Отечественные штаммы энтерококков, используемые в качестве заквасок, не содержат гены вирулентности, обычно присутствующие в штаммах *Enterococcus faecalis*. / С. Г. Ботина, В. В. Суходолец // Биотехнология. – 2005. – № 2. – С. 33–37.

3. Купрейчик, А. В. Дифференцирование лактофагов на основе рестрикционного анализа их ДНК / А. В. Купрейчик, А. П. Райский, Н. А. Белясова // 58-я студенческая научно-техническая конференция: материалы конф., Минск, 23–27 апр. 2007 г. / Белорус. гос. технол. ун-т. – Минск, 2007. – С. 53–55.

4. Райский, А. П. Биоразнообразие и идентификация распространенных на молочных комбинатах Беларуси лактофагов / А. П. Райский, С. Н. Шпилевский, Н. А. Белясова // Труды БГТУ. Сер. IV. Химия и технология органических веществ. – 2008. – Вып. XVI. – С. 166–168.

5. Novel bacteriophages in *Enterococcus ssp.* / M. Mazaheri [et al.] // Curr. Microbiol. – 2010. – Vol. 60. – P. 400–406.

Поступила 07.03.2011