

Е.Н. Бирюк<sup>1</sup>, С.Л. Василенко<sup>1</sup>, Н.Н. Фурик<sup>1</sup>,  
Д.В. Галиновский<sup>2</sup>, Е.Н. Сысолятин<sup>2</sup>, К.К. Яцевич<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Институт мясо-молочной промышленности, Минск, Республика Беларусь

<sup>2</sup> ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»,  
Минск, Республика Беларусь

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ БАКТЕРИЙ РОДА *LACTOCOCCUS*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ РАЗНЫХ ПРИРОДНЫХ ИСТОЧНИКОВ, С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА RFLP-ПЦР

(Поступила в редакцию 26.03.2015 г.)

Проведено генетическое типирование и дифференциация изолятов *Lactococcus lactis subsp. lactis* и *Lactococcus lactis subsp. lactis*bv. *diacetylactis*, выделенных из разных природных источников, с помощью RFLP-ПЦР метода.

**Введение.** Основой большинства бактериальных концентратов, производимых в настоящее время, являются лактококки, реже – термофильные стрептококки. Обычно в составе бактериального консорциума, который и составляет концентрат, используется от 3 до 7 различных штаммов *Lactococcus lactis* ssp. и от 1 до 3 – *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*[1].

На молокоперерабатывающих предприятиях всегда присутствует потенциальная опасность развития бактериофаговой инфекции, которая поражает микроорганизмы, входящие в бактериальные консорциумы. Это вынуждает проводить ротацию партий бактериальных концентратов, а также вести работу по постоянному обновлению фонда заквасочных культур и схем подбора бактериальных консорциумов.

Составление консорциумов ведется с использованием культур с разными производственно-ценными свойствами, в том числе фаготипом. Для создания устойчивых к фагам консорциумов необходимо использовать штаммы, имеющие низкий уровень внутривидового генетического родства, что стабилизирует их производственно-ценные свойства (газо-, аромато-, кислотообразование, фагоустойчивость и т.д.) и обеспечивает гарантированное получение ферментированных продуктов высокого качества.

Отбор штаммов с близкими характеристиками из ограниченного числа источников был основным способом получения традиционно

используемых в заквасочных консорциумах культур *Lactococcus lactis*, следствием чего стала высокая степень генетического родства данных микроорганизмов. Это в свою очередь может быть причиной периодически возникающих технологических проблем, прежде всего таких, как нарушение ферментации из-за поражения новыми высоко вирулентными формами бактериофагов, недостаточное кислотообразование и ухудшение органолептических свойств ферментированных молочных продуктов. В связи с этим, в качестве этапа поиска новых заквасочных культур лактококков, целесообразным представляется использование молекулярного типирования, позволяющего дифференцировать штаммы по генотипу, а затем объединять в бактериальные консорциумы промышленно-ценные микроорганизмы, которые при этом максимально различаются генетически.

Для выявления внутривидовой генетической гетерогенности при необходимости анализа большого количества штаммов наиболее часто применяют методические подходы, основанные на использовании полимеразной цепной реакции: амплификация со случайными праймерами (RAPD), амплификация переменных участков генома (Rep-ПЦР) и риботипирование (ITS-ПЦР) [2–5].

При проведении RAPD в качестве праймеров используют короткие (около 10 оснований) последовательности, предварительно подобранные эмпирически. Успешный подбор праймера позволяет получить набор продуктов амплификации различной длины, индивидуальный для каждого штамма и в определенной степени сходный у родственных штаммов. Результат амплификации при использовании случайных праймеров в большой степени зависит от качества подготовки матричной ДНК и ее количества в реакционной смеси. Поэтому проведение RAPD-анализа сопряжено с дополнительными издержками, связанными с выделением и очисткой ДНК.

Гораздо более надежные результаты могут быть получены с помощью Rep-ПЦР, основанной на амплификации переменных участков генома, расположенных между консервативными участками повторяющихся последовательностей (Rep-элементов), примером которых могут быть REP-, ERIC-, BOX-, SERE- элементы [6–10]. Повторяющиеся последовательности встречаются в геномах различных микроорганизмов. Количество и/или расположение Rep-элементов уникально для конкретной бактерии. Соответственно, использование

праймеров комплементарных Rep-элементам приводит к получению уникального набора продуктов амплификации.

**Материалы и методы исследования.** В экспериментах использовали 4 культуры из Централизованной отраслевой коллекции промышленных штаммов молочнокислых бактерий РУП «Институт мясо-молочной промышленности» (999М-А, 1047МА-D, 1896М-А, В132), а также изоляты лактококков, выделенные из различных природных источников: 33 изолята молочного лактококка и 26 изолятов ароматобразующего лактококка (табл. 1).

*Выделение ДНК* проводили методом лизиса в присутствии Chelex 100. С этой целью клетки исследуемого штамма ресуспендировали в суспензии 5% Chelex® 100 (1 колония на 50 мкл). Затем образцы выдерживали на кипящей водяной бане в течение 5 мин., после чего сразу же охлаждали в тающем льду в течение 5 мин. Для обеспечения надежного лизиса процедуру кипячения-охлаждения повторяли.

*Проведение Rep-ПЦР.* ПЦР осуществляли в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 1X ПЦР буфера, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 мкМ dNTP; 60 пкмоль праймера, 1 УТаq-полимеразы (Диалат, Москва) и 0,5 мкл клеточного лизата в качестве матрицы. В исследовании использовали праймеры ERIC1R-1, ERIC 2-1, BOXA1R.

Таблица 1 – Характеристика используемых бактериальных культур

Номер изолята	Источник выделения	Место отбора	Время отбора
1	2	3	4
<i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i>			
p50/6	яблоко	г. Дрогичин, Брестская обл.	сентябрь 2009
p51/9	яблоко	г. Молодечно, Минская обл.	сентябрь 2009
p55/10	груша	г. Молодечно, Минская обл.	сентябрь 2009
p57/7	груша	г. Щучин, Гродненская обл.	сентябрь 2009
p59/5	яблоко	д. Янушковичи, Логойский р-н	сентябрь 2009
p62/2d	эхинацея (листья)	д. Янушковичи, Логойский р-н	сентябрь 2009
p49/3-6	яблоко	г. Браcлав, Браcлавский р-н, Витебская обл.	сентябрь 2009
p98/4-8	яблоко	д. Богино, Браcлавский р-н, Витебская обл.	сентябрь 2009
p118/5	молоко	ГМЗ №2, г. Минск	октябрь 2009
p133/7	яблоко	д. Лысовичи, Минская обл.	ноябрь 2009
p159/1, p159/3, p159/4, p159/5, p159/6, p159/7, p159/10	ель (хвоя)	г. Толочин, Витебская обл.	апрель 2010

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4
p189/1-3	волчьи ягоды	д. Дегтяревка, Минский р-н, Минская обл.	апрель 2010
p297/9	молоко цельное	д. Шишчицы, Минский р-н Минская обл.	февраль 2011
p306/3	молоко цельное	г. Молодечно, Молодечненский р-н, Минская обл.	февраль 2011
p320/2	сосна (хвоя)	г. Раков, д/о Исlochь, Минская обл.	февраль 2011
p585/2, 585/3, p585/5, 585/3d	ромашка	д. Пацки, Дзержинский р-н, Минская обл.	август 2011
p615/5, p615/6, p615/9, p615/10,	манжетка	д. Подбережье, Пуховичский р-н, Минская обл.	август 2011
p642/8, p642/9	цельное молоко	д. Павловичи, Зельвинский р-н, Гродненская обл.	октябрь 2011
1095/4-1-9	ландыш (цветки)	д. Янушковичи, Логойский р-н, Минская обл.	май 2008
1239/4-3	слива (цветки)	д. Янушковичи, Логойский р-н, Минская обл.	апрель 2009
<b><i>Lactococcus lactis</i> sp. <i>lactis</i> bv. <i>diacetylactis</i></b>			
p154/1, p154/2, p154/3, p154/4, p154/5, p154/6, p154/7, p154/8, p154/9, p154/10	ромашка (листья)	д. Заполье, Новогрудский р-н, Гродненская обл.	апрель 2010
p288/3	яблоня (побеги)	м-н Лошица, г. Минск	январь 2011
p468/6-8	ясень (листья)	Косовский замок, д.Косово, Ивацевичский р-н Брестская обл.	май 2011
p469/7-1, p469/7-5, p469/7-6	рябинник	Косовский замок, д.Косово, Ивацевичский р-н, Брестская обл.	май 2011
p576/7, p576/8	яблоко	д. Новодевятковичи, Слонимский р-н, Гродненская обл.	август 2011
p606/4, p606/6, p606/7, p606/8	щука (глаза, жабры)	р. Припять	август 2011
p749/4-1, p749/4-2, p749/4-4	верба (цветки и листья)	г. Орша, Оршанский р-н, Витебская обл.	май 2012
392/3	яблоко	д. Большие Пруссы, Копыльский р-н	сентябрь 2008
1164/4-3-7	сосна (хвоя)	а.г. Раков, Воложинский р-н	март 2009

Продукты ПЦР разделяли с помощью электрофореза в 2% агарозном геле в 1X TBE буфере. Гель окрашивали бромистым этидием и фотографировали в ультрафиолетовом свете.

Кластерный анализ полученных ПЦР-профилей осуществляли с помощью программы TREECON for Windows (version 1.3b) [12]. Бинарные матрицы исходных данных получали вручную после визуализации гелей, обозначая присутствие фрагмента как 1, а его отсутствие – 0. Анализ осуществляли методом невзвешенного попарного среднего (UPGMA). Бутстрап вычисляли по выборке из 100 деревьев. Критерием устойчивости кластера считали значение бутстрапа выше 50.

**Результаты и их обсуждение.** На основании полученных результатов, исследуемые культуры *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* достоверно разделены на три генетически различающиеся группы (I, II и III) (рис. 1).

Наибольшее количество исследованных культур отнесены к I группе – 23 изолята из 13 природных образцов и три коллекционные культуры.

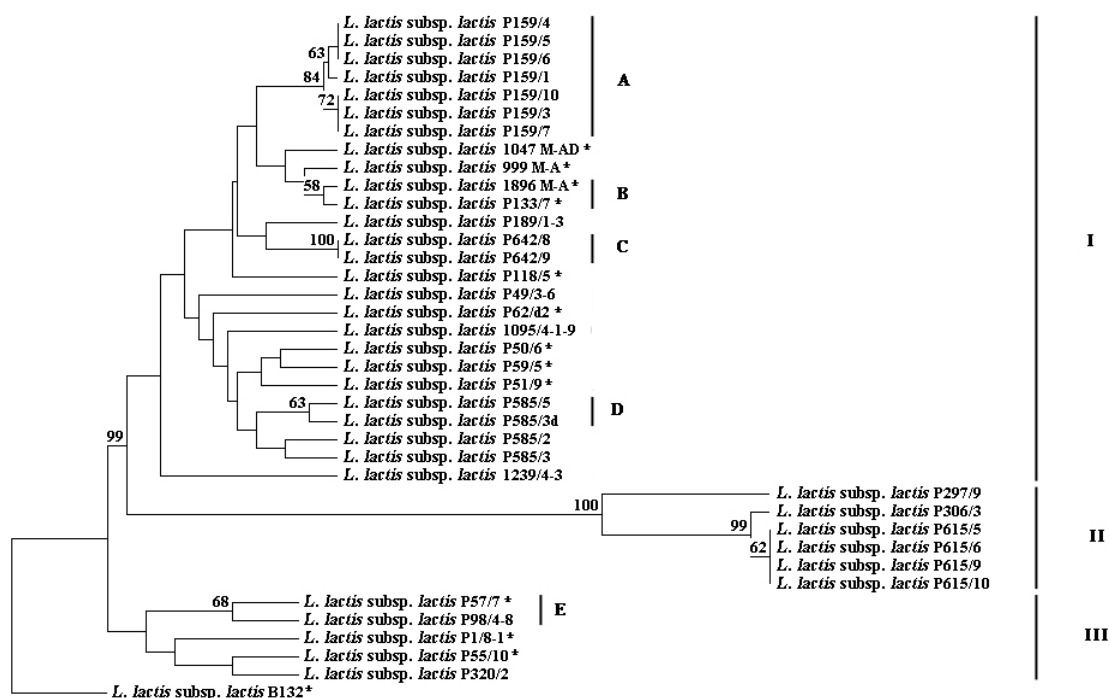


Рисунок 1 – Суммарное филогенетическое дерево, полученное при типировании *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* с помощью Rep-ПЦР. Указано значение бутстрапа больше 50.

Внутри данной группы выделено несколько подгрупп, изоляты в которых характеризовались наиболее заметным достоверным генетическим сходством, причем в состав каждой из трех подгрупп входили изоляты, выделенные из одного природного источника: еловой

хвои, отобранной на территории г. Толочина (подгруппа А), цельного молока из хозяйства д. Павловичи (подгруппа С), ромашки из д. Пацки (подгруппа D).

Наиболее уникальной оказалась подгруппа В с невысоким уровнем бутстрапа, к которой отнесены коллекционный штамм 1896 М-А (из цветов г. Туапсе) и изолят р133/7 (из яблока д. Лысовичи).

Для всех штаммов внутри II группы положение в филогенетическом дереве было определено с высоким уровнем бутстрапа. При этом, изоляты, выделенные из двух природных образцов, полученных в разное время из разных образцов: молока цельного из г. Молодечно (отбор проб провели в феврале 2011 г.) и манжетки из д. Подбережье (отбор проб провели в августе 2011 г.), оказались практически идентичны.

Высокий уровень достоверности ветвей, численно выраженный значением бутстрапа, узлов филогенетического дерева в участке группы II подтверждает эффективность внутривидовой генетической дифференциации *L. lactis* subsp. *lactis* с помощью метода Rep-ПЦР.

К группе III отнесены пять изолятов, полученных из разных природных образцов, отобранных в различных географических регионах Республики Беларусь и на Украине, а наиболее близкое родство определено для двух из них, выделенных из груши из г. Щучина Гродненской обл. (р57/7) и яблока из д. Богино Браславского р-на Витебской обл. (р98/4-8) (рис. 1, табл.1).

Одна коллекционная культура – типовая культура *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* В 132 не вошла ни в одну из охарактеризованных групп.

Таким образом, при конструировании заквасочных консорциумов рекомендуется использовать изоляты генетически различающиеся между собой: культуры, относящиеся к генетической группе I, комбинировать с изолятами из генетических групп II и III.

На основании полученных результатов, исследуемых культур *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* в. *diacetylactis* достоверно выделено две группы (I и II) (рис.2).

Внутри I группы полную идентичность показали изоляты р154/1-р154/10, выделенные из одного природного образца (ромашка), а также изоляты р749/4-1, р749/4-2 и р741/4-4 (выделенные из листьев вербы).

Внутри II группы выделено несколько подгрупп, в которых изоляты характеризовались заметным генетическим сходством: генетическая однородность определена для изолятов р606/7 и р606/8

(выделены из глаз и жабр щуки), а также с более низким уровнем бутстрап-поддержки для подгруппы, включающей изоляты 392/3, 1164/4-3-7, p288/3 (выделены из различных природных образцов, отобранных в разное время в различных регионах Беларуси) и подгруппы, включающей изоляты p468/6-8, p469/7-1, p469/7-5, p469/7-6 (выделены из разных природных образцов, отобранных в д.Косово).

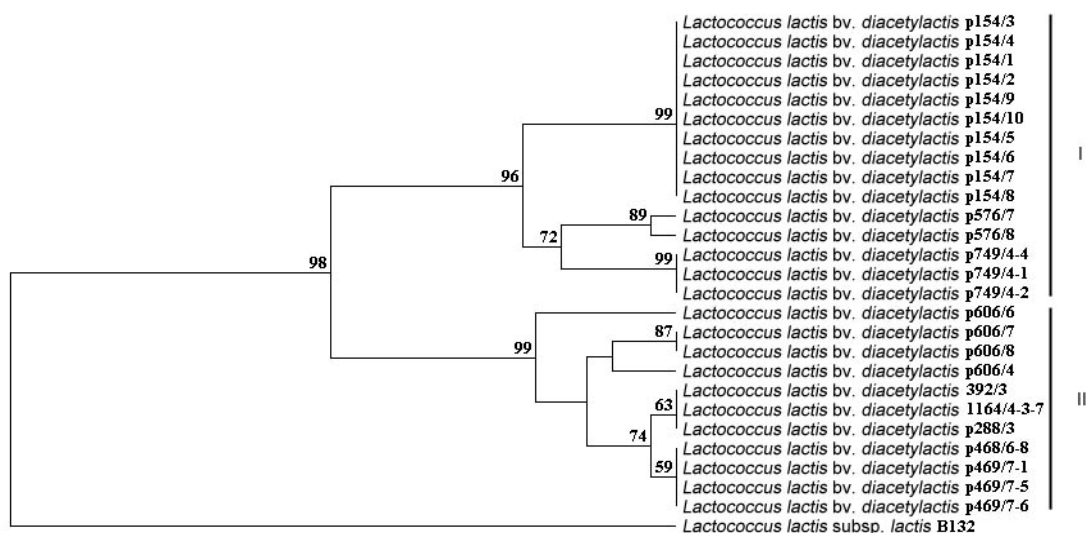


Рисунок 2 – Суммарное филогенетическое дерево, полученное при типировании *L. lactis* subsp. *diacetylactis* помощью Rep-ПЦР. Указано значение бутстрапа больше 50.

Таким образом, изоляты ароматобразующих лактококков, выделенные из природных источников, характеризуются более высоким генетическим родством и генетической однородностью, чем штаммы молочного лактококка.

**Заключение.** С помощью метода Rep-ПЦР проведено генетическое типирование и дифференциация изолятов *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis*, выделенных из разных природных источников, что позволит использовать в составе консорциумов изоляты относящиеся к разным филогенетическим группам различающиеся между собой генетически.

## Литература

1. Банникова, Л.А. Микробиологические основы молочного производства: Справочник / Л.А. Банникова, Н.С. Королева, В.Ф. Семенихина. – М.: Агропромиздат, 1987 – 400 с.
2. Giraffa, G. Monitoring of the bacterial composition of dairy starter cultures by RAPD-PCR / G. Giraffa, L. Rossetti // Ital. J. Food Sc. – 2000. – Vol. 12, № 4. – P. 403–423.
3. Application of RAPD analysis for identification of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* strains isolated from artisanal cultures / D. Samarzija[et. al.] // Microbiol Res.– 2002. –Vol. 157.– P. 13–17.
4. Random amplified polymorphic DNA and amplified ribosomal DNA spacer polymorphism: powerful methods to differentiate *Streptococcus thermophilus* strains /G. Moschetti[et. al.]// J Appl Microbiol.–1998. – Vol. 85. – P. 25–36.
5. Olive, D.M. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms / D.M. Olive, P. Bean // J. Clin. Microbiol. – 1999. –Vol. 37. –P. 1661–1669.
6. Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome / M.J. Stern [et. al.] // Cell. – 1984. – Vol. 37. – P. 1015–1026.
7. Versalovic, J. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes /J. Versalovic, T. Koeuth, J.R. Lupski // Nucleic Acids Res. –1991. –Vol. 19. – P. 6823–6831.
8. Koeuth, T. Differential subsequence conservation of interspersed repetitive *Streptococcus pneumoniae* BOX elements in diverse bacteria /T. Koeuth, J. Versalovic, J.R. Lupski // Genome Res. –1995. –Vol. 5. – P. 408–418.
9. SERE, a widely dispersed bacterial repetitive DNA element / G. Rajashekar[et. al.]// J. Med. Microbiol. –1998. –Vol. 47. –P. 489–497.
10. Novel BOX repeat PCR assay for high-resolution typing of *Streptococcus pneumoniae* strains / A. Van Belkum[et. al.]//Clin. Microbiol. – 1996. –Vol. 34. –P. 1176–1179.
11. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers /J.G.K. Williams [et. al.]// Nucleic Acids Res. –1990. – Vol. 18. –P. 6531–6535.



12. Van de Peer, Y. TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment / Y. Van de Peer, Y. De Wachter // Comput. Applic. Biosci. – 1994. –Vol. 10. –P. 569–570.

*A. Biruk, S. Vasylenko, N. Furik,*

*D. Galinowsky, E. Sysaliatsin, K. Yatsevich*

**THE STUDY OF GENETIC DIVERSITY OF  
*LACTOCOCCUS* BACTERIA ISOLATED FROM DIFFERENT  
NATURAL SOURCES USING REP-PCR METHOD**

**Summary**

The results of genetic typing and differentiation of bacteria *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* bv. *diacetylactis* isolated from different natural sources using Rep-PCR method are presented in the article.