

ӘОЖ 579.864.1
ГТАМР 62.41.99

ҚАЗАҚСТАННЫҢ ОҢТҮСТІК ӨңІРІНДЕГІ ӨСІМДІК ШИКІЗАТЫНАН АЛЫНҒАН СҮТ ҚЫШҚЫЛДЫ БАКТЕРИЯЛАРДЫ ЖІКТЕУ

Исмаилова М.Е.¹, Хани А.Б.¹, Карипбаева Р.К.¹

¹І.Жансүгіров атындағы Жетісу университетінің биотехнология мәселелері
ғылыми-зерттеу институты, Талдықорған, Қазақстан

Аңдатпа

Лактобациллалар көптеген табиғи ортада кең таралған, олар ашу процесінде маңызды рөл атқарады. Бұл түрлердің кейбіреулері сүт қышқылы бактерияларының тобына жатады, ашытылған өнімдерді пайдалы қасиеттермен байытады. Лактобациллалардың бір түрі *L. plantarum* денсаулыққа пайдалы, бірақ оны анықтау басты мәселелердің бірі болып табылады. Зерттеу жұмысының жаңалығы полимеразды тізбекті реакция (ПТР) әдісін қолдана отырып, Өсімдік шикізатынан оқшауланған сүт қышқылы бактерияларын жіктеу, олардың қасиеттерін зерттеу, сонымен қатар заманауи 16S rRNA молекулалық генінің нуклеотидтер тізбегін талдау әдістерімен жіктелді. Анықталған штаммның маңызды, пайдалы сәттерін көрсете отырып, өндірісте қолдану. Зерттеу мақсаты: Қазақстанның оңтүстік аймағында өсірілетін қияр (*Cucumis sativus* L.) және беде (*Truolium pereps*) сорттарынан бөлінген лактобактерияларды алу және жіктеу. Сүт қышқылды бактерияларды жіктеуде қолданатын заманауи әдіс Полимеразды тізбекті реакциясы болып табылады. Штаммдардың генотиптік және фенотиптік сипаттарын зерттей отырып іске асырылады. Әдістеме арнайы сатылармен орындалады.

Түйінді сөздер: сүтқышқылы микроорганизмдер, сәйкестендіру, ПТР, праймерлер, РНК 16s, Gene Bank.

УДК 579.864.1
МРНТИ 62.41.99

КЛАССИФИКАЦИЯ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ ИЗ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ ЮЖНОГО РЕГИОНА КАЗАХСТАНА

Исмаилова М.Е.¹, Хани А.Б.¹, Карипбаева Р.К.¹

¹Научно-исследовательский институт проблем биотехнологии Жетысуского
университета им. И.Жансугурова, Талдықорған, Казахстан

Аннотация

Лактобациллы широко распространены во многих природных средах, которые играют важную роль в процессе вскрытия. Некоторые из этих видов относятся к группе молочнокислых бактерий, обогащает ферментированных продуктов полезными свойствами. Один из видов лактобацилл *L. plantarum* полезен для здоровья, но его идентификация является одной из главных проблем. Новизна исследовательской работы была классифицирована методами классификации молочнокислых бактерий, выделенных из растительного сырья с применением метода полимеразной цепной реакции (ПЦР), изучения их свойств, а также анализа нуклеотидной последовательности современного молекулярного гена 16S rRNA. Применение в производстве с указанием важных, полезных моментов выявленного штамма. Цель исследования: извлечение и классификация лактобактерий,

выделенных из сортов огурца (*Cucumis sativus* L.) и клевера (*Trupolium repens*), выращиваемых в южном регионе Казахстана. Современным методом, используемым при классификации молочнокислых бактерий, является полимеразная цепная реакция. Проводится с изучением генотипических и фенотипических характеристик штаммов. Методика выполняется по специальным ступеням.

Ключевые слова: молочнокислые микроорганизмы, идентификация, ПЦР, праймеры, РНК 16S, Gene Bank.

UDS 579.864.1

SCSTI 62.41.99

CLASSIFICATION OF LACTIC ACID BACTERIA FROM PLANT RAW MATERIALS OF THE SOUTHERN REGION OF KAZAKHSTAN

Ismailova M.E.¹, Khani A.B.¹, Karipbayeva R.K.¹

Scientific and Research Institute of Biological Diseases of Zhetysu University named after I. Zhansugurov, Taldykorgan, Kazakhstan

Summary

Lactobacilli are widely distributed in many natural environments, which play an important role in the autopsy process. Some of these species belong to the group of lactic acid bacteria, which enriches fermented foods with useful properties. One type of Lactobacillus, *L. plantarum*, is good for health, but its identification is one of the main problems. The novelty of the research work was classified by methods of classification of lactic acid bacteria isolated from plant raw materials using the method of polymerase chain reaction(PCR), studying their properties, and analyzing the nucleotide sequence of the modern molecular gene 16S rRNA. Use in production with an indication of important, useful points of the identified strain. The purpose of the study: extraction and classification of lactobacilli isolated from cucumber (*Cucumis sativus* L.) and clover (*Trupolium herpes*) varieties grown in the southern region of Kazakhstan. The modern method used in the classification of lactic acid bacteria is the polymerase chain reaction. It is carried out with the study of genotypic and phenotypic characteristics of strains. The technique is performed using special steps.

Keywords: lactic acid microorganisms, identification, PCR, primers, 16S RNA, Gene Bank.

Введение

Молочнокислые бактерии имеют практическое значение. Антагонистические свойства молочнокислых бактерий начали применять с древнейших времен: продукты жизнедеятельности молочнокислых бактерий считались одним из первых антисептиков народной медицины на основе бактерий. Штаммы молочнокислых бактерий широко используются в качестве пробиотиков для человека и животных. Молочнокислые бактерии широко распространены в природе и имеют важное значение в ферментационных процессах. Среди лактобактерий *Lactobacillus plantarum* является одним из основных видов, который обладает огромной пользой для здоровья, в том числе выполняет функции улучшения функции желудочно-кишечного тракта, иммунной модуляции и снижения уровня холестерина [1]. *L. Plantarum*- гомоферментативная лактобактерия, встречается в основном в ферментированных или консервированных пищевых продуктах. *L. plantarum* завершает заключительную стадию ферментации, имеет более высокую

кислотостойкость при естественной ферментации или консервировании фруктов и овощей чем другие бактерии [2]. Идентификация лактобактерий является одной из значимых проблем прикладной микробиологии. Для идентификации клеток лактобактерий используются *Lactobacillus spp.* и *Bifidobacterium spp.*, СКС, ДНК зонды и ПЦР-праймеры. Ген TUF, гены рРНК 16S и 23s получены из последовательности гена гесА в качестве праймеров и зондов. Методы ПЦР используются одновременно для количественной идентификации клеток лактобактерии в культуре или в образцах ферментированной пищи. Ростовая и ферментативная активность *L. plantarum* оказывает существенное влияние на конечный продукт в огурцах и капусте, т. е. на качество ферментации [3].

Материалы исследования: сорта огурца (*Cucumis sativus L.*) и клевера ползучего (*Trifolium repens*), выращиваемые в южной части Казахстана. Для выделения лактобактерий из огурцов и клевера, растения помещают в соляной раствор (7-9% NaCl).

Методы исследования

- Окраска по Граму: все исследуемые штаммы являются грамположительными микроорганизмами;
- Исследуемые штаммы бактерии растут в питательной среде при pH 9,2-9,6; оптимальная температура 35-37°C;
- В питательных средах, содержащих 2, 4, 6% поваренной соли, рост наблюдался в штаммах, выделенных из клевера; все исследуемые штаммы могут расти в среде с предельным содержанием соли 40% ;
- Сбраживание молока исследуемыми штаммами микроорганизмов происходит 6-9 часов и предел кислотного образования колеблется от 90-127°Т;
- Штаммы микроорганизмов способны образовывать аммиак;
- В качестве источника углерода штаммы применяют глюкозу, лактозу, сахарозу, фруктозу, мальтозу. Рост лактобактерий при различных водородных показателях и температурных условиях различен. Рост лактобактерий при различных водородных показателях и температурных условиях различен. Показатели указанные в 1 таблице.

Таблица 1 Вероятность роста лактобактерий

Показатели	Температура		
	25° С	30° С	35° С
pH= 3,8 рост	+	-	-
pH= 3,9 рост	-	+	-
pH= 4,0 рост	+	-	+
pH= 4,2 рост	+	+	+

Для изучения движений были разработаны препараты, содержащие живые клетки. Все исследования проводились традиционными методами: капельным методом, с использованием светового микроскопа.

Результаты исследования морфологических свойств отобранных штаммов бактерий представлены в 2 таблице.

Согласно данным таблице штаммы бактерий штаммы порядковый номер №1-5 грамположительные, шаровидные неподвижные микроорганизмы, неспособные к спорообразованию. Штаммам №6-8 характерна палочковидная форма, штаммы грамположительные, неподвижные и не образующие спор.

Таблица 2 Морфологические свойства полученных штаммов лактобактерий

№	Шифр штаммов	Морфология культур	Окрашивани е в граммах	Подвижн ость	Спорообразу ющая способность
1	1	Отдельные кокки, малые группы	+	-	-
2	2	Цепные кокки	+	-	-
3	4	Индивидуальные палочки, короткие цепные палочки	+	-	-
4	6	Цепные кокки	+	-	-
5	9	Диплоки, короткие цепи	+	-	-
6	10	Отдельные кокки, малые группы	+	-	-
7	13	Индивидуальные палочки, короткие цепные палочки	+	-	-
8	15	Индивидуальные палочки, короткие цепные палочки	+	-	-

Результаты исследования

После морфологических, культуральных, физиолого-биохимических исследований проводится анализ 16S РНК для идентификации штаммов микроорганизмов. 16S рРНК является одним из трех основных типов рРНК и является основным рибосомы прокариот. Числа в названии РНК равны значению константы седиментации. На первом этапе был проведен сев каждой исследуемой культуры и получена биомасса для проведения анализа РНК 16S. Далее были выделены молекулы ДНК. Выделение ДНК из многих видов растений считается чрезвычайно сложным из-за концентрации вторичных метаболитов, таких как полисахариды и полифенолы, а также белков, жиров и ингибиторов в образце.

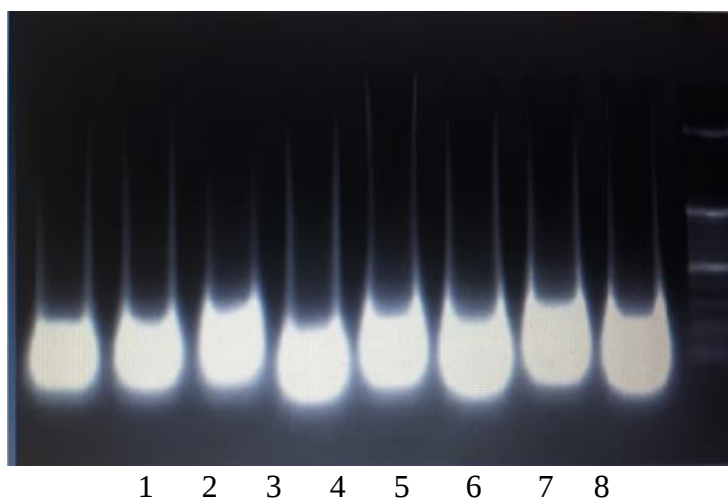


Рисунок 1 Электрофореграмма ДНК, выделенная из штаммов микроорганизмов, указана в 1% агарозном геле

Получены консервативные праймеры и режимы для обработки кодируемых генов 16s РНК – 8f (AGAGTTGATCTGCTCAG) и 1492r (GCYTACCTTGTGTACGACTT) 926r – CCGTCAATTCCTTTAGTTT. В целом режим амплификации метода ПЦР состоял из 35 циклов. Требования к амплификации методом ПЦР: в первом случае денатурация ДНК 95°C – 5 минут, во втором случае денатурация ДНК 95°C – 30 сек. температура нагрева рекомендуемых праймеров составляет 45°C – 55°C 1 минута и стадия элонгации температура 72°C 45 сек., последняя стадия синтеза проводилась в пределах 72°C – 5 мин. При визуализации ПЦР-продукта электрофорез проводился в 1% агарозном геле несколько минут.

Объем реакционных смесей составил 25 мкл. Смесь содержит: 2,5 мкл 10 X буфер; 1,5 мкл 25 mM MgCl₂; 4 мкл 0,2 mM концентрационный dNTP; 0,5 мкл Taq polymerase фермент; 1,0 мкл 25 мкМ праймер; 3 мкл ДНК и дистиллированная вода 12,5 мкл.

В нашем исследовании генетическая идентификация 8 штаммов осуществлялась методом определения прямой нуклеотидной последовательности фрагмента гена 16s rRNA, в последующем осуществлено сравнение нуклеотидной идентичности с последовательностями, переданными на хранение в международной базе данных Gene Bank. В результате выделения ДНК были получены образцы с высокой концентрацией ДНК от 80 до 150 нг/мкл, длина волн составила 260/280 в среднем 1,99. Методом ПЦР амплифицирована фрагмент гена 16S rRNA с молекулярной массой около 800 п.н.

Генетическое родство исследованных штаммов гена 16S rRNA составляет 98% относительно *Lactobacillus plantarum*. Определили лимит ПЦР праймеров согласно описанным действиям. В соответствии с описанными условиями молекулярная масса 4-го образца (техника поверхностного посева, при 25 °C) равна 598 bp, эти штаммы получены в результате ПЦР. Для быстрой идентификации и определения видов бактерий РНК анализирует последовательность 16S, 23S и 16S-23S генов ITS, производит родственные и турспецифические олигонуклеотидные праймеры и зонды [4]. Однако сложно определить *Lactobacillus plantarum*, так как генотип, фенотип, последовательность цепей *L. pentosus* являются похожими на *L. paraplantarum*. В этой связи, использование цепи ITS *L. plantarum* праймер LPL-1/LPL-2, относящийся к двум штаммам *L. pentosus*, определяет, что ложный положительный результат не показывает. Особенность этих ПЦР праймеров праймеры *L. plantarum* были похожи на праймер готового гена гесА. Это праймеры гена гесА может отличить штамма *L. paraplantarum* от штаммов *L. pentosus* и *L. plantarum*.

L. plantarum гомоферментативные и аргинин негативные, мезофильные бактерии. Формы колоний, которые произрастали из общих моделей, агара MRS, белые и неправильные формы, а также центры некоторых из них были приподняты. Согласно результатам работы *L. plantarum* является толерантным к NaCl, чем другие штаммы, и они могут расти на 8% NaCl [5].

Заключение

При использовании 16 и LPL видеоспецифических праймеров при обработке фрагмента размером 265 п.н установлено, что исследуемый штамм относится к виду *Lactobacillus plantarum*. Отсутствие фрагментов при использовании праймеров 16 и Lrapl, 16 и Lpe показывает, что исследуемый штамм не относится к видам *Lactobacillus paraplantarum* и *Lactobacillus pentosus*. По результатам проведенного

анализа Секвенс вариабельных участков генов, кодирующих РНК 16s, доказано, что *Lactobacillus plantarum* (99%) относится к виду. Изучены морфологическими, культурными, физиолого-биохимическими методами и их результаты представлены в таблице. Идентификацию исследуемых штаммов бактерий осуществлял методом ПЦР. Анализ ПЦР показал, что праймер *Lpl* характерен для типа *Lactobacillus plantarum*. Методом ПЦР классифицированы молочнокислые бактерии из растительного сырья. Вырабатывая молочнокислые бактерии из различных источников сырья, можно получить микроорганизмы, необходимые для производства, путем изучения новых штаммов.

Литература

1. Руководство к практическим занятиям по сельскохозяйственной микробиологии: Для высш. с.-х. учеб.заведений по агр. спец. / под ред. Г.И. Ежова; изд. 2-е, перераб. и доп. – М.: Высш. – М.: Высшая школа, 2011.
2. Гриневич, А.Г. Молочнокислые бактерии. Селекция промышленных штаммов. – М.: Высшая школа, 2006. – 400 с.
3. Цугкиев Б.Г. Синбиотические кисломолочные продукты функционального назначения / Цугкиев Б.Г., Кабисов Р.Г., Рамонова Э.В. // Известия Горского государственного аграрного университета. - 2016. – Т.53. –Ч.1. – 102-108 бет.
4. Точилина, А.Г. Биохимическая и молекулярно-генетическая идентификация бактерий рода *Lactobacillus*: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.04, 03.00.07 / А.Г.Точилина; Нижегород. НИИ эпидемн. и микробиол. – Нижний Новгород, 2012. – 263с
5. Горбачева, Е.С. Современные тенденции отбора и идентификации производственно-ценных штаммов, сбраживающих лактозу / Е.С. Горбачева // СевКавГТУ. Серия «Продовольствие», 2006. №2. – С. 24.