

ЛОКАЛИЗАЦИЯ ГЕНОВ УСТОЙЧИВОСТИ К АНТИБИОТИКАМ У БИФИДОБАКТЕРИЙ

В.А. Щетко, Н.А. Головнева, Н.И. Астапович А.Н. Евтушенков*, С.А. Кулиш*

Институт микробиологии НАН Беларуси, г. Минск, Беларусь, natali@mbio.bas-net.by

**Белорусский государственный университет, г. Минск, Беларусь, evtushenkov@bsu.by*

В настоящее время биопрепараты, содержащие живые бактерии нормофлоры (пробиотики), в том числе бифидобактерии, находят широкое применение в ветеринарной практике и медицине. Представители рода *Bifidobacterium*, являясь основными компонентами нормальной микрофлоры кишечника теплокровных животных и человека, оказывают положительное воздействие на организм хозяина. По мнению ряда исследователей бифидобактерии являются индикатором здоровья макроорганизма [1]. Нарушения в нормальном составе микрофлоры возникают при разнообразных стрессовых воздействиях, и, главным образом, в связи с применением антибактериальных препаратов широкого спектра действия. Возникающий при этом дефицит бифидобактерий изменяет симбиотическое равновесие микрофлоры желудочно-кишечного тракта, способствует реализации патогенного действия условно патогенных форм микроорганизмов, развитию дисбактериоза. Использование бифидобактерий в качестве биотерапевтических агентов приводит к нормализации микрофлоры кишечника, подавлению развития гнилостной и высоковирулентной микрофлоры, улучшению иммунного статуса организма. Однако их применение обычно проводится на фоне антибиотиков и других антибактериальных препаратов широкого спектра действия. В связи с этим актуальным является получение штаммов бифидобактерий, обладающих признаком полирезистентности к широко используемым антибиотикам.

Ранее нами был изучен спектр антибиотикорезистентности различных штаммов бифидобактерий к широко используемым в медицине и ветеринарной практике антибактериальным препаратам, а также получены штаммы бифидобактерий обладающие высокой устойчивостью к антибиотикам с различным механизмом действия [2].

Целью данной работы являлось определение локализации генов, отвечающих за устойчивость бифидобактерий к некоторым антибиотикам.

Объектами исследований служили штаммы бифидобактерий *Bifidobacterium adolescentis* МС-42, *B.bifidum* 791, *B.longum* В379М, любезно предоставленные ВНИКМИ и МНИИЭМ им. Г.Н.Габричевского, а также штамм *B.adolescentis* 91-БИМ, полученный в лаборатории биохимии микроорганизмов путем аутоотбора из *B.adolescentis* МС-42. Для трансформации был использован штамм бактерий *E.coli* XL1-Blue со следующей генотипической характеристикой: F[']:: Tn10 pro A⁺B⁺ lac I^a Δ (lacZ) M15/recA1 end A1 gurA96 (Nal^r) thi hsdR17 (r_k - m_k+) sup E44 relA₁ lac, а также искусственно синтезированная плазмида pUC-18.

На начальном этапе исследования были отработаны методы выделения ДНК бифидобактерий – плазмидной и хромосомной. У исследуемых штаммов бактерий не обнаружено присутствие плазмид. Выделенная ДНК бифидобактерий обрабатывалась последовательно РНКазой и смесью фенол-хлороформ. Для дальнейшей работы была взята ДНК штамма *B.adolescentis* 91-БИМ. Линеаризацию плазмиды pUC-18 проводили эндонуклеазой рестрикции *SalI*. Образцы хромосомной ДНК *B.adolescentis* 91-БИМ также обрабатывались по сайтам рестрикции *SalI*. Аналогично готовили банки генов по рестриктазам *EcoRI* и *HindIII*.

Далее полученные фрагменты ДНК были клонированы в плазмиду pUC-18 по сайтам рестрикции. Полученные трансформанты высевались на селективные среды, содержащие ампициллин и канамицин в концентрации 50 мкг/мл и 20 мкг/мл, соответственно. В результате скрининга отобраны два клона при клонировании по SalI, в плазмидах которых рестрикционный анализ показал наличие вставки ДНК *V.adolescentis* 91-БИМ размером около 6000 п.н., содержащей гены резистентности к антибиотикам пенициллинового ряда и аминогликозидам (рис.1).

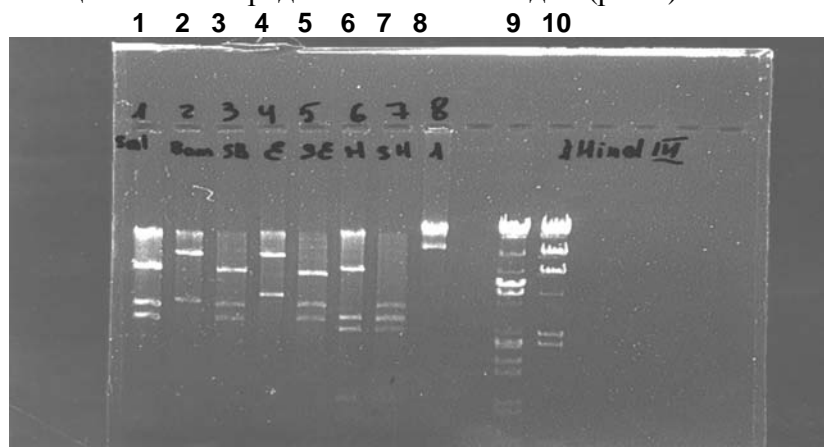


Рис 1. Рестрикционный анализ вставки ДНК *V.adolescentis* 91-БИМ
 1. SalI, 2. BamHI, 3. SalI+ BamHI, 4. EcoRI, 5. SalI+ EcoRI, 6. HindIII,
 7. SalI+ HindIII, 8. pUC-18 со вставкой ДНК *V.adolescentis* 91-БИМ
 9. ДНК фага λ разрезанного рестриктазами HindIII+ EcoRI.
 10. ДНК фага λ разрезанного рестриктазой HindIII.

Последующий рестрикционный анализ по сайтам рестрикции PstI, EcoRI, HindIII, BamHI, SalI позволил составить рестрикционную карту локуса хромосомной ДНК *V.adolescentis* 91-БИМ, отвечающего за устойчивость к антибиотикам пенициллинового ряда и аминогликозидам (рис.2).

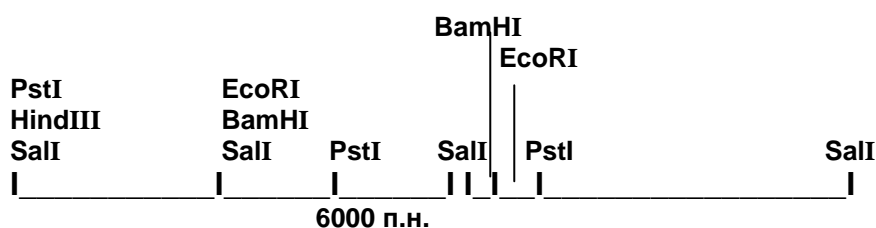


Рис.2 Рестрикционная карта локуса ДНК хромосомной ДНК *V.adolescentis* 91-БИМ, отвечающего за устойчивость к антибиотикам пенициллинового ряда и аминогликозидам.

ЛИТЕРАТУРА

1. De Roos N.M., Katan M.B. Effects of probiotic bacteria on diarrhea, lipid metabolism, and carcinogenesis: a review of papers published between 1988 and 1998. // Am.J.Clin.Nutr. –2000.-V.71.-P.405-411.
- 2 Щетко В.А., Головнева Н.А., Астапович Н И., Былицкая Л.В., Евтушенко А.Н., Кулиш С.В. Антибиотикорезистентность бифидобактерий. // Молекулярная генетика, геномика и биотехнология. Материалы международной науч. конф. Минск, 24-26 ноября 2004 г. С 281-282.