ЛОКАЛИЗАЦИЯ ГЕНОВ БАКТЕРИОЦИПРОДУКЦИИ БИФИДОБАКТЕРИЙ – КОМПОНЕНТОВ ПРОБИОТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

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*

Создание и широкое применение в медицине и ветеринарной практике биопрепаратов - пробиотиков является одним из актуальных направлений биотехнологии. Несмотря на различия в определении понятия «пробиотики», большинство исследователей относят к ним препараты, содержащие живые штаммы нормальной микрофлоры кишечника человека и животных, оказывающие положительное действие на организм хозяина, улучшая баланс нормофлоры желудочно-кишечного тракта. Бактерии рода *Bifidobacterium* составляют основу индигенной микрофлоры и имеют особое значение для создания высокой резистентности организма по отношению к патогенной микрофлоре, нормализации белкового, липидного и углеводного обмена. Большое значение в реализации лечебно-профилактической эффективности пробиотиков имеет продукция метаболитов, обеспечивающих антагонистическую активность пробиотических микроорганизмов по отношению к патогенной и условно патогенной микрофлоре.

Ранее нами в механизме антимикробной активности бифидобактерий наряду с кислотообразованием выявлено образование бактериоцинов [1]. Было показано, что некоторые штаммы бифидобактерий продуцируют бактериоцинподобные соединения, обладающие антагонистической активностью по отношению к близкородственным штаммам. Бактериоциногения широко распространена у грамположительных и грамотрицательных бактерий и в последние годы интенсивно исследуется, что связано с перспективой коммерческого использования бактериоцинов в терапии инфекционных заболеваний или для предотвращения порчи пищевых продуктов [2, 3]. Изучение бактериоцинпродукции бифидобактерий особенно актуально для создания поликомпонентных биопрепаратов-пробиотиков.

Целью данной работы являлось определение локализации генов, отвечающих за синтез бактериоцинов клетками бифидобактерий.

Объектами исследований служили штаммы бифидобактерий *Bifidobacterium adolescentis* МС-42 и *B.bifidum* 791, а также *B.adolescentis* 91БИМ – штамм, наиболее чувствительный к действию бактериоцинов, продуцируемых *B. adolescentis* МС-42 и *B.bifidum* 791. Антагонистическую активность бактериоцинов определяли методом диффузии в агар и выражали в условных единицах. За единицу активности принимали 0,1 мм зоны задержки роста тест-штамма. Для трансформации был использован штамм бактерий *E.coli* XL1-Blue со следующей генотипической характеристикой:

F'':: Tn10 pro A^+B^+ lac l^a Δ (lacZ) M15/recA1 end A1 gurA96 (Nal^r) thi hsdR17 (r_k - m_k+) sup E44 $relA_1$ lac, а также искусственно синтезированная плазмида pUC-18. Выделение хромосомной ДНК осуществляли по методу Pospiech [4].

Для выделения плазмидной ДНК бифидобактерий использовались общепринятый метод щелочного лизиса и модифицированный метод Sgorbati [5]. В литературе указывается, что присутствие плазмидной ДНК бифидобактерий обнаружено, преимущественно, у видов B.longum и B.breve. [6, 7]. У этих штаммов обнаружены многокопийные плазмиды малых размеров (1,25 - 9,5 т.п.н.). Показано, что эти плазмиды являются, в основном, криптическими [8], однако не исключается возможность детерминации и контроля таких признаков, как синтез бактериоцинов,

антибиотикорезистентность или утилизация углеводов, генами, расположенными на автономно реплицирующихся плазмидах. В наших исследованиях ни один из используемых методических подходов не выявил наличия плазмидной ДНК у исследуемых штаммов бифидобактерий. Отсутствие плазмид показывает, что продукция бактериоцинов у *B. adolescentis* МС-42 и *B.bifidum* 791 кодируется генами, которые находятся в хромосомной ДНК.

Следующим этапом работы было выявление генов, кодирующих синтез бактериоцинов бифидобактерий. В экспериментах использовалась искусственно синтезированная плазмида pUC-18 с уникальными сайтами рестрикции. Были получены банки генов хромосомной ДНК *B. adolescentis* МС-42 и *B.bifidum* 791 по рестриктазе EcoRI. Далее осуществлялось клонирование полученных фрагментов ДНК в плазмиду pUC-18 по сайтам рестрикции EcoRI. Плазмидами трансформировался штамм бактерии *E.coli* XL1-Blue. Полученные трансформанты высевались на селективные среды, и проверялись на способность к антагонизму по отношению к индикаторному штамму *B.adolescentis* 91БИМ. В результате проведенных экспериментов отобраны два клона, которые ингибировали рост индикаторного штамма. Рестрикционный анализ плазмид показал наличие вставки ДНК, содержащей гены, кодирующие синтез бактериоцинов B.bifidum 791.

ЛИТЕРАТУРА

1.Астапович Н.И, Головнева Н.А., Щетко В.А., Кондратьева Л.В., Грель М.В. К механизму антимикробной активности бифидобактерий // Доклады НАН Беларуси – 2004. – Т. 48, №4. – С57-61.

2. Yildirim Z., Jonson M.G. Characterization and antimicrobial spectrum of bifidocin B, a bacteriocin produced by Bifidobacterium bifidum NCFB 1454 // J. Food Prot. – 1998. – V. 61, № 1. – P. 47-51.

3. Jack R.W., Tagg J. R., Ray B. Bacteriocins of gram-positive bacteria // Microbiological reviews. - 1995. - V. 59, № 2. - P. 170-200.

4.Pospiech A. //Adversatile quick-prep of genomic DNA from Grampositive bacteria. // Trendsin Genetics, Technical Tips online. – 1995. – V.11. - P.217-218.

5.Донских Е.Е., Тюрин М.В., Гончарова Г.И., Б.А.Шендеров Выделение плазмидной ДНК из бифидобактерий // Антибиотики и химиотерапия. – 1990. – Т.35, №7. – С.21-22.

6.Sgorbati B., Scardovi V., Leblanc D. // Plasmids in the Genus Bifidobacterium. // J. General Microbiology. – 1982. – V.128. - P.2121-2131.

7.Park M. S., Lee K. T., Ji G. E. // Isolation and characterization of two plasmids from Bifidobacterium longum. // Lett. Appl. Microbiol. – 1997. – V.25. - P. 5-7.

8. Гончарова Г.И., Дорофейчук В.Г., Смолянская А.З., Соколова К.Я. Характеристика бактерий желудочно-кишечного тракта // Антибиотики и химиотерапия. –1989. – Т. 34, № 6. – С. 462.