

УДК 57.017:579.852.11:602.3

Н.Е. САЦУНКЕВИЧ, В.А. ПРОКУЛЕВИЧ, М.А. ТИТОК

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПРИРОДНЫХ БАКТЕРИЙ, ПЕРСПЕКТИВНЫХ В ПРОБИОТИЧЕСКОМ ОТНОШЕНИИ

It has been identified and learnt physiology biochemical characteristics of natural probiotic prospective bacteria. It has been established that among strains isolated from hen excrements there were gram-positive bacteria from genera *Bacillus* and gram-negative bacteria from family *Enterobacteriaceae* by sequencing analysis. The results of phagotyping were confirmed and two strains isolated from soil were identified as *Bacillus subtilis*. The mutual antagonism of natural bacteria has been studied that will allow to make certain combinations of strains with complementary properties.

В последнее время пробиотики на основе живых микробных сообществ рассматриваются как серьезная альтернатива синтетическим лекарственным препаратам, систематическое использование которых приводит к серьезным нарушениям в организме животных из-за угнетения полезной микрофлоры кишечника и иммунной системы. Использование кормов и кормовых добавок, обработанных бактериями, обладающими антибактериальной и антифунгальной активностью и продуцирующими во внешнюю среду ферменты, способствующие лучшему перевариванию пищи, может компенсировать отсутствие контактов животного с внешней средой (почва, вода, воздух, растения) в условиях промышленного производства [1].

Особый интерес представляют пробиотические препараты для птицеводческой отрасли, способной в короткие сроки обеспечить население диетическими продуктами питания (куриное мясо и яйца). Получение экологически чистой продукции является одной из приоритетных задач пищевой промышленности и приобретает все большее значение при возрастающем загрязнении внешней среды соединениями природного и антропогенного происхождения. С этой точки зрения весьма перспективным является поиск пробиотических штаммов среди бактерий, повсеместно распространенных в природной

среде обитания, контакт животного с которыми абсолютно неизбежен в естественных условиях. Однако использование природного микробного пробиотического сообщества требует всестороннего знания микроорганизмов, входящих в их состав.

Целью настоящей работы являлась идентификация и физиолого-биохимическая характеристика перспективных пробиотических бактерий, выделенных из природной среды.

Материал и методика

В работе использовали 9 природных штаммов грамположительных спорообразующих бактерий (Bs53-3, BsN2, B10, Bs21Z, Bs7IA3, Bs15, Bs37, Bs57, Bs112), отнесенных к виду *B. subtilis* на основании чувствительности к специфическим бактериофагам (AR1, AR3, AR9, θ 105, SP01), и 8 штаммов (F6, F36, F37, F38, F39, F44, F102, FАп), выделенных из помета кур на птицефабриках Республики Беларусь (коллекция кафедры микробиологии БГУ). Для штаммов, выделенных из фекалий кур, в аббревиатуру названия входит буква F, для природных бактерий *B. subtilis* – буквы Bs.

Бактерии выращивали в полноценной среде LB и M17, а также минимальной среде M9 и SMS [2].

Физиолого-биохимические тесты (окраска по методу Грама, КОН-тест, определение отношения к кислороду, тест Хью – Лейфсона, определение способности кислотообразования на среде Кларка, реакция Фогеса – Проскауэра, определение каталазы, оксидазы, определение сахаролитических ферментов с использованием дифференциально-диагностической среды Гисса) проводили согласно методам, изложенным в работе [3].

Взаимный антагонизм определяли согласно методу из [4].

Тотальную ДНК исследуемых бактерий выделяли саркозидовым методом [5].

Реакцию амплификации генов 16S рРНК проводили с праймерами 8f (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') и 1492r (5'-TAC GGH TAC CTT GTT ACG ACT T-3') при режимах, указанных в работе [6]. В секвенирующей реакции использовали праймеры 5'-[Cy5]AGAGTTTGATCTMTGGCTCAG-3' и 5'-[Cy5]TACGGHTACCTTGTTACGACTT-3'.

Сиквентс-анализ осуществляли с помощью автоматического секвенатора (ALFexpress II). Результаты анализировали с использованием компьютерных программ BLASTN2.2.1 (NCBI сайт: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), ALFwin™ Sequence Analyser (version 2.10).

Результаты и их обсуждение

Физиолого-биохимические свойства исследовали у изолированных из различных природных источников бактерий, которые по ряду свойств представлялись перспективными в пробиотическом отношении – в той или иной степени обладали антибактериальной и антифунгальной активностью, продуцировали целлюлолитические, амилолитические, протеолитические и пекталитические ферменты. Следует отметить, что указанные признаки являлись определяющими для отбора данных штаммов в результате анализа достаточно представительной коллекции природных микроорганизмов (всего исследовано 152 штамма, из них 63 представлены грамположительными спорообразующими бактериями, на основании чувствительности к специфическим бактериофагам отнесенными к виду *B. subtilis*, остальные штаммы выделены из фекалий кур).

Наибольший интерес в плане видовой принадлежности представляли штаммы микроорганизмов из фекалий кур и цыплят. Предполагалось, что знание видовой принадлежности данных бактерий позволит охарактеризовать состав естественной микрофлоры кишечника кур, а также облегчит различного рода генетические манипуляции с этими микроорганизмами. Например, позволит правильно выбрать векторную систему для молекулярного клонирования и использовать определенные подходы, обеспечивающие максимальную экспрессию чужеродных белков в клетках данных микроорганизмов (в частности, гена куриного интерферона). Тем не менее физиолого-биохимические тесты проводились для всех штаммов, поскольку общеизвестно, что природные бактерии характеризуются разнообразием физиолого-биохимических признаков.

На основании окраски по методу Грама и КОН-теста было установлено, что только один штамм из фекалий кур (F102) относится к грамотрицательным бактериям, остальные представлены грамположительными микроорганизмами (табл. 1).

Особенностью физиологии кур является достаточно высокая температура их тела, в норме составляющая 41–42 °С (при инфекционных заболеваниях, вызываемых вирусами и бактериями, наблюдается повышение температуры тела до 43–44 °С). В желудочно-кишечном тракте у кур так же, как и у других животных, рН среды варьирует. Кислая среда (рН 3–4) характерна для желудка, а слабощелочная – для кишечника (рН чуть более 6) [7]. В связи с этим физиологические параметры роста

(температурный режим, pH среды), при котором могут эффективно размножаться пробиотические штаммы, являются весьма важными показателями.

Таблица 1

Физиолого-биохимические свойства природных бактерий

Признак	Штаммы, характеризующиеся	
	наличием признака	отсутствием признака
Положительная реакция по методу Грама	F6, F36, F37, F38, F39, F44, FАп, Bs53-3, BsN2, B10, Bs21Z, Bs7IA3, Bs15, Bs37, Bs57, Bs112	F102
Подвижность	F102, FАп, Bs10, Bs57	F6, F36, F37, F38, F39, F44, Bs53-3, BsN2, Bs21Z, Bs7IA3, Bs15, Bs37, Bs112
Рост при температуре 37 °С	F6, F36, F37, F38, F39, F44, F102, FАп, Bs53-3, BsN2, Bs10, Bs21Z, Bs7IA3, Bs15, Bs37, Bs57, Bs112	Нет
Рост при температуре 42 °С	F6, F36, F37, F44, F102, FАп, Bs53-3, BsN2, Bs10, Bs21Z, Bs7IA3, Bs15, Bs37, Bs57, Bs112	F38, F39
Рост в среде со значением pH = 3	F6, F44, BsN2, Bs10, Bs7IA3, Bs37, Bs57	F36, F37, F38, F39, F102, FАп, Bs53-3, Bs21Z, Bs15, Bs44
Рост в среде со значением pH = 4	F6, F44, BsN2, Bs10, Bs7IA3, Bs37, Bs57	F36, F37, F38, F39, F102, FАп, Bs53-3, Bs21Z, Bs15, Bs112
Рост в среде со значением pH = 9	F6, F36, F37, F38, F39, F44, F102, FАп, Bs53-3, BsN2, Bs10, Bs21Z, Bs7IA3, Bs15, Bs37, Bs57, Bs112	Нет
Продукция ацетилметилкарбинола	F36, F37, F44, Bs21Z, Bs57	F6, F38, F39, F102, FАп, Bs53-3, BsN2, B10, Bs7IA3, Bs15, Bs37, Bs112
Наличие каталазы	F6, F36, F37, F38, F39, F44, F102, FАп, Bs53-3, BsN2, B10, Bs21Z, Bs7IA3, Bs15, Bs37, Bs57, Bs112	Нет
Наличие оксидазы	F6, F39, Bs21Z, Bs15, Bs37	F36, F37, F38, F44, F102, FАп, Bs53-3, BsN2, B10, Bs7IA3, Bs57, Bs112
Разжижение желатина	F38, F39, Bs53-3, BsN2, Bs10, Bs21Z, Bs7IA3, Bs15, Bs37, Bs57, Bs112	F6, F36, F37, F44, F102, FАп
Утилизация сахарозы	F6, F36, F37, FАп, Bs53-3, BsN2, Bs10, Bs21Z, Bs7IA3, Bs15, Bs37, Bs57, Bs112	F38, F39, F44, F102
Утилизация мальтозы	F39, F44, F102, FАп, Bs53-3, BsN2, Bs21Z, Bs7IA3, Bs15, Bs37, Bs57, Bs112	F6, F36, F37, F38, Bs10
Утилизация лактозы	F102, Bs15	F6, F36, F37, F38, F39, F44, FАп, Bs53-3, BsN2, Bs10, Bs21Z, Bs7IA3, Bs37, Bs57, Bs112
Утилизация манита	F6, F36, F37, F38, F39, F44, F102, FАп, Bs53-3, BsN2, Bs10, Bs21Z, Bs7IA3, Bs15, Bs37, Bs57, Bs112	Нет
Кислотообразование*	F36, F102, F44	F6, F37, F38, F39, FАп, Bs53-3, BsN2, Bs10, Bs21Z, Bs7IA3, Bs15, Bs37, Bs57, Bs112
Ферментативный способ утилизации глюкозы**	F6, F36, F37, F38, F39, F44, F102, FАп, Bs53-3, BsN2, Bs10, Bs21Z, Bs7IA3, Bs15, Bs37, Bs57, Bs112	Нет

Примечание. * Использование среды Кларка позволило установить, что исследованные штаммы характеризуются сильным (внесены в графу наличие признака) и слабым кислотообразованием (внесены в графу отсутствие признака); ** на основании теста Хью – Лейфсона определено, что все штаммы имеют сбраживающий тип метаболизма сахаров.

Анализ способности штаммов расти при различных температурах культивирования позволил установить, что практически все растут при 42 °С, исключение составили два штамма, выделенные из фекалий кур (F38 и F39) (см. табл. 1). Полученные результаты закономерны для бактерий *B. subtilis*, которые жизнеспособны в широких температурных диапазонах, а их споры выдерживают достаточно длительное кипячение. В то же время для бактерий, выделенных из фекалий кур, также можно было ожидать, что они могут размножаться или по крайней мере сохраняться при температуре 42 °С, являющейся физиологической нормой для тела птицы.

При культивировании бактерий в кислой среде (pH = 3 или pH = 4) рост был зарегистрирован для двух штаммов из фекалий кур (F6, F44) и пяти штаммов *B. subtilis* (BsN2, Bs10, Bs7IA3, Bs37, Bs57),

тогда как в щелочной среде (рН = 9) размножались все исследованные бактерии (см. табл. 1). Данные, полученные в результате анализа физиологических параметров роста исследуемых бактерий, являются весьма важными, поскольку в дальнейшем позволят сузить круг штаммов, перспективных в пробиотическом отношении, и остановить свой выбор на тех, которые способны размножаться в широких диапазонах температур и рН среды.

На основании физиолого-биохимических тестов установлено, что все проанализированные бактерии являются каталазоположительными, утилизируют манит в качестве единственного источника углерода и энергии, а также имеют сбразивающий тип метаболизма сахаров (см. табл. 1). По остальным исследованным свойствам наблюдались вариации (штаммы характеризовались либо их присутствием, либо отсутствием). Например, наличие оксидазы регистрировали для пяти штаммов (F6, F39, Bs21Z, Bs15, Bs37). Способностью разжижения желатина и утилизации сахарозы обладали все бактерии *B. subtilis* и некоторые штаммы из фекалий кур (F38, F39 и F6, F36, F37, FАп) (см. табл. 1).

Следует отметить, что большинство пробиотических препаратов включают, как правило, не менее двух штаммов микроорганизмов.

В связи с этим представлялось важным выяснить, обладают ли исследованные бактерии взаимным антагонизмом, что позволило бы в дальнейшем составлять определенные комбинации штаммов с взаимодополняющими свойствами. При этом подобрать комбинацию, состоящую из штаммов, представленных бактериями, изолированными из фекалий кур и почвенных микроорганизмов. Как видно из данных, представленных в табл. 2, штаммы из почвенных изолятов проявляют в большей степени антагонистическую активность в отношении друг друга, а также бактерий, выделенных из фекалий кур. Например, штаммы Bs37 и Bs57 подавляют рост пяти различных штаммов, изолированных из фекалий кур, и до шести штаммов почвенных микроорганизмов. Исключение составили бактерии штамма Bs53, способные расти совместно со всеми исследованными микроорганизмами, а также штамм Bs112, в незначительной степени подавляющий рост одного штамма Bs7IA3. Из почвенных бактерий можно отметить еще два штамма – BsN2 и Bs7IA3, проявляющие антагонизм только в отношении двух штаммов, выделенных из фекалий кур (соответственно против штаммов F44, FАп и F39, FАп). Что касается бактериальных изолятов из куриных фекалий, только штамм F6 характеризовался достаточно выраженным антагонизмом, угнетая рост пяти штаммов, один из которых представлен почвенными бактериями (Bs7IA3) (см. табл. 2).

Таблица 2

Взаимный антагонизм исследуемых бактерий

Штамм	Способность исследуемых штаммов подавлять рост бактерий																
	F6	F36	F37	F38	F39	F44	F102	FАп	Bs53-3	BsN2	Bs10	Bs21Z	7IA3	Bs15	Bs37	Bs57	Bs112
F6		3	5	–	–	–	2	1	–	–	–	–	3	–	–	–	–
F36	–		–	–	–	–	1	–	–	2	–	–	–	–	–	–	–
F37	–	–		м	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
F38	–	–	–		–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
F39	–	–	–	–		–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
F44	–	–	–	–	–	–	–	1	–	–	–	–	–	–	–	–	–
F102	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
FАп	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Bs53-3	–	–	м	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
BsN2	–	–	–	–	–	4	–	4	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Bs10	4	6	4	–	–	–	–	2	–	–	–	12	2	–	3	м	11
Bs21Z	4	8	4	–	–	6	–	3	–	3	–	–	–	–	1	–	–
Bs7IA3	–	–	–	–	1	–	–	7	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Bs15	2	–	–	–	–	–	–	1	2	–	–	8	2	–	1	1	6
Bs37	2	2	2	–	–	–	2	–	4	1	–	5	6	–	–	–	6
Bs57	2	2	2	–	–	–	–	4	2	–	–	4	4	–	1	–	6
Bs112	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1	–	–	–	–

Примечание. «–» – Отсутствие зоны задержки роста бактериальной культуры, цифрами обозначен диаметр зоны задержки роста бактериальной культуры за вычитанием диаметра колонии исследуемого штамма (в мм).

На следующем этапе была осуществлена идентификация бактерий на основании результатов сиквенс-анализа генов 16S рРНК. С этой целью из всех исследованных бактерий саркозидовым методом была выделена тотальная ДНК, которую использовали в качестве матрицы для проведения полимеразной цепной реакции с вырожденными праймерами 8f и 1492r [6], обеспечивающими амплификацию последовательности гена 16S рРНК размером 1484 п. н. Следует отметить, что при выращивании грамположительных бактерий пришлось подбирать полноценную питательную среду для их культивирования. Оказалось, что штамм F44 способен достигать стационарной стадии роста за 24 ч только при выращивании в среде M17, традиционно используемой для работы с лактобациллами. Остальные грамположительные бактерии также лучше росли на среде M17.

Полученные специфические продукты амплификации чистили с помощью набора DNA Extraction Kit (Fermentas, EU) и использовали в качестве матрицы в реакции секвенирования. В результате сиквенс-анализа было установлено, что ген 16S рибосомальной РНК штамма F6 проявляет наибольшую степень идентичности (97 %) с аналогичным геном бактерий *Bacillus pumilus* 7-5 (регистрационный номер в Genbank соответствует EU912555.1). Такой же анализ, проведенный для штамма F37, показал 97 % сходство гена 16S рибосомальной РНК с аналогичным геном бактерий *Bacillus* sp. HL-5 (регистрационный номер в Genbank соответствует JF734317.1). Изучение последовательности гена 16S рибосомальной РНК штаммов F44 и FАп позволило установить 97 % гомологии с аналогичными генами бактерий *Bacillus* sp. штаммов D12(2010) и sh_49 соответственно. Анализ секвенированной последовательности гена 16S рибосомальной РНК штамма F102 выявил 96 % сходства с *Enterobacter* sp. CD08 (EF198176.1). Секвенированные последовательности генов 16S рРНК штаммов F38 и F39 показывали низкую степень гомологии с известными последовательностями (менее 90 %), значит, для их идентификации требуется дополнительный анализ. Для бактерий штаммов Bs53-3 и Bs7IA3 подтверждена их принадлежность к *Bacillus subtilis* (табл. 3).

Таблица 3

Идентификация природных штаммов бактерий на основании сиквенс-анализа генов 16S рРНК

Штамм	Размер секвенированной ДНК, п. н.	Бактерии с гомологичными последовательностями генов 16S рРНК	Идентичность, %	Регистрационный номер в GenBank
F6	502	<i>Bacillus pumilus</i> 7-5	97	EU912555.1
F36	345	<i>Bacillus pumilus</i> TBZ1-2	96	HQ236078.1
F37	489	<i>Bacillus</i> sp. HL-5	97	JF734317.1
F102	410	<i>Enterobacter</i> sp. CD08	96	EF198176.1
FАп	562	<i>Bacillus</i> sp. sh 49	97	EU878909.1
F44	700	<i>Bacillus</i> sp. D12(2010)	97	GU566355.1
Bs53-3	520	<i>Bacillus subtilis</i> AIMST	97	HQ694232.1
Bs7IA3	536	<i>Bacillus subtilis</i> 6-7	97	HM242217.1

Таким образом, проведенный сиквенс-анализ позволил заключить, что среди штаммов бактерий, выделенных из фекалий кур, выявляются грамположительные бактерии, принадлежащие к роду *Bacillus*, и грамотрицательные микроорганизмы (штамм F102), принадлежащие к бактериям семейства *Enterobacteriaceae*. Для двух штаммов, выделенных из почвы, были подтверждены результаты фаготипирования, а именно установлена их принадлежность к бактериям *Bacillus subtilis*.

1. Тараканов Б. В. // Ветеринария. 2000. № 1. С. 47.
2. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике. М., 1976.
3. Определитель бактерий Берджи: в 2 т. / Под ред. Дж. Хоулта и др. М., 1997.
4. Егоров Н. С. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. М., 1995. С. 124.
5. TeRiele H., Michel B., Ehrlich S. D. // Proc Natl Acad Sci USA. 1986. Vol. 83. P. 2541.
6. Weisburg W. G., Barns S. M., Pelletier D. A. // Bacteriology. 1991. Vol. 173. P. 697.
7. Ноздрин А. Г., Иванова А. Б., Шевченко А. И. и др. Научные основы применения пробиотиков в птицеводстве. Новосибирск, 2005. С. 24.

Поступила в редакцию 07.12.11.

Наталья Евгеньевна Сацункевич – стажер младшего научного сотрудника НИЛ биотехнологии.

Владимир Антонович Прокулевич – доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой микробиологии.

Марина Алексеевна Титок – доктор биологических наук, профессор кафедры микробиологии.