

УДК 664.641.1:576.8.094

DOI: 10.33284/2658-3135-102-4-256

**Выделение и идентификация бактерий из пшеничной муки
с перспективой использования в комбикормовой промышленности**

Г.А. Молдахметова, Ш.А. Альпейсов, Ж.А. Кусаинова, У.А. Нуралиева

Казахский национальный аграрный университет (г. Алматы, Республика Казахстан)

Аннотация. Настоящее исследование посвящено выделению, идентификации и анализу бактерий из пшеничной муки с помощью молекулярной техники на основе секвенирования 16S рРНК. Бактериальные штаммы были выделены и охарактеризованы с использованием различных биохимических тестов и подтверждены молекулярным методом. Бактериальный ген 16S рРНК амплифицировали с использованием подходящих праймеров. Амплифицированную последовательность гена 16S рРНК сравнивали с последовательностью в базе данных последовательностей NCBI. Штаммы бактерий были идентифицированы как штаммы *Atlantibacter hermannii*, *Pantoea agglomerans*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus* с соответствующими регистрационными номерами генного банка NCBI. Последовательность, представленная в базу данных генного банка NCBI с использованием BLAST, показала максимальную идентичность 98-100 % и значение E, равное 0 для всех тесно связанных таксонов.

Ключевые слова: пшеничная мука, бактерии, BLAST, секвенирование 16S рРНК.

UDC 664.641.1:576.8.094

**Isolation and identification of bacteria from wheat flour with the prospect of use
in mixed fodder industry**

Gaukhar A Moldakhmetova, Shokhan A Alpeisov, Zhanar A Kusainova, Ulzhan A Nuralieva

Kazakh National Agrarian University (Almaty, Republic of Kazakhstan)

Summary. The present research is devoted to selection, identification and analysis of bacteria from wheat flour by means of molecular technique based on sequencing 16S of rRNA. Bacterial strains were allocated and characterized using various biochemical tests and confirmed with molecular method. The bacterial 16S rRNA gene was amplified using appropriate primers. The amplified 16S rRNA gene sequence was compared with the sequence in NCBI sequence database. Bacterial strains were identified as strains of *Atlantibacter hermannii*, *Pantoea agglomerans*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus* with the corresponding NCBI gene bank identification numbers. The sequence presented in the NCBI genebank database using BLAST showed a maximum identity of 98-100% and an E value of 0 for all closely related taxa.

Key words: wheat flour, bacteria, BLAST, sequencing 16S rRNA

Введение.

Бактерии обычно идентифицируют секвенированием 16S рРНК. рРНК является наиболее консервативным (наименее вариабельным) геном во всех клетках. Части последовательности рРНК из отдалённо родственных организмов удивительно похожи. Это означает, что последовательности от отдалённо связанных организмов могут быть точно выровнены, что позволяет легко измерить истинные различия. Таким образом, сравнение последовательности 16S рРНК может показать эволюционное родство среди микроорганизмов. Последовательности из десятков тысяч клинических и экологических изолятов доступны через Интернет, через NCBI (Национальный центр биотехнологической информации) (www.ncbi.nlm.nih.gov). Эти сайты также предоставляют алгоритмы поиска для сравнения новых последовательностей с их базой данных.

Цель исследования.

Выделение, биохимическая характеристика и молекулярная идентификация бактерий из пшеничной муки с помощью молекулярной техники на основе 16S рРНК.

Материалы и методы исследования.

Объект исследования. Пшеничная мука первого сорта.

Схема эксперимента. Исследования проводились в Республике Корея, в городе Сеул, в Университете Конкук на кафедре «Животноводство и технологии», в лаборатории биотехнологий.

Состав пшеничной муки: калорийность – 334 ккал, белки – 10,8 г, жиры – 1,3 г, углеводы – 69,9 г.

Образцы были собраны в стерильный пластиковый контейнер и доставлены в лабораторию для бактериологического анализа. Бактериальные изоляты были подвергнуты скринингу на планшетах с питательным агаром (NA) стандартным методом для разливания на чашки. Планшеты инкубировали при +37 °C/24 ч и в общей сложности было получено сто сорок четыре изолята, их видовой состав представлен в таблице 1. Выделенные бактерии были идентифицированы на основе характеристик колоний, методов окрашивания по Граму и различных биохимических тестов, приведённых в руководстве по детерминирующей бактериологии Bergey (1984).

Таблица 1. Результаты молекулярной идентификации бактерий из пшеничной муки
Table 1. The results of the molecular identification of bacteria from wheat flour

Сикв. # /SK #	Штамм/Strain	Планшет/Plate	Покрытие (%)/ Query Cover (%)	Идент (%)/ Ident (%)
4800	<i>Atlantibacter hermannii</i>	YPD	100	98,8
4801	<i>Pantoea agglomerans</i>	YPD	96	99,07
4802	<i>Bacillus megaterium</i>	MRS	99	98,66
4803	<i>Bacillus megaterium</i>	MRS	100	99,84
4804	<i>Bacillus cereus</i>	MRS	100	100

Биохимическая характеристика бактерий. Выбранный штамм выращивали в питательной бульонной культуральной среде, содержащей 2,5 % пептона, 1,0 % дрожжевого экстракта и 0,5 % экстракта говядины. Культуры (50 мл в конических колбах на 250 мл) инокулировали 5 % (об./об.) инокулятами и инкубировали при +37 °C с энергичным орбитальным встряхиванием при 120-150 об./мин. Для приготовления твёрдой среды 1,5 % агара добавляли в бульон (Himedia, Индия). Форма и цвет колоний были исследованы под микроскопом после окрашивания по Граму. Изоляты были подвергнуты биохимическому анализу на активность оксидазы, каталазы, теста MR-VP, теста на уреазу, подвижности, продукции индола (табл. 2) и утилизации цитрата (табл. 1).

ПЦР-амплификация гена 16S рРНК: реакцию ПЦР проводили в градиенте термоциклер (Эппендорф, Германия). Универсальные праймеры (Forward primer 5'-AGAGTTTGTACCTGGCTCAG-3' и обратный праймер 5'GGTTACCTTGTTACGACTT 3') использовали для амплификации фрагмента гена 16S рРНК. Реакционная смесь из 50 мкл состояла из 10 нг геномной ДНК, 2,5 единиц ДНК-полимеразы Taq, 5 мкл 10X буфера для амплификации ПЦР (100 mM Трис-НСl, 500 mM KCl pH-8,3), 200 мкМ dNTP, 10 п.моль каждый двух универсальных праймеров и 1,5 mM MgCl₂.

Традиционная идентификация бактерий на основе фенотипических характеристик, как правило, не так точна, как идентификация на основе генотипических методов. Сравнение последовательности гена бактериальной 16S рРНК стало предпочтительным генетическим методом (Patel JB, 2001).

Последовательность гена 16S рРНК широко использовалась в качестве молекулярных часов для оценки взаимоотношений между бактериями (филогения), но в последнее время она также стала важной в качестве средства идентификации неизвестной бактерии на уровне рода или вида (Sac-

chi CT et al., 2002). Использование последовательностей генов 16S рРНК для изучения бактериальной филологии (Amann RI et al., 1992) и таксономии является наиболее распространённым домашним генетическим маркером, используемым по ряду причин.

В таблице 2 представлены биоактивные компоненты в 100 граммах пшеничной муки.

Всего было получено сто сорок четыре изолята, и они были использованы для дальнейшего анализа. Выделенные колонии из смешанных популяций на чашках с YPD и MRS агаром были охарактеризованы и субкультивированы для получения чистых культур, а выделенные бактерии были идентифицированы на основе характеристик колоний и биохимических исследований на активность ферментов, MR-VP-теста, уреазного теста, и молекулярных методов исследований (табл. 1).

Таблица 2. Содержание биоактивных компонентов в 100 граммах пшеничной муки в граммах
Table 2. The content of bioactive components in 100 grams of wheat flour in grams

№	Биоактивный компонент/Bioactive component	Содержание в граммах/ 100 г муки/ Content in grams/100 g flour
1	α -Линолевая кислота (18:3n-3)/ α -Linoleic acid (18:3n-3)	0,16
2	Соединения серы/Sulphur compounds	0,7
3	Итого свободного глутатиона/Total free glutathione/	0,038
4	Волокно (синтетический бульон)/Fibre (as AOAC)	44,6
5	Лигнины/Lignins	5,6
6	Олигосахариды/Oligosaccharides/	3,7
7	Фитиновая кислота/Phytic acid/	4,2
8	Минералы и микроэлементы/Minerals and trace elements	3,39
9	Витамины группы В/B vitamins	0,0303
10	Vitamin E (tocopherols and tocotrienols/ Витамин Е (токоферол и токотриенол)	0,0095
11	Каротиноиды/Carotenoids	0,00072
12	Полифенолы/Polyphenols	1,1
13	Фенольная кислота/Phenolic acid	1,07
14	Флавоноиды/Flavonoids	0,028
15	Лигнанс /Lignans	0,005
16	Алкилрезорцинол/Alkylresorcinol	0,27
17	Фитостерол/Phytosterol	0,16

Бактериальную геномную ДНК выделяли в соответствии со стандартным протоколом (Hoffman CS and Winston F, 1987). Присутствие выделенной бактериальной геномной ДНК было подтверждено на 0,8 % агарозном геле, окрашенном бромидом этидия. Интенсивная одиночная полоса была замечена вместе с маркером ДНК. Извлечённую ДНК использовали в качестве матрицы для амплификации гена 16S рРНК. Универсальные праймеры 27F и 1429R были использованы для амплификации и секвенирования фрагмента гена 16S рРНК. Оптимальная температура отжига составила +55 °С. На 1% агарозном геле, окрашенном бромидом этидия, видна интенсивная одиночная полоса (рис. 1).

Продукт ПЦР подвергали секвенированию с использованием набора для секвенирования циклов BDT V3.1 на генетическом анализаторе ABI 3730 XL как в прямом, так и в обратном направлении. Полученные последовательности сравнивали с базой данных генного банка NCBI с использованием программы поиска BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>; Marchler-Bauer A et al., 2017; Pruitt KD et al., 2005). Процент совпадения последовательностей также анализировали. Поиск гомологии, выполненный с использованием BLAST, показал максимальную идентичность на 98-100 % с таковой для выделенных штаммов (рис. 2).

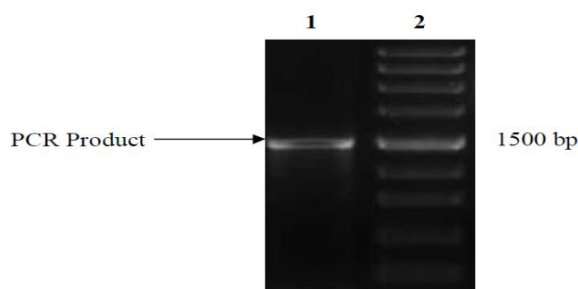


Рис. 1 – Гелевое изображение ампликона 16S рРНК, полоса 1 – полоса ампликона 16S рРНК; дорожка 2 – ДНК-маркер
Figure 1 – Gel image of amplicon 16S rRNA, lane 1 – lane amplicon 16S rRNA; lane 2 – DNA marker

4800: *Atlantibacter hermannii*

GTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGG-
 GAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAG-
 CATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTT-
 GACATCCACAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAAGTGTGAGACAGGTGCTG-
 CATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCG-
 CAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTCCGGCCGGGAAGTCAAAGGAGACTGCCAGTGA-
 TAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGACCAGGGC-
 TACACACGTGCTACAATGGCGCATACAAAGAGAAGCAATCTCGCCGAGAGCTAGCGGAC-
 CTCATAAAGTGCGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCG-
 GAATCGCTAGTTAATCGTGAATCAGAATGTCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTT-
 GTACACACCGCCCGTCAACCATGGGAGTGGGTTGCAAAAGAAGTAGGTAGCTTAAC-
 CTCGGGAGGGCGCTTACCACTTTGTGATTCATGACTGGGGTGAA

Описание/Description	Покрытие/ Query Cover	Идент/ Per. Ident
штамм <i>Atlantibacter hermannii</i> CIP 103176 16S рибосомная РНК, частичная последовательность/ <i>Atlantibacter hermannii</i> strain CIP 103176 16S ribosomal RNA, partial sequence	100 %	98,80 %
подвид штамма <i>Salmonella enterica</i> Enterica Ty2 16S рибосомная РНК, частичная последовательность/ <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> strain Ty2 16S ribosomal RNA, partial sequence	100 %	98,49 %
Штамм <i>Escherichia marmotae</i> HT073016 16S рибосомальная РНК, частичная последовательность/ <i>Escherichia marmotae</i> strain HT073016 16S ribosomal RNA, partial sequence	100 %	98,34 %

Рис. 2 – Частичная последовательность продукта ПЦР последовательности гена 16S рРНК выделенных видов бактерий (: *Atlantibacter hermannii*)
Figure 2 – Partial sequence of a PCR product with isolated 16S rRNA genes of isolated bacterial species (: *Atlantibacter hermannii*)

Обсуждение полученных результатов.

Пшеничная мука создаёт благоприятные условия для роста и распространения микробной популяции. Бактериальные виды имеют по меньшей мере одну копию гена 16S рРНК, содержащую высококонсервативные области вместе с гипервариабельными областями. Использование последова-

тельностью генов 16S р РНК для идентификации новых штаммов бактерий набирает обороты в последние годы. Мы показали использование последовательности гена 16S рРНК для характеристики бактерии из пшеничной муки.

Выводы.

Таким образом, метод генотипирования с использованием последовательности гена 16S рРНК является простым и эффективным при идентификации штаммов бактерий.

Литература

1. Amann RI, Zarda B, Stahl DA, Schleifer KH. Identification of individual prokaryotic cells by using enzyme-labeled, rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Appl Environ Microbiol.* 1992;58(9):3007-3011.
2. Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology. Krieg NR, Holt JG, editors. Baltimore: The Williams and Wilkins Co; 1984: 2648 p.
3. Hoffman CS, Winston F. A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformiaon of Escherichia coli. *Gene.* 1987;57(2-3):267-272. doi: [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(87\)90131-4](https://doi.org/10.1016/0378-1119(87)90131-4)
4. Marchler-Bauer A, Bo Y, Han L, et al. CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via sub-family domain architectures. *Nucleic Acids Research.* 2017;45(D1): D200-D203. doi: <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1129>
5. National Center for Biotechnology Information [Internet]. The National Center for Biotechnology Information advances science and health by providing access to biomedical and genomic information. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
6. Patel JB. 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. *Molecular Diagnosis.* 2001;6(4):313-321. doi: <https://doi.org/10.1054/modi.2001.29158>
7. Pruitt KD et al. NCBI Reference Sequence (RefSeq): a curated non-redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins. *Nucleic Acids Research.* 2005;33(suppl_1):D501-D504. doi: <https://doi.org/10.1093/nar/gki025>
8. Sacchi CT, Whitney AM, Mayer LW, Morey R, Steigerwalt A, et al. Sequencing of 16S rRNA Gene: a rapid tool for identification of Bacillus anthracis. *Emerg. Infect. Dis.* 2002;8(10):1111-1123. doi: <http://dx.doi.org/10.3201/eid0810.020391>

Молдахметова Гаухар Абикеновна, магистр сельскохозяйственных наук, докторант 2 курса кафедры «Технология производства продукции животноводства», Казахский национальный аграрный университет, 050010, Республика Казахстан, г. Алматы, проспект Абая, 8, сот.: 8-7474-426-74-01, e-mail: gosha_86kz@mail.ru

Альпейсов Шохан Ашенович, доктор сельскохозяйственных наук, профессор, заведующий кафедрой «Пчеловодства, птицеводства и рыбного хозяйства», Казахский национальный аграрный университет, 050010, Республика Казахстан, г. Алматы, проспект Абая, 8, e-mail: Sh.alpeisov@mail.ru

Кусаинова Жанар Абикеновна, доктор PhD, Казахский национальный аграрный университет, 050010, Республика Казахстан, г. Алматы, проспект Абая, 8, сот.: 8(701) 653-49-53, моб. телефон: 8(727)272-13-42, 8-701-111-84-06, e-mail: Zhanar.kusainova@kaznau.kz

Нуралиева Улжан Ауезхановна, кандидат сельскохозяйственных наук, ассоциативный профессор кафедры «Пчеловодства, птицеводства и рыбного хозяйства», Казахский национальный аграрный университет, 050010, Республика Казахстан, г. Алматы, проспект Абая, 8, сот.: 8(778)920-48-62, e-mail: nua.ulgan@mail.ru

Поступила в редакцию 30 октября 2019 г.; принята после решения редколлегии 16 декабря 2019 г.; опубликована 31 декабря 2019 г. / Received: 30 October 2019; Accepted: 16 December 2019; Published: 31 December 2019