

<sup>1</sup>Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины  
ул. Академика Заболотного, 154, Киев 03680, Украина

<sup>2</sup>ДП "Укрметртестстандарт", лаборатория молекулярно-генетических исследований,  
ул. Метрологическая, 4, Киев 03680, Украина

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ МОЛОЧНОКИСЛЫХ И БИФИДОБАКТЕРИЙ В МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТАХ

Методом амплификации в реальном времени (количественная ПЦР) с использованием родоспецифических праймеров к *Enterococcus*, *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* проанализирован состав молочнокислых бактерий и бифидобактерий в молоке и кисломолочных продуктах домашнего изготовления. Во всех исследуемых образцах молока, сметаны и творога обнаружены бактерии, относящиеся к родам *Enterococcus*, *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*. В исследованных образцах преобладали представители рода *Enterococcus* и *Lactobacillus* ( $10^3 - 10^7$  геном-экв/мл (мг)). Наибольшее их количество ( $10^7$  геном-экв/мг) обнаружено в твороге.

*Ключевые слова:* молочнокислые бактерии, бифидобактерии, ПЦР в реальном времени.

Идентификация видов молочнокислых бактерий и бифидобактерий, обитающих в сложных микробных экосистемах, традиционными методами трудоемка и занимает много времени, так как основана на исследовании фенотипических признаков этих микроорганизмов. Такой подход ограничивает возможность проведения качественного и количественного анализа видового состава лакто- и бифидофлоры в природных субстратах и не позволяет достоверно оценить биоразнообразие микроорганизмов, заселяющих ту или иную экосистему.

Современная систематика и диагностика микробиоценозов среды обитания молочнокислых бактерий и бифидобактерий используют анализ генетических структур этих бактерий, что позволяет достаточно четко качественно и количественно оценить видовое разнообразие сообществ микроорганизмов, присущих конкретной экосистеме [2]. Среди таких методов для быстрой идентификации и количественного определения видов молочнокислых бактерий и бифидобактерий используют дот-блот гибридизацию рРНК, гибридизацию *in situ*, денатурирующий градиентный гель-электрофорез [13]. Однако наиболее точным и обладающим высокой чувствительностью и специфичностью является метод ПЦР в реальном времени (количественная ПЦР) [2]. Этот метод был успешно использован для анализа содержания молочнокислых бактерий и бифидобактерий в грудном молоке, а также на разных стадиях производства кисломолочных продуктов [3, 11].

Целью нашей работы было изучение и идентификация состава молочнокислых бактерий и бифидобактерий, содержащихся в кисломолочных продуктах домашнего изготовления, с помощью метода ПЦР в реальном времени.

**Материалы и методы.** В работе исследовали по 5 образцов домашнего коровьего молока, а также сметаны и творога, полученных в процессе самосквашивания. Образцы были отобраны в Киевской области.

Суммарную ДНК выделяли из молочных продуктов методом температурного лизиса с последующей доочисткой набором "ДНК-сорб В" ("Амплисенс", Россия), согласно инструкции производителя. Концентрацию и чистоту выделенной нуклеиновой кислоты определяли на спектрофотометре «BioPhotometer» ("Eppendorf", Германия) при длине волны  $\lambda=260$  нм. Для построения калибровочной кривой использовали ДНК, выделенную из суточных культур типовых штаммов *Enterococcus faecalis* CCM 7000<sup>T</sup>, *Lactobacillus casei* subsp. *casei* CCM 7088<sup>T</sup>, *Bifidobacterium longum* CCM 4990<sup>T</sup>.

Для определения бактерий родов *Enterococcus*, *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* проводили амплификацию с родоспецифическими праймерами, как указано в работах [6, 9, 10]. Список использованных олигонуклеотидных праймеров представлен в табл. 1. Продукты амплификации разделяли в 1,7 % агарозном геле, содержащем 0,01 % бромистого этидия. Результаты визуализировали в УФ-свете, полученные электрофореграммы обрабатывали с помощью программы Gel Imager ("ДНК-технология", Россия).

Праймеры, использованные в работе

Род бактерий	Последовательность праймера, 5' → 3'	Литература
<i>Bifidobacterium</i>	GGGTGGTAATGCCGGATG CCACCGTTACACCGGGAA	[10]
<i>Lactobacillus</i>	CTCAAAACTAAACAAAGTTTC STTGTACACACCGCCCGTCA	[6]
<i>Enterococcus</i>	TACTGACAAACCATTTCATGATG AACTTCGTACCAACGCGAAC	[9]

ПЦР амплификацию в режиме реального времени проводили с помощью прибора CFX96 (“Bio-Rad”, США) в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 5 мкл ДНК, 12,5 мкл Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (“Fermentas”, Литва) и 5 пкМ каждого праймера. В реакции использовали праймеры, приведенные в табл. 1. Температурный режим включал начальную денатурацию 10 мин при 95 °С и последующие 40 циклов: денатурация – 15 сек при 95 °С, отжиг праймеров – 30 сек при 55 °С и синтез – 30 сек при 72 °С. Регистрацию флуоресценции комплекса ДНК/SYBR Green проводили на стадии синтеза (72 °С) в каждом цикле амплификации. Пороговый цикл ( $C_p$ ) для каждого образца определяли циклом, при котором кинетическая кривая флуоресценции пересекала пороговую линию. Базовая линия, которая представляет собой фоновый уровень флуоресценции, рассчитывалась программным обеспечением. Специфичность целевого продукта устанавливали с помощью аналитического плавления по завершению процесса амплификации в диапазоне температур от 60 °С до 95 °С (шаг: 0,5 °С / 0,05 сек).

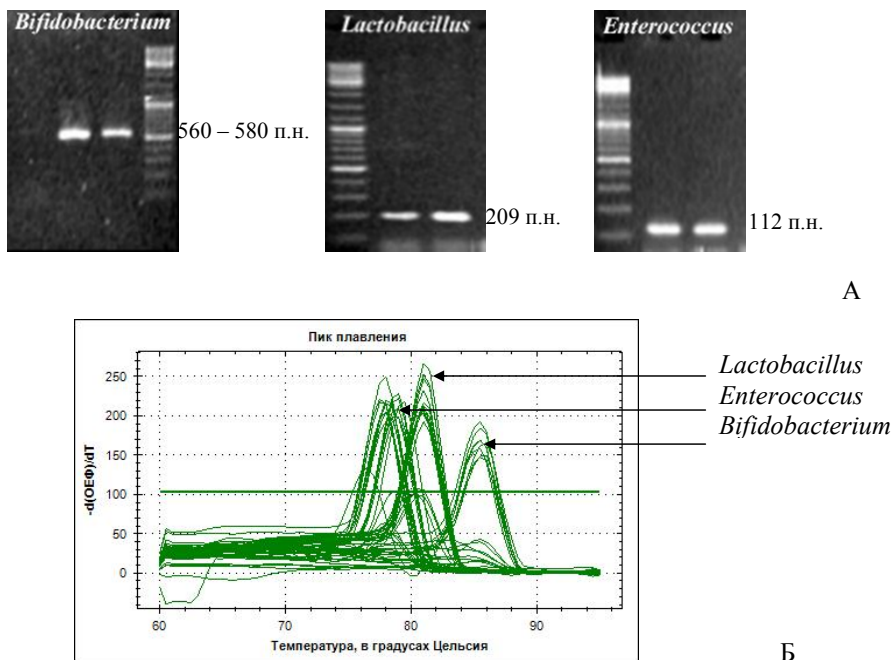
Для проведения количественного анализа использовали метод построения калибровочных кривых (зависимость порогового цикла от логарифма концентрации стандартного образца) с определением эффективности реакции. В качестве стандартных образцов использовали десятикратные разведения бактериальной ДНК типовых штаммов. По калибровочной кривой определяли начальное количество ДНК, вносимое в реакционную смесь. Количество геном-эквивалентов (геном/экв) бактерий в образце рассчитывали как отношение среднего начального количества ДНК к количеству ДНК, которое содержится в геноме типового штамма. Последний показатель определяли по формуле: количество ДНК (пкг) = размер генома (п.н.) / ( $0,978 \times 10^9$ ) [5].

**Результаты и их обсуждение.** В результате амплификации с родоспецифическими праймерами с последующей детекцией ПЦР-фрагментов в агарозном геле были идентифицированы бактерии трех родов: *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* и *Enterococcus* (рис. 1, А). Дифференциация этих микроорганизмов основывается на отличии размеров полученных ампликонов. Однако этот метод не позволяет судить о количественном составе бактерий каждой таксономической группы в молочных продуктах, что не дает возможности оценить роль каждой из них в процессе сбраживания молока. Поэтому нами была проведена ПЦР в реальном времени.

*Оценка кривых плавления продуктов амплификации в реальном времени.* Для проведения ПЦР мы использовали неспецифический краситель SYBR Green I. В этом случае, как указано в работе К. де Претера с соавт. [4], специфичность реакции достигается с помощью “hot-start” ПЦР, эмпирически подобранной температуры плавления и обнаружения сигнала для каждой пары праймеров. Кроме того, на основании результатов исследований, проведенных в работе [14], было показано, что анализ кривой плавления позволяет оценить специфичность амплификации, отличить ПЦР-продукты от димеров праймеров и обнаружить загрязнения. Введение в состав ПЦР-смеси интеркалирующего флуоресцентного красителя SYBR Green I и модификация температурного режима реакции позволили нам разработать протокол для амплификации и анализа продуктов ПЦР в формате реального времени.

Для оценки специфичности метода ПЦР в режиме реального времени был проведен постаплификационный анализ кривых плавления. В результате было показано, что каждый образец характеризовался одним преобладающим пиком, что соответствовало единственной полосе на электрофореграмме (рис. 1, Б). Наличие одного четко выраженного пика кривых плавлений свидетельствует о специфичности использованных праймеров для идентификации бактерий родов *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* и *Enterococcus*. Диапазон значений температур плавления продуктов амплификации отличался у исследованных микроорганизмов и

составил 85 – 86 °С у *Bifidobacterium*, 80 – 82 °С у *Lactobacillus* и 77 – 79 °С у *Enterococcus*. Таким образом, анализ кривых плавления позволяет идентифицировать каждый из исследуемых родов микроорганизмов, поскольку они характеризуются индивидуальными профилями плавления. Следует отметить, что в исследуемых образцах молочных продуктов кривые плавления для бифидобактерий не выявили четких пиков, а на электрофореграмме продукты амплификации были слабо выражены или же отсутствовали.



**Рис. 1. А – электрофореграмма продуктов амплификации с родоспецифическими праймерами; Б – график кривых плавления ПЦР-продуктов**

*ПЦР-анализ в реальном времени.* В результате проведенного анализа были амплифицированы разные фрагменты гена, кодирующего 16S рРНК, характерные для лактобацилл и бифидобактерий, и фрагмент гена, кодирующего фактор элонгации Tu, специфичный для энтерококков. В каждом из исследованных образцов кисломолочных продуктов (молоко, сметана, творог) выявлены микроорганизмы, принадлежащие к родам *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* и *Enterococcus*. Значение порогового цикла ( $C_t$ ) позволило определить относительное содержание этих бактерий в образце. Общее количество исследуемых микроорганизмов, содержащееся в 1 мл / мг материала, было наибольшим в твороге и наименьшим в молоке (данные не представлены). Согласно значениям  $C_t$  для каждой группы бактерий, во всех образцах преобладали энтерококки, меньше всего обнаружено бифидобактерий.

С помощью калибровочных кривых, построенных для десятикратных разведений ДНК типовых штаммов, было определено абсолютное количество бактерий каждого из исследованных родов, содержащееся в 1 мл/мг материала (рис. 2). В результате было показано, что содержание бифидобактерий в молоке, сметане и твороге практически не отличалось, т.е. не возрастало в процессе молочнокислого брожения, что позволяет предположить случайное попадание этих микроорганизмов в молочные продукты. Возможно, они имеют животное происхождение. Эти результаты подтверждаются и литературными данными: наибольшее количество бактерий рода *Bifidobacterium*, как правило, обнаруживают в грудном молоке [3]. В то же время нами было выявлено увеличение числа лактобацилл и энтерококков в сметане и твороге по сравнению с их количеством в молоке (табл. 2).

Наиболее многочисленная группа бактерий, составляющих микробиоту сырого молока, представлена лактококками, энтерококками и лейконостоками [12, 15]. Наличие энтерококков в молочных продуктах долгое время рассматривали как свидетельство антисанитарных условий, в которых происходит процесс их получения. Однако в ряде работ было показано, что энтерококки могут входить в состав нормальной микробиоты многих пищевых продук-

тов, кроме того, они играют важную роль в формировании органолептических свойств сыров [8]. В нашей работе значительное количество энтерококков было обнаружено как в сыром молоке, так и в кисломолочных продуктах. Бактерии рода *Lactobacillus* относят к вторичной микрофлоре молочных продуктов [1]. В результате анализа образцов сырого молока, сметаны и творога было отмечено возрастание числа этих микроорганизмов, что согласуется с данными, приведенными в других работах [7, 11].

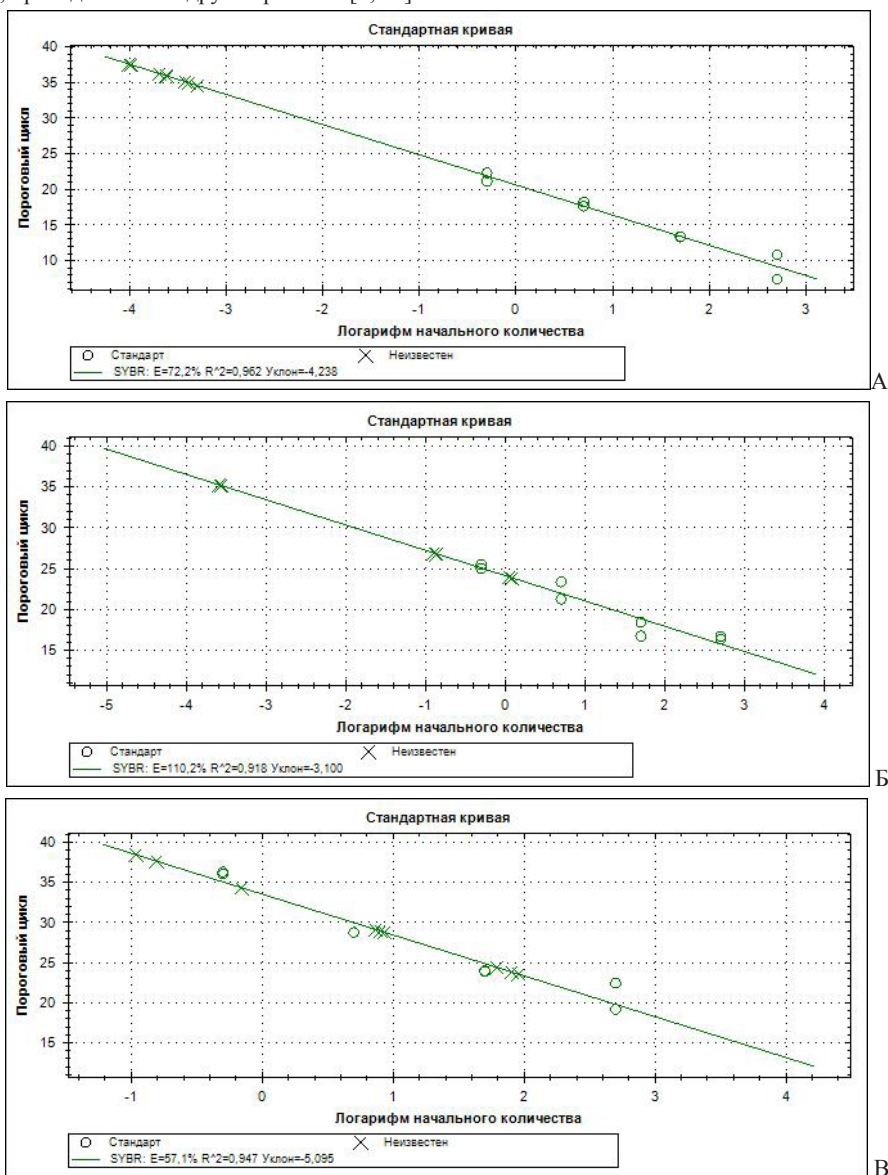


Рис. 2. Калибровочные кривые, построенные для десятикратных разведений ДНК, выделенной из *Bifidobacterium longum* CCM 4990<sup>T</sup> (А), *Lactobacillus casei* subsp. *casei* CCM 7088<sup>T</sup> (Б), *Enterococcus faecalis* CCM 7000<sup>T</sup> (В)

Таблица 2

Определение бактериальной ДНК в кисломолочных продуктах методом ПЦР в реальном времени. Указаны средние значения геном-экв/мл (мг)

Род бактерий	Молоко	Сметана	Творог
<i>Bifidobacterium</i>	0,04	0,15	0,19
<i>Lactobacillus</i>	2 x 10 <sup>3</sup>	1,9 x 10 <sup>5</sup>	9,4 x 10 <sup>5</sup>
<i>Enterococcus</i>	1,7 x 10 <sup>6</sup>	2,3 x 10 <sup>7</sup>	2,7 x 10 <sup>7</sup>

Таким образом, использование количественного метода ПЦР в реальном времени существенно сокращает продолжительность и трудоемкость анализа, исключает риск появления ложноположительных результатов благодаря детектированию результатов в формате закрытых пробирок и отсутствию необходимости постаmplификационных манипуляций. Этот метод позволяет четко идентифицировать группу молочнокислых бактерий и бифидобактерий, обитающих в кисломолочных продуктах, что необходимо для контроля состава и динамики молочной микрофлоры, а также может быть использовано для создания новых заквасок, пробиотиков и пробиотических продуктов.

**Л.Б. Зелена<sup>1</sup>, Н.К. Коваленко<sup>1</sup>, Р.В. Облап<sup>2</sup>, Н.Б. Новак<sup>2</sup>, Р.А. Голубец<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України  
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ 03680, Україна

<sup>2</sup> ДП "Укрметрестандарт", лабораторія молекулярно-генетичних досліджень,  
вул. Метрологічна, 4, Київ 03680, Україна

## **ВИКОРИСТАННЯ ПЛР У РЕАЛЬНОМУ ЧАСІ ДЛЯ КІЛЬКІСНОЇ ОЦІНКИ МОЛОЧНОКИСЛИХ І БІФІДОБАКТЕРІЙ У МОЛОЧНИХ ПРОДУКТАХ**

### **Резюме**

Методом ПЛР у реальному часі (кількісна ПЛР) з використанням родоспецифічних праймерів до *Enterococcus*, *Lactobacillus* і *Bifidobacterium* проаналізовано склад молочнокислих бактерій і бифидобактерій у молоці і кисломолочних продуктах домашнього виготовлення. У всіх досліджених зразках молока, сметани і сиру виявлені бактерії, що відносяться до родів *Enterococcus*, *Lactobacillus* і *Bifidobacterium*. У проаналізованих зразках переважали представники роду *Enterococcus* і *Lactobacillus* ( $10^3 - 10^7$  геном-екв/мл (мг)). Найбільша їх кількість ( $10^7$  геном-екв/мг) виявлена у сирі.

Ключові слова: молочнокислі бактерії, бифидобактерії, ПЛР у реальному часі

**L.B. Zelena<sup>1</sup>, N.K. Kovalenko<sup>1</sup>, R.V. Oblap<sup>2</sup>, N.B. Novak<sup>2</sup>, R.A. Golubets<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

<sup>2</sup>SE Ukrmetrestsstandart, Laboratory of Molecular-Genetic Researches, Kyiv

## **USE OF REAL-TIME PCR FOR QUANTITATIVE ASSESSMENT OF LACTIC ACID BACTERIA AND BIFIDOBACTERIA IN DAIRY PRODUCTS**

### **S u m m a r y**

Composition of lactic acid bacteria and bifidobacteria in raw milk and home-made milk products has been analyzed using real-time PCR (quantitative PCR) with genus-specific primers to *Enterococcus*, *Lactobacillus* and *Bifidobacteria*. Bacteria belonging to these genera have been revealed in all samples analyzed (milk, sour cream, cottage cheese). It has been shown that the representatives of *Enterococcus* and *Lactobacillus* genera dominated in the samples analyzed ( $10^3-10^7$  genome equivalent/ml (mg)). The largest number of these microorganisms ( $10^7$  genome equivalent/mg) has been detected in cottage cheese.

The paper is presented in Russian.

Key words: lactic acid bacteria, bifidobacteria, real-time PCR.

The authors' address: Zelena L.B., Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D03680, Ukraine.

1. Casalta E., Sorba J.-M., Aigle M., Ogier J.-C. Diversity and dynamics of the microbial community during the manufacture of Calenzana, an artisanal Corsican cheese // International Journal of Food Microbiology. – 2009. – 133. – P. 243–251.
2. Cenciari-Borde C., Courtois S., La Scola B. Nucleic acids as viability markers for bacteria detection using molecular tools // Future Microbiology. – 2009. – 4,N1. – P. 45-64.
3. Collado M.C., Delgado S., Maldonado A., Rodriguez J.M. Assessment of the bacterial diversity of breast milk of healthy women by quantitative real-time PCR // Letters in Applied Microbiology. – 2009. – 48. – P. 523–528.
4. De Preter K., Speleman F., Combaret V., Lunec J., Laureys G., Eussen B.H., Francotte N., Board J., Pearson A.D., De Paep A., Van Roy N., Vandensompele J. Quantification of MYCN, DDX1, and NAG gene copy number in neuroblastoma using a real-time quantitative PCR assay // Modern Pathology. – 2002. – 15. – P. 159–166.

5. Dolezel J., Bartos J., Voglmayr H., Greilhuber J. Nuclear DNA content and genome size of trout and human // *Cytometry A*. – 2003. – **51**,N2. – P. 127-128.
6. Dubernet S., Desmasures N., Gueguen M. A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2002. – **214**. – P. 271–275.
7. Ercolini D., Frisso G., Mauriello G., Salvatore F., Coppola S. Microbial diversity in natural whey cultures used for the production of Caciocavallo Silano PDO cheese // *International Journal of Food Microbiology*. – 2008. – **124**,N 2. – P. 164–170.
8. Franz C.M.A.P., Stiles M.E., Schleifer K.H., Holzapfel W.H. Enterococci in foods – a conundrum for food safety // *Int. J. Food Microbiol.* – 2003. – **88**. – P. 105–122.
9. Ke D., Picard F.J., Martineau F., Ménard C., Roy P.H., Ouellette M., Bergeron M.G. Development of a PCR assay for rapid detection of enterococci // *Journal of Clinical Microbiology*. – 1999. – **37**. – P. 3497–3503.
10. Kok R.G., De Wall A., Schut F., Welling G.W., Weenk G., Hellingwerf K.J. Specific detection and analysis of a probiotic *Bifidobacterium* strain in infant feces // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1996. – **62**. – P. 3668–3672.
11. Ladero V., Fernández M., Cuesta I., Alvarez M.A. Quantitative detection and identification of tyramine-producing enterococci and lactobacilli in cheese by multiplex qPCR // *Food Microbiology*. – 2010. – **27**,N 7. – P. 933 – 939.
12. Oudghiri M., Vancanneyt M., Vandamme P., Naser S., Gevers D., Lefebvre K., Swings J., Amar M. Identification of lactic acid bacteria in Moroccan raw milk and traditionally fermented skimmed milk “Iben” // *Journal of Applied Microbiology*. – 2009. – **106**. – P. 486–495.
13. Randazzo C.L., Caggia C., Neviani E. Application of molecular approaches to study lactic acid bacteria in artisanal cheeses // *Journal of Microbiological Methods*. – 2009. – **78**. – P. 1–9.
14. Ririe K.M., Rasmussen R.P., Wittwer C.T. Product differentiation by analysis of DNA melt curves during the polymerase chain reaction // *Analytical Biochemistry*. – 1997. – **245**. – P. 154–160.
15. Zamfir M., Vancanneyt M., Makras L., Vaningelgem F., Lefebvre K., Pot B., Swings J., De Vuyst L. Biodiversity of lactic acid bacteria in Romanian dairy products // *Systematic and Applied Microbiology*. – 2006. – **29**, N6. – P. 487–495.

Отримано 15.02.2011