

УДК 637.136.3:66.095.261

ВИДІЛЕННЯ ТА ІДЕНТИФІКАЦІЯ МОЛОЧНОКИСЛИХ БАКТЕРІЙ ЗА ДОПОМОГОЮ МЕТОДУ RFLP-PCR ГЕНУ 16S рРНК

I. М. Сливка¹, О. Й. Цісарик¹, Т. Боцер²
slyvka.88@ukr.net, tsisaryk_o@yahoo.com

¹Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького, вул. Пекарська, 50, м. Львів, 79010, Україна

²Жешувський університет, вул. Соколовська, 26, м. Кольбушово, 36-100, Польща

*Застосування генетично-молекулярних методів для ідентифікації молочнокислих бактерій (МКБ) є одним із критеріїв відбору штамів МКБ перспективних для використання їх в біотехнології та харчовій промисловості. Метою дослідження було ідентифікувати МКБ, виділені із овечого сиру, який традиційно виготовляється в Карпатському регіоні України. Для ідентифікації МКБ використано метод аналізу довжин рестрикційних фрагментів ДНК (англ. restriction fragment length polymorphism RFLP) на основі полімеразної ланцюгової реакції (англ. polymerase chain reaction PCR). Із дослідного зразка сиру виділено 28 штамів бактерій роду *Lactobacillus*. Для порівняльного аналізу рестрикційних фрагментів ДНК використано 12 референтних штамів бактерій роду *Lactobacillus*.*

*Виділення геномної ДНК з отриманих культур бактерій проводили, використовуючи набір Genotipic Mini фірми A&A Biotechnology. Для ампліфікації гену 16S рРНК використано пару праймерів EGE1 та 1492R, фірми Sigma-Aldrich. Для розсікання ампліфікованої ДНК використано два ензими *RsaI* та *HinfI*.*

*Метод RFLP-PCR дав змогу виділити кілька різних профілів рестрикційних фрагментів ДНК. За подібністю розташування рестрикційних фрагментів ДНК досліджуваних штамів МКБ в агарозному гелі було виділено три групи бактерій із використанням ензиму *HinfI* та чотири групи бактерій із використанням ензиму *RsaI*.*

*На основі порівняльного аналізу рестрикційних фрагментів ДНК досліджуваних штамів МКБ із референтними штамми ідентифіковано два види бактерій роду *Lactobacillus*. При використанні ензиму *RsaI* визначено вид *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides* та при використанні ензиму *HinfI* вид *Lactococcus lactis* ssp.*

Метод RFLP-PCR є доцільним щодо визначення спорідненості виділених МКБ, виявлення їх гетерогенних властивостей та часткового визначення видової приналежності досліджуваних штамів бактерій.

Ключові слова: МОЛОЧНОКИСЛІ БАКТЕРІЇ, ГЕНОТИПУВАННЯ, ПОЛІМЕРАЗНА ЛАНЦЮГОВА РЕАКЦІЯ, АМПЛІФІКАЦІЯ, ПОЛІМОРФІЗМ

THE ISOLATION AND IDENTIFICATION OF LACTIC ACID BACTERIA USING THE RFLP-PCR METHOD OF THE GENE 16 rRNA

I. M. Slyvka¹, O. Y. Tsisaryk¹, T. Bocer²
slyvka.88@ukr.net, tsisaryk_o@yahoo.com

¹Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies named after S. Z. Gzhytskyj, Pekarska st., 50, Lviv, 79010, Ukraine

²University of Rzeszow, Sokolowska str., 26, Kolbuszowa, 36-100, Poland

The application of modern molecular genetic methods for identification of lactic acid bacteria (LAB) is one of the criteria for the selection strains of LAB which are perspective for use in biotechnology and the food industry. Our purpose was to identify LAB, isolated from ewe's cheese that is traditionally produce in the Carpathian region of Ukraine. We used a method of analysis of restriction fragment length polymorphism DNA (RFLP) based on polymerase chain reaction (PCR). We used a method of analysis of restriction fragment length polymorphism DNA (RFLP -PCR). 28 pure cultures of LAB were isolated from

prototype cheese of bacteria of the genus *Lactobacillus*. 12 reference strains bacteria of the genus *Lactobacillus* were used for a comparative analysis of DNA restriction fragment.

The isolation of genomic DNA from cultures was carried out with using a set of Genomic Mini (A&A Biotechnology). Two primers EGE1 and 1492R (Sigma-Aldrich) used for amplification of the 16S rRNA gene. Two enzymes *RsaI* and *HinfI* used for dissection amplified DNA.

Several different restriction fragment DNA profiles made it possible to identify method RFLP-PCR.

Three groups of bacteria using the enzyme *HinfI* and four groups of bacteria using enzyme *RsaI* were identified similarity location restriction fragment DNA investigating strains of LAB in agarose gel. Two types of bacteria of the genus *Lactobacillus* identified based on comparative analysis of DNA restriction fragment investigating strains of LAB reference strains. Species *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides* identified when using enzyme *RsaI* and species *Lactococcus lactis* ssp. identified when using the enzyme *HinfI*.

The appropriate is to determine the affinity of selected of LAB detection of heterogeneous properties and partial definition of belonging to the species investigating strains of bacteria using the RFLP-PCR method.

Keywords: LACTIC ACID BACTERIA, GENOTYPING, POLYMERASE CHAIN REACTION, AMPLIFICATION, POLYMORPHISM

ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА RFLP-PCR ГЕНА 16S рРНК

И. Н. Сливка¹, О. И. Цисарык¹, Т. Боцер²
slyvka.88@ukr.net, tsisaryk_o@yahoo.com

¹ Львовский национальный университет ветеринарной медицины и биотехнологий имени С. З. Гжицкого, ул. Пекарская, 50, г. Львов, 79010, Украина

² Жешувский университет, ул. Соколовская, 26, г. Кольбушово, 36-100, Польша

Применение генетически молекулярных методов для идентификации молочнокислых бактерий (МКБ) является одним из критериев отбора штаммов МКБ перспективных для использования в биотехнологии и пищевой промышленности. Целью исследования было идентифицировать МКБ, выделенные из овечьего сыра, который традиционно изготавливается в Карпатском регионе Украины. Для идентификации МКБ использован метод анализа длин рестрикционных фрагментов ДНК (англ. Restriction fragment length polymorphism RFLP) на основе полимеразной цепной реакции (англ. Polymerase chain reaction PCR). С опытного образца сыра выделено 28 штаммов бактерий рода *Lactobacillus*. Для сравнительного анализа рестрикционных фрагментов ДНК использовано 12 референтных штаммов бактерий рода *Lactobacillus*.

Выделение геномной ДНК из полученных культур бактерий проводили, используя набор Genomic Mini фирмы A & A Biotechnology. Для амплификации гена 16S рРНК использовано пару праймеров EGE1 и 1492R, фирмы Sigma-Aldrich. Для расщепления амплифицированной ДНК использовано два фермента *RsaI* и *HinfI*.

Метод RFLP-PCR позволил выделить несколько различных профилей рестрикционных фрагментов ДНК. По сходству расположения рестрикционных фрагментов ДНК Исследование штаммов МКБ в агарозном геле было выделено три группы бактерий с использованием фермента *HinfI* и четыре группы бактерий с использованием фермента *RsaI*.

На основе сравнительного анализа рестрикционных фрагментов ДНК исследуемых штаммов МКБ с референтными штаммами идентифицировано два вида бактерий рода *Lactobacillus*. При использовании фермента *RsaI* определен вид *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides* и при использовании фермента *HinfI* вид *Lactococcus lactis* ssp.

Метод RFLP-PCR целесообразно использовать для определения родства выделенных МКБ, выявление их гетерогенных свойств и частичного определения видовой принадлежности исследуемых штаммов бактерий.

Ключевые слова: МОЛОЧНОКИСЛИЕ БАКТЕРИИ, ГЕНОТИПИРОВАНИЕ, ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ, АМПЛИФИКАЦИЯ, ПОЛИМОРФИЗМ

Молочнокислі бактерії (МКБ) все більше привертають увагу дослідників створенням на їх основі функціональних продуктів з метою оздоровлення організму людини. Пошук нових штамів молочнокислих бактерій, їх виділення із різних природних джерел, зокрема із традиційних кисломолочних продуктів, та вивчення їх властивостей сьогодні є актуальними [1].

Застосування комплексу молекулярно-генетичних методів для ідентифікації та вивчення генетичної різноманітності штамів МКБ дасть можливість відтворення природної мікрофлори у складі бактеріальних препаратів для виробництва традиційних кисломолочних продуктів і сирів у промислових умовах [2].

Серед вимог до штамів МКБ важливим є правильна ідентифікація мікроорганізмів з використанням сучасних мікробіологічних і молекулярно-генетичних методів. Це обґрунтовується використанням близькоспоріднених видів мікроорганізмів у складі бактеріальних препаратів для функціональних продуктів, диференціація яких ускладнена внаслідок перехресних міжвидових властивостей.

З метою запобігання втрати біорізноманіття МКБ традиційних кисломолочних продуктів і сирів, важливою є її точна ідентифікація. Свою увагу зосередили на традиційному овечому сирі — бринза, виробництво якого набуло значного поширення у багатьох країнах світу. Бринза вважається національним харчовим продуктом болгар, румунів, молдаван, а також українців. Бринзу традиційно виготовляють в українських Карпатах, однак її мікрофлора не досліджена. Для виконання цієї задачі необхідно використовувати нові методи вивчення властивостей МКБ, які відображають взаємовідносини штамів на рівні роду, виду, підвиду.

Генотипування сьогодні є одним із сучасних методів молекулярної ідентифікації МКБ. Метод полягає у вивченні нуклеотидних послідовностей в

генах з метою пошуку відмінностей (мутацій, поліморфізмів) та ідентифікації окремих генотипів. Більшість методів генотипування засновані на основі проведення полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) та різних її варіантів.

Метод RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) базується на поліморфізмі довжин рестрикційних фрагментів. Метод дає можливість провести аналіз довжин рестрикційних фрагментів ДНК та отримати інформацію щодо положення сайтів рестрикції в геномі бактерії [3]. Ензими рестрикції розпізнають специфічні нуклеотидні послідовності і розсікають ДНК на певні фрагменти з утворенням ниток різної довжини [4].

Ген 16S рРНК, вважається універсальним генетичним маркером, що використовується в процесі дослідження бактеріальних популяцій, який присутній у геномі усіх видів бактерій. До складу бактеріального геному може входити кілька копій гену 16S рРНК, що відрізняються окремими ділянками нуклеотидної послідовності. Гетерогенність інтрагеномних копій гену 16S рРНК використовується в молекулярній мікробіології для визначення таксонів до видів, штамів і риботопів (груп, штамів, об'єднаних за ознакою спільних нуклеотидних послідовностей гена 16S рРНК). Незначні відмінності в секвенції гену 16S рДНК або генетичний поліморфізм дозволяють диференціювати групи мікроорганізмів [5].

Метою роботи було проведення ідентифікації штамів МКБ, ізольованих із овечого сиру — буц з використанням молекулярно-генетичних методів.

Матеріали і методи

Об'єктом досліджень був свіжий сир — буц, виготовлений із сирого овечого молока. Зразки сиру відбирали у гірській зоні Путилівського району Чернівецької області. Із дослідного зразка сиру було ізольовано 28 чистих культур МКБ.

Визначення приналежності виділених бактерій до роду *Lactobacillus*

проводили за ГОСТ 10444.11-89 «Продукти харчові. Методи виявлення молочнокислих мікрорганізмів».

Для виділення чистих культур МКБ використовували метод посіву десятикратних розведень досліджуваного матеріалу на спеціальні селективні середовища. Використовували два середовища: *MRS (de Man, Rogosa and Sharpe)* та *M17*. Метод виявлення молочнокислих паличок базувався на їх здатності розвиватися на твердому поживному середовищі *MRS*. Для ізоляції лактококів використовували середовище *M17*. Поживні середовища були приготовлені на основі дистильованої води і стерилізовані в автоклаві за температури 121 °С, тиску 1 атм, упродовж 15 хв. Інкубування лактобактерій здійснювали в анаеробних і мікроаерофільних умовах за температури 38 °С, інкубування лактококів

за температури 25 °С та 42 °С. Після інкубування на твердих поживних середовищах поодинокі КУО МКБ переносили у рідке поживне середовище *MRS* та *M17* для нарощення біологічної маси для подальшої ізоляції геномної ДНК бактерій.

Ізоляцію геномної ДНК проводили використовуючи набір *Genomic Mini* фірми *A&A Biotechnology* згідно з інструкцією виробника. Визначення концентрації і чистоти ізольованої ДНК проводили на спектрофотометрі *NanoDrop 2000* фірми *Thermo Scientific*.

Ампліфікацію ДНК виконано на основі ПЛР. Синтетичні олігонуклеотиди *EGE1* та *1492R*, використані для ампліфікації ДНК, виготовлені фірмою *Sigma-Aldrich*. Секвенція олігонуклеотидів наведена у таблиці 1.

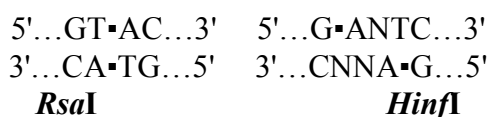
Таблиця 1

Секвенція стартерів, які використані для ампліфікації гену 16S рДНК

Стартер	Нуклеотидна секвенція
EGE1	5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG -3'
1492R	5' - GGTTACCTTGTTACGACTT -3'

Реакційну суміш для ампліфікації складала: деіонізована вода, диоксинуклеозидтрифосфати (dNTPy), буфер для полімерази з іонами Mg²⁺, термостабільна полімераза *Taq*, 2 праймери *EGE1 (forward)* та *1492R (reverse)* і ДНК-матриця. Процес ампліфікації проведено на термоциклері *Mastercycler Gradient* фірми *Eppendorf*.

Для розщеплення продукту ампліфікації використано два ензими рестрикції *RsaI* і *HinI* фірми *Roche*. Процес розщеплення проводили за температури 37 °С упродовж 60 хв. Секвенція розпізнавання ензимів представлена нижче (N-вільний нуклеотид).



Електрофорез в агарозному гелі здійснено в апараті фірми *Bio-Rad*. Гель приготовлено відповідно до кількості

агарози і розведення буферу 1xTBE (TrisHCl, H₃BO₃, EDTA) за напруги 70–90 V. Кількість ампліфікованого ДНК визначали на основі маркера молекулярної маси *GeneRuler 1kb DNA Ladder* фірми *Fermentas*. Візуалізацію ДНК виконано в транслюмінаторі *G-Box Syngene*. Відтворюваність рестрикційних профілів оцінювали шляхом порівняння ампліфіконів, отриманих при ампліфікації. Для порівняльного аналізу рестрикційних профілів ДНК використано контрольні штами МКБ із колекції кафедри промислової мікробіології і продовольств *Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego*, Польща. У роботі використано 12 штамів МКБ: *Lactococcus lactis spp. lactis* 6; *Lactococcus lactis ssp. cremoris*; *Lactococcus lactis ssp. lactis 1267*; *Lactococcus lactis subsp. lactis var. diacetyllactis*; *Lactobacillus plantarum 295/1*; *Lactobacillus brevis 211*; *Enterococcus faecalis*; *Lactobacillus plantarum 21*; *Lactobacillus delbrueckii ssp.*

bulgaricus; *Lactobacillus acidophilus* 43/15; *Lactobacillus brevis* 32; *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides*.

Результати й обговорення

Вперше ізолювано і проведено аналіз бактеріальної мікрофлори овечого сиру методом RFLP-PCR. За морфолого-культуральними властивостями МКБ відносилися до родини *Lactobacteriaceae* та *Streptococcaceae* та трьох родів *Lactobacterium*, *Lactococcus* і *Streptococcus*.

Молочнокислі палички росли на щільному живильному середовищі *MRS* при температурі +38 °С, формуючи білі або сіруваті колонії, діаметром від 1 мм до 5 мм, інколи лінзоподібної або зіркоподібної форми. Поверхня колоній була переважно гладенькою і блискучою

(S-форма), проте в окремих випадках спостерігали шорсткі колонії (R-форми).

Для лактококів відзначали характерний ріст на щільному поживному середовищі *M17* при температурі +25 °С та +42 °С у вигляді округлих і човникоподібних колоній. На поверхні середовища утворювалися округлі колонії з рівними краями, а човникоподібні колонії дещо вросли в агар.

У препаратах, пофарбованих за Грамом, виявляли прямі чи злегка зігнуті грамозитивні палички, зазвичай, розташовані поодинокі або ж короткими ланцюжками, без ознак споро- чи капсулоутворення.

Виділено 28 чистих культур МКБ. Із культур ізолювано геномну ДНК. Концентрацію та чистоту ізолюваної ДНК наведено у таблиці 2.

Таблиця 2

Результати визначення ступеня чистоти і кількості ізолюваної геномної ДНК із досліджуваних культур МКБ

№ ізоляту МКБ	Кількість ДНК нг/мкл	Чистота ДНК A260/A280	№ ізоляту МКБ	Кількість ДНК нг/мкл	Чистота ДНК A260/A280
1	84,7	1,81	15	93,7	1,69
2	83,6	1,80	16	185,4	1,63
3	72,4	1,81	17	87,3	1,78
4	113,4	1,82	18	145,2	1,69
5	96,6	1,66	19	53,6	1,73
6	87,5	1,78	20	122,2	1,62
7	77,0	1,78	21	189,7	1,60
8	94,4	1,80	22	134,0	1,62
9	84,3	1,76	23	103,8	1,75
10	164,1	1,61	24	78,9	1,83
11	79,5	1,76	25	87,6	1,67
12	86,8	1,81	26	107,3	1,78
13	95,6	1,77	27	73,4	1,86
14	76,6	1,81	28	82,6	1,68

Ампліфікацію гену 16S рРНК виконано методом ПЛР на основі ізолюваної ДНК-матриці з додаванням двох праймерів *EGE1 (forward)* та *1492R (reverse)* та застосуванням термостабільної полімерази *Taq*. Для візуалізації

отриманого ПЛР-продукту виконано електрофорез в агарозному гелі. Отримана електрофореграма представлена на рисунку 1.

Очищений продукт ПЛР розщеплювали двома ензимами рестрикції: *HinI* і *RsaI*.

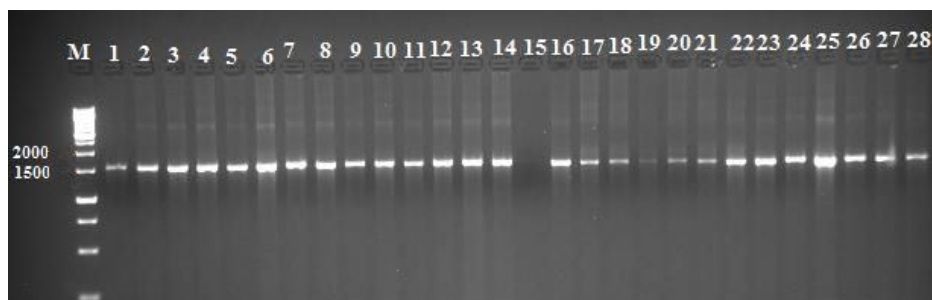


Рис. 1. Електрофореграма продуктів ампліфікації гену гену 16S рРНК. М — маркер молекулярної маси ДНК. Доріжки № 1–28 продукти реакції PCR

Зразки піддавали розщепленню кожним ензимом окремо. Перший ензим *RsaI* залишив фрагменти РНК з тупими кінцями. Друге розщеплення виконано з використанням ензиму *HinfI*, який залишав липкі кінці фрагментів РНК. Буфер для розщеплення був вибраний так, щоб забезпечити оптимальну активність ензиму. Після розщеплення, зразки піддавали

електрофорезу. Отримані фрагменти рестрикції дозволили розділити на групи генетично подібні ізоляти.

Результати рестрикційного розщеплення досліджуваних зразків ензимом *RsaI* подано на рисунку 2. Результати рестрикційного розщеплення досліджуваних зразків ензимом *HinfI* представлені на рисунку 3.

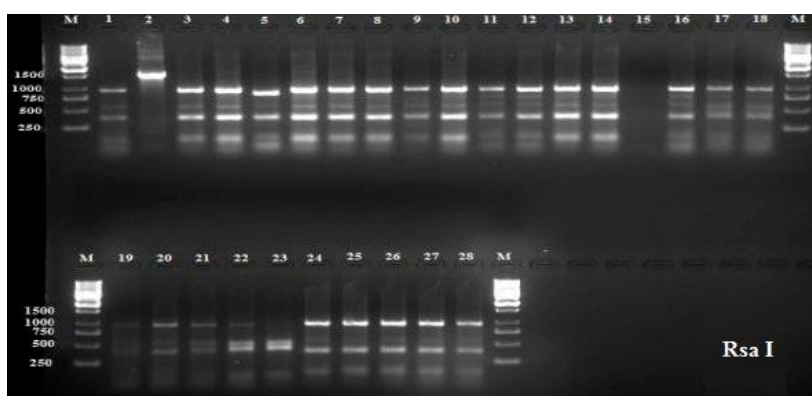


Рис. 2. Електрофореграма рестрикційного розщеплення гену 16S рРНК ензимом *RsaI*. М — маркер молекулярної маси. Доріжки № 1–28 досліджуванні зразки. Доріжка № 15 — брак продукту рестрикції в колонці (є результатом браку продукту PCR після ізоляції ДНК)

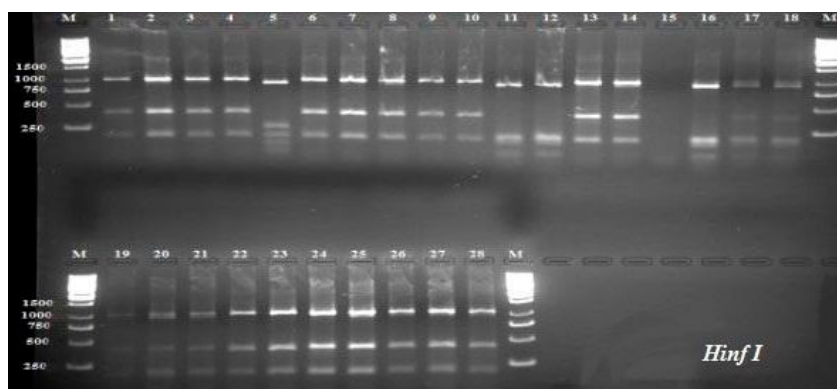


Рис. 3. Електрофореграма рестрикційного розщеплення гену 16S рРНК ензимом *HinfI*. М — маркер молекулярної маси. Доріжки № 1–28 досліджуванні зразки. Доріжка № 15 — брак продукту рестрикції в колонці (є результатом браку продукту ПЛР після ізоляції ДНК)

Аналогічно було проведено розщеплення продукту ампліфікації гену 16S рРНК референтних штамів молочнокислих бактерій. Референтні штами МКБ розщеплені ензимом *RsaI* представлені на рисунку 4.

Розщеплення продукту ампліфікації гену 16S рРНК референтних штамів ензимом *HinfI* представлені на рисунку 5.

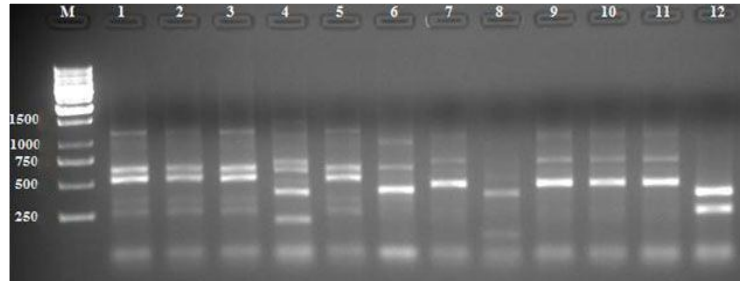


Рис. 4. Електрофореграма рестрикційного розщеплення гену 16S рРНК ензимом *RsaI* референтних штамів М — маркер молекулярної маси; 1 — *Lactococcus lactis* spp. *lactis* 6, 2 — *Lactococcus lactis* spp. *cremoris*, 3 — *Lactococcus lactis* spp. *lactis* 1267, 4 — *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis*, 5 — *Lactobacillus plantarum* 295/1, 6 — *Lactobacillus brevis* 211, 7 — *Enterococcus faecalis*, 8 — *Lactobacillus plantarum* 21, 9 — *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, 10 — *Lactobacillus acidophilus* 43/15, 11 — *Lactobacillus brevis* 32, 12 — *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides*

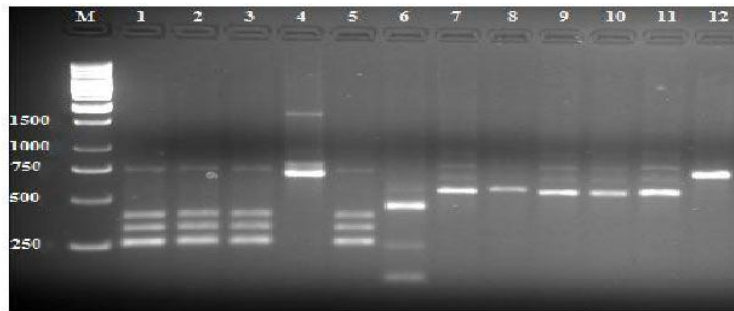


Рис. 5. Електрофореграма рестрикційного розщеплення гену 16S рРНК ензимом *HinfI* референтних штамів. М — маркер молекулярної маси; 1 — *Lactococcus lactis* spp. *lactis* 6, 2 — *Lactococcus lactis* spp. *cremoris*, 3 — *Lactococcus lactis* spp. *lactis* 1267, 4 — *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis*, 5 — *Lactobacillus plantarum* 295/1, 6 — *Lactobacillus brevis* 211, 7 — *Enterococcus faecalis*, 8 — *Lactobacillus plantarum* 21, 9 — *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, 10 — *Lactobacillus acidophilus* 43/15, 11 — *Lactobacillus brevis* 32, 12 — *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides*

Генотипування з високою роздільною здатністю, проведене за допомогою ГЕПП (гель-електрофорез у пульсуючому полі), показало значний ступінь гетерогенності між досліджуваними штамми МКБ. Кожний окремий ізолят МКБ характеризувався унікальним фінгерпринтом, який полягав у різній кількості рестрикційних фрагментів ДНК і їх молекулярній масі, а, отже, і розташуванні в гелі. Це демонструє високу ступінь гетерогенності ізольованих штамів, які було розподілено на 7 груп.

Рестрикційні профілі ДНК досліджуваних штамів МКБ отримані при застосуванні ензиму *RsaI* за їх схожістю було розподілено у 4 групи, а при використанні ензиму *HinfI* у 3 групи.

Досліджувані зразки, які віднесені до певних груп наведено в таблиці 3 і 4.

Порівнюючи отримані рестрикційні профілі ДНК досліджуваних МКБ із рестрикційними профілями контрольних штамів МКБ при застосуванні RFLP-ПЛР, вдалося відшукати декілька спільних електрофоретичних фрагментів.

Таблиця 3

Групи схожих генетичних профілей МКБ за використання рестрикційного ензиму *RsaI*

Номер групи, що мають схожий генетичний профіль	Номери доріжок електрофоретичних знімків, що мають схожі генетичні профілі
I	2
II	1,3,4,5,6,7,8,11,12,16,17,18
III	9,10,13,14,19,24,25,26,27,28
IV	20,21,22,23

Таблиця 4

Групи схожих генетичних профілей МКБ за використання рестрикційного ензиму *HinfI*

Номер групи, що мають схожий генетичний профіль	Номери доріжок електрофоретичних знімків, що мають схожі генетичні профілі
I	1,2,3,4,6,7,8,9,10,13,14
II	5
III	11,12,16,17,18, 19, 20,21,22,23,24,25,26,27,28

Розщеплення ензимами *RsaI* і *HinfI* дозволило виділити декілька різних профілів рестрикції ДНК. Розщеплення ензимом *RsaI* дало можливість вирізнити чотири різні групи рестрикційних профілів, ензимом *HinfI* три групи профілів. Беручи до уваги те, що для розщеплення ензимами рестрикції було піддано досить консервативну ділянку 16S рДНК, це свідчить про диференціювання семи різних груп (видів) МКБ, які беруть участь в процесі виробництва сиру. Рестрикційні профілі ДНК досліджуваних штамів МКБ із застосуванням цих двох ензимів частково покриваються із профілями контрольних штамів МКБ. Попередньо досліджувані штамми молочнокислих бактерій при використанні ензиму *HinfI* було віднесено до роду *Lactobacillus*, виду *Lactococcus lactis ssp.* (рис. 3, електрофоретична доріжка № 5) та ідентифіковано вид *Leuconostoc mesenteroides ssp. mesenteroides* (рис. 2, електрофоретичні доріжки № 22, 23) при використанні ензиму *RsaI*.

Варто відзначити, що застосування ензимів *RsaI* і *HinfI* для розсікання фрагментів ДНК молочнокислих бактерій використовувались вперше. Отримані результати показують, що стратегія використання цих ензимів є доцільною, оскільки профілі рестрикції частково покриваються із профілями референтних штамів МКБ, що дозволяє диференціювати аналізовані мікроорганізми. Детальніша

ідентифікація досліджуваних штамів МКБ потребує використання ширшого діапазону референтних штамів МКБ та додаткових методів дослідження.

За даними літератури відомо, що присутність у різних сирах *Lactococcus lactis ssp.* є характерним, оскільки штамми цього виду відповідають за продукування молочної кислоти на початку дозрівання сиру та за перетворення амінокислот в ароматичні сполуки [10]. Роль виду *Leuconostoc mesenteroides ssp. mesenteroides* є невід’ємною під час процесу протеолізу і ліполізу, виробництва молочної кислоти і зменшення окислювально-відновного потенціалу [11].

Висновки

Проведено ізоляцію та ідентифікацію молочнокислих бактерій із природної еконіші — розсольного сиру бринзи, який традиційно виготовляється у Карпатському регіоні України. Ідентифікація штамів молочнокислих бактерій здійснена молекулярно-генетичними методами на основі полімеразної ланцюгової реакції, а саме методом аналізу довжин рестрикційних фрагментів RFLP-PCR.

Рестрикційне розщеплення ензимом *RsaI* дало змогу вирізнити 4 групи бактерій із схожим розташуванням рестрикційних фрагментів у агарозному гелі.

Використання ензиму *Hinf*I дало змогу виділити 3 групи бактерій.

При використанні ензиму *Rsa*I ідентифіковано вид *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides* за порівняльним аналізом рестрикційних фрагментів із референтним штамом № 12.

Вид *Lactococcus lactis* ssp ідентифіковано при використанні ензиму *Hinf*I та покриттям рестрикційних фрагментів цього виду із референтними штамми № 1, 2, 3 і 5.

Перспективи подальших досліджень. Остаточним підтвердженням приналежності ідентифікованих видів МКБ є секвенування гену 16S рРНК. Тому подальшу роботу скеровуємо на детальнішу ідентифікацію молочнокислої мікрофлори методом філогенетичного аналізу секвенованих фрагментів гену 16S рРНК з подальшою селекцією найефективніших штамів.

1. Bondarenko V. M. Probiotics and their mechanisms of therapeutic action *Experimental Clinical gastroenterology*, 2004, no. 3, pp. 83–87 (in Ukrainian).

2. Ljaskovskyy T. M., Pidgorsky V. S., Kovalenko N. K. Identification of probiotic strains of lactic acid bacteria. *Microbiological journal*, 2008, vol. 70, no 6, pp. 3–9 (in Ukrainian).

4. Charon K. M., Switoński M. Genetyka zwierząt. Wydawnictwo Naukowe PWN ISBN 83-01-14022-4, 2004, pp. 88.

5. Brown T. A. Genomy. Wydawnictwo Naukowe PWN ISBN 83-01-13439-9, 2001, pp. 17–20.

6. Farber J.M. and ather, An Introduction to the hows and whys of molecular typing. *Journal of Food Protection*, 1996, 59 (10), pp. 1091–1101.

7. Kovalenko N. K., Laschevskyy V. V. Application of the polymerase chain reaction (PCR) for identification of lactic acid bacteria. *Dairy Industry*, 2003, vol. 1, no 4, pp. 24–25 (in Ukrainian).

8. Gala E., Landi S., Solieri L., Nocetti M., Pulvirenti A., & Giudici P. Diversity of lactic acid bacteria population in ripened Parmigiano Reggiano cheese. *International journal of food microbiology*, 2008, 125 (3), pp. 347–351.

9. Mannu L., Comunian R. and Scintu M. F. Mesophilic lactobacilli in Fiore Sardo cheese: PCR-identification and evolution during cheese ripening. *International Dairy Journal*, 2000, 10, pp. 383–389.

10. Bouton Y., Guyot P., Beuvier E. and Grappin R. Use of PCR-based methods and PFGE for typing and monitoring homofermentative lactobacilli during Comté cheese Ripening. *International Journal of Food Microbiology*, 2002, 76, pp. 27–38.

11. Feutry, F., Oneca, M., Berthier, F. and P. Torre Biodiversity and growth dynamics of lactic acid bacteria in artisanal PDO Ossau-Iraty cheese made from raw ewe's milk with different starters. *International journal of food microbiology*, 2012, 29, pp. 33–42.

12. Terzik-Vidojevic A., Mihailovic S., Uzelac G. and Topisirovic L. Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from artisanal white brined Golia cow's milk cheeses. *Archives of Biological Science Belgrade*, 2014, 66 (1), pp. 179–192.