

В будущем селекция, основанная на молекулярных маркерах, может значительно увеличить эффективность селекции сельскохозяйственных культур.

Литература

- 1 Biotechnology for agricultural development. Proceedings of the fao international technical conference on "agricultural biotechnologies in developing countries: options and opportunities in crops, forestry, livestock, fisheries and agro-industry to face the challenges of food insecurity and climate change" (ABDC-10). FAO. - 2011. -P. 11.
- 2 Riede C.R., Anderson, J.A. Linkage of RFLP markers to an aluminum tolerance gene in wheat// Crop Sci. - 1996. - No 36. - P. 905–909.
- 3 Chen X.M., Line R. F., Leung H. Genome scanning for resistance gene analogs in rice, barley, and wheat by high resolution electrophoresis// Theor. Appl. Genet. - 1998. -No 97. -P.345-355.
- 4 Wang X., Mulock E., Guus B., McCallum B. Development of EST-derived simple sequence repeat markers for wheat leaf rust fungus, *Puccinia triticina* Ericks // Canadian Journal of Plant Pathology. – 2012. -V. 32:1. -P. 98-107.
- 5 Кохметова А.М., Атишова М.Н. Идентификация источников устойчивости к стеблевой ржавчине пшеницы с использованием молекулярных маркеров // Вавиловский журнал генетики и селекции. - 2012, -том 16, -№ 1. -С. 132-141.
- 6 Hayden M.J., Kuchel H., Chalmers K.J. Sequence tagged microsatellites for the *Xgwm533* locus provide new diagnostic markers to select for the presence of stem rust resistance genes *Sr2* in bread wheat (*Triticum aestivum* L.)// Theor. Appl. Genet. -2004. -No 109. - P. 1641–1647.
- 7 Peterson R.F., Campbell A.B., Hannah A.E. A diagrammatic scale for estimating rust intensity on leaves and stems of cereals // Can. J. Res. -1948. -V. 26. - P.496–500.
- 8 Kokhmetova A., Morgounov A., Rsaliev Sh. *et al.* Wheat germplasm screening for stem rust resistance using conventional and molecular techniques // Czech J. Genet. Plant Breeding. - 2011. - V. 47. -P. 146–154.
- 9 Shi Z.X., Chen X.M., Line R.F. *et al.* Development of resistance gene analog polymorphism markers for the *Yr9* gene resistance to wheat stripe rust// Genome. - 2001. - V. 44. - P. 509–516.

УДК 579.62:575.58

М.С. Уразова*¹, А.С. Джаилбекова², А.К. Молдагулова¹, С.С. Ануарбекова¹, А.К. Туякова¹,
Г.К. Абитаева¹, К.Г. Ли¹, Э.Е. Бекенова¹, С.М. Шайхин¹, К.Х. Алмагамбетов¹

¹Республиканская коллекция микроорганизмов, г. Астана, Казахстан

²Национальный референтный центр по ветеринарии, г. Астана, Казахстан

*e-mail: maira_01@mail.ru

Молочнокислые бактерии, обладающие бактериоциногенной активностью по отношению к *Listeria monocytogenes*

В результате исследования было выделено и определено до вида 50 культур молочнокислых бактерий из различных продуктов питания. Были изучены их морфологические признаки, антагонистическая и бактериоциногенная активности. Выявлены бактериоцин-продуцирующие штаммы, обладающие широким спектром антимикробной активности, в том числе и к *Listeria monocytogenes*

Ключевые слова: МКБ - молочнокислые бактерии, бактериоцин, супернатант, *Listeria*.

M.S. Urazova, A.S. Djailbekova, A.K. Moldagulova, S.S. Anuarbekova, A.K. Tuyakova, G.K. Abitaeva, K.G. Li, E.E. Bekenova, S.M. Shaikhin, K.H. Almagambetov

Lactic acid bacteria which possess bacteriocin activity to control *Listeria monocytogenes*

We picked out and determined to species 50 cultures of lactic acid bacteria from different food stuff. The morphological, antagonistic and bacteriocin activity were investigated and described. Bacteriocin producing strains with antimicrobial activity to different bacteria including *Listeria monocytogenes* were obtained during the investigation

Keywords: lactic acid bacteria, supernatant, bacteriocins, *Listeria*.

М.С. Уразова, А.С. Джаилбекова, А.К. Молдагулова, С.С. Ануарбекова, А.К. Туякова,
Г.К. Абитаева, К.Г. Ли, Э.Е. Бекенова, С.М. Шайхин, К.Х. Алмагамбетов

Listeria monocytogenes-ке бактериоцинді белсенділігін байқататын сүт қышқылы бактериялар

Зерттеу нәтижесінде әр түрлі тамақ өнімдерінен сүтқышқылды бактериялардың 50 түрі алынды және анықталды. Олардың морфологиялық, антагонистік және бактериоциногендік белсенділігі зерттелді. Антимикробтық белсенділігі бар бактериоцин штаммдары бөліп алынды.

Түйін сөздері: сүт қышқылды бактериялар, супернатант, бактериоцин, *Listeria*.

Листериоз - антропургическое, клинически полиморфное инфекционное заболевание, распространенное повсеместно и протекающее с преимущественным поражением системы мононуклеарных фагоцитов, нервных тканей или в виде ангинозно-септической формы. Возбудитель - *Listeria monocytogenes* - грамположительная палочка, способная размножаться при 4-6 °С в различных объектах (почве, воде, на растениях, в трупах и пищевых продуктах, хранящихся в холодильнике). Длительно выдерживает 6-20% концентрации поваренной соли, при 62 °С погибают через 35 мин, при 100 °С - в течение 5-10 мин [1].

Заболеемость листериозом в Казахстане, как и в России держится на низких цифрах (примерно 50-70 случаев), что абсолютно не отражает реальной ситуации, а связано лишь со слабой диагностикой инфекции. Между тем возбудитель при пищевом пути передачи может вызвать тяжелые патологии, часто со смертельным исходом, о чем сообщалось медицинскими службами США, Финляндии, России, Франции [2]. Так в США ежегодно регистрируется 2500 случаев листериоза человека, из них в 500 случаях инфекция приводит к смерти больного. Особенно опасен листериоз для беременных в связи с перинатальной передачей возбудителя от матери к ребёнку (трансплацентарно или во время родов). Листериоз отнесен к группе TORCH – инфекций, вызывающих у плода стойкие дефекты различных органов, наиболее важными из которых являются поражения центральной нервной системы [3].

Одним из методов борьбы с контаминацией пищевой продукции патогенной микрофлорой является применение бактериоцинов молочнокислых бактерий (МКБ). На данный момент известны более 100 бактериоцинов, отличающихся по структуре, биохимическим особенностям и спектру чувствительных микроорганизмов. Возможны два способа использования бактериоцинов МКБ в пищевой промышленности: 1 - в очищенном виде (как биоконсервант низин), или 2 – в виде бактериоцин-продуцирующих микроорганизмов. В случае использования бактериоцин-продуцирующего штамма необходимо учитывать возможное негативное влияние продуктов метаболизма микроорганизма на вкусовые характеристики конечного продукта, поэтому инновационным подходом является выделение бактериоциногенных штаммов МКБ непосредственно из продуктов питания (из кисломолочных продуктов, мясных полуфабрикатов и т.д.) [3].

Целью нашей работы было выделение молочнокислых бактерий из продуктов питания, обладающих широким спектром бактериоциногенной активности, в том числе по отношению к *Listeria monocytogenes*, являющейся причиной опасной для человека инфекции листериоза.

Материалы и методы

Объектами исследования служили 50 культур МКБ, которые были выделены нами из различных мясо-молочных продуктов питания домашнего и промышленного производства. Тест-штаммы *E.coli*, *S.marcescens*, *S.aureus* были взяты из музея РГП «РКМ». Проверка антагонистической и бактериоциногенной активности МКБ по отношению к *Listeria monocytogenes*, проводилась нами на базе РГП «Национальный референтный центр по ветеринарии» МСХ РК, штамм В 0600 КДК-1 был предоставлен музеем данной организации. Данный штамм был выделен в апреле 2012 года от павшего верблюда Мангистауской области, Бейнеуский р-н, к/х "Абен".

Методы выделения и изучения МКБ. Общеизвестный метод идентификации бактерий в основном ориентирован на использование определителя «Bergey Manual of Systematic Bacteriology».

Для получения чистых культур был использован метод десятичных разведений с последующим пересевом на твердую питательную среду (MRS, HiMedia), селективную по отношению к МКБ.

Видовая идентификация МКБ методом анализа нуклеотидной последовательности гена 16S rRNA. Для определения нуклеотидной последовательности 16S rDNA проводили ПЦР с использованием праймеров 8f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') и 806r (5'-GGACTACCAGGGTATCTAAT-3'), которые являются универсальными для бактерий. Очистку и разделение фрагментов гена проводили с помощью автоматического секвенатора ABI Prism 310 (Applied Biosystems, США), согласно инструкциям фирмы-производителя.

Методы изучения антагонистической активности МКБ. Антагонистическую активность МКБ по отношению к тест-культурам: *E.coli*, *S.marcescens*, *S.aureus* изучали методом отсроченного антагонизма. Антагонистическую активность МКБ по отношению к *Listeria monocytogenes* изучали методом агаровых блоков [3].

Метод изучения бактериоциногенной активности МКБ. Для изучения антимикробной активности МКБ, обусловленной веществами белковой природы, т.е. бактериоцинами, использовали метод диффузии в агар, описанный Yang et al. (2012г), с тремя видами супернатантов: 1 – чистый; 2 – с добавлением NaOH, для подавления действия кислоты; 3 – с добавлением NaOH и каталазы, для элиминации, как кислоты, так и перекиси водорода [4].

Результаты и их обсуждение

В результате идентификации методом анализа нуклеотидных последовательностей гена 16S rRNA были определены виды бактерий, выделенных из различных продуктов питания. Согласно полученным результатам секвенирования 16S rDNA основную группу из числа выделенных изолятов бактерий составили кокковые виды МКБ: *Pediococcus acidilactici*, *Lactococcus lactis*, *L.garvieae*, *Enterococcus durans*. Лактобациллы были представлены большим разнообразием видов: *Lb.casei*, *Lb.rhamnosus*, *Lb.plantarum*, *Lb.pentosus*, *Lb.brevis*, *L.fermentum*, *Lb.sakei*.

Для отбора бактериоциногенных культур МКБ мы провели скрининг наших изолятов по антагонистической активности по отношению к патогенным и условно-патогенным штаммам. Оценка антагонистической активности методом отсроченного антагонизма показала, что большинство из них обладают достаточно сильным антимикробным эффектом.

Используя методику Yang et al. (2012), был проведен анализ МКБ на бактериоциногенную активность, т.е. исследовалась природа антагонизма МКБ. Антагонизм к индикаторным культурам мог быть обусловлен действием: (а) органических кислот, (б) перекиси водорода, секретлируемой некоторыми МКБ, и (в) собственно бактериоцином, как продуктом секреции МКБ.

У некоторых бактерий антагонизм проявили лишь «чистые» супернатанты, т.е. без добавок щелочи и/или каталазы. Это дает основание предположить, что антибиотическая активность у этих штаммов обусловлена действием лишь органических кислот. У трех штаммов МКБ антагонистическая активность проявлялась и при добавления щелочи, но при введении в супернатант каталазы, расщепляющей перекись водорода, данная активность терялась.

Таблица 1 – Супернатанты МКБ, обладающие бактериоциногенной активностью

Обозначение штамма	Зоны угнетения роста (мм)								
	<i>S.marcescens</i>			<i>E.coli</i>			<i>S.aureus</i>		
	чист	NaOH	Ката лаза	чист	NaOH	Ката лаза	чист	NaOH	Ката лаза
<i>P.acidilactici</i> 25	15,3±0,6	14,6±1,5	12,3±0,6	15,3± 0,6	13,6±1,5	13,3±0,6	12,6±1,5	12±1	10±1
<i>Lc.garvieae</i> 10a	14,6±0,6	10,6±0,6	11,3±0,6	12,3±1,15	10,3±0,6	10±1	11±1	10±0	10±1
<i>Lb.pentosus</i> 16ал	12,3±1,2	11,3±0,6	10,6±1,2	14±1	10±1	10±0	-	-	-
<i>Lb.pentosus</i> П-2	16,3±1,2	12±0	10±0	-	-	-	13,3±0,6	11±0	11±0
<i>P. acidilactici</i> 8	18±1	12±1	13±1	-	-	-	12±0	11±1	11±0
<i>P. acidilactici</i> 34	13,3±0,6	-	-	15,6±0,6	-	-	12±1	12±0	11±0
<i>Lb.brevis</i> 13б	12,3±0,6	14,3±1,15	10,3±0,57	-	-	-	-	-	-
<i>L.fermentum</i> 9.1	17,6±1,5	10,33±0,6	10,6±1,5	-	-	-	-	-	-
<i>Lb.plantarum</i> 27	17±0	12,6±1,15	12±1	-	-	-	-	-	-
<i>P. acidilactici</i> 12	14,3±1,2	12±1	10±0	-	-	-	-	-	-
<i>P. acidilactici</i> 54	16,3±1,6	11±1	10±1	-	-	-	-	-	-
<i>Lb.fermentum</i> 58	15±1	11±1	10±1	-	-	-	-	-	-
<i>P.acidilactici</i> 41	12,6±0,6	11,6±1,5	11±0	-	-	-	11±0	-	-
<i>L.acidofillus</i> 23	12±1	10±1	11±1	-	-	-	-	-	-
<i>Lb.brevis</i> 8.2	13±1	11±0	10±1	-	-	-	-	-	-
<i>P.acidilactici</i> л-2	13,6±0,6	10,6±0,6	11±0	-	-	-	-	-	-
<i>Lb.casei</i> 7л	12,3±0,3	12,3±1,5	11±0	-	-	-	-	-	-

В результате, только у 18 из 50 исследуемых штаммов (табл.), согласно полученным результатам, антагонистическая активность определялась действием бактериоцин-подобных веществ, но опять же у большинства она выражалась только к одной из тест-культур *S.marcescens*. Активными культурами, обладающими широким спектром бактериоциногенной активности в отношении как грам-положительных, так и грам-отрицательных бактерий можно назвать лишь 5: 10a - *Lactococcus garvieae* (выделен из казы г.Караганда), 25 - *Pediococcus acidilactici* (сметана «Родина»), 16 ал – *Lactobacillus pentosus* (сметана домашняя Астана), П-2 - *Lactobacillus pentosus* (Препарат Пробиотик Россия) и 8 - *Pediococcus acidilactici* (сметана домашняя Астана). Все 17 культур МКБ, обладающие

бактериоциногенной активностью были проверены на антагонизм к *Listeria monocytogenes* B-0600 КДК-1 на базе РГП «НВЦР» МСХ РК (таблица 1).

Проверка на антагонизм осуществлялась как самих культур МКБ методом агаровых блоков [3], так и супернатантов методом Yang et al [4].

Большинство из исследуемых штаммов МКБ проявили антагонистическую активность по отношению к *Listeria monocytogenes* B 0600, в эксперименте с применением метода агаровых блоков. Исключение составили штаммы *L.acidophilus* 23, *Lb.fermentum* 58, *P.acidilactici* Л-2.

Но при проверке активности супернатантов, лишь у 2 штаммов была выявлена бактериоциногенная активность, при которой регистрировалась зона задержки роста *Listeria monocytogenes* B 0600 вокруг всех 3 лунок с супернатантами. Это штаммы: *P.acidilactici* 25 (выделенный из сметаны фирмы «Родина» г.Астана) и *Lb.pentosus* 16ал (сметана домашняя г.Астана) (рисунок 1).

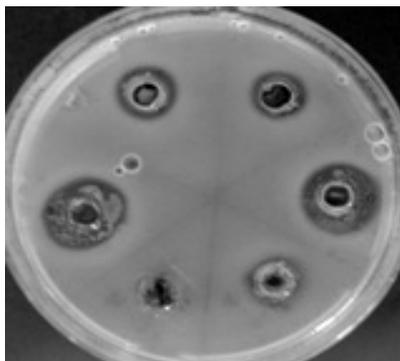


Рисунок 1 – Антагонистическое действие супернатантов МКБ в отношении *Listeria monocytogenes* B 0600: стрелками показаны 3 лунки заполненные тремя видами супернатанта (1 - чистый; 2 - с добавлением NaOH; 3 – с добавлением NaOH и каталазы) штамма *Lb. pentosus* 16 ал.

В результате проведенных нами исследований были выделены и определены бактериоцин-продуцирующие штаммы МКБ, обладающие широким спектром антимикробного действия, в том числе в отношении возбудителя листериоза бактерии *Listeria monocytogenes*. Данные штаммы в дальнейшем могут быть применены в качестве бактериоцин-продуцентов в борьбе со штаммами - контаминантами в мясо-молочной промышленности.

Литература

1. Криницина Э.В. Листериоз / Памятка врачу. Новосибирск, Вектор, 2011. - С.14.
 2. Тартаковский И.С. Листерии: роль в инфекционной патологии человека и лабораторная диагностика // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2000. -Т.2, - №10. - С. 121-125.
 3. Hartmann H., Wilke T. Efficacy of bacteriocin containing cell-free culture supernatants from lactic acid bacteria to control *Listeria monocytogenes* in food // International Journal of Food Microbiology. – 2011. - P.192-199.
- Yang E., Fan L., Doucette C., Fillmore S. Antimicrobial activity of bacteriocin-producing lactic-acid bacteria isolated from cheeses and yogurts // AMB Express a Springer Open Journal. - Canada.- 2012. – P.134-139.

УДК: 631.52. 633. 633.1; 635

Б.Н. Усенбеков^{*1}, Д.Т.Казкеев¹, Е.А. Жанбырбаев¹, А.Б. Рысбекова¹, К.М. Булатова², И.А. Сартбаева¹,
Л.К. Мамонов¹, Х.А. Беркимбай¹

¹Институт биологии и биотехнологии растений, г. Алматы, Казахстан

²КазНИИ земледелия и растениеводства, пос. Алмалыбак, Казахстан

*e-mail: bakdaulet7@yandex.ru,

Перспективы использования дигаплоидных регенерантов в селекции отечественных сортов глютинозного риса

В работе приведены данные по оптимизации получения дигаплоидных регенерантов в культуре пыльников для селекции казахстанских глютинозных сортов риса.