

POSTĘPY W IDENTYFIKACJI I RÓŻNICOWANIU BAKTERII FERMENTACJI MLEKOWEJ. CZĘŚĆ I.

Ilona Stefańska, Krystyna Stecka

Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego

Zakład Technologii Fermentacji,

ul. Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa, e-mail: istefanska@ibprs.pl

Streszczenie

Badania obejmujące selekcję i charakterystykę szczepów bakterii fermentacji mlekowej (LAB), połączone z ich molekularną identyfikacją, mają szczególne znaczenie z uwagi na istotną rolę tych bakterii w przemyśle spożywczym, a także ich pozytywny wpływ na zdrowie ludzi i zwierząt. Korzystne właściwości LAB często są cechą ściśle określonego szczepu i nie można ich przypisywać całemu gatunkowi. Z tego względu dużą wagę przywiązuje się do znalezienia i doboru odpowiednich technik umożliwiających nie tylko rzetelną i precyzyjną identyfikację tych bakterii, ale także różnicowanie wewnątrzgatunkowe. Pozwala to na przypisanie specyficznych właściwości konkretnemu szczepowi LAB.

W literaturze opisano wiele metod molekularnych służących identyfikacji i różnicowaniu LAB. Każdą z nich charakteryzuje określony potencjał różnicujący i powtarzalność. W niniejszej pracy podsumowano wykorzystanie wybranych metod molekularnych, bazujących na łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR), do celów dokładnej i jednoznacznej identyfikacji oraz typowania bakterii fermentacji mlekowej. Omówiono także przykłady praktycznego zastosowania tych metod.

Słowa kluczowe: bakterie fermentacji mlekowej, genotypowanie, PCR

ADVANCE IN IDENTIFICATION AND DIFFERENTIATION OF LACTIC ACID BACTERIA. PART I.

Summary

Research focusing on selection and characterization of lactic acid bacteria (LAB) strains including their molecular identification are substantial due to a great economic importance of these bacteria for the food industry and their positive impact on human and animal health. The beneficial effects of LAB are often not attributed to a species, but are strain-dependent. Therefore, it is crucial to find and select the appropriate methods not only for the reliable and precise identification of bacteria but also for strain-level differentiation. These allow to associate a specific effect to a concrete LAB strain.

In many literature data, a broad range of molecular techniques has become available for the identification and discrimination of LAB. All of them displaying differences in discriminatory power and reproducibility. The present review briefly summarizes the application of selected molecular methods based on polymerase chain reaction for the purpose of precise and reliable identification and typing of lactic acid bacteria. The examples of these methods practical application are also discussed.

Key words: lactic acid bacteria, genotyping, PCR

WSTĘP

Bakterie fermentacji mlekowej (LAB - *ang.* lactic acid bacteria) stanowią bardzo zróżnicowaną grupę bakterii spokrewnionych funkcjonalnie zdolnością do syntezy kwasu mlekowego podczas homo- lub hetero-fermentacji. Są to drobnoustroje Gram-dodatnie, względnie beztlenowe, niewytwarzające przetrwalników. Pomimo bliskiego pokrewieństwa filogenetycznego LAB zasiedlają bardzo odmienne nisze ekologiczne, np. glebę, rośliny, przewód pokarmowy i błony śluzowe ludzi i zwierząt, układ moczowo-płciowy, surowe mleko i różne produkty fermentacji. Taka różnorodność zasiedlanych środowisk pomiędzy blisko spokrewnionymi gatunkami wiąże się z wszechstronnymi zdolnościami metabolicznymi tych bakterii. To w konsekwencji umożliwia szerokie wykorzystanie ich w wielu dziedzinach, takich jak ochrona mikrobiologiczna żywności czy jako kultury starterowe do produkcji pasz zwierzęcych i żywności fermentowanej, np. produktów mlecznych, pieczywa, napojów, przetworów z owoców, warzyw i mięsa. LAB stanowią bardzo ważny element naturalnej mikrobioty ludzi i zwierząt, a z uwagi na ich profilaktyczne i terapeutyczne działanie znalazły zastosowanie także jako probiotyki. Identyfikacja gatunkowa szczepu jest niezbędnym warunkiem dopuszczenia do stosowania produktów otrzymanych z jego udziałem. Istotne jest to, że korzystne i pożądane właściwości tych bakterii często są cechą ściśle określonego szczepu i nie można ich przypisywać całemu gatunkowi. Z tego powodu ogromną uwagę przywiązuje się do znalezienia dobrych technik umożliwiających nie tylko precyzyjne i jednoznaczne określenie przynależności taksonomicznej LAB, ale także ich różnicowanie wewnątrzgatunkowe pozwalające na łączenie istotnych właściwości z konkretnym szczepem [Collado i in. 2006].

Identyfikacja bakterii na podstawie właściwości fenotypowych nie zawsze jest zgodna z wynikami analizy genotypowej. Metody fenotypowe, obejmujące m.in. charakterystykę morfologiczną i fizjologiczną izolatu oraz analizę cech biochemicznych, charakteryzują

znacznie mniejszy potencjał do różnicowania mikroorganizmów. Identyfikacja gatunkowa LAB wymaga przeprowadzenia wielu reakcji enzymatycznych. Bazy do analizy uzyskanych wyników nie są wystarczająco szybko uaktualniane i często nie uwzględniają ostatnich zmian w taksonomii, w tym nowo opisanych gatunków. Problem z jednoznaczną i precyzyjną identyfikacją za pomocą metod fenotypowych wiąże się także z powszechnym zjawiskiem zmienności fenotypowej wynikającej m.in. ze zmiany ekspresji genów pod wpływem warunków środowiska.

W tej sytuacji szerokie zastosowanie znalazły metody biologii molekularnej oparte na analizie materiału genetycznego bakterii, który jest unikalny i bardziej stabilny. Genotypowe metody typowania drobnoustrojów są mniej zależne od warunków wzrostu bakterii i umożliwiają zróżnicowanie na poziomie nie tylko gatunku i podgatunku, ale i szczepu. Charakteryzuje je większa czułość i powtarzalność wyników. Szerokie wykorzystanie ich przyczyniło się do wprowadzenia kluczowych zmian w klasyfikacji wielu LAB, w tym także do wyodrębnienia nowych gatunków [Bringel i in. 2005, De Bruyne i in. 2007, Singh i in. 2009]. Należy podkreślić, że nie zastąpią one klasycznych metod mikrobiologicznych, w tym analizy biochemicznej szczepów, jednak stanowią ich istotne uzupełnienie.

Niniejszy artykuł stanowi pierwszą część opracowania dotyczącego wybranych, najważniejszych metod biologii molekularnej, wykorzystywanych do celów dokładnej i jednoznacznej identyfikacji oraz oceny wewnątrzgatunkowego zróżnicowania szczepów należących do grupy bakterii fermentacji mlekowej.

1. Metody genotypowania LAB

Wiele technik biologii molekularnej z powodzeniem wykorzystano do identyfikacji i/lub różnicowania wewnątrzgatunkowego szczepów LAB. Bakterie fermentacji mlekowej stanowią liczną grupę zróżnicowanych genetycznie drobnoustrojów. Wielkość genomów LAB zawiera się w przedziale od około 1,2 Mbp (1.219.250 bp - *Lactobacillus iners* ATCC 55195) do 3,30 Mbp (3.308.274 bp - *Lactobacillus plantarum* WCFS1), a zawartość par zasad G+C u samego rodzaju *Lactobacillus* waha się pomiędzy 32% a 54%. Z tego powodu identyfikacja LAB jest trudnym zadaniem. O przydatności danej metody genotypowania decydują przede wszystkim trzy parametry: typowalność, czyli możliwość uzyskania wyniku w przypadku każdego z badanych szczepów; dyskryminacja (potencjał różnicujący), czyli zdolność do rozróżnienia niespokrewnionych szczepów oraz powtarzalność, czyli uzyskiwanie zawsze takiego samego wyniku w odniesieniu do określonego szczepu. Każdą z metod genotypowych charakteryzuje określony potencjał różnicujący, począwszy od

identyfikacji na poziomie rodzaju i gatunku, a skończywszy na różnicowaniu w obrębie poszczególnych szczepów (typowanie). Spośród metod wykorzystywanych w analizie genotypowej LAB wiele bazuje na technice łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR). PCR z użyciem specyficznych oligonukleotydów jako starterów, w ściśle kontrolowanych warunkach reakcji, umożliwia wybiórczą amplifikację swojego DNA.

2. Metody bazujące na technice PCR

Od wielu lat stale wzrasta wykorzystywanie, do identyfikacji LAB, testów opartych na amplifikacji kwasów nukleinowych. Ogromną zaletą jest ich czułość, swoistość i prostota wykonania. W identyfikacji za pomocą PCR kluczowy jest wybór odpowiedniego odcinka DNA w zależności od poziomu taksonomicznego, który chcemy badać. Amplifikowany fragment powinien zawierać sekwencję swoistą, pozwalającą na dokładną identyfikację danego gatunku LAB i jednocześnie wykazującą wystarczającą zmienność do różnicowania szczepów bakteryjnych. Po amplifikacji produkt reakcji można ocenić na podstawie jego wielkości (liczba par zasad), analizy restrykcyjnej, sekwencji nukleotydowej lub hybrydyzacji z sondami molekularnymi.

PCR wykorzystywany jest nie tylko do identyfikacji LAB, ale również do wykrywania swoistych genów związanych m.in. z opornością na antybiotyki [Toomey i in. 2010] lub syntezą bakteriocyn [Kizerwetter-Świda i Binek, 2010].

2.1. Multipleks PCR

Technika multipleks PCR pozwala na równoczesną amplifikację dwóch lub większej liczby fragmentów DNA, w jednej mieszaninie reakcyjnej, dzięki zastosowaniu różnych par starterów. Wszystkie startery musi charakteryzować ta sama optymalna temperatura przyłączania się do matrycy. Równoczesna amplifikacja więcej niż jednego regionu DNA obniża koszty eksperymentu, oszczędza pracę i czas, a także zmniejsza zużycie matrycowego DNA i odczynników. Reakcje multipleksowe są jednak trudne do optymalizacji. Powinna charakteryzować je czułość porównywalna do czułości pojedynczych reakcji, kiedy to każdy z drobnoustrojów wykrywany jest w oddzielnej próbie. W literaturze opisano dotychczas wiele reakcji multipleksowych mających na celu identyfikację i różnicowanie LAB. Kwon i in. (2004) opracowali multipleks PCR bazujący na zestawach starterów właściwych dla genów 16S, 23S rDNA oraz regionu 16S/23S rDNA ISR (ang. *Intergenic Spacer Region*). Reakcję z powodzeniem zastosowano do jednoczesnej identyfikacji siedmiu probiotycznych

gatunków w obrębie rodzaju *Lactobacillus*: *L. acidophilus*, *L. delbrueckii*, *L. casei*, *L. gasseri*, *L. plantarum*, *L. reuteri* i *L. rhamnosus*. Torriani i in. (2001) zaproponowali różnicowanie bardzo blisko spokrewnionych gatunków w obrębie grupy *Lactobacillus plantarum*: *L. plantarum*, *L. paraplantarum* i *L. pentosus*, na podstawie amplifikacji genu *recA* kodującego białko uczestniczące w rekombinacji homologicznej. Opracowany multipleks PCR okazał się przydatny także do różnicowania podgatunków *L. plantarum* subsp. *plantarum* i *L. plantarum* subsp. *argentoratensis* [Bringel i in. 2005]. W innych badaniach, Ventura i in. (2003) oraz Sheu i in. (2009), wykorzystując sekwencję genu kodującego czynnik elongacyjny Tu, zaprojektowali specyficzne reakcje multipleksowe umożliwiające równoczesną identyfikację *L. rhamnosus*, *L. casei* i *L. paracasei* subsp. *paracasei* [Ventura i in. 2003] oraz *L. acidophilus*, *L. delbrueckii*, *Bifidobacterium longum* i gatunków z grupy *L. casei* [Sheu i in. 2009].

2.2. Real-time PCR

Wśród technik wykrywania kwasów nukleinowych, łańcuchowa reakcja polimerazy z analizą przyrostu ilości produktu w czasie rzeczywistym (real-time PCR, qPCR) cieszy się coraz większą popularnością. Jest techniką bardzo czułą, szybką i wymaga niewielkich ilości DNA do przeprowadzenia analizy. Ilość powstającego podczas qPCR produktu monitorowana jest przy zastosowaniu różnych metod opartych na fluorescencji. Najprostszą i najtańszą jest użycie niespecyficznych barwników fluorescencyjnych (np. SYBR Green I) silnie wiążących się z cząsteczką dwuniciowego DNA, co prowadzi do wzrostu fluorescencji proporcjonalnie do wzrostu ilości produktu reakcji. Po zakończonej amplifikacji można wyznaczyć krzywą topnienia powstałego produktu PCR poprzez pomiar fluorescencji w trakcie powolnego ogrzewania próbki (stopniowa denaturacja dwuniciowych cząsteczek prowadzi do spadku fluorescencji). Temperatura topnienia jest charakterystyczną cechą amplikonu, zależną od jego długości i sekwencji nukleotydowej, dzięki czemu może być wykorzystana w celach identyfikacji. Bardziej swoistą analizę qPCR można przeprowadzić z użyciem komplementarnych do powielanej sekwencji sond molekularnych. Sondy wyznakowane są związkiem fluorescencyjnym (reporter, fluorochrom), który emituje światło w odpowiednich warunkach, proporcjonalnie do ilości produktu w każdym cyklu reakcji.

Niewątpliwą zaletą qPCR jest możliwość przeprowadzenia badań ilościowych, tj. oznaczania liczby bakterii fermentacji mlekowej bezpośrednio w próbkach środowiskowych (np. mleko, kał, woda, żywność), z pominięciem klasycznej hodowli

mikrobiologicznej. Real-time PCR skutecznie wykorzystano m.in. do wykrywania i ilościowego oznaczania szczepu starterowego *L. plantarum* IWBT B 188 [Cho i in. 2011] i szczepów *Oenococcus oeni* [Solieri i Giudici 2010], podczas procesu fermentacji jabłczanowo-mleczanowej, oraz probiotycznego szczepu *L. casei* Shirota w kale [Fujimoto i in. 2008]. Użyto w tym celu swoistych starterów zaprojektowanych na podstawie wyników analizy RAPD. Warto podkreślić, iż pewnym ograniczeniem tej metody jest brak możliwości rozróżnienia pomiędzy żywymi i martwymi komórkami bakteryjnymi, w efekcie amplifikacja materiału genetycznego pochodzącego także z niezdolnych do podziału i nieaktywnych metabolicznie komórek bakteryjnych [Cho i in. 2011, Fujimoto i in. 2008].

Innym zastosowaniem qPCR jest oznaczanie poziomu ekspresji wybranych genów. W badaniach tych przeprowadza się odwrotną transkrypcję, która umożliwia przepisanie sekwencji mRNA oznaczanego genu na sekwencję cDNA bezpośrednio przed qPCR (Reverse Transcriptase real-time PCR, RT-qPCR). Metoda RT-qPCR została wykorzystana m.in. do badania aktywności metabolicznej LAB przez oznaczenie ekspresji kluczowych genów metabolizmu podstawowego, warunkujących przeżycie komórki (ang. housekeeping genes). Ekspresja tych genów jest na stosunkowo stałym poziomie i nie podlega regulacji. RT-qPCR umożliwia także śledzenie zmian zachodzących w syntezie białka np. pod wpływem zmiany warunków środowiska lub po potraktowaniu bakterii wybranym czynnikiem stresowym. Falentin i in. (2010) opracowali metodę RT-qPCR do oceny liczby, aktywności metabolicznej i odpowiedzi na stres u *Propionibacterium freudenreichii* i *L. paracasei* podczas procesu dojrzewania sera. Badano poziom transkrypcji genu kodującego 16S rRNA, czynnik elongacyjny Tu zaangażowany w biosyntezę białek (gen *tuf*) oraz białko opiekuńcze (gen *groL*). W innych badaniach [Beltramo i in. 2006] metodę RT-qPCR zastosowano do monitorowania poziomu ekspresji 13 genów mogących pełnić istotną rolę w adaptacji *O. oeni* do niesprzyjających warunków występujących podczas procesu fermentacji jabłczanowo-mleczanowej.

2.3. RAPD

Wśród technik molekularnych, umożliwiających typowanie drobnoustrojów, dużym zainteresowaniem cieszą się techniki nie wymagające znajomości sekwencji genomowego DNA lub gatunkowo swoistych genów. Jedną z nich jest opracowana przez Williams'a i in. (1990) metoda RAPD (ang. *Random Amplified Polymorphic DNA*). Polega ona na amplifikacji z udziałem krótkiego (najczęściej 10 nukleotydów) startera o przypadkowej sekwencji nukleotydów, który łączy się z mniej lub bardziej homologicznymi sekwencjami DNA chromosomalnego. W początkowych cyklach amplifikacji, na etapie przyłączania starterów do matrycy DNA, stosowane są często niższe niż w klasycznym PCR temperatury. Może przez to dochodzić do amplifikacji nawet w przypadku niepełnej komplementarności startera. Dzięki szybkości, prostocie wykonania, niskim kosztom i jednocześnie dużym potencjale różnicującym, metoda ta wielokrotnie była wykorzystywana do typowania LAB. W badaniach przeprowadzonych przez Plengvidhya i in. (2004) w odniesieniu do każdego z dziewięciu przebadanych szczepów *Leuconostoc mesenteroides* uzyskano inny wzór RAPD. Wysoki potencjał różnicujący i przydatność tej techniki zarówno do identyfikacji, jak i typowania LAB wykazali m.in. Zawadzka-Skomiła i in. (2009) oraz Rodas i in. (2005). Połączenie wyników uzyskanych przy użyciu dwóch starterów może zwiększyć zdolność różnicującą RAPD, dzięki czemu wśród 250 LAB wyizolowanych z fermentujących kiełbas wyróżniono 136 profili. Sekwencje produktów RAPD, charakterystycznych dla określonego gatunku lub szczepu, można wykorzystać do zaprojektowania swoistych sond lub starterów PCR [Fujimoto i in. 2008, Solieri i Giudici 2010, Cho i in. 2011]. Wielu autorów zwraca jednak uwagę na niską powtarzalność wyników otrzymywanych tą metodą, zwłaszcza w skali międzylaboratoryjnej [Gevers i in. 2001, Mohania i in. 2008]. Jest to związane głównie z niską swoistością przyłączania starterów i dużą podatnością na zmiany warunków reakcji, głównie składu mieszaniny reakcyjnej [Singh i in. 2009].

2.4. rep-PCR

Inną metodą, przy której nie trzeba dysponować danymi o sekwencji DNA, jest rep-PCR (ang. *repetitive bacteria DNA element-PCR*). W metodzie tej używa się starterów komplementarnych do stosunkowo krótkich i wysoce konserwatywnych sekwencji powtórzonych, występujących w genomie bakteryjnym w wielu kopiach. Liczba, rodzaj, jak i rozmieszczenie tych sekwencji w genomach poszczególnych szczepów stanowi źródło istotnych informacji na temat ich zróżnicowania. Amplifikacji ulegają odcinki DNA położone

między dwoma sąsiadującymi na przeciwległych niciach powtórzeniami. Przykładem takich regionów polimorficznych są sekwencje REP (ang. *Repetitive Extragenic Palindromic Elements*, REP-PCR) o długości 35-40 pz, występujące w 500-1000 kopii w genomie i zajmujące do 1% jego długości; sekwencje ERIC (ang. *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*; ERIC-PCR) o długości 124-127 pz, powtarzające się w genomie 30-50 (*Escherichia coli*) lub 150 razy (*Salmonella Typhimurium*); oraz motywy typu BOX (BOX-PCR), złożone z trzech podjednostek (boxA- 59 pz, boxB- 45 pz, boxC- 50 pz), tworzące stabilne drugorzędowe struktury i występujące w genomie w 25 kopiach [Hulton i in. 1991, Martin i in. 1992, Stern i in. 1984]. W genomie bakterii występują także proste sekwencje powtórzeniowe złożone z 1-5 nukleotydów powtórzonych wielokrotnie obok siebie. Przykładem ich wykorzystania u LAB jest opisany przez Gevers i in. (2001) (GTG)₅-PCR.

W wielu pracach wykazano, że rep-PCR stanowi użyteczne narzędzie w szybkim różnicowaniu LAB wyizolowanych z żywności. Gevers i in. (2001) porównywali trzy metody rep-PCR do typowania 61 szczepów należących do 32 gatunków/podgatunków LAB. Najbardziej złożone profile, obejmujące od 10 do 20 prążków i pozwalające na najdokładniejszą analizę porównawczą badanych szczepów, uzyskano przy zastosowaniu startera (GTG)₅. W przypadku pozostałych starterów otrzymano mniej złożone wzory amplifikacji, na które składało się od 1 do 10 (REP-PCR) lub od 0 do 6 prążków DNA (BOX-PCR). Połączenie wyników uzyskanych trzema metodami nie zwiększyło znacząco zdolności różnicującej tej techniki. Co istotne, przy użyciu startera (GTG)₅ obserwowano występowanie ampikonów swoistych w odniesieniu do bardzo blisko spokrewnionych gatunków, trudnych do różnicowania, takich jak *L. pentosus*, *L. plantarum* i *L. paraplantarum* oraz *L. alimentarius* i *L. paralimentarius* [Gevers i in. 2001]. (GTG)₅-PCR stosowano także jako metodę pierwszego wyboru w identyfikacji bakterii z rodzaju *Pediococcus* [Huys i in. 2006]. W innych badaniach typowanie 8 szczepów z rodzaju *Lactobacillus* z wykorzystaniem BOX-PCR, (GTG)₅-PCR, jak i REP-PCR pozwoliło na uzyskanie powtarzalnych profili, swoistych w odniesieniu do każdego szczepu, włączając rozróżnienie gatunków z grupy *L. casei* [Coudeyras i in. 2008]. Stephenson i in. (2009) wykazali, że zarówno REP-PCR, (GTG)₅-PCR, jak i ERIC-PCR są technikami pozwalającymi na różnicowanie wewnątrzgatunkowe szczepów z rodzaju *Lactobacillus*. Podkreślono jednak przewagę techniki ERIC-PCR nad pozostałymi, z uwagi na m.in. łatwość interpretacji otrzymanych wyników, generowanie profili zawierających produkty swoiste zarówno w przypadku gatunku, jak i szczepu

oraz wysoki potencjał różnicujący, porównywalny z metodą PFGE (ang. *Pulsed Field Gel Electrophoresis*).

Dobór odpowiedniego startera jest jednym z ważniejszych etapów procesu optymalizacji RAPD i rep-PCR, mającym bezpośredni wpływ na jakość otrzymywanego profilu genomowego i analizę. Liczba powstających produktów amplifikacji powinna być wystarczająca aby wykazać różnice pomiędzy blisko spokrewnionymi, ale odmiennymi szczepami (różnice w ilości i wielkości produktów amplifikacji). Zbyt duża liczba fragmentów może utrudniać analizę wyników. Jednocześnie powinno unikać się prostych profili, zawierających niewiele produktów jako, że nie pozwalają one na wykonanie rzetelnej i właściwej analizy porównawczej. Dużą zaletą obu technik jest możliwość analizowania całego genomu bakteryjnego, jednak wyniki uzyskane w różnych badaniach są często trudne do porównania [Picozzi i in. 2010].

2.5. Metody wykorzystujące analizę restrykcyjną

2.5.1. PCR-RFLP

W celu dokładniejszej charakterystyki szczepów, otrzymany produkt lub produkty amplifikacji mogą zostać poddane analizie restrykcyjnej. Umożliwia to wykrycie specyficznego w odniesieniu do badanego DNA polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP, ang. *Restriction Fragment Length Polymorphism*). Różnice we wzorze prążków odzwierciedlają zmiany w sekwencji DNA, skutkujące brakiem lub dodatkowym miejscem restrykcyjnym rozpoznawanym przez użytą restryktazę. Dobór odpowiedniego enzymu/enzymów restrykcyjnych jest jednym z ważniejszych etapów procesu optymalizacji. Częstotliwość cięcia enzymatycznego DNA wpływa bezpośrednio na liczbę powstających produktów, a tym samym na jakość otrzymywanego profilu genomowego i zdolności różnicujące metody. Enzymy restrykcyjne można dobrać na podstawie analizy *in silico*, w oparciu o znajomość sekwencji powielonego regionu DNA i z użyciem odpowiedniego programu, np. REBsites lub NEBcutter (<http://tools.neb.com>). Warto jednak podkreślić, że o przydatności danego enzymu powinny decydować ostatecznie wyniki otrzymane na podstawie przeprowadzonych doświadczeń [Rodas i in. 2003, Krawczyk 2007].

Do typowania LAB z powodzeniem wykorzystywano analizę restrykcyjną produktów amplifikacji genów metabolizmu podstawowego. Giraffa i in. (2003) użyli genów kodujących β -galaktozydazę (*βgal*), permeazę laktozy (*lp*) i dipeptydazę proliny (*pepQ*), do identyfikacji i różnicowania wyizolowanych z produktów mleczarskich 35 szczepów *Lactobacillus*

delbrueckii subsp. *lactis* i subsp. *bulgaricus*. Wykazali większe zróżnicowanie na poziomie szczepu w porównaniu z wynikami otrzymanymi na podstawie analizy sekwencji genu 16S rDNA. W innych badaniach, na podstawie amplifikacji fragmentu genu *hsp60* (*groEL*) kodującego 60kDa białko szoku cieplnego, typowano 110 szczepów z rodzaju *Lactobacillus* wyizolowanych z żywności. Trawienie uzyskanych produktów amplifikacji enzymami restrykcyjnymi *AluI* i *TacI* (w oddzielnych reakcjach) pozwoliło na identyfikację i różnicowanie przeważającej większości badanych gatunków, także tych bardzo blisko spokrewnionych, jak *L. casei* i *L. rhamnosus*, *L. acidophilus* i *L. crispatus* czy *L. acidophilus*, *L. helveticus* i *L. amylovorus*. Nie udało się zróżnicować jedynie gatunków *L. plantarum* i *L. pentosus*, jednak zastosowanie przy badaniu tych szczepów dodatkowej restryktazy *Sau3AI* lub *MseI* umożliwiło otrzymanie odrębnych wzorów RFLP i identyfikację gatunkową [Blaiotta i in. 2008]. W innych badaniach, amplifikacja genu kodującego dekarboksylazę glutaminianu (*gadB*) i trawienie enzymem *AseI* pozwoliły na różnicowanie podgatunków *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* i *L. lactis* subsp. *cremoris* [Nomura i in. 2002].

Użytecznym narzędziem w identyfikacji niektórych LAB okazała się analiza restrykcyjna produktu amplifikacji genu kodującego 16S rRNA (ARDRA, ang. *Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*) (metoda opisana w II części opracowania). Sekwencja nukleotydowa genów rybosomalnych charakteryzuje się jednak wyższym konserwatyzmem ewolucyjnym niż geny kodujące białka zaangażowane w metabolizm podstawowy bakterii [Giraffa i in. 2003, Rodas i in. 2003].

Pewną modyfikacją techniki PCR-RFLP jest technika T-RFLP (polimorfizm długości terminalnych fragmentów restrykcyjnych, ang. *Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism*), w której starter znakowany jest na końcu 5' barwnikiem fluorescencyjnym, przez co wykrywane są tylko wyznakowane terminalne fragmenty restrykcyjne. T-RFLP jest metodą umożliwiającą analizę dynamiki zmian składu mikrobiologicznego w złożonych ekosystemach i badanie bioróżnorodności populacji, bez konieczności prowadzenia uprzednio hodowli mikrobiologicznej. Każdy fragment TRF reprezentuje pojedynczą jednostkę taksonomiczną. Technikę tę wykorzystali z powodzeniem McEniry i in. (2008) do oceny składu mikrobiologicznego kiszonki podczas przebiegu procesu fermentacji.

2.5.2. AFLP

AFLP (polimorfizm długości amplifikowanego fragmentu, ang. *Amplified Fragment Length Polymorphism*) opiera się na analizie całego genomu bakteryjnego i należy do grupy

technik wykorzystujących zjawisko ligacji adaptorów nukleotydowych i wybiórczej amplifikacji fragmentów restrykcyjnych. W technice tej w pierwszej kolejności DNA genomowe poddawane jest trawieniu z użyciem dwóch enzymów restrykcyjnych, pozostawiających lepkie końce. Sekwencja rozpoznania w przypadku jednego enzymu występuje setki razy w badanym genomie (restryktaza często tnąca), a drugiego kilkadziesiąt razy rzadziej (restryktaza rzadko tnąca). Dzięki odpowiednio przygotowanej do PCR matrycy (ligacja adaptorów odpowiadających miejscom restrykcyjnym użytych enzymów) i odpowiednio zaprojektowanym sekwencjom starterów, dochodzi do zjawiska wybiórczej amplifikacji tylko części produktów ligacji. Ograniczenie liczby powstających amplikonów wiąże się z brakiem komplementarności startera na końcu 3', spowodowanym obecnością jednego do trzech selektywnych nukleotydów. Analiza wyników opiera się na rozdiale elektroforetycznym produktów PCR w żelu poliakrylamidowym i detekcji, np. za pomocą autoradiografii lub barwienia solami srebra [Janssen i in. 1996, Krawczyk 2007]. W badaniach przeprowadzonych przez Dimitrov i in. (2008) wykazano przewagę techniki AFLP nad RAPD i PFGE. Typowanie 49 szczepów *Lactobacillus* spp., wyizolowanych z próbek kału pochodzących od zdrowych ludzi, pozwoliło na wyodrębnienie 41 profili, podczas gdy w przypadku PFGE i RAPD wyróżniono wśród badanych szczepów odpowiednio 34 i 27 wzorów. Profile otrzymane metodą AFLP zawierały większą liczbę fragmentów krótszych, a powtarzalność metody była tylko nieznacznie gorsza w porównaniu z PFGE. Duży wpływ na zdolność różnicującą metody ma dobór enzymów restrykcyjnych, zależny od zawartości par zasad G+C w genomie badanego gatunku, oraz stopień selektywności starterów (liczba i rodzaj selektywnych zasad na końcu 3'). Z uwagi na to metoda powinna być optymalizowana w odniesieniu do każdego gatunku z osobna [Janssen i in. 1996].

Jedną z modyfikacji techniki AFLP, mającej na celu uproszczenie analizy, jest technika FAFLP (ang. *Fluorescence-based AFLP*), w której startery znakowane są fluorescencyjnie. FAFLP stosowano jako metodę pierwszego wyboru w identyfikacji *Enterococcus* spp., *Lactobacillus* spp. i *Lactococcus* spp. [Huys i in. 2006]. Z powodzeniem użyto jej także do różnicowania 118 szczepów *L. rhamnosus*, włączając szczepy probiotyczne i potencjalnie probiotycznie, kultury starterowe w żywności i izolaty pochodzące od ludzi [Vancanneyt i in. 2006].

2.6. Metody obejmujące sekwencjonowanie

2.6.1. MLST

Metodą opartą na sekwencjonowaniu jest MLST (ang. *Multi Locus Sequence Typing*), polegająca na analizie porównawczej częściowych sekwencji kilku (5-7) wybranych genów typu „housekeeping”. Różne sekwencje danego genu odpowiadają określonym profilom allelicznym. Na podstawie kombinacji profili allelicznych wszystkich badanych genów określa się dla każdego izolatu tzw. typ sekwencyjny (ST - ang. *Sequence Type*).

W typowaniu niechorobotwórczych bakterii związanych z produkcją żywności, po raz pierwszy technika MLST została wykorzystana w 2004 roku przez de las Rivas i in. do analizy pokrewieństwa genetycznego w obrębie 18 szczepów *O. oeni* wyizolowanych z wina. Autorzy porównali sekwencję 5 genów: genu kodującego podjednostkę β gyrazy DNA (*gyrB*), fosfoglukomutazę (*pgm*), ligazę D-alaninową (*ddl*), transketolazę (*recP*) oraz enzym biorący udział w fermentacji jabłczanowo-mleczanowej (*mleA*). Metodę charakteryzował bardzo wysoki potencjał różnicujący. Każdy z badanych szczepów reprezentował inny typ sekwencyjny. Liczba alleli w obrębie badanych genów wahała się od 2 (*mleA*) do 12 (*pgm*). Ten sam zespół opracował metodę wykorzystującą technikę MLST do typowania szczepów *L. plantarum* [de las Rivas i in. 2006]. Oprócz genu *gyrB*, *pgm*, *ddl*, do analizy włączono gen kodujący dehydrogenazę glutaminianową (*gdh*), białko naprawcze DNA (*mutS*) oraz podjednostkę ATPazy - karboksylazę fosforybozylo-aminoimidazolową (*purKI*). Na podstawie otrzymanych sekwencji wyodrębniono aż 14 typów sekwencyjnych w obrębie 16 przebadanych szczepów. Największym zróżnicowaniem charakteryzował się gen *gdh* (12 alleli), a najmniejszym gen *pgm* (3 allele). W innych badaniach, Cai i in. (2007) zaproponowali schemat analizy MLST szczepów *L. casei* oparty na charakterystyce alleli 6 stosunkowo konserwatywnych genów: genu *pgm*, genu kodującego białko zaangażowane w proces podziału komórkowego (*ftsZ*), syntetazę metionilo-tRNA (*metRS*), białko naprawcze DNA (*mutL*), enzym z grupy reduktaz (*nrdD*) i DNA polimerazę I (*polA*). Wykorzystanie wymienionych genów pozwoliło na wykrycie 36 typów sekwencyjnych w obrębie 40 przebadanych szczepów. Stwierdzono od 11 (*nrdD*) do 20 alleli (*mutL*) w locus. Do typowania wewnątrzgatunkowego szczepów *Lactobacillus sanfranciscensis* opracowano analizę sekwencji pochodzących z genów kodujących: dehydrogenazę glutaminianową (*gdh*), podjednostkę alfa gyrazy DNA (*gyrA*), fosforylazę maltozy (*mapA*), oksydazę NADH (*nox*), fosfoglukomutazę (*pgmA*) i fosfotransacetylazę (*pta*) [Picozzi i in. 2010]. Na podstawie uzyskanych sekwencji wyróżniono 19 typów sekwencyjnych wśród 24 przebadanych

szczepów *L. sanfranciscensis* wyizolowanych z zakwasów. Największą liczbę kombinacji alleli stwierdzono w genach *gyrA* i *nox* (po 8 alleli), a najmniejszą w genie *pgmA* (2 allele).

Technika MLST, bazując na analizie sekwencji nukleotydowych, charakteryzuje się bardzo wysokim potencjałem różnicującym. Umożliwia wykrycie wszystkich zmian genetycznych w obrębie amplifikowanego regionu genu oraz zapewnia jednoznaczne i precyzyjne wyniki, które mogą być bezpośrednio porównywane między laboratoriami [de las Rivas i in. 2006].

PODSUMOWANIE

Ogromny rozwój, w minionych latach, technik opartych na reakcji łańcuchowej polimerazy DNA znacznie usprawnił identyfikację i możliwości różnicowania wewnątrzgatunkowego wielu drobnoustrojów, ważnych nie tylko z klinicznego punktu widzenia, ale i w biotechnologii czy produkcji żywności. PCR stanowi podstawę przedstawionych w niniejszym opracowaniu metod typowania genetycznego bakterii fermentacji mlekowej. Nie wyczerpuje to jednak wszystkich narzędzi jakimi dysponuje obecnie biologia molekularna. Omówieniu innych metod, takich jak analiza oparta na genach kodujących operon *rrn* czy PFGE poświęcono drugą część opracowania.

PIŚMIENNICTWO

1. Beltramo C., Desroche N., Tourdot-Maréchal R., Grandvalet C., Guzzo J. (2006).; Real-time PCR characterizing the stress response of *Oenococcus oeni* in a wine-like medium. Res. Microbiol. 157(3), 267-27
2. Blaiotta G., Fusco V., Ercolini D., Aponte M., Pepe O., Villani F. (2008).: *Lactobacillus* strain diversity based on partial *hsp60* gene sequences and design of PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism assays for species identification and differentiation. Appl. Environ. Microbiol. 74(1), 208-21
3. Bringel F., Castioni A., Olukoya D.K., Felis G.E., Torriani S., Felis G.E., Dellaglio F. (2005).: *Lactobacillus plantarum* subsp. *argentoratensis* subsp. nov., isolated from vegetable matrices. Intern. J. Syst. Evol. Microbiol. 55, 1629-2634
4. De Bruyne K., Schillinger U., Caroline L., Boehringer B., Cleenwerck I., Vancanneyt M., De Vuyst L., Franz C.M., Vandamme P. (2007).: *Leuconostoc holzapfelii* sp. nov., isolated from Ethiopian coffee fermentation and assessment of sequence analysis

- of housekeeping genes for delineation of *Leuconostoc* species. Intern. J. Syst. Evol. Microbiol. 54(Pt 12), 2952-2959
5. Cai H., Rodríguez B.T., Zhang W., Broadbent J.R., Steele J.L. (2007): Genotypic and phenotypic characterization of *Lactobacillus casei* strains isolated from different ecological niches suggests frequent recombination and niche specificity. Microbiology 153(8), 2655-2665
 6. Cho G.S., Krauss S., Huch M., Du Toit M., Franz C.M. (2011): Development of a quantitative PCR for detection of *Lactobacillus plantarum* starters during wine malolactic fermentation. J. Microbiol. Biotechnol. 21(12), 1280-1286
 7. Collado M.C., Moreno Y., Cobo J.M., Hernández M. (2006): Microbiological evaluation and molecular characterization of bifidobacteria strains in commercial fermented milks. Europ. Food. Res. Technol. 222, 112-117
 8. Coudeyras S., Marchandin H., Fajon C., Forestier C. (2008). Taxonomic and strain-specific identification of the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* 35 with the *Lactobacillus casei* group. Appl. Environ. Microbiol. 74, 2679-2689
 9. Dimitrov Z.P., Minkova S., Michaylova M. (2008). Comparative evaluation of three molecular typing methods in their applicability to differentiate *Lactobacillus* strains with human origin. World J. Microbiol. Biotechnol. 24, 1305-1312
 10. Falentin H., Postollec F., Parayre S., Henaff N., Le Bivic P., Rochoux R., Thierry A., Sohier D. (2010). Specific metabolic activity of ripening bacteria quantified by real-time reverse transcription PCR throughout Emmental cheese manufacture. Int. J. Food Microbiol. 144(1), 10-19
 11. Fujimoto J., Matsuki T., Sasamoto M., Tomii Y., Watanabe K. (2008). Identification and quantification of *Lactobacillus casei* strain Shirota in human feces with strain-specific primers derived from randomly amplified polymorphic DNA. Int. J. Food. Microbiol. 126(1-2), 210-215
 12. Gevers D., Huys G., Swings J. (2001). Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. FEMS Microbiol. Lett. 205(1), 31-36
 13. Giraffa G., Lazzi C., Gatti M., Rossetti L., Mora D., Neviani E. (2003). Molecular typing of *Lactobacillus delbrueckii* of dairy origin by PCR-RFLP of protein-coding genes. Int. J. Food Microbiol. 82(2), 163-172

14. Hulton C.S., Higgins C.F., Sharp P.M. (1991).: ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium and other enterobacteria. *Mol. Microbiol.* 5(4), 825-834
15. Huys G., Vancanneyt M., D'Haene K., Vankerckhoven V., Goossens H., Swings J. (2006). Accuracy of species identity of commercial bacterial cultures intended for probiotic or nutritional use. *Res. Microbiol.* 157(9), 803-810
16. Janssen P., Coopman R., Huys, G., Swings J., Bleeker M., Vos P., Zabeau M., Kersters K. (1996). Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. *Microbiology* 142, 1881-1893
17. Kizerwetter-Świda M, Binek M. (2010). Salivaricin B gene – its localisation and RFLP analysis in two potentially probiotic *Lactobacillus salivarius* strains. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 54, 513-516
18. Krawczyk B. (2007). Diagnostyka molekularna w zakażeniach szpitalnych. *Post. Mikrobiol.* 46, 367-378
19. Kwon H.S., Yang E.H., Yeon S.W., Kang B.H., Kim T.Y. (2004). Rapid identification of probiotic *Lactobacillus* species by multiplex PCR using species-specific primers based on the region extending from 16S rRNA through 23S. *FEMS Microbiol Lett.* 239(2), 267-275
20. Martin B., Humbert O., Camara M., Guenzi E., Walker J., Mitchell T., Andrew P., Prudhomme M., Alloing G., Hakenbeck R., Morrison D.A., Boulnois G.J., Claverys J.P. (1992). A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. *Nucleic Acids Res.* 20, 3479-3483
21. McEniry J., O'Kiely P., Clipson N.J., Forristal P.D., Doyle E.M. (2008). Bacterial community dynamics during ensilage of wilted grass. *J. Appl. Microbiol.* 105, 359-371
22. Mohania D., Nagpal R., Kumar M., Bhardwaj A., Yadav M., Jain S., Marotta F., Singh V., Parkash O., Yadav H. (2008). Molecular approaches for identification and characterization of lactic acid bacteria. *J. Dig. Dis.* 9, 190-198
23. Nomura M., Kobayashi M., Okamoto T. (2002). Rapid PCR-based method which can determine both phenotype and genotype of *Lactococcus lactis* subspecies. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(5), 2209-2213
24. Picozzi C., Bonacina G., Vigentini I., Foschino R. (2010). Genetic diversity in Italian *Lactobacillus sanfranciscensis* strains assessed by multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis analyse. *Microbiology* 156(Pt 7), 2035-2045

25. Plengvidhya V., Breidt F. Jr, Fleming H.P. (2004). Use of RAPD-PCR as a method to follow the progress of starter cultures in sauerkraut fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 93, 287-296
26. de las Rivas B., Marcobal A., Muñoz R. (2004). Allelic diversity and population structure in *Oenococcus oeni* as determined from sequence analysis of housekeeping genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(12), 7210–7219
27. de las Rivas B., Marcobal A., Muñoz R. (2006) Development of a multilocus sequence typing method for analysis of *Lactobacillus plantarum* strains. *Microbiology* 152, 85-93
28. Rodas A.M., Ferrer S., Pardo I. (2003). 16S-ARDRA, a tool for identification of lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *System. Appl. Microbiol.* 26(3), 412-422
29. Rodas A.M., Ferrer S., Pardo I. (2005). Polyphasic study of wine *Lactobacillus* strains: taxonomic implications. *Intern. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55, 197-207
30. Sheu S.J., Hwang W.Z., Chen H.C., Chiang Y.C., Tsen H.Y. (2009). Development and use of *tuf* gene-based primers for the multiplex PCR detection of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* group, *Lactobacillus delbrueckii*, and *Bifidobacterium longum* in commercial dairy products. *J. Food Prot.* 72(1), 93-10
31. Singh S., Goswami P., Singh R., Heller K.J. (2009). Application of molecular identification tools for *Lactobacillus*, with a focus on discrimination between closely related species: A review. *Food Sci. Technol.* 42, 448-457
32. Solieri L., Giudici P. (2010). Development of a sequence-characterized amplified region marker-targeted quantitative PCR assay for strain-specific detection of *Oenococcus oeni* during wine malolactic fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 76(23), 7765-7774
33. Stephenson D.P., Moore R.J., Allison G.E. (2009). Comparison and utilization of repetitive-element PCR techniques for typing *Lactobacillus* isolates from the chicken gastrointestinal tract *Appl. Environ. Microbiol.* 75(21), 6764-6776
34. Stern M.J., Ames G.F., Smith N.H., Robinson E.C., Higgins C.F. (1984). Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome. *Cell* 37(3), 1015-1026
35. Toomey N., Bolton D., Fanning S. (2010). Characterisation and transferability of antibiotic resistance genes from lactic acid bacteria isolated from Irish pork and beef abattoirs. *Res. Microbiol.* 161, 127-135

36. Torriani S., Felis G.E., Dellaglio F. (2001) Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by *recA* gene sequence analysis and multiplex PCR assay with *recA* gene-derived primers. Appl. Environ. Microbiol. 67(8), 3450-3454
37. Vancanneyt M., Huys G., Lefebvre K., Vankerckhoven V., Goossens H., Swings J. (2006). Intraspecific genotypic characterization of *Lactobacillus rhamnosus* strains intended for probiotic use and isolates of human origin. Appl. Environ. Microbiol. 72(8), 5376-5383
38. Ventura M., Canchaya C., Meylan V., Klaenhammer T.R., Zink R. (2003). Analysis, characterization, and loci of the *tuf* genes in *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species and their direct application for species identification. Appl Environ Microbiol. 69(11), 6908-6922
39. Williams J.G., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A., Tingey S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 18, 6531-6535
40. Zawadzka-Skomił J., Piasecka-Jóźwiak K., Kotyrba D., Chabłowska D. (2009). Zastosowanie metod biologii molekularnej do identyfikacji i różnicowania szczepów bakterii fermentacji mlekowej o znaczeniu aplikacyjnym. Pr. Inst. Lab. Bad. Przem. Spoż. 64, 13-28