

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

**Ilona Stefańska, Krystyna Stecka**  
Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego  
Zakład Technologii Fermentacji  
ul. Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa  
istefanska@ibprs.pl

### Streszczenie

Wzrastające zainteresowanie wykorzystaniem szczepów bakterii fermentacji mlekowej (LAB) do produkcji żywności, pasz dla zwierząt i preparatów probiotycznych powoduje, że selekcja, jednoznaczna identyfikacja i dokładna charakterystyka szczepów LAB odgrywają ważną rolę. Niezwykle istotne dla identyfikacji i rozróżnienia szczepów jest dysponowanie szybkimi i niezawodnymi narzędziami do typowania molekularnego.

Dynamiczny rozwój technik biologii molekularnej wpłynął na znaczny postęp w doskonaleniu metod wykorzystywanych w identyfikacji i typowaniu bakterii fermentacji mlekowej. Ogromną zaletą tych metod jest możliwość dostosowania testu do poziomu taksonomicznego, który chcemy badać. Duże zróżnicowanie genetyczne powoduje jednak, że w celu sporządzenia dokładnej charakterystyki LAB oraz określenia zmienności szczepów często niezbędne jest zastosowanie kilku metod genotypowych.

Niniejszy artykuł stanowi drugą część opracowania, mającego na celu omówienie najczęściej stosowanych metod genotypowania LAB wraz z wybranymi przykładami ich zastosowania. W pracy skupiono się głównie na metodach opartych na analizie operonu *rrn*, w tym sekwencjonowaniu genu 16S rDNA, a także na uznawanej za złoty standard technice PFGE.

**Słowa kluczowe:** bakterie fermentacji mlekowej, genotypowanie, rDNA, PFGE

## ADVANCE IN IDENTIFICATION AND DIFFERENTIATION OF LACTIC ACID BACTERIA. PART II.

### Summary

The increasing demand of food industry for strain of lactic acid bacteria (LAB) with novel and desirable properties caused that the selection, unambiguous identification and precise characterization of various LAB strains are essential. For this purpose it is of crucial importance to possess rapid and reliable tools for molecular typing in order to identify and

distinguish various strains.

The dynamic development of molecular biology techniques has contributed to significant progress in improving the methods used in the identification and typing of lactic acid bacteria. The great value of these methods is possibilities to match assay to detect a specific taxonomic level. However, high genetic variability caused that it is necessary to use often various methods to precise characterize LAB and to determine the diversity of strains.

The present paper is the second part of review discussing the most commonly used methods for the genotypic identification of LAB, with selected examples of their application. This part focuses mainly on methods based on analysis of operon *rrn*, including sequencing of 16S rDNA gene, and PFGE technique, regarded as a gold standard.

**Key words:** lactic acid bacteria, genotyping, rDNA, PFGE

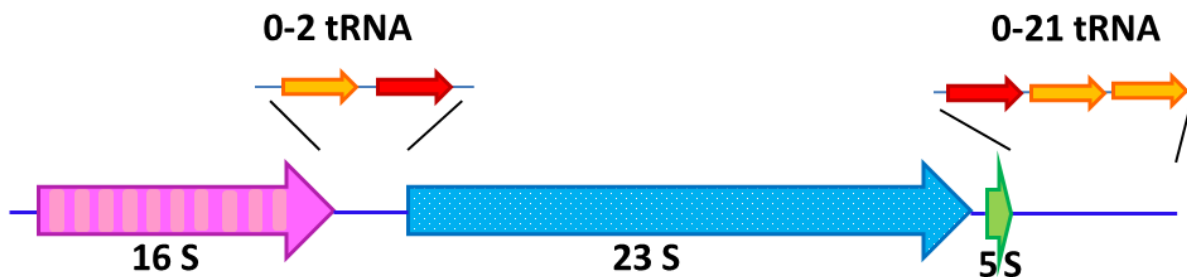
## WSTĘP

Bakterie fermentacji mlekowej (LAB) stanowią liczną i niejednorodną grupę bakterii Gram-dodatnich. Charakteryzują się wysokim stopniem zróżnicowania fenotypowego i genotypowego w obrębie szczepów tego samego gatunku, co stanowi częściowo przystosowanie do różnych miejsc bytowania tych mikroorganizmów [Cai i in. 2007].

W obrębie genomu bakteryjnego istnieją regiony o różnym stopniu zmienności genetycznej, od wysoce konserwatywnych po obszary wysoce zmienne. Wiele metod genotypowania opiera się na poszukiwaniu sekwencji swoistej dla określonej grupy taksonomicznej. Jednocześnie, w sytuacjach dysponowania DNA o całkowicie nieznannej sekwencji nukleotydowej, możliwe jest zastosowanie zdegenerowanych starterów i sond tzw. uniwersalnych. Do tego celu wykorzystywane są powszechnie oligonukleotydy komplementarne do sekwencji genu kodującego podjednostkę rybosomalnego rRNA lub genów kodujących białka biorące udział w metabolizmie podstawowym komórki.

W typowaniu bakterii fermentacji mlekowej powszechnie wykorzystuje się obszar operonu *rrn*. Występuje on u wszystkich bakterii i zawiera geny odpowiedzialne za syntezę trzech podjednostek rybosomalnych: 16S rRNA (około 1500–1600 pz), 23S rRNA (ok. 2900 pz) i 5S rRNA (około 120 pz). U niektórych LAB stwierdzono występowanie nawet 6 kopii operonu *rrn* [De Vries i in. 2006]. Geny rDNA charakteryzują się wysokim stopniem zakonserwowania ewolucyjnego, ale obok regionów wysoce konserwatywnych zawierają również regiony zmienne, o dużym polimorfizmie. Stanowią dzięki temu użyteczny marker filogenetyczny. Wysokokonserwatywne sekwencje genów kodujących rRNA rozdzielone są polimorficznymi regionami zawierającymi sekwencje niekodujące oraz geny kodujące tRNA

(rysunek 1). Długość i sekwencja niekodujących regionów polimorficznych, a także liczba i typ sekwencji dla tRNA w obrębie operonu *rrn* są cechami charakterystycznymi danego drobnoustroju i mogą być podstawą identyfikacji na poziomie rodzaju, gatunku, a nawet szczepu [Trotha i in. 2001].



**Rysunek 1.** Schemat budowy rybosomalnego operonu *rrn* u LAB [wg De Vries i in. 2006]

*Structure of ribosomal operon rrn of LAB [according to De Vries et al. 2006]*

Coraz większe zainteresowanie wykorzystaniem do identyfikacji i różnicowania mikroorganizmów metod opartych na analizie różnych fragmentów operonu *rrn* zaowocowało stworzeniem wielu stale i szybko rozwijających się baz. Zawierają one zarówno liczne sekwencje genów rDNA, jak i regionów międzygenowych (ISR – ang. *Intergenic Spacer Region*), które mogą być wykorzystywane do projektowania starterów i sond molekularnych oraz stałego ulepszania metod służących identyfikacji i różnicowaniu LAB.

### 1. Genotypowanie oparte na analizie operonu *rrn*

W identyfikacji/różnicowaniu LAB opartym na regionach operonu *rrn* wykorzystuje się wiele metod, m.in. amplifikację zmiennego regionu w obrębie genu kodującego 16S lub 23S rRNA, amplifikację polimorficznych sekwencji położonych pomiędzy genami kodującymi 16S i 23S rRNA (ITS-PCR, ang. *Internal Transcribed Spacer-PCR*) [Kizerwetter-Świda i Binek 2005, Ouoba i in. 2010], amplifikację regionów położonych między genami kodującymi tRNA (tDNA-PCR) [Baele i in. 2002], analizę sekwencyjną genu kodującego 16S, 23S rRNA lub sekwencji ITS [Dicks i in. 1995, Nour 1998, Janda i Abbott 2007, Hirschhäuser i in. 2005], analizę restrykcyjną produktu amplifikacji genu rDNA (ang. *Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*, ARDRA), rybotypowanie, DGGE/TGGE. Podstawę większości tych technik stanowi PCR.

### 1.1. Amplifikacja regionu położonego w obrębie operonu *rrn*

Do identyfikacji gatunkowej LAB można wykorzystać swoiste gatunkowo startery amplifikujące wybrany odcinek polimorficzny w obrębie genów rDNA. Gen kodujący podjednostkę 16S rRNA składa się z 10 regionów zmiennych (V1–V10) i 10 regionów konserwatywnych (C1–C10) [Trotha i in. 2001]. Chagnaud i in. (2001) opracowali metodę identyfikacji bakterii z rodzaju *Lactobacillus*: *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. reuteri*, *L. salivarius*, *L. paracasei* i *L. casei*, z wykorzystaniem starterów gatunkowo swoistych, komplementarnych do wysoce zmiennego regionu V1. Furet i in. (2004) opracowali real-time PCR (qPCR) z wykorzystaniem gatunkowo swoistych starterów amplifikujących 16S rDNA do ilościowego oznaczenia *Streptococcus thermophilus*, *L. delbrueckii*, *L. acidophilus*, *L. johnsonii*, *L. paracasei*, i *L. rhamnosus* w fermentowanych produktach mlecznych. Należy jednak podkreślić, że oznaczenie liczby bakterii na podstawie qPCR z użyciem starterów zaprojektowanych do genów rDNA wymaga uwzględnienia liczby kopii operonu *rrn* w genomie badanych szczepów.

Baele i in. (2002) wykorzystali tDNA-PCR połączony z elektroforezą kapilarną do szybkiej identyfikacji bakterii należących do rodzaju *Lactobacillus*. Pomimo otrzymania w przypadku wielu szczepów swoistych gatunkowo wzorów tDNA, nierozróżnialne pozostały: *L. acidophilus*, *L. gallinarum* i *L. helveticus*, *L. crispatus* i *L. amylovorus*, *L. buchneri* i *L. collinoides*, *L. gasseri* i *L. farciminis*, *L. fermentum* i *L. cellobiosus*, *L. sakei* i *L. graminis*, oraz *L. animalis* i *L. murinus*. Nie otrzymano także pełnej zgodności pomiędzy drzewem pokrewieństwa filogenetycznego wygenerowanym na podstawie uzyskanych wyników a dendrogramem opartym na sekwencji 16S rDNA.

Dotychczas opracowano wiele zestawów starterów oraz sond molekularnych komplementarnych do sekwencji rDNA, które mogą być wykorzystywane w celu identyfikacji oraz różnicowania LAB [Satokari i in. 2003, Hirschhäuser i in. 2005].

### 1.2. ARDRA

Innym narzędziem stosowanym w identyfikacji niektórych LAB jest analiza restrykcyjna produktu amplifikacji genu kodującego 16S rRNA (ang. *Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*; ARDRA). Stanowi ona odmianę PCR-RFLP. Pierwszy etap opiera się na amplifikacji fragmentu genu rDNA z użyciem przeważnie starterów uniwersalnych, komplementarnych do genu kodującego 16S rDNA. Otrzymany produkt PCR poddaje się trawieniu enzymem/enzymami restrykcyjnymi, a powstałe produkty trawienia rozdziela się

elektroforetycznie w żelu agarozowym lub poliakryloamidowym. O potencjale różnicującym metody decyduje przede wszystkim odpowiedni dobór enzymu restrykcyjnego (częstość cięcia restryktazy).

Rodas i in. (2003) jako metodę identyfikacji LAB wyizolowanych z moszczu gronowego i wina zasugerowali amplifikację fragmentu 16S rDNA, a następnie analizę restrykcyjną powstałego produktu z wykorzystaniem trzech restryktaz w oddzielnych reakcjach (*MseI*, *BfaI* i *AluI*). Pomimo że wzory uzyskane techniką ARDRA są powtarzalne, wiele badań wskazuje na ograniczony potencjał różnicujący tej metody. Wysokie podobieństwo rDNA pomiędzy niektórymi bardzo blisko spokrewnionymi gatunkami w obrębie LAB powoduje, że dobór enzymu restrykcyjnego, umożliwiającego rozróżnienie na podstawie wzorów RFLP poszczególnych gatunków, jest trudny. Analiza restrykcyjna bardziej zmiennego regionu międzygenowego 16S/23S rDNA również nie zawsze daje wystarczające zróżnicowanie, czego przykładem są badania de las Rivas i in. (2004, 2006). Pomimo zastosowania 4 enzymów restrykcyjnych (*TaqI*, *CfoI*, *DdeI* i *NdeI*) autorom nie udało się wykazać różnic pomiędzy 18 szczepami *Oenococcus oeni* należącymi do różnych typów sekwencyjnych [de las Rivas i in. 2004]. Także w analizie restrykcyjnej 16 szczepów *L. plantarum* z użyciem enzymów *AluI*, *CfoI*, *DdeI* i *TaqI* otrzymano tylko jeden wzór RFLP, mimo że inne metody typowania wykazały duże zróżnicowanie w obrębie badanych szczepów (4 rybotypy i 14 profili ST) [de las Rivas i in. 2006].

#### 1.4. Rybotypowanie

Istotą metody rybotypowania jest analiza restrykcyjna genomowego DNA. Uzyskane produkty trawienia rozdzielane są elektroforetycznie. W kolejnym etapie przeprowadzany jest transfer na nylonową lub nitrocelulozową membranę oraz hybrydyzacja DNA z sondami molekularnymi, wyznakowanymi fragmentami DNA o sekwencji komplementarnej do regionów w obrębie operonu *rrn*. Na potencjał różnicujący metody istotnie wpływa rodzaj zastosowanego enzymu restrykcyjnego [Miteva i in. 2001]. W typowaniu szczepów LAB często stosuje się restryktazę *EcoRI*. Rybotypowanie wykonane z jej użyciem umożliwiło zróżnicowanie trzech podgatunków: *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* i *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* [Miteva i in. 2001] oraz identyfikację gatunkową 29 szczepów *Lactobacillus* spp. (*L. brevis*, *L. plantarum*, *L. paracasei* subsp. *paracasei*) wyizolowanych z zepsutego piwa [Yansanjav i in. 2003]. Zastosowanie restryktaz *EcoRI* i *HindIII* do typowania ośmiu szczepów z grupy *L. casei* pozwoliło na uzyskanie różnych profili restrykcyjnych poszczególnych gatunków (*L. rhamnosus*, *L. casei*, *L. paracasei* subsp.

*paracasei*, *L. paracasei* subsp. *tolerans* i *L. zae*), jednakże możliwość różnicowania wewnątrzgatunkowego w porównaniu z innymi metodami (PFGE, rep-PCR) była ograniczona [Coudeyras i in. 2008].

Obecnie rybotypowanie można przeprowadzić komercyjnymi, całkowicie zautomatyzowanymi testami, czego przykładem jest RiboPrinter Microbial Characterization System (DuPont-Qualicon, Inc.). Automatyczne rybotypowanie, wykonane z zastosowaniem restryktazy *EcoRI* i wyznakowanych sond, umożliwiło typowanie 21 szczepów *L. sanfranciscensis* wyizolowanych z zakwasów. Na podstawie uzyskanych profili restrykcyjnych wyodrębniono 4 odmienne rybotypy [Kitahara i in. 2005]. Zautomatyzowaną metodę wykorzystano także z powodzeniem do potwierdzenia identyfikacji i typowania 20 wyizolowanych z wina szczepów *L. paracasei* subsp. *paracasei*, *L. plantarum* i *L. pentosus* [Rodas i in. 2005]. Z kolei w badaniach przeprowadzonych przez Švec i in. (2010), w obrębie 67 szczepów z rodzaju *Lactobacillus* wyodrębniono 55 rybotypów. Identyfikacja gatunkowa szczepów na podstawie otrzymanych profili restrykcyjnych była jednak ograniczona. Tylko 18 szczepów zostało zidentyfikowanych do poziomu gatunku, jako że pozostałe wykazywały mniejsze niż 85% podobieństwo ze szczepami referencyjnymi zawartymi w bazie DuPont Qualicon.

### 1.5. Analiza sekwencyjna rDNA

Analiza sekwencji rDNA odgrywa ogromną rolę w określaniu filogenetycznego pokrewieństwa organizmów i stała się standardem w obecnej klasyfikacji bakterii. Gen kodujący podjednostkę 16S rRNA jest podstawowym molekularnym markerem w badaniach filogenetycznych. O jego wyborze zdecydowało m.in. powszechne występowanie u bakterii, wielkość (około 1500 pz) oraz obecność w jego obrębie fragmentów wysoce konserwatywnych poprzedzielanych regionami o dużym polimorfizmie [Małek i in. 2005]. Wykorzystanie starterów, które hybrydują z sekwencjami konserwatywnymi, flankującymi regiony zmienne, pozwala na amplifikację zmiennych sekwencji badanego szczepu. Analiza tych zmiennych fragmentów umożliwia określenie filogenetycznych związków, zarówno na poziomie rodzaju, gatunku, jak i szczepu. Identyfikacja opiera się na poszukiwaniu homologii między sekwencją otrzymanego produktu PCR a sekwencjami zgromadzonymi w dostępnych bazach danych, takich jak np. GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>), EMBL (<http://www.ebi.ac.uk/embl>) lub Ribosomal database project – RDP (<http://rdp.cme.msu.edu>). Szczepy wykazujące przynajmniej 95% identyczności sekwencji 16S rDNA klasyfikuje się do tego samego rodzaju, podczas gdy na podstawie 97% i większego podobieństwa określa się

przynależność gatunkową szczepu [Małek i in. 2005]. Sekwencjonowanie genu 16S rDNA wykorzystywane jest w wielu przypadkach jako metoda referencyjna, potwierdzająca identyfikację fenotypową wyizolowanego szczepu. Ma ona jednak pewne ograniczenia. Metoda ta wykazuje zbyt niską rozdzielczość w przypadku organizmów bardzo blisko spokrewnionych. Stwierdzono, że poszczególne gatunki/podgatunki w obrębie tego samego rodzaju mogą mieć identyczną sekwencję genu 16S rDNA [Małek i in. 2005]. Dane zbiorcze uzyskane na podstawie badań różnych zespołów wykazały, że sekwencjonowanie genu 16S rDNA pozwoliło na ustalenie przynależności rodzajowej badanego szczepu w ponad 90% przypadków, podczas gdy identyfikacja gatunkowa była możliwa tylko w przypadku od 65 do 83% izolatów. Na podstawie sekwencji genu 16S rDNA pozostało niezidentyfikowanych od 1 do 14% szczepów [Janda i Abbott 2007]. Przyczyną braku możliwości dokładnego określenia przynależności gatunkowej czy rodzajowej szczepu, oprócz wspomnianej bardzo wysokiej homologii pomiędzy sekwencją badanego genu różnych gatunków/podgatunków, może być także baza danych stosowana w analizie (m.in. błędy i luki w sekwencjach, zbyt mała liczba zdeponowanych sekwencji) lub rozpoznanie nowego taksonu [Janda i Abbott 2007].

W przypadku drobnoustrojów należących do LAB, analiza sekwencji genu kodującego podjednostkę 16S rRNA wykazuje niekiedy stosunkowo niski polimorfizm, nie dając jednoznacznych wyników. Badanie homologii 16S rRNA nie pozwala m.in. na różnicowanie gatunków z grupy *L. plantarum*: *L. plantarum*, *L. paraplantarum* i *L. pentosus*, gatunków *L. sakei* i *L. curvatus* oraz trzech podgatunków *Leuconostoc* spp. [Naser i in. 2007, Tohno i in. 2012]. Stwierdzono także, że genom bakteryjny może zawierać kilka kopii genów 16S rDNA wykazujących niekiedy niewielkie różnice w sekwencji nukleotydowej. Geny te mogą ulegać także horyzontalnemu transferowi [Małek i in. 2005, Acinas i in. 2004]. Z tego powodu w genomie LAB poszukuje się innych konserwatywnych sekwencji, mogących służyć jako markery molekularne zapewniające większy potencjał różnicujący niż geny kodujące rRNA [Naser i in. 2007]. Geny użyteczne do takich analiz powinny spełniać dwie podstawowe zasady: powszechnie występować w genomie bakteryjnym i zawierać gatunkowo swoisty region, wystarczająco zmienny, aby zapewnić jednoznaczne różnicowanie pomiędzy poszczególnymi gatunkami/podgatunkami [Naser i in. 2007]. Claesson i in. (2008) zaproponowali użycie genu *groEL* (*hsp60*), kodującego 60 kDa białko szoku cieplnego, jako alternatywnego markera filogenetycznego i identyfikacyjnego w odniesieniu do *Lactobacillus* spp. Sekwencja tego genu była silniej zróżnicowana niż sekwencja 16S rDNA. W innych badaniach analiza sekwencji genu *pheS*, kodującego podjednostkę alfa syntazy fenyloalanylo-tRNA (Phe-tRNA), oraz genu *rpoA*, kodującego podjednostkę alfa polimerazy RNA, okazała

się przydatna w badaniach bakterii z rodzaju *Lactobacillus* i *Enterococcus*. Dobrze się sprawdziła przy różnicowaniu drobnoustrojów wykazujących bardzo duży stopień podobieństwa genetycznego. Sekwencjonowanie obu genów umożliwiło różnicowanie m.in. gatunków z grupy *L. acidophilus*, z wyjątkiem szczepów *L. kitasatonis* i *L. amylovorus*, (podobieństwo sekwencji genu *pheS* i *rpoA* między gatunkami wynosiło odpowiednio do 94% i 98%), gatunków z grupy *L. plantarum* (podobieństwo sekwencji genu *pheS* i *rpoA* do 90% i 98%), gatunków *L. sakei* i *L. curvatus* (do 88% i 96%) oraz gatunków z grupy *L. casei* (do 84% i 95%) z wyjątkiem szczepów *L. casei* i *L. zaeae*. Na podstawie analizy sekwencji genu *pheS* można było różnicować także podgatunki *L. plantarum* subsp. *plantarum* i *L. plantarum* subsp. *argenteratensis* (91% podobieństwa sekwencji) oraz *L. sakei* subsp. *sakei* i *L. sakei* subsp. *carnosus* (92% podobieństwa sekwencji) [Naser i in. 2007]. W innych badaniach wykazano, że sekwencja nukleotydowa genu *tuf*, kodującego czynnik elongacyjny Tu zaangażowany w biosyntezę białek, jest silniej zróżnicowana niż 16S rDNA. Analiza częściowej sekwencji tego genu okazała się przydatna w identyfikacji *Lactobacillus* spp., dobrze sprawdzając się przy różnicowaniu drobnoustrojów wykazujących bardzo wysoki stopień podobieństwa genetycznego [Ventura i in. 2003, Chavagnat i in. 2002]. Na wygenerowanym drzewie pokrewieństwa filogenetycznego rozróżnione zostały gatunki z prawie identyczną sekwencją 16S rDNA, np. *L. casei*, *L. paracasei* subsp. *paracasei* i *L. rhamnosus* oraz *L. gasseri* i *L. johnsonii* [Ventura i in. 2003]. Nie wykazano jednak zmienności sekwencji w obrębie poszczególnych szczepów tego samego gatunku/podgatunku.

Warto podkreślić, że sekwencje genów LAB innych niż 16S rDNA są mniej dostępne w bazach danych. Można je odnaleźć głównie w postaci sekwencji całych genomów, co może utrudniać analizę i interpretację uzyskanych wyników.

### 1.6. DGGE/TGGE

Innymi metodami, wykorzystującymi najczęściej jako sekwencję docelową gen kodujący 16S rRNA, są DGGE (ang. *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) oraz TGGE (ang. *Temperature Gradient Gel Electrophoresis*). Opierają się one na właściwościach topnienia DNA, a ich podstawę stanowi elektroforeza w gradiencie czynnika denaturującego strukturę DNA, chemicznego (DGGE) bądź temperaturowego (TGGE).

Ogromną zaletą tych metod jest możliwość badania składu oraz różnicowania w całych złożonych populacjach mikroorganizmów, np. w próbkach żywności lub pochodzących z przewodu pokarmowego ludzi i zwierząt. W pierwszym etapie przeprowadza się PCR z użyciem całkowitego DNA wyizolowanego z badanej próbki oraz starterów uniwersalnych,



najczęściej komplementarnych do wysoce konserwatywnego fragmentu genu 16S rDNA. Otrzymane produkty PCR rozdziela się na żelu poliakryloamidowym z uformowanym rosnąco gradientem czynnika denaturującego (mocznik, formamid) lub gradientem temperatury. Rozdział fragmentów oparty jest na zjawisku zmniejszonej migracji elektroforetycznej częściowo zdenaturowanych cząsteczek dwuniciowego DNA (dsDNA). Topnienie cząsteczki dsDNA zależy ściśle od sekwencji nukleotydów. W trakcie rozdziału elektroforetycznego dwuniciowe fragmenty DNA o tej samej długości ulegają denaturacji i spowolnieniu migracji przy innym stężeniu czynnika denaturującego, w zależności od sekwencji i liczby par zasad G+C. W efekcie odległość, na jaką migrują poszczególne fragmenty DNA podczas rozdziału elektroforetycznego, jest zróżnicowana [Muyzer i Smalla 1998]. Umieszczenie na końcu 5' jednego ze starterów krótkiego fragmentu (ok. 30–50 pz) bogatego w nukleotydy GC (tzw. GC clamps) zwiększa zdolności rozdzielcze techniki niemal do 100%. Sekwencja GC stanowi domenę o wysokiej temperaturze topnienia i zapobiega całkowitej denaturacji analizowanej cząsteczki DNA podczas elektroforezy. Żele elektroforetyczne wybarwiane są solami srebra lub barwnikami fluorescencyjnymi, np. SYBRGreen I, bromkiem etydyny [Muyzer i Smalla 1998].

W wyniku rozdziału DGGE/TGGE otrzymuje się wzory złożone z produktów PCR, z których każdy odpowiada innej sekwencji obecnej w badanej próbce. Do identyfikacji otrzymanych produktów można zastosować marker składający się z mieszaniny produktów PCR, otrzymanych w wyniku amplifikacji czystych kultur poszukiwanych mikroorganizmów. Przy bardziej złożonych wzorach przeprowadza się procedurę hybrydacyjną z wykorzystaniem znakowanych sond molekularnych lub oczyszczone produkty poddaje się sekwencjonowaniu [Muyzer i Smalla 1998]. Podejmowane są próby optymalizacji metody zmierzające do uzyskiwania mniej złożonych i łatwiejszych w interpretacji wzorów, pozwalających na wyeliminowanie potrzeby stosowania dodatkowych technik w celu identyfikacji. Przykładem jest zastosowanie starterów swoistych w odniesieniu do danego rodzaju LAB [Walter i in. 2001, Satokari i in. 2002].

Potencjał różnicujący DGGE/TGGE zależy od przeprowadzonej optymalizacji procedury, przy czym kluczowe znaczenie mają takie czynniki, jak: gradient czynnika denaturującego, czas elektroforezy oraz starter użyty do PCR. W badaniach przeprowadzonych przez Ercolini i in. (2003) do oceny różnorodności mikrobiologicznej w serze metodą DGGE wykorzystano dwa zestawy starterów: pierwszy amplifikujący region zmienny V3, drugi amplifikujący region V4–V5 w obrębie genu 16S rDNA. Tylko analiza w oparciu o podstawie amplifikacji regionu V3 pozwoliła na wykrycie gatunków *L. plantarum*, *L. curvatus* i

*Enterococcus faecalis* w badanej próbce, podczas gdy *Leuconostoc mesenteroides* był identyfikowalny tylko przy użyciu startera amplifikującego region V4–V5.

Metoda DGGE/TGGE jest niezależna od procesu klasycznej hodowli bakterii na pożywkach mikrobiologicznych. W badaniach przeprowadzonych przez Temmerman i in. (2003) wykazano jej przewagę nad konwencjonalnymi metodami hodowli mikroorganizmów. Autorzy analizowali skład mikrobiologiczny 10 preparatów probiotycznych metodą DGGE opartą na amplifikacji regionu zmiennego V3. Wykryli w ten sposób większą liczbę gatunków niż liczba gatunków wyhodowanych z zastosowaniem czterech rodzajów wybiórczych pożywek. W innych badaniach, porównanie DGGE z hodowlą wykazało konieczność łączenia obu metod dla uzyskania bardziej precyzyjnej analizy [Miambi i in. 2002].

Metoda DGGE/TGGE znalazła szerokie zastosowanie w badaniach dotyczących zmian składu mikrobiologicznego zarówno podczas produkcji, jak i w gotowym produkcie [Cocolin i in. 2011], oraz do oceny wpływu preparatów probiotycznych i prebiotycznych [Konstantinov i in. 2004], antybiotykoterapii [Donskey i in. 2003] czy diety [Satokari i in. 2002] na skład mikroflory jelitowej. Wykorzystywano ją także do badania bioróżnorodności mikroflory w różnych odcinkach jelita [Malmuthuge i in. 2012] oraz analizy dynamiki zmian ilościowych i jakościowych w populacjach mikroorganizmów, wywoływanych zmianami w środowisku [Mohania i in. 2008].

Należy jednak podkreślić pewne wady tej metody, m.in. możliwość występowania w obrębie tego samego szczepu kilku genów 16S rRNA różniących się sekwencją, tworzenie heterodupleksów powodujących dodatkowe prążki w otrzymanych wzorach, komigracja niektórych fragmentów DNA.

### 1.7. SSCP

Metoda SSCP (polimorfizm konformacyjny jednoniciowego DNA – ang. *Single Strand Conformation Polymorphism*), podobnie jak DGGE/TGGE, należy do metod opartych na właściwościach topnienia DNA. Jednoniciowe cząsteczki DNA (ssDNA), uzyskane poprzez denaturację i szybkie chłodzenie produktów PCR, rozdzielane są elektroforetycznie w żelu poliakryloamidowym. Cząsteczki ssDNA o takiej samej długości mogą tworzyć różne struktury drugorzędowe, co wynika z różnic w sekwencji nukleotydowej i objawia się różną szybkością migracji w żelu [Krawczyk 2007]. Nawet pojedyncza mutacja może wywołać zmiany w konformacji cząsteczki. Metoda SSCP, opierająca się na amplifikacji regionu zmiennego V3 lub V4, została z powodzeniem wykorzystana m.in. przez Duthoit i in. (2003). W badaniach tych oceniano dynamikę zmian składu mikrobiologicznego podczas procesu

produkcji i dojrzewania sera.

## 2. Metody oparte na analizie restrykcyjnej DNA chromosomalnego

### 2.1. REA-PFGE

Metoda REA-PFGE opiera się na trawieniu DNA chromosomalnego rzadko tnącymi enzymami restrykcyjnymi i rozdziale otrzymanych produktów trawienia w żelu agarozowym, przy zastosowaniu dwóch zmieniających się na przemian pól elektrycznych (PFGE – ang. *Pulsed Field Gel Electrophoresis*; elektroforeza w zmiennym (pulsacyjnym) polu elektrycznym). Liczba i wielkość powstających fragmentów zależą od rozmieszczenia w genomie sekwencji rozpoznawanych przez użyty enzym. W czasie elektroforezy produktów zmienia się kierunek migracji cząsteczek DNA pod wpływem okresowej zmiany orientacji pola elektrycznego. Zmiana kierunku działania pola elektrycznego wymusza zmianę konformacji cząsteczki DNA i jej reorientację. Czas potrzebny do reorientacji zależy od wielkości cząsteczki, tj. większe fragmenty wymagają dłuższego czasu adaptacji do nowego pola elektrycznego [Krawczyk 2007].

Potencjał różnicujący metody jest niezwykle wysoki, a przy tym charakteryzuje ją bardzo dobra powtarzalność. Metoda uznawana jest za referencyjną i najbardziej miarodajną procedurę przy genotypowaniu drobnoustrojów (tzw. „złoty standard”) [Cai i in 2007, Krawczyk 2007]. Uzyskane wzory są odzwierciedleniem organizacji strukturalnej całego chromosomu bakteryjnego. Zastosowanie PFGE dostarczyło pierwszych szacunkowych ocen wielkości DNA chromosomalnego u bakterii z rodzaju *Lactobacillus* [Roussel i in. 1993, Chevallier i in. 1994]. Wysoki potencjał różnicujący tej metody potwierdzają badania przeprowadzone przez Rodas i in. (2005). Autorzy, analizując 178 szczepów *Lactobacillus* spp. z wykorzystaniem enzymów *SfiI*, *NotI* i *SmaI*, otrzymali odpowiednio 130, 118 i 130 wzorów restrykcyjnych. Połączenie wyników uzyskanych po cięciu tymi enzymami zwiększyło zdolność różnicującą techniki i wyodrębniło 143 wzory w obrębie badanych szczepów [Rodas i in. 2005]. Z kolei w doświadczeniu przeprowadzonym przez Cai i in. (2007) badaniu poddano 40 szczepów *L. casei* różnego pochodzenia. Dzięki zastosowaniu REA-PFGE z restryktazą *SfiI* uzyskano odrębne profile genotypowe w przypadku wszystkich izolatów, podczas gdy analiza z zastosowaniem MLST [Stefańska i Stecka 2012] pozwoliła na rozróżnienie 36 izolatów.

REA-PFGE jest metodą umożliwiającą analizowanie całego materiału genetycznego, co powoduje, że otrzymane wzory mogą być zaburzone fragmentami DNA plazmidowego, izolowanego wraz z chromosomalnym [Krawczyk 2007]. Przydatność tej techniki do

różnicowania wewnątrzgatunkowego szczepów ocenia się bardzo wysoko. Jednak z uwagi na potencjał różnicujący wykorzystanie jej do identyfikacji gatunkowej jest znacznie ograniczone [Rodas i in. 2005]. Dodatkowo analiza REA-PFGE jest kosztowna, czasochłonna, wymaga posiadania specjalistycznej aparatury oraz dużego doświadczenia badawczego.

## 2.2. RFLP

Analizę restrykcyjną chromosomalnego DNA można łączyć z procedurą hybrydyzacyjną (hybrydyzacja metodą Southerna). Rozdzielone elektroforetycznie fragmenty restrykcyjne, po przeniesieniu na membranę zostają poddane hybrydyzacji ze swoistą znakowaną (np. dioksygeniną, biotyną) sondą molekularną. Sonda jest komplementarna do obecnej w chromosomie bakteryjnym sekwencji obejmującej polimorficzne miejsce restrykcyjne. Metoda ta została wykorzystana m.in. do typowania 18 szczepów *O. oeni* wyizolowanych z wina. Jako sondy użyto znakowanego produktu PCR otrzymanego w wyniku amplifikacji fragmentu genu 16S rDNA *O. oeni*. Potencjał różnicowania wewnątrzgatunkowego był jednak znacznie ograniczony [de las Rivas 2004]. Metoda RFLP obecnie powszechniej stosowana jest w połączeniu z techniką PCR (PCR-RFLP) [Stefańska i Stecka 2012].

## 3. Analiza profili plazmidowych

Plazmidy odgrywają ważną rolę w ewolucji i adaptacji do zmieniających się warunków środowiska bakterii fermentacji mlekowej, a przy tym stanowią istotne źródło zmienności ich genomów. Z badań wynika, że wiele gatunków LAB zawiera jeden lub więcej plazmidów [Pouwels i Leer 1993]. Analiza profili plazmidowych wykazała obecność u *Lactococcus* spp. od 2 do 7 plazmidów, u *Enterococcus* spp. od 1 do 7, a u *Lactobacillus* spp. od 1 do 12 plazmidów [Aymerich i in. 2006]. Na plazmidach zlokalizowane są głównie geny przydatne bakteriom, ale niekluczowe dla przeżycia komórki. Obecność tych genów warunkuje specyficzne właściwości, np. geny kodujące białka związane z proteolizą, metabolizmem cukrów, opornością na bakteriofagi i antybiotyki, syntezą bakteriocyn czy wytwarzaniem śluzu [Pouwels i Leer 1993]. Izolacja DNA plazmidowego z komórek bakteryjnych i jego rozdział elektroforetyczny w żelu agarozowym prowadzi do uzyskania, w zależności od liczby i wielkości plazmidów obecnych w komórce, charakterystycznego wzoru, tzw. profilu plazmidowego szczepu. Metodę można uzupełnić poprzez dodanie etapu trawienia restrykcyjnego otrzymanego DNA plazmidowego. Mannu i Pabo (2002) wykazali większe zróżnicowanie izolatów *L. lactis* i *Enterococcus* spp. poprzez analizę profili

plazmidowych niż na podstawie metody PFGE.

Stosowanie metody ogranicza jej mała uniwersalność, jako że szczepy bakteryjne nieniosące plazmidów nie podlegają różnicowaniu [Krawczyk 2007, Temmerman i in. 2004]. Plazmidy są przyczyną dużej zmienności wewnątrzszczepowej, powodowanej nabyciem lub utratą określonego plazmidu na drodze horyzontalnego transferu genów lub jego integracji z chromosomem bakteryjnym.

### **PODSUMOWANIE**

Metody biologii molekularnej stały się integralną częścią badań w większości laboratoriów mikrobiologicznych. Rozwój i udoskonalanie metod typowania molekularnego prowadzą do polepszenia ich czułości, odtwarzalności uzyskiwanych wyników, a także obniżenia czasu i kosztów analizy. Zakres ich zastosowania w identyfikacji i różnicowaniu szczepów bakteryjnych rozszerza się coraz szybciej. Warto jednak pokreślić, że nie są to metody uniwersalne, każdą z nich charakteryzuje określony potencjał różnicujący, czułość i powtarzalność (tabela 1). Z tego powodu coraz częściej stosuje się kombinację kilku technik w celu podwyższenia precyzji i rzetelności analizy.

**Tabela 1.** Porównanie najczęściej stosowanych metod typowania LAB*Comparison of the most common LAB typing methods*

<b>Technika</b>	<b>Podstawa metodyczna</b>	<b>Potencjał różnicujący/poziom różnicowania</b>	<b>Powtarzalność</b>	<b>Nakład pracy</b>
Sekwencjonowanie genu	analiza sekwencji nukleotydowej genu (np. 16S rDNA)	wysoki / od rodzaju do szczepu	wysoka	średni
MLST	analiza sekwencji 5-7 genów metabolizmu podstawowego	wysoki / od gatunku do szczepu	wysoka	wysoki
PCR-RFLP	analiza restrykcyjna produktu PCR	średni / od gatunku do szczepu	wysoka	średni
RAPD-PCR	PCR oparty na arbitralnych starterach	wysoki / od gatunku do szczepu	niska	niski
Rep-PCR	PCR oparty na sekwencjach powtórzonych	wysoki / od gatunku do szczepu	średnia	niski
PFGE	analiza restrykcyjna DNA i elektroforeza w pulsowym polu elektrycznym	wysoki / szczepy	wysoka	wysoki
ITS-PCR	PCR – regiony międzygenowe 16S/23S i 23S/5S rDNA	wysoki / od gatunku do szczepu	wysoka	niski
Rybotypowanie	analiza restrykcyjna i hybrydyzacja z sondą (operon <i>rrn</i> )	średni / od gatunku do szczepu	wysoka	średni/wysoki
AFLP	Analiza restrykcyjna/ligacja/PCR	wysoki / od gatunku do szczepu	wysoka	wysoki
DGGE, TGGE	PCR/ elektroforeza w gradiencie czynnika denaturującego	średni / od gatunku do szczepu	wysoka	średni/wysoki
SSCP	PCR/elektroforeza ssDNA	wysoki / od gatunku do szczepu	wysoka	średni/wysoki

## PIŚMIENNICTWO

1. Acinas S.G., Marcelino L.A., Klepac-Ceraj V., Polz M.F. (2004). Divergence and redundancy of 16S rRNA sequences in genomes with multiple *rrn* operons. *J. Bacteriol.*, 186, 2629-2635
2. Aymerich T., Martín B., Garriga M., Vidal-Carou M.C., Bover-Cid S., Hugas M. (2006). Safety properties and molecular strain typing of lactic acid bacteria from slightly fermented sausages. *J. Appl. Microbiol.*, 100(1), 40-49
3. Baele M., Vanechoutte M., Verhelst R., Vancanneyt M., Devriese L.A., Haesebrouck F. (2002). Identification of *Lactobacillus* species using tDNA-PCR. *J. Microbiol. Methods.*, 50(3), 263-271
4. 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
5. Chagnaud P., Machinis K., Coutte L.A., Marecat A., Mercenier A. (2001). Rapid PCR-based procedure to identify lactic acid bacteria: application to six common *Lactobacillus* species. *J. Microbiol. Methods.*, 44(2), 139-148
6. Chavagnat F., Haueter M., Jimeno J., Casey M.G. (2002). Comparison of partial *tuf* gene sequences for the identification of lactobacilli. *FEMS Microbiol. Lett.*, 217, 177-183
7. Chevallier B., Hubert J.C., Kammerer B. (1994). Determination of chromosome size and number of *rrn* loci in *Lactobacillus plantarum* by pulsed-field gel electrophoresis. *FEMS Microbiol. Lett.*, 120(1-2), 51-56
8. Claesson M.J., van Sinderen D., O'Toole P.W. (2008). *Lactobacillus* phylogenomics-towards a reclassification of the genus. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 25, 2945-2954
9. Cocolin L., Dolci P., Rantsiou K. (2011). Biodiversity and dynamics of meat fermentations: the contribution of molecular methods for a better comprehension of a complex ecosystem. *Meat Sci.*, 89(3), 296-302
10. 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
11. Dicks L.M., Dellaglio F., Collins M.D. (1995). Proposal to reclassify *Leuconostoc oenos* as *Oenococcus oeni* [corrig.] gen. nov., comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 45(2), 395-397
12. Donskey C.J., Hujer A.M., Das S.M., Pultz N.J., Bonomo R.A., Rice L.B. (2003). Use of denaturing gradient gel electrophoresis for analysis of the stool microbiota of hospitalized patients. *J. Microbiol. Methods*, 54, 249-256
13. Duthoit F., Godon J.J., Montel M.C. (2003). Bacterial community dynamics during production of registered designation of origin salers cheese as evaluated by 16S rRNA gene single-strand conformation polymorphism analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(7), 3840-3848
14. Ercolini D., Hill P.J., Dodd C.E.R. (2003). Bacterial community structure and location in Stilton cheese. *Appl. Environ. Microbiol.*, 36, 3540-3548

15. Furet J.P., Quénéée P., Tailliez P. (2004). Molecular quantification of lactic acid bacteria in fermented milk products using real-time quantitative PCR. *Int. J. Food Microbiol.*, 97(2): 197-207
16. Hirschhäuser S., Fröhlich J., Gneipel A., Schönig I., König H. (2005). Fast protocols for the 5S rDNA and ITS-2 based identification of *Oenococcus oeni*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 244(1), 165-171
17. Janda J.M., Abbott S.L. (2007). 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *J. Clin. Microbiol.*, 45, 2761-2764
18. Kitahara M., Sakata S., Benno Y. (2005). Biodiversity of *Lactobacillus sanfranciscensis* strains isolated from five sourdoughs. *Lett. Appl. Microbiol.*, 40(5), 353-357
19. Kizerwetter-Świda M., Binek M. (2005). Selection of potentially probiotic *Lactobacillus* strains towards their inhibitory activity against poultry enteropathogenic bacteria. *Pol. J. Microbiol.*, 54, 287-294
20. Konstantinov S.R., Awati A., Smidt H., Williams B.A., Akkermans A.D., de Vos W.M. (2004). Specific response of a novel and abundant *Lactobacillus amylovorus* -like phylotype to dietary prebiotics in the guts of weaning piglets. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70(7), 3821-3830
21. Krawczyk B. (2007). Diagnostyka molekularna w zakażeniach szpitalnych. *Post. Mikrobiol.*, 46, 367-378
22. Malmuthuge N., Li M., Chen Y., Fries P., Griebel P.J., Baurhoo B., Zhao X., Guan L.L. (2012). Distinct commensal bacteria associated with ingesta and mucosal epithelium in the gastrointestinal tracts of calves and chickens. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 79(2), 337-347
23. Małek W., Wdowiak-Wróbel S., Kalita M., Świącicka I., Studzińska B. (2005). W poszukiwaniu koncepcji gatunku bakteryjnego. *Post. Mikrobiol.*, 44, 323-328
24. Mannu L., Pabo A. (2002). Genetic diversity of lactococci and enterococci isolated from home-made Pecorino Sardo ewes' milk cheese. *J. Appl. Microbiol.*, 92, 55-62
25. Miambi E., Guyot J.P., Ampe F. (2002). Identification, isolation and quantification of representative bacteria from fermented cassava dough using an integrated approach of culture-dependent and culture-independent methods. *Int. J. Food Microbiol.*, 82(2), 111-120
26. Miteva V., Boudakov I., Ivanova-Stoyancheva G., Marinova B., Mitev V., Mengaud J. (2001). Differentiation of *Lactobacillus delbrueckii* subspecies by ribotyping and amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). *J. Appl. Microbiol.*, 90(6), 909-918
27. 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
28. Muyzer G., Smalla K. (1998). Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 73, 127-141
29. Naser S.M., Dawyndt P., Hoste B., Gevers D., Vandemeulebroecke K., Cleenwerck I., Vancanneyt M., Swings J. (2007). Identification of lactobacilli by *pheS* and *rpoA* gene sequence analyses. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 57, 2777-2789



30. Nour M. (1998). 16-S and 23-S intergenic spacer regions of *Lactobacilli*: nucleotide sequence, secondary structure and comparative analysis. *Res. Microbiol.*, 149(6), 433-448
31. Ouoba L.I., Nyanga-Koumou C.A., Parkouda C., Sawadogo H., Kobawila S.C., Keleke S., Diawara B., Louembe D., Sutherland J.P. (2010). Genotypic diversity of lactic acid bacteria isolated from African traditional alkaline-fermented foods. *J. Appl. Microbiol.*, 108(6), 2019-2029
32. Pouwels P.H., Leer R.J. (1993). Genetics of lactobacilli: plasmids and gene expression *Antonie van Leeuwenhoek.*, 64, 85-107
33. 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
34. 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
35. 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
36. Rodas A.M., Ferrer S., Pardo I. (2005). Polyphasic study of wine *Lactobacillus* strains: taxonomic implications. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 55, 197-207
37. Roussel Y., Colmin C., Simonet J.M., Decaris B. (1993). Strain characterization, genome size and plasmid content in the *Lactobacillus acidophilus* group (Hansen and Møcquot). *J. Appl. Bacteriol.*, 74(5), 549-556
38. Satokari R.M., Vaughan E.E., Favier C.F., Doré J., Edwards C., de Vos W.M. (2002). Diversity of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* spp. in breast-fed and formula-fed infants as assessed by 16S rDNA sequence differences. *Microb. Ecol. Health Dis.*, 14, 97-105
39. Satokari R.M., Vaughan E.E., Smidt H., Saarela M., Mättö J., de Vos W.M. (2003). Molecular approaches for the detection and identification of bifidobacteria and lactobacilli in the human gastrointestinal tract. *System. Appl. Microbiol.*, 26, 572-584
40. Stefańska I., Stecka K. (2012). Postępy w identyfikacji i różnicowaniu bakterii fermentacji mlekowej. Część I. *Post. Nauki Technol. Przem. Rol.-Spoż.*, 67(3), 35-51
41. Švec P., Kukletová M., Sedláček I. (2010). Comparative evaluation of automated ribotyping and RAPD-PCR for typing of *Lactobacillus* spp. occurring in dental caries. *Antonie van Leeuwenhoek*, 98, 85-92
42. Temmerman R., Scheirlinck I., Huys G., Swings J. (2003). Culture-independent analysis of probiotic products by denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(1), 220-226.
43. Temmerman R., Huys G., Swings J. (2004). Identification of lactic acid bacteria: culture-dependent and culture-independent methods. *Trends Food Sci. Technol.*, 15, 348-359
44. Tohno M., Kobayashi H., Nomura M., Kitahara M., Ohkuma M., Uegaki R., Cai Y. (2012). Genotypic and phenotypic characterization of lactic acid bacteria isolated from Italian ryegrass silage. *Anim. Sci. J.*, 83(2), 111-120
45. Trotha R., Hanck T., König W., König B. (2001). Rapid ribosequencing - an effective diagnostic tool for detecting microbial infection. *Infection*, 29, 12-16
46. 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, 6908-6922
47. De Vries M.C., Siezen R.J., Wijman J.G.E., Zhao Y., Kleerebezem M., de Vos W.M., Vaughan E.E. (2006). Comparative and functional analysis of the rRNA-operons and their tRNA gene complement in different lactic acid bacteria. *System. Appl. Microbiol.*, 29, 358-367
48. Walter J., Hertel C., Tannock G.W., Lis C.M., Munro K., Hammes W.P. (2001). Detection of *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, and *Weisella* species in human feces by using group-specific PCR primers and denaturing gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, 2578-2585
49. Yansanjav A., Svec P., Sedláček I., Hollerová I., Nemeč M. (2003). Ribotyping of lactobacilli isolated from spoiled beer. *FEMS Microbiol. Lett.*, 229, 141-144