

LIDIA MARKIEWICZ, ELŻBIETA BIEDRZYCKA, MARIA BIELECKA

RÓŻNICOWANIE MLECZARSKICH SZCZEPÓW *LACTOBACILLUS* METODĄ PFGE

Streszczenie

Izolacja bakterii z danego środowiska może prowadzić do wielokrotnego pozyskania tego samego szczepu, co jest trudne do zweryfikowania tradycyjnymi metodami mikrobiologicznymi ze względu na ich niską siłę dyskryminacyjną. Dlatego do różnicowania szczepów *Lactobacillus* zastosowano metodę PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis; elektroforeza w polu pulsowym) i enzymy restrykcyjne Sma I, Apa I i Not I.

Zróżnicowano 12 izolatów *Lactobacillus* pochodzących z mleka acidofilnego, napojów probiotycznych, serów i kultur mleczarskich oraz 4 szczepy referencyjne należące do gatunków *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* i *L. helveticus*. Przy użyciu enzymów Sma I oraz Apa I uzyskano 14 różnych wzorów restrykcyjnych, a identycznymi genotypami charakteryzowały się szczepy *L. acidophilus* 145 i *L. acidophilus* A (wyzolowane z kultur mleczarskich) oraz *L. acidophilus* La5 i *L. acidophilus* DSM 20079 (odpowiednio z mleka acidofilnego i szczep referencyjny pochodzący od człowieka). Przy użyciu restryktazy Not I uzyskano jedynie 12 unikatowych wzorów restrykcyjnych, lecz nie udało się rozróżnić szczepów *L. acidophilus* DSM 20079, *L. acidophilus* La5, *L. acidophilus* Bs i *L. acidophilus* K1, pomimo, że ich profile PFGE po trawieniu Sma I i Apa I były odmienne.

W grupie 12 badanych izolatów stwierdzono 10 oryginalnych szczepów. Najwyższą siłą dyskryminacyjną charakteryzowały się enzymy Sma I i Apa I, a uzyskane przy ich użyciu wyniki świadczą o różnorodności szczepów stosowanych w produkcji mleczarskiej.

Słowa kluczowe: *Lactobacillus*, PFGE, różnicowanie

Wprowadzenie

Bakterie z rodzaju *Lactobacillus* zasiedlają przewód pokarmowy człowieka, a jako korzystnie wpływające na zdrowie i funkcje przewodu pokarmowego oraz ze względu na swoje cechy technologiczne znalazły szerokie zastosowanie w przemyśle mleczarskim i w produkcji probiotycznych suplementów diety. Poszukując nowych szczepów o właściwościach probiotycznych uzyskuje się dużą liczbę izolatów. Ze względu na możliwość wielokrotnego wyizolowania tego samego szczepu, zwłaszcza wtedy, gdy szczepy izolowane są z tego samego środowiska (fermentowane produkty

mleczne i warzywne, przewód pokarmowy ludzi i zwierząt), istnieje potrzeba zastosowania rzetelnych metod potwierdzających lub wykluczających ich podobieństwo. Ponadto, identyfikacja bakterii na poziomie szczepu jest niezbędna w badaniach probiotyków do odróżniania wprowadzanych szczepów od naturalnie zasiedlających przewód pokarmowy, a także pod względem ich zastosowania w przemyśle np. do ochrony własności opatentowanych szczepów.

Molekularne metody stosowane do różnicowania szczepów wykorzystują: łańcuchową reakcję polimerazy, np. RAPD (randomly amplified polymorphic DNA) [3]; analizę restrykcyjną zamplifikowanego rybosomalnego DNA, np. ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) [5] lub analizę restrykcyjną całego genomu, np. PFGE (pulsed-field gel electrophoresis – elektroforeza w polu pulsowym) [7]. W metodzie PFGE wykorzystywane są enzymy restrykcyjne, które tną bakteryjne DNA w ściśle określonym miejscu, charakterystycznym dla danego enzymu. Powstałe w ten sposób wielkocząsteczkowe fragmenty DNA są następnie rozdzielane w polu elektrycznym o zmiennej długości pulsu i tworzą charakterystyczny dla każdego szczepu wzór restrykcyjny.

Celem badań było określenie przydatności metody PFGE i wybranych enzymów restrykcyjnych do różnicowania szczepów *Lactobacillus* oraz określenie różnicowania izolatów mleczarskich.

Materiał i metody badań

Szczepy i warunki hodowli

Zbadano 4 szczepy referencyjne i 12 izolatów *Lactobacillus* należących do gatunków: *L. acidophilus* (6 szczepów), *L. casei* (5), *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (3) i *L. helveticus* (2). Wszystkie szczepy wraz z ich pochodzeniem zostały wyszczególnione w tab. 1. Przed izolacją DNA szczepy *Lactobacillus* uaktywniano przez dwukrotny pasaż w płynnym podłożu MRS [2] w warunkach tlenowych, stosując inkubację w temp. 37°C przez 18-20 h.

Przygotowanie bakteryjnego DNA

Jeden mL całonocnej hodowli bakterii odwirowywano i osad komórek przemywano dwukrotnie 1 mL buforu SE (75 mM NaCl, 25 mM EDTA pH 7,4). Zawiesinę komórek bakteryjnych (60 µL) łączono z 2% agarozą o niskiej temperaturze topnienia (CleanCut™ Agarose, Bio-Rad) w proporcji 1:1 (v/v) i wprowadzano do studzienek o wymiarach 5 x 2 x 10 mm (Bio-Rad). Zestalone bloczki agarozowe inkubowano w buforze lizującym (0,5 mL), zawierającym 50 mM EDTA pH 8,5; 0,05% sarkozyl; 2 mg/mL lizozymu (Sigma) i 3 U/mL mutanolizyny (Sigma) w temp. 37°C przez 16 h. Następnie bloczki inkubowano w roztworze proteinyzy K (0,5 mL) zawierającym 10 mM Tris-HCl, 0,05 M EDTA pH 8,5; 1% dodecylosiarczan sodu (Fluka) i 2 mg/mL proteinyzy K w temp. 53°C przez 18 h. Po tym czasie bloczki

płukano w buforze SE 4-krotnie po 1 h w temp. pokojowej (20-22°C) i przechowywano w temperaturze +4°C.

Trawienie enzymami restrykcyjnymi

Do różnicowania szczepów zastosowano endonukleazy Sma I (5' CCCGGG 3'), Apa I (5' GGGCCC 3') i Not I (5' GCGGCCGC 3') (Fermentas) mające unikalne miejsca restrykcji w genomie *Lactobacillus*. Błoczki agarozowe z unieruchomionym w nich bakteryjnym DNA przemywano 0,1x buforem SE w temp. pokojowej przez 1 h, a następnie 1x buforem odpowiednim do enzymu. Trawienie prowadzono w objętości 0,3 mL buforu zawierającego 10 U enzymu restrykcyjnego w temp. 37°C (Apa I, Not I) lub 30°C (Sma I) przez 16-18 h. Po trawieniu błoczki płukano w 0,5 mL 0,5 x buforu TBE (45 mM Tris, 45 mM H₃BO₃, 1 mM EDTA) stosowanego do elektroforezy.

Warunki rozdziału i barwienia

Błoczki agarozowe zawierające bakteryjne DNA trawione restryktazami umieszczano w studzienkach 1% żelu agarozowego (Pulsed Field Certified Agarose, Bio-Rad). Dwudziestogodzinny rozdział elektroforetyczny prowadzono w 0,5x buforze TBE, przy stałym napięciu 5 V/cm i długości pulsu 1-15 s, w aparacie CHEF III (Bio-Rad). Jako markery masy molekularnej zastosowano: 5 kb Ladder (Bio-Rad) i Lambda Ladder (Bio-Rad). Po elektroforezie żele barwiono w roztworze bromku etydyny (5 µg/mL, Sigma) przez 40 min, po czym płukano w wodzie destylowanej przez 30 min. Żele wizualizowano w świetle UV i dokumentowano w systemie DigiDOC (Biogenet, Polska).

Wyniki i dyskusja

Wzory restrykcyjne otrzymane po trawieniu DNA poszczególnych szczepów endonukleazami Sma I, Apa I i Not I poddano analizie porównawczej, a wyniki zestawiono w tab. 1.

Stosując enzym Sma I, w grupie 16 badanych szczepów otrzymano 14 unikatowych genotypów (S1 – S14) oraz identyczne profile PFGE szczepów *L. acidophilus* DSM 20079 i *L. acidophilus* La5 (genotyp S1) oraz *L. acidophilus* 145 i *L. acidophilus* A (S4). Podobne wyniki uzyskano po trawieniu enzymem Apa I, gdzie tym samym parom szczepów oznaczono identyczne genotypy – odpowiednio A1 i A4. Natomiast po trawieniu enzymem Not I wyróżniono 12 unikatowych genotypów (N1 – N12), a takie same profile PFGE miały szczepy: *L. acidophilus* DSM 20079, *L. acidophilus* La5, *L. acidophilus* BS i *L. acidophilus* K1 (genotyp N1) oraz *L. acidophilus* 145 i *L. acidophilus* A (N2). Wymienione szczepy o genotypie N1 charakteryzowały się odmiennymi genotypami przy zastosowaniu restryktaz Sma I i Apa I, odpowiednio: S1/A1 (dwa pierwsze szczepy), S2/A2 i S3/A3; natomiast szczepy o genotypie N2 charakteryzowały się genotypem S4/A4.

Tabela 1

Zestawienie genotypów otrzymanych na podstawie analizy restrykcyjnej DNA mleczarskich szczepów *Lactobacillus* z zastosowaniem enzymów Sma I, Apa I i Not I.

Configuration of genotypes obtained by restriction analysis of DNA of dairy *Lactobacillus* strains using Sma I, Apa I and Not I enzymes.

Lp. No	Szczep / Strain	Pochodzenie / Origin	Genotyp Sma I Sma I genotype	Genotyp Apa I Apa I genotype	Genotyp Not I Not I genotype
1.	<i>L. acidophilus</i> DSM 20079	człowiek / human	S1	A1	N1
2.	<i>L. acidophilus</i> La5	mleko acydoofilne acidophilic milk	S1	A1	N1
3.	<i>L. acidophilus</i> Bs	kultura mleczarska milk culture	S2	A2	N1
4.	<i>L. acidophilus</i> K1	napój probiotyczny probiotical drink	S3	A3	N1
5.	<i>L. acidophilus</i> 145	kultura mleczarska milk culture	S4	A4	N2
6.	<i>L. acidophilus</i> A	kultura mleczarska milk culture	S4	A4	N2
7.	<i>L. casei</i> DSM 20011	ser / cheese	S5	A5	N3
8.	<i>L. casei</i> LcY	napój probiotyczny probiotical drink	S6	A6	N4
9.	<i>L. casei</i> 906	bd ¹ / nd	S7	A7	N5
10.	<i>L. casei</i> E1H3.3	ser / cheese	S8	A8	N6
11.	<i>L. casei</i> E1R6	ser / cheese	S9	A9	N7
12.	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> DSM 20081	jogurt / yoghurt	S10	A10	N8
13.	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> 151	kultura mleczarska milk culture	S11	A11	N9
14.	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> E	napój probiotyczny probiotical drink	S12	A12	N10
15.	<i>L. helveticus</i> DSM 20075	ser emmentaler emmentaler	S13	A13	N11
16.	<i>L. helveticus</i> b9	kultura mleczarska milk culture	S14	A14	N12

¹ bd – brak danych / no data available

Otrzymane genotypy Sma I, Apa I i Not I w większości składały się z ponad 10 prążków o wielkości ok. 2-145 tys. par zasad (pz), co pozwalało na dobre rozróżnienie otrzymanych wzorów restrykcyjnych. Jedyne nieliczne profile PFGE charakteryzowały się małą liczbą wysokocząsteczkowych fragmentów, tj. genotypy A7 i N1 (jeden prążek, ok. 240 tys. pz) oraz N2 (dwa prążki, ok. 240 i 190 tys. pz). Powstawanie takich wzorów restrykcyjnych może być wynikiem obecności zbyt małej liczby sekwencji rozpoznawanych przez restryktazy w genomie badanych izolatów, bądź wrażliwości restryktaz na metylację reszt cytozynowych w tych sekwencjach, która blokuje trawienie endonukleazami [8]. W zastosowanych warunkach elektroforezy duże fragmenty DNA (powyżej 200 tys. pz) nie rozdzieliły się, dlatego nie mogły być brane pod uwagę w różnicowaniu szczepów. Uzyskane wyniki skłaniają do wyboru endonukleazy Sma I do rutynowego zastosowania w różnicowaniu *Lactobacillus*. Pomimo, że enzym Apa I miał taką samą zdolność różnicującą, ale jako bardziej wrażliwy na metylację, może okazać się mniej przydatny do różnicowania innych szczepów *Lactobacillus*.

Szczepy o genotypie S1/A1 zostały wyizolowane od człowieka (*L. acidophilus* DSM 20079) i z jogurtu (*L. acidophilus* La5). Ze względu na to, że izolaty o identycznym wzorze restrykcyjnym uważa się za jeden szczep [6], zatem obecność tego samego szczepu w dwóch różnych środowiskach można interpretować w dwojaki sposób. Albo szczep wyizolowany od człowieka zastosowano do produkcji mleka fermentowanego, albo reizolowano go od człowieka spożywającego produkt mleczarski zawierający ten szczep. Ta druga hipoteza wydaje się prawdopodobna, zwłaszcza że zdolność wyselekcjonowanych bakterii fermentacji mlekowej do pasażu przez przewód pokarmowy została potwierdzona, np. metodą PFGE przez Orrhage i wsp. [4]. Szczepy *L. acidophilus* 145 i *L. acidophilus* A również charakteryzowały się identycznym genotypem (S4/A4/N2), jednak pochodziły z tego samego źródła tj. z kultur mleczarskich. Podobne obserwacje poczynili Coeuret i wsp. [1]. Autorzy, metodą PFGE z zastosowaniem trzech enzymów restrykcyjnych Nco I, Sal I i Mlu I wykazali, że szczepy *L. casei* o takim samym genotypie (w niektórych przypadkach identycznym do szczepu referencyjnego) obecne były w różnych produktach mleka fermentowanego.

Wnioski

1. Uzyskane wyniki wskazują na przydatność metody PFGE do różnicowania szczepów *Lactobacillus* po uprzednim starannym doborze enzymów restrykcyjnych.
2. Wykazano, że endonukleazy Sma I i Apa I charakteryzują się taką samą zdolnością różnicującą, wyższą niż Not I.
3. Wśród 12 badanych izolatów stwierdzono 10 oryginalnych szczepów *Lactobacillus* i jeden identyczny do szczepu referencyjnego *L. acidophilus*

DSM 20079, co świadczy o różnorodności zbadanych szczepów stosowanych w produkcji mleczarskiej.

Autorki pragną serdecznie podziękować Panom prof. Włodzimierzowi Bednarskiemu i dr. Markowi Adamczakowi z Katedry Biotechnologii Żywności Wydziału Nauki o Żywności UWM w Olsztynie za udostępnienie do badań aparatu CHEF III firmy Bio-Rad.

Literatura

- [1] Coeuret V., Gueguen M., Vernoux J.P.: Numbers and strains of lactobacilli in some probiotics products. *Int. J. Food Microbiol.*, 2004, **97**, 147-156.
- [2] De Man J.C., Rogosa M., Sharpe M.E.: A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.*, 1960, **23**, 130-135.
- [3] Hayford A., Petersen A., Vogesen F.K., Jakobsen M.: Use of conserved randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) fragments and RAPD pattern for characterization of *Lactobacillus fermentum* in Ghanaian fermented maize dough. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, **65** (7), 3213-3221.
- [4] Orrhage K., Sjöstedt S., Nord C.E.: Effect of supplements with lactic acid bacteria and oligofructose on the intestinal microflora during administration of cefpodoxime proxetil. *J. Antimicrob. Chemoth.*, 2000, **46**, 603-612.
- [5] Roy D., Sirois S., Vincent D.: Molecular discrimination of lactobacilli used as starter and probiotic cultures by amplified ribosomal DNA restriction analysis. *Current Microbiol.*, 2001, **42**, 282-289.
- [6] Simpson P.J., Stanton C., Fitzgerald G.F., Ross R.P.: Genomic diversity within the genus *Pediococcus* as revealed by randomly amplified polymorphic DNA PCR and pulsed-field gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002, **68**, 765-771.
- [7] Tynkkynen S., Satokari R., Saarela M., Mattila-Sandholm T., Saxelin M.: Comparison of ribotyping, randomly amplified polymorphic DNA analysis, and pulsed-field gel electrophoresis in typing of *Lactobacillus rhamnosus* and *L. casei* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999, **65**, 3908-3914.
- [8] <http://rebase.neb.com>, 2006.05.22.

DIFFERENTIATION OF DAIRY *LACTOBACILLUS* STRAINS USING PFGE METHOD

S u m m a r y

Isolation of bacteria from a given environment may cause multiple isolation of the same strain. Verification of such strains is difficult using traditional microbiological methods due to their low discriminative power. Therefore, the PFGE method (Pulsed Field Gel Electrophoresis) as well as Sma I, Apa I and Not I endonucleases were used.

Twelve *Lactobacillus* isolates derived from dairy products and 4 reference strains belonging to species of *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *L. helveticus* were differentiated. Using Sma I and Apa I enzymes, 14 unique restriction patterns were obtained, and identical genotypes were observed for *L. acidophilus* 145 and *L. acidophilus* A isolates (derived from dairy cultures) and for *L. acidophilus* La5 and *L. acidophilus* DSM 20079 (from acidophilic milk and human, respectively). Using Not I enzyme, only 12 distinct restriction patterns were obtained. Four strains: *L. acidophilus* DSM 20079,

L. acidophilus La5, *L. acidophilus* Bs and *L. acidophilus* K1 were not able to be distinguished with Not I, although they demonstrated different patterns after Sma I and Apa I digestion.

In the group of 12 isolates examined, 10 original strains were affirmed. Sma I and Apa I enzymes were characterised by the highest discriminative power. The obtained results confirmed diversity of the strains used in dairy production.

Key words: *Lactobacillus*, PFGE, differentiation ☒