

К.С. Огірчук, Н.К. Коваленко

*Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Академіка Заболотного 154, Київ, 03143, Україна*

ФІЛОГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ НУКЛЕОТИДНОЇ ПОСЛІДОВНОСТІ ГЕНА 16S рРНК ПРОБІОТИЧНОГО ШТАМУ *LACTOBACILLUS SP. 55*

*Проведено видову ідентифікацію пробіотичного штаму *Lactobacillus sp. 55* на основі аналізу нуклеотидних послідовностей гена 16S рРНК. Встановлено приналежність досліджуваного штаму до виду *Lactobacillus gasseri*. Нуклеотидна послідовність фрагменту гена 16S рРНК штаму *Lactobacillus gasseri 55* задепонована в міжнародній базі даних GenBank (NCBI) під номером KT 314159.*

*К л ю ч о в і с л о в а: сиквенування гена 16S рРНК, група *Lactobacillus delbrueckii-acidophilus*.*

Представники роду *Lactobacillus* займають чільне місце серед молочнокислих бактерій. Багато видів цього роду, особливо виділені з різних ділянок шлунково-кишкового тракту (ШКТ) людини, активно використовуються в якості пробіотиків та сприяють оздоровленню організму [14]. У даний час значні зусилля направлені на ідентифікацію та відбір штамів молочнокислих бактерій (МКБ) з новими корисними властивостями. Сучасна ідентифікація є важливою складовою характеристики нових штамів-продуцентів перспективних для промислового використання [8].

Протягом багатьох років видова ідентифікація МКБ ґрунтувалась лише на вивченні їх морфолого-культуральних та фізіолого-біохімічних ознак. Саме за цими характеристиками більшість штамів лактобацил, виділених із ШКТ людей, були віднесені до виду *Lactobacillus acidophilus* та визнані найбільш важливими представниками індигенної мікрофлори організму. Подальший розвиток молекулярно-генетичних методів ідентифікації мікроорганізмів дозволяє вдосконалювати знання про вже існуючі види та сприяє відкриттю нових [1, 5, 6, 9, 16]. У 1980 році Johnson [11] зі співавторами розділили таксономічно неоднорідну групу мікроорганізмів, раніше ідентифікованих як *Lactobacillus acidophilus*, на дві ДНК-гомологічні групи А і В, які, за даними сучасної таксономії, складають шість окремих видів: *Lactobacillus acidophilus* (А1), *L. crispatus* (А2), *L. amylovorus* (А3), *L. gallinarum* (А4), *L. gasseri* (В1) і *L. johnsonii* (В2). Дані види лактобацил відносяться до філогенетичної групи *Lactobacillus delbrueckii-acidophilus*, представники якої фенотипово споріднені [13]. Тому, для точної видової ідентифікації представників цієї групи необхідно застосовувати новітні молекулярно-генетичні методи, одним з яких є аналіз нуклеотидної послідовності гена 16S рРНК [4, 10, 12].

Зважаючи на зазначене вище, метою даного дослідження була видова ідентифікація пробіотичного штаму *Lactobacillus sp. 55* на основі аналізу нуклеотидних послідовностей гена 16S рРНК.

Матеріали та методи. Об'єктом дослідження був пробіотично активний штам *Lactobacillus sp. 55*, виділений з кишечника людини. Культивування штаму проводили 24–48 годин [2] на середовищі MRS за температури 37 °С.

Ідентифікацію штаму *Lactobacillus sp. 55* здійснювали шляхом визначення нуклеотидної послідовності ПЛР-фрагментів гена 16S рРНК. Бактеріальну ДНК для проведення ПЛР-ампліфікації виділили з культури бактерій за допомогою набору реактивів «ДНК-Сорб 100» (Росія) згідно інструкції виробника. Для проведення ПЛР-реакції використовували набір реактивів «Амплиценс PCR» (Росія) та ампліфікатор «Терцик» (Росія). Об'єм ПЛР-суміші становив 30 мкл. Склад реакційної суміші був наступним: 50 мМ КСl; 10 мМ Трис-НСl; 1,5 мМ MgCl₂; 0,1 % Тритон X-100; 200 мкМ кожного з нуклеотидів дНТФ; по 100 нг обох праймерів, та 0,15 одиниць Таq-полімерази. В якості матриці використовували приблизно 100 нг геномної ДНК. Ген 16S рРНК ампліфікували за допомогою універсальних праймерів рН та рА (табл. 1) [7] за наступних умов: початкова денатурація при 95 °С – 3 хв, 35 циклів: денатурація – 94 °С – 1 хв, відпал праймерів при 65 °С – 1 хв, елонгація при 72 °С – 2 хв. Продукти ампліфікації розділяли у 1,5 % агарозному гелі з вмістом бромистого етидію, за напруженості електричного поля 6 вольт/см протягом 30 хв, та візуалізували в ультрафіолетовому світлі довжиною хвилі 315 нм. Електрофоретичний розподіл продуктів реакції проводили в камері для горизонтального електрофорезу BioRad PowerPack Basic. Для визначення довжини ампліфікантів використовували ДНК маркер SM0403 MassRuler DNA Ladder Mix з діапазоном 100–10000 пар нуклеотидів (MBI Fermentas, Литва).

ДНК з необхідного фрагмента виділяли з використанням GeneJet Gel Extraction Kit #K0691 згідно інструкції виробника. Концентрацію ДНК вимірювали спектрофотометричним методом з використанням спектрофотометра Nano Drop 1000 при довжині хвилі 260 нм.

Визначення нуклеотидної послідовності ПЛР-фрагментів проводили на генетичному аналізаторі ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems) з використанням набору Big Dye® Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США) згідно інструкції виробника. Побудову зворотного компліменту, редагування, вирівнювання та елаймент послідовностей здійснювали за допомогою програм Multalin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) та Sequence Manipulation Suite (<http://www.bioinformatics.org/sms2/>) [17, 18]. Пошук гомологічних нуклеотидних послідовностей генів 16S рРНК проводили з використанням програми BLAST у базі даних GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) [19]. Ідентифікація

Таблиця 1
Праймери, використані при молекулярно-генетичній ідентифікації

Праймер	5' - 3'	Нумерація по <i>E. coli</i>	Джерело літератури	Довжина фрагмента, пар нуклеотидів
рА	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	8-27	Devereux, 2004	1533
рН	AAGGAGGTGATCCAGCCGA	1541-1522		

була здійснена з використанням нуклеотидних послідовностей штамів, задепонованих у GenBank, які мають максимальний збіг. Для побудови філогенетичних дерев використовували Neighbor-Joining (NJ) метод [19]. Додатково в аналіз були включені нуклеотидні послідовності близькоспоріднених видів філогенетичної групи *Lactobacillus delbrueckii-acidophilus*, що задепоновані в міжнародних базах даних.

Результати та обговорення. В наших попередніх роботах [2, 3] із вмісту дистального відділу кишечника жінок постменопаузального віку було виділено кілька штамів молочнокислих бактерій, серед яких проведено скринінг за пробіотичними властивостями. Найперспективнішим для використання в якості пробіотику виявився штам № 55. За морфолого-культуральними ознаками штам був віднесений нами до роду *Lactobacillus*, оскільки являв собою грампозитивні, нерухливі, неспоруотворюючі, каталазо-негативні палички правильної форми (0,4–0,6 x 1,0–15,0 мкм), розташовані переважно у довгих ланцюжках, рідше поодинокі або парами. У рідкому середовищі культура проявляла високу здатність до аутоагрегації (17,5 %). Після дослідження ряду фізіолого-біохімічних ознак (табл. 2) штаму *Lactobacillus sp. 55*, було виявлено його значну спорідненість з представниками філогенетичної групи *Lactobacillus acidophilus* [2, 3]. Але за даними сучасної таксономії виключно цих даних не достатньо для коректної видової ідентифікації даного штаму. Тому, для визначення таксономічного положення штаму *Lactobacillus sp. 55*, нами було проведено визначення нуклеотидної послідовності гена 16S рРНК. В результаті було отримано ДНК-фрагмент розміром близько 1500 пар нуклеотидів (рис. 1). Нуклеотидна послідовність фрагменту гена 16S рРНК відповідала штаму *Lactobacillus gasseri 55* і була депонована в міжнародній базі даних GenBank (NCBI) під номером KT 314159 (рис. 2).

Оцінка ідентичності гена 16S рРНК штаму *Lactobacillus sp. 55* із депонованими в міжнародній базі даних GenBank аналогічними нуклеотидними послідовностями видів, що належать до філогенетичної групи

Таблиця 2

**Фізіолого-біохімічні ознаки деяких видів філогенетичної групи
*Lactobacillus delbrueckii-acidophilus***

Вид лактобацил	Характеристики																
	Ріст при				Галактоза	Маноза	Мальтоза	D-маніт	Цукроза	Амігдалін	Саліцин	D-целобіоза	D-лактоза	D-мелбіоза	D-трегалоза	D-рафіноза	ДНК Г+С вміст (мол, %)
	15 °C	45 °C	pH 4,0	5 % NaCl													
<i>Lactobacillus sp. 55*</i>	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	нд
<i>Lactobacillus gasseri**</i>	-	+	+	+	+	+	d	-	+	+	+	+	d	d	d	d	33-35
<i>Lactobacillus johnsonii**</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	d	d	d	d	33-35
<i>Lactobacillus taiwanensis***</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	35,8

Примітка: * Дані Огірчук зі співавт. (2013) [2]. ** +, 90 % або більше штамів позитивні; -, 90 % або більше штамів негативні; d, 11–89 % штамів позитивні (Bergey's manual, 2009). *** Дані Li-Ting Wang et al. (2009) [9, 15, 16]

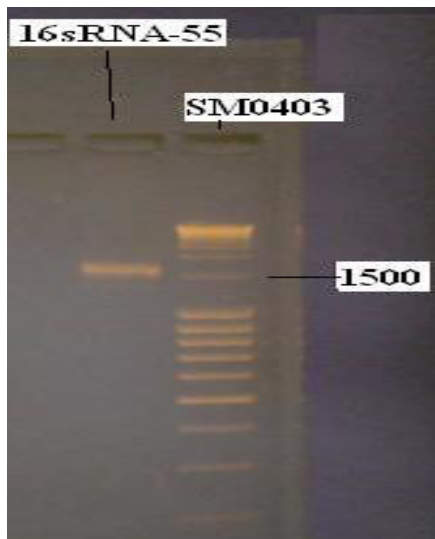


Рис. 1. Електрофоретичний розподіл продуктів ампліфікування гена 16S рРНК штаму *Lactobacillus sp.55*

```

1  gcggcgtgcc taatacatgc aagtcgagcg agcttgcccta gatgaatttg gtgcttgcac
61  caaatgaaac tagatacaag cgagcggcgg acgggtgagt aacacgtggg taacctgccc
121 aagagactgg gataacacct ggaacagat gctaataccg gataacaaca ctagacgcat
181 gtctagagtt taaaagatgg ttctgctatc actcttgatg ggacctgcgg tgcattagct
241 agttggtaag gtaacggctt accaaggcaa tgatgcatag ccgagttgag agactgatcg
301 gccacattgg gactgagaca cggcccaaac tcctacggga ggcagcagta gggaatcttc
361 cacaatggac gcaagtctga tggagcaacg ccgctgtagt gaagaagggt ttcggctcgt
421 aaagctctgt tggtagtgaa gaaagataga ggtagtaact ggcctttatt tgacggtaat
481 tacttagaaa gtcacggcta actacgtgcc agcagccgcg gtaatacgtg ggtggcaagc
541 gttgtccgga tttattgggc gtaaagcgag tgcaaggcgtt tcaataagtc tgatgtgaaa
601 gccttcggct caaccggaga attgcatcag aaactgttga acttgagtgc agaagaggag
661 agtggaaact catgtgtagc ggtggaatgc gtagatata ggaagaacac cagtggcgaa
721 ggcggctctc tggctctgaa ctgacgctga ggctcgaag catgggtagc gaacaggatt
781 agataccctg gtagtccatg ccgtaaacga tgagtgctaa gtgttgggag gtttccgcct
841 ctcagtgtcg cagctaacgc attaagcact ccgcctgggg agtacgaccg caaggttgaa
901 actcaaagga attgacgggg gcccgcaaa gcggtggagc atgtggttta attcgaagca
961 acgcgaagaa cttaccagg tcttgacatc cagtgcacac ctaagagatt aggtgttccc
1021 ttcggggacg ctgagacagg tggtgcatgg ctgtcgtcag ctctgtctcg gagatgttgg
1081 gttaagtccc gcaacgagcg caacccttgt cattagttgc catcattaag ttgggcactc
1141 taatgagact gccgggtgaca aaccggagga aggtggggat gacgtcaagt catcatgccc
1201 cttatgacct gggctacaca cgtgctacaa tggacggtac aacgagaagc gaacctgcga
1261 aggcaagcgg atctctgaaa gccgttctca gttcggactg taggctgcaa ctgcctaca
1321 cgaagctgga atcgctagta atcgcggtac agcacgccgc ggtgaatacg ttcccggggc
1381 ttgtacacac cgcccgtcac accatgagag tctgtaacac ccaaagccgg tgggataacc
1441 tttataggag tcagccgtct aaggtaggac agatgattag ggtgaagtcg taacaaggta
1501 gccgtaggag aacc

```

Рис. 2. Нуклеотидна послідовність фрагмента гена 16S рРНК штаму *Lactobacillus sp. 55* [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/kt314159>]

Lactobacillus acidophilus наведена в таблиці 3. Найвищий рівень ідентичності (99 %) нуклеотидних послідовностей 16S рРНК зафіксовано з представниками філогенетичної підгрупи В: *L. gasseri* ATCC 33323, *L. johnsonii* ATCC 33200 та *Lactobacillus taiwanensis* BCRC 17755.

Результати філогенетичного аналізу фрагменту гена 16S рРНК, наведені на філогенетичному дереві (рис. 3), підтверджують належність штаму

Оцінка гомології нуклеотидних послідовностей фрагмента гена 16S рРНК штаму *Lactobacillus sp. 55* із задепонованими у GenBank референтними штамми *Lactobacillus sp.*

Штам	Референтні штамми, задепоновані у GenBank	Ідентичність послідовностей	
		%	Пар нуклеотидів
<i>Lactobacillus sp. 55</i>	<i>Lactobacillus gasseri strain 55</i>	100	1514/1514
	<i>Lactobacillus gasseri</i> ATCC 33323	99	1513/1514
	<i>Lactobacillus johnsonii</i> ATCC 33200	99	1475/1486
	<i>Lactobacillus taiwanensis</i> BCRC 17755	99	1501/1506
	<i>Lactobacillus acidophilus</i> VPI 6032	94	1345/1438
	<i>Lactobacillus gallinarum</i> ATCC 33199	93	1406/1517
	<i>Lactobacillus crispatus</i> ATCC 33820	92	1399/1516
	<i>Lactobacillus amylovorus</i> DSM 20531	92	1398/1518

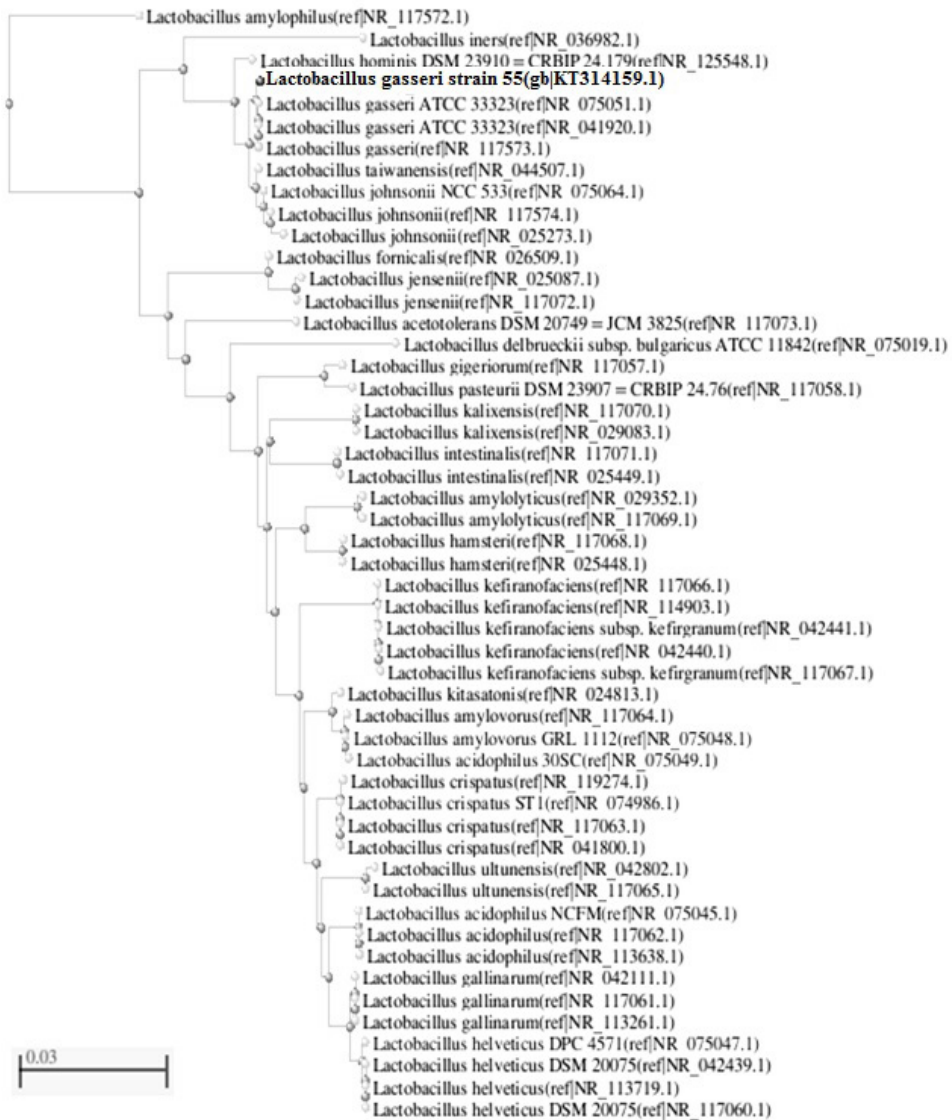


Рис. 3. Філогенетичне дерево, побудоване на основі аналізу фрагментів гена 16S рРНК штамів філогенетичної групи *Lactobacillus delbrueckii-acidophilus*

Lactobacillus sp. 55 до роду *Lactobacillus* і вказують на його найближчу спорідненість до підгрупи у складі філогенетичної групи *Lactobacillus delbrueckii-acidophilus*. Досліджуваний штам знаходиться на одній гілці з *L. gasseri* ATCC 33323 (рис. 4) та є найбільш наближеним до нього за співпадінням пар нуклеотидів (1513 з 1514). Беручи до уваги результати філогенетичного аналізу та високу здатність штаму *Lactobacillus sp. 55* до аутоагрегації, що є культуральною особливістю виду *L. gasseri*, не притаманною іншим представникам підгрупи В [13], ми схиляємося до висновку, що досліджуваний штам найбільш споріднений саме з представниками виду *L. gasseri*.

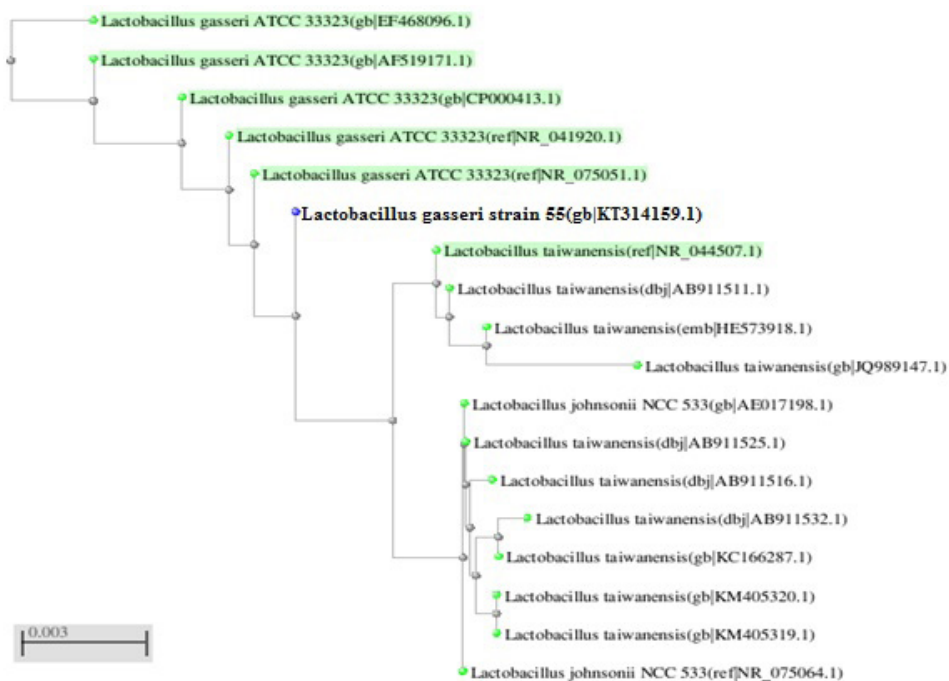


Рис. 4. Філогенетичне дерево, побудоване на основі аналізу фрагментів гена 16S рРНК штаму *Lactobacillus sp. 55* підгрупи В філогенетичної групи *Lactobacillus delbrueckii-acidophilus*

Е.С. Огирчук, Н.К. Коваленко

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного
НАН Украины, ул. Академика Заболотного, 154, 03143, Киев, Украина

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ НУКЛЕОТИДНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ГЕНА 16S рРНК ПРОБИОТИЧЕСКОГО ШТАММА *LACTOBACILLUS SP. 55*

Р е з ю м е

Проведена видова ідентифікація пробіотического штаму *Lactobacillus sp. 55* на основі аналізу нуклеотидних послідовностей гена 16S рРНК. Установлена належність досліджуваного штаму до виду *Lactobacillus gasseri*. Нуклеотидна послідовність фрагмента гена 16S рРНК штаму *Lactobacillus gasseri* 55 депонувана в міжнародній базі даних GenBank (NCBI) під номером KT 314159.

К л ю ч е в ы е с л о в а: сиквенирование гена 16S рРНК, группа *Lactobacillus delbrueckii-acidophilus*.

**PHYLOGENETIC ANALYSIS OF GENE 16S rRNA NUCLEOTIDE SEQUENCE
OF PROBIOTIC STRAIN *LACTOBACILLUS SP. 55***

S u m m a r y

The identification of probiotic strain *Lactobacillus sp. 55* at species level on the basis of analysis of the 16S rRNA gene nucleotide sequences has been done. It has been established that investigated strain belongs to the species *Lactobacillus gasseri*. The nucleotide sequence of strain *Lactobacillus gasseri 55* 16S rRNA gene's fragment has been deposited in international database GenBank (NCBI) under number 314 159 KT.

K e y w o r d s: 16S rRNA gene sequencing, *Lactobacillus delbrueckii-acidophilus* group.

1. Джобулаева А.К., Саданов А.К., Айткельдиева С.А., Байкара Б.Т., Джакибаева Г.Т., Кебекбаева К.М. Молекулярно-генетическая идентификация двух штаммов молочнокислых бактерий на основе анализа нуклеотидных последовательностей 16S rRNA гена // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2014. – № 8. – С. 63–67.
2. Огірчук К.С., Коваленко Н.К., Полтавська О.А. Ідентифікація та біологічні властивості молочнокислих бактерій, ізольованих від жінок старших вікових груп // Мікробіол. журн. – 2013. – Т. 75. – № 5. – С. 3–9.
3. Огірчук К.С., Полтавська О.А., Коваленко Н.К. Антагоністичні властивості молочнокислих бактерій, виділених від жінок практично здорових та хворих на остеопороз // Мікробіол. журн. – 2013. – Т. 75. – № 1. – С. 21–27.
4. Berger B., Pridmore R.D., Barretto C., Delmas-Julien F., Schreiber K., Arigoni F., Brussow H. Similarity and differences in the *Lactobacillus acidophilus* group identified by polyphasic analysis and comparative genomics // J. Bacteriol. – 2007. – V. 189. – P. 1311–1321.
5. Chandok H., Shah P., Akare U.R., Hindala M., Bhadoriya S.S., Ravi G.V., Sharma V., Bandaru S., Rathore P., Nayarisseri A. Screening, Isolation and Identification of Probiotic Producing *Lactobacillus Acidophilus* Strains EMBS081 & EMBS082 by 16S rRNA Gene Sequencing // Interdiscip. Sci. Comput. Life Sci. – 2014. – № 6. – P. 1–6.
6. Cousin S., Motreff L., Gulat-Okalla M-L., Gouyette C., Sproer C., Schumann P., Begaud E., Bouchier C., Clermont D., Bizet C. *Lactobacillus pasteurii sp. nov.* and *Lactobacillus hominis sp. nov.* // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2013. – V. 63. – P. 53–59.
7. Devereux R., Wilkinson S.S. Amplification of ribosomal RNA sequences // Molecular Microbial Ecology Manual, Second Edition. – 2004. – N 3.01. – P. 509–522.
8. Donelli G., Vuotto C., Mastromarino P. Phenotyping and genotyping are both essential to identify and classify a probiotic microorganism // Microbial Ecology in Health & Disease. – 2013. – 24: 20105 – <http://dx.doi.org/10.3402/mehd.v24i0.20105>.
9. Fujisawa T., Benno Y., Yaeshima T., Mitsuoka T. Taxonomic Study of the *Lactobacillus acidophilus* group, with recognition of *Lactobacillus gallinarum sp. nov.* and *Lactobacillus johnsonii sp. nov.* and synonymy of *Lactobacillus acidophilus* group A3 (Johnson et al. 1980) with the type strain of *Lactobacillus amylovorus* (Nakamura 1981) // International journal of systematic bacteriology. – 1992. – V. 42, N 3. – P. 487–491.

10. Huang C.-H., Chang M.-T., Huang M.-C., Wang L.-T., Huang L., Lee F.-L. Discrimination of the *Lactobacillus acidophilus* group using sequencing, species-specific PCR and SNaPshotmini-sequencing technology based on the recA gene // J. Sci. Food Agric. – 2012. – <http://www.wileyonlinelibrary.com/jsfa>
11. Johnson J.L., Phelps C.F., Cummins C.S., London J., Gasser F. Taxonomy of the *Lactobacillus acidophilus* group // Int. J. Syst. Bacteriol. – 1980. – V. 30. P. 53–68.
12. Kullen M.J., Sanozky-Dawes R.B., Crowell D.C., Klaenhammer T.R. Use of the DNA sequence of variable regions of the 16S rRNA gene for rapid and accurate identification of bacteria in the *Lactobacillus acidophilus* complex // Journal of Applied Microbiology. – 2000. – N 89. – P. 511–516.
13. Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy, First Edition. Edited by W.H. Holzapfel, B.J.B. Wood. – John Wiley & Sons, Ltd., 2014. – 606 p.
14. Pessione E. Interactive Probiotics. – CRC Press, 2014. – 274 p.
15. Sarmiento-Rubiano L.-A., Berger B., Moine D., Zúñiga M., Pérez-Martínez G., Yebra M.J. Characterization of a novel *Lactobacillus* species closely related to *Lactobacillus johnsonii* using a combination of molecular and comparative genomics methods // BMC Genomics. – 2010. 11:504. – <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/11/504>
16. Wang L.-T., Kuo H.-P., Wu Y.-C., Tai C.-J., Lee F.-L. *Lactobacillus taiwanensis* sp. nov., isolated from silage. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2009. V. 59. – P. 2064–2068.
17. Програма Multalin - <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>.
18. Програма Sequence Manipulation Suite - <http://www.bioinformatics.org/sms2/>.
19. Програма BLAST у базі даних GenBank - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.

Отримано 02.11.2015