

OSAMITEV IN OPIS VAMPNIH SPIROHET

Marija TRKOV^{a)+}, Tomaž ACCETTO^{b)} in Gorazd AVGUŠTIN^{c)}

^{a)} Univ. v Ljubljani, Biotehniška fak., Odd. za zootehniko, Groblje 3, SI-1230 Domžale, Slovenija, dr., mag.

^{b)} Isti naslov, asist.

^{c)} Isti naslov, izr.prof., dr., mag., e-pošta: gorazd.avgustin@bfro.uni-lj.si.

⁺ Sedaj Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano RS, Dunajska 56-58, SI-1000 Ljubljana, Slovenija.

Delo je prispelo 07. septembra 2000, sprejeto 16. oktobra 2000.

Received September 07, 2000, accepted October 16, 2000.

IZVLEČEK

Iz vzorca vampne vsebine smo osamili tri seve vampnih spirohet. Morfologijo osamljenih sevov smo opazovali s fazno kontrastno in epifluorescentno mikroskopijo ter jih opisali s hitrimi biokemijskimi preskusi (API 50CH) in molekulske biološkimi preiskavami. Rezultati preiskav so pokazali, da sta si seva SM1 in SM3 zelo podobna in značilno različna od seva SM2. Vsi osamljeni sevi so bili Gram negativni. Celice sevov SM1 in SM3 so bile manjše od celic seva SM2, pri sevih SM1 in SM3 je bila krajša tudi amplituda in valovna dolžina posameznega zavoja. Od 49 ogljikovih hidratov so vsi osamljeni sevi razkrajali sedem ogljikovih hidratov, sev SM2 pa je razkrajal še dodatnih 14. Primerjava literarnih podatkov razkroja ogljikovih hidratov tipskih sevov *T. bryantii* in *T. saccharophilum* je pokazala, da se seva spirohet SM1 in SM3 razlikujeta od opisanih vrst, sev SM2 pa je podoben tipskemu sevu *T. saccharophilum*. Veliko raznolikost med preiskovanimi sevi pa smo ugotovili s teoretično in eksperimentalno preiskavo RFLP, pri čemer smo gen za 16S rRNK sevov *T. bryantii*, *T. saccharophilum*, SM1, SM3 in SM2 razrezali z različnimi restrikcijskimi encimi.

Ključne besede: mikrobiologija / spirohete / osamitev / opis / vamp

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF RUMINAL SPIROCHETES

ABSTRACT

Three strains of rumen spirochetes have been isolated from the rumen fluid sample. Phase-contrast and epifluorescence microscopy have been used for morphological observation of isolated strains. For further characterisation rapid biochemical tests (API 50CH) and molecular biological analysis have been used. The morphological observations showed that two of the isolated strains SM1 and SM3 are similar and differ significantly from the strain SM2. All three isolated strains of rumen spirochetes are Gram-negative. The SM1 and SM3 cells were smaller than SM2 cells. Smaller were also the amplitude and the wavelength of coils of SM1 and SM3 cells. SM1 and SM3 strains utilised seven of 49 tested carbohydrates, whereas strain SM2 utilised additional 14 sugars. The literature data describing sugar fermentation in *T. bryantii* and *T. saccharophilum* showed significant differences between type strains *T. bryantii* and *T. saccharophilum* and strains SM1 and SM3. The strain SM2 seems to be similar to the type strain of *T. saccharophilum*. Large differences between analysed strains were found with theoretical and experimental RFLP analysis using different restriction enzymes of the 16S rRNA gene.

Key words: microbiology / spirochetes / isolation / characterization / rumen

UVOD

Že nekatere zgodnejše študije vampnega ekosistema so pokazale, da so v vampu prisotne tudi spirohete (Wojciechowicz in Ziolecki, 1979; Paster in Canale-Parola, 1982). Čeprav le-te ne razkrajajo celuloze, so jih pogosto opazili pri osamitvi celulolitičnih bakterij iz vampne vsebine (Stanton in Canale-Parola, 1980; Kudo in sod., 1987). Stanton in Canale-Parola (1979) sta ugotovila, da se njihovo število giblje med 1 in 6% glede na skupno število vampnih bakterij.

Med vampnimi spirohetami prevladuje rod *Treponema*. V literaturi sta opisani dve vrsti spirohet, ki so jih izolirali iz vampa. Razlikujeta se morfološko in fiziološko. Bakterije vrste *T. bryantii* so Gram-negativne, običajno dolge 3-8 μm , gibljive, z enim periplazemskim bičkom na vsakem koncu celice. Celice razgrajujejo pektin, celobiozo, saharozo, D-ksilozo, L-arabinozo, glukozo, galaktozo, manozo in laktozo. Za rast potrebujejo ogljikov dioksid, izobutirat, 2-metilbutirat in vitamine kompleksa B (Stanton in Canale-Parola, 1980). Celice vrste *T. saccharophylum* so široke do 0,7 μm in dolge 20 μm , običajno imajo 16 periplazemskih bičkov. Razkrajajo širok spekter substratov kot npr. pektin, poligalakturonsko kislino, topen škrob, dekstrin, saharozo, maltozo, celobiozo, D-glukuronsko kislino, D-glukozo, D-manozo, D-fruktozo, D-galaktozo in L-arabinozo. Glavni produkti razgradnje glukoze so format, acetat in etanol (Paster in Canale-Parola, 1985). Vrsti *T. bryantii* in *T. saccharophylum* pa verjetno nista edini vrsti spirohet v vampu, saj je že Ziolecki leta 1979 iz vampa krav, hranjenih s senom in močnimi krmili, osamil zelo velike spirohete, premera 0,7 μm in dolge 12 - 25 μm . V primerjavi z zgoraj opisanimi vrstama so razkrajale manjše število ogljikovih hidratov, in sicer pektin, L-arabinozo, inulin in saharozo. Stanton in Canale-Parola (1979) sta iz vampne vsebine osamila sedem različnih morfoloških skupin spirohet, ki so se med seboj razlikovale po velikosti, spiralni obliki in številu periplazemskih bičkov.

Vampne spirohete imajo za prežvekovalce verjetno dokaj pomembno vlogo, saj podobno kot mnoge druge vampne bakterije razkrajajo rastlinske polisaharide do prostih maščobnih kislin (Paster in Canale-Parola, 1982). Le-te prežvekovalci izkoristijo kot vir energije, gostujočim mikroorganizmom pa v zameno nudijo ugodno življenjsko okolje. V pričujoči študiji smo opisali postopek osamitve doslej še neopisanih predstavnikov spirohet iz vzorca vampne vsebine. Osamljene seve smo opazovali s fazno kontrastno in epifluorescentno mikroskopijo. Opisali smo jih na osnovi hitrih biokemijskih testov (API 50CH) in molekulske bioloških preiskav.

MATERIAL IN METODE

Osamitev bakterij

Spirohete smo osamili in gojili v anaerobni atmosferi po Bryantovi modifikaciji Hungatove tehnike za gojitev anaerobnih mikroorganizmov (Bryant, 1972).

Anaerobne spirohete smo izolirali iz vzorca vampne vsebine, ki smo ga odvzeli fistulirani kravi črno-bele frizijske pasme. Vzorec vampnega soka smo serijsko redčili s tekočim gojiščem M2 do redčitve 10^{-8} . Desetinko ml vsake redčitve smo nanegli direktno na trdno gojišče M2 ali pa na filter papir s premerom por 0,4 μm , ki je bil položen na gojišče. Po 24 urni inkubaciji pri 39° C smo opazovali rast zraslih bakterij. Spirohete niso tvorile tipičnih bakterijskih kolonij, temveč prozorne kolonije, ki so se značilno povečevale zaradi gibanja celic po trdnem gojišču. Iz roba takšnih kolonij smo s cepilno zanko prenesli čim manjši delež na sveže gojišče in ta postopek ponovili vsaj trikrat. Čistost kulture in morfološke značilnosti osamljenih spirohet smo preverjali z mikroskopskim opazovanjem po Gramu barvanih celic pri 1000-kratni povečavi in s fazno kontrastno mikroskopijo. Osamili smo tri seve in jih poimenovali SM1, SM2 in SM3.

Razkroj ogljikovih hidratov

Čiste kulture spirohet smo gojili preko noči v tekočem gojišču M2 pri 39° C. Za preiskave razkroja ogljikovih hidratov smo uporabili teste API 50CH (API System S.A., Lyon, France), kot je opisano že drugje (Avguštin in sod., 1997). Inokulirali smo jih v anaerobni komori v atmosferi CO₂ in H₂ po navodilih proizvajalca. Rezultate testov smo odčitavali po 6, 24, 48 in 72 urni inkubaciji v anaerobni komori pri 39° C.

Osamitev genomske DNK in pomnoževanje z verižno reakcijo s polimerazo (PCR)

Postopek osamitve genomske DNK sta opisala Tepšič in Avguštin (2000). Gen za 16S rRNK smo pomnoževali z univerzalnim začetnim oligonukleotidom fD1 (5'-agagtttgatcctggtcag-3') (Weisburg in sod., 1991) in začetnim oligonukleotidom 1392 (5'-acgggctgtgtrc-3', r=a/g) (Olsen in sod., 1986), ki priležeta na mesti 8-26 in 1392-1404 po štetju pri *E. coli*. Dvajset µl reakcijska mešanica je vsebovala 1 x pufer PCR, 2 mmol l⁻¹ MgCl₂, 0,06 mmol l⁻¹ vsakega nukleotida dATP, dTTP, dGTP, dCTP (Gibco BRL), 6 pmol posameznega začetnega oligonukleotida, 0,9 U polimeraze DNK (Gibco BRL) in približno 100 ng tarčne DNK. Pomnoževanje v verižni reakciji s polimerazo je potekalo po naslednji shemi: pet minutni začetni denaturaciji DNK pri 94° C je sledilo 30 ciklov (pet minutna denaturacija pri 94° C, 30 sekundno prileganje začetni oligonukleotidov pri 58° C, 30 sekundno podaljševanje pri 72° C) in pet minutno zaključno podaljševanje pri 72° C. Vsa pomnoževanja z verižno reakcijo s polimerazo (PCR) smo izvedli na cikličnem termostatu "Gene Amp PCR System 2400" (Perkin-Elmer).

Preiskava RFLP (restriction fragment length polymorphism)

Pomnožke PCR gena za 16S RNK smo očistili z reagenti za čiščenje pomnožkov PCR (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen). Nato smo pomnožke razrezali z naslednjimi restrikcijskimi encimi: *TaqI* (Boehringer Mannheim), *DdeI* (Boehringer Mannheim), *HhaI* (Gibco BRL) in *Sau3AI* (Boehringer Mannheim), vedno po navodilih proizvajalcev. Velikost nastalih fragmentov smo ocenili s primerjavo z velikostnim standardom DNK (50 bp ladder, Boehringer Mannheim). Pomnožke PCR in restrikcijske fragmente smo pregledovali v 1-2% TBE agaroznih gelih (agaroz SeaKem LE, TBE: pufer Tris-borat EDTA) pri 6 V/cm.

Hibridizacija *in situ*

Čiste kulture spirohet smo gojili v tekočem gojišču M2 pri 39° C do pozne eksponencialne faze rasti. Postopek fiksiranja celic, hibridizacije *in situ*, epifluorescentne mikroskopije in mikrofotografije sta podrobno opisala Tepšič in Avguštin (1997). Za hibridizacijo *in situ* smo uporabili široko specifični sonde EUB338 in fD1 (Weisburg in sod., 1991). Obe sondi sta bili na koncu 5' označeni s fluorescentnim barvilom TRITC (tetrametilrodamin izotiocianat) (MWG Biotech, Ebersberg, Nemčija). Fiksirane celice smo hibridizirali 16 ur pri 46° C.

Obdelava rezultatov

Razkroj ogljikovih hidratov

Rezultate razkroja ogljikovih hidratov izoliranih sevov spirohet smo odčitali iz testov API 50 CH. Za primerjavo smo uporabili tudi literaturne podatke razkroja ogljikovih hidratov tipskih sevov *Prevotella bryantii* B₁₄, *P. brevis* GA33, *P. albensis* M384 in *P. ruminicola* 23 (Avguštin in sod., 1997) ter *Bifidobacterium adolescentis* 20083, *B. cuniculi* 20435, *B. animalis* 20104 in *B. indicum* 20214 (Fanedl in Avguštin, 1997). Podatke smo vnesli v matriko v obliki n x t, kjer je

n število sevov, t pa število lastnosti, t.j. število testiranih ogljikovih hidratov. Če je preiskovan sev razkrojil ogljikov hidrat, smo v matriko vnesli 1, če pa ne, smo vnesli 0.

Preiskave RFLP

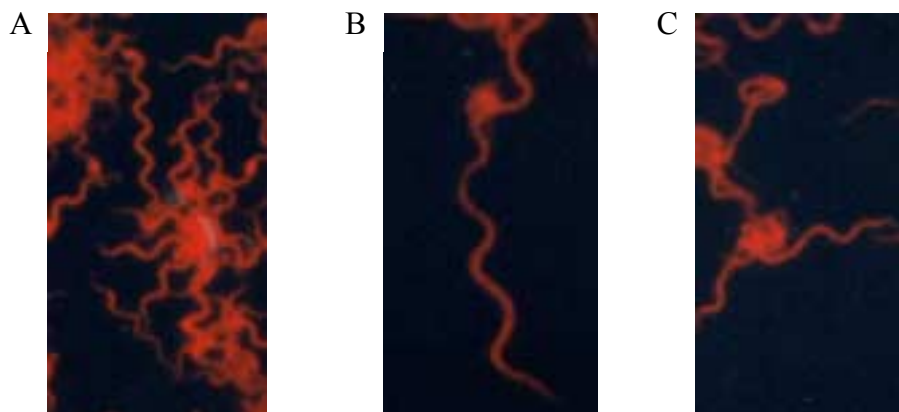
Poleg eksperimentalnih podatkov smo uporabili tudi podatke, dobljene s teoretičnim encimskim razrezom sekvenc gena za 16S rRNK sevov *T. saccharophilum* (accession no. M71238) in *T. bryantii* (accession no. M57737). Omenjeni sekvenci smo poiskali z iskalnikom Entrez Browser (<http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/>) v banki nukleinskih in beljakovinskih sekvenc GenBank. Obdelali smo ju z restrikcijskimi encimi *TaqI*, *DdeI*, *HhaI* in *Sau3AI* iz baze REBASE in programom Web Cutter. To je eden od programov, dostopnih na spletni strani BCM Search Launcherja (<http://gc.bcm.tmc.edu:8088/search-launcher.html>). Podatke o številu in velikosti fragmentov po encimskem razrezu gena za 16S rRNK z različnimi restrikcijskimi encimi smo odčitali iz slik gelov za vsak osamljen sev spirohet posebej. Skupaj s teoretičnimi podatki smo jih vnesli v matriko v obliki $n \times t$, kjer je n število sevov, t pa število lastnosti, t.j. število fragmentov po razrezu. Prisotnost fragmenta določene velikosti smo označili z 1, če pa ga ni bilo, smo v matriko vnesli 0.

Podatke, vnešene v matriko, smo obdelali s programom NTSYS-pc (Rohlf, 1993) in izračunali Jaccardov koeficient podobnosti (Bridge, 1993). Izračunane koeficiente podobnosti smo uporabili v metodi neponderirane aritmetične sredine UPGMA za nadaljnje izračune. Na njihovi osnovi smo narisali fenogram.

REZULTATI IN RAZPRAVA

Staton in Canale-Parola (1979) sta s štetjem spirohet pod svetlobnim mikroskopom ugotovila, da je v ml vampnega soka od 0,4 do $2,0 \times 10^8$ teh bakterij. Vendar pa je njihovo število lahko zelo različno, saj je odvisno tako od časa odvzema vzorca kot tudi prehrane živali (Paster in Canale-Parola, 1979). Vzorce vampnega soka smo odvezemali kravi črno-bele frizijske pasme po jutranjem hranjenju. Nato smo jih serijsko redčili do redčitve 10^{-8} , nanesli na trdno gojišče M2 in inkubirali pri 39°C , ki je najugodnejša temperatura za rast vampnih spirohet (Paster in Canale-Parola, 1985). Paster in Canale-Parola (1982) sta ugotovila, da je morfologija kolonij odvisna od sestave gojišča. Na trdnem gojišču M2 so spirohete tvorile značilne prozorne kolonije, ki so se povečevale zaradi gibanja celic po gojišču. Rast takšnih kolonij smo opazili na ploščah, cepljenih z desetinko ml 10^{-5} redčenega vampnega soka in na ploščah s filter papirjem, na katerega smo nanesli nerazredčen vampni sok. Spirohete so prešle skozi pore filter papirja. Celice z roba značilnih kolonij smo s cepilno zanko prenašali na sveže gojišče vsakih 24 ur. Pri osamitvi smo dodajali tudi antibiotik rifampin (Paster in Canale-Parola; 1985), vendar smo ugotovili, da so poleg spirohet na omenjeni antibiotik odporne tudi nekatere druge vampne bakterije. Osamili smo tri seve spirohet in jih poimenovali SM1, SM2 in SM3. Celice, barvane po Gramu, smo opazovali s fazno kontrastno mikroskopijo, po hibridizaciji *in situ* pa tudi z epifluorescentno mikroskopijo (slika 1).

Obe uporabljeni sondi EUB338 in fD1 sta prepoznali osamljene seve. Vsi sevi so bili Gram negativni. Ugotovili smo, da sta si seva SM1 in SM3 morfološko zelo podobna. Celice sevov SM1 in SM3 so manjše od celic seva SM2. Posamezni zavoji so pri sevih SM1 in SM3 bolj pravilni (regularni) kot pri sevu SM2, amplituda in valovna dolžina zavojev pa sta pri sevih SM1 in SM3 krajši kot pri sevu SM2. Puščica na sliki prikazuje poseben način zvijanja celic spirohet, kakršnega je opazil tudi Zirolecki (1979) pri kulturah vampnih spirohet, inkubiranih nad 36 ur.



Slika 1. Epifluorescentna mikrofotografija sevov SM1 (A) in SM2 (B, C) po hibridizaciji *in situ* z oligonukleotidno sondo EUB338, označeno s TRITC (1000 kratna povečava mikroskopa).

Figure 1. Epifluorescent microphotography of the strains SM1 (A) and SM2 (B, C) following *in situ* hybridization with the EUB338 oligonucleotide probe labelled with TRITC (1000 times magnification).

Preiskali smo tudi razkroj ogljikovih hidratov z osamljenimi sevi spirohet. Uporabili smo teste API 50 CH. Ugotovili smo, da sta seva SM1 in SM3 testirane ogljikove hidrate razkrajala povsem enako, zato smo prikazali rezultate le za sev SM1 (preglednica 1).

V preglednici 1 so prikazani rezultati razkroja tistih ogljikovih hidratov, ki sta jih seva SM1 in SM2 razkrajala različno in literaturni podatki za tipska seva *T. bryantii* (Stanton in Canale-Parola, 1980) in *T. saccharophilum* (Paster in Canale-Parola, 1985). Sev SM2 je od 49 ogljikovih hidratov razkrajal 14 takšnih, ki jih sev SM1 ni. Oba seva sta prav tako kot že opisana tipska seva *T. bryantii* in *T. saccharophilum* razkrajala L-arabinozo, galaktozo, D-glukozo, celobiozo in saharozo, noben sev pa ni razkrajal glicerola, riboze, L-sorboze, ramnoze, manitola, sorbitola, in ksilitola.

Da bi imeli predstavo o stopnji različnosti oz. podobnosti preiskovanih sevov spirohet, smo v analizo vključili tudi rezultate razkroja sladkorjev nekaterih drugih mikroorganizmov, ki naseljujejo prebavila živali. Uporabili smo rezultate preiskav tipskih sevov *Prevotella bryantii* B₁₄, *P. brevis* GA33, *P. albensis* M384 in *P. ruminicola* 23 (Avguštin in sod., 1997) ter *Bifidobacterium adolescentis* 20083, *B. cuniculi* 20435, *B. animalis* 20104 in *B. indicum* 20214 (Fanedl in Avguštin, 1997). Vse podatke smo vnesli v matriko in podatke obdelali s programom NTSYS-pc. Izračunali smo Jaccardov koeficient podobnosti in po metodi UPGMA narisali drevo, ki prikazuje podobnost preiskovanih sevov glede na njihov razkroj ogljikovih hidratov (slika 2).

Primerjava je pokazala, da se sev SM1 razlikuje od obeh doslej opisanih vrst vampnih spirohet, *T. bryantii* in *T. saccharophilum*, sev SM2 pa je podoben vrsti *T. saccharophilum*. Iz analize razkroja ogljikovih hidratov pa seveda še ne moremo taksonomsko opredeljevati bakterijskih vrst, še posebno ne v primeru, ko primerjamo rezultate, pridobljene z različnimi metodami. Tako je npr. tipski sev *T. saccharophilum* po razkroju ogljikovih hidratov enak tipskemu sevu *P. brevis* GA33, kar pa ju seveda še ne uvršča v isto taksonomsko enoto. Zato smo uporabili še molekularni pristop. Izolirali smo DNK osamljenih sevov spirohet in v verižni reakciji s polimerazo pomnožili približno 1400 bp dolgo regijo gena za 16S rRNK. Osamljene in očiščene pomnožke PCR smo razrezali z restrikcijskimi encimi *TaqI*, *DdeI*, *HhaI* in *Sau3AI* po navodilih proizvajalcev (slika 3). Restrikcijski encimi *TaqI*, *HhaI* in *Sau3AI* imajo v svoji prepoznavni sekvenci štiri nukleotide, *DdeI* pa pet. Za omenjene encime smo se odločili po

računalniški obdelavi genov za 16S rRNK sevov *T. bryantii* (M57737) in *T. saccharophilum* (M71238), in sicer glede na število in velikost fragmentov po teoretičnem razrezu. Sekvenco gena seva *T. bryantii* je restrikcijski encim *TaqI* rezal 3-krat, *DdeI* 10-krat, *HhaI* 5-krat in *Sau3A* 4-krat. Sekvenco seva *T. saccharophilum* pa je *TaqI* rezal 3-krat, *DdeI* 6-krat, *HhaI* 4-krat, *Sau3A* pa 2-krat. Dolžine nastalih kosov DNK so se pri obeh sevih precej razlikovale (pregl. 2).

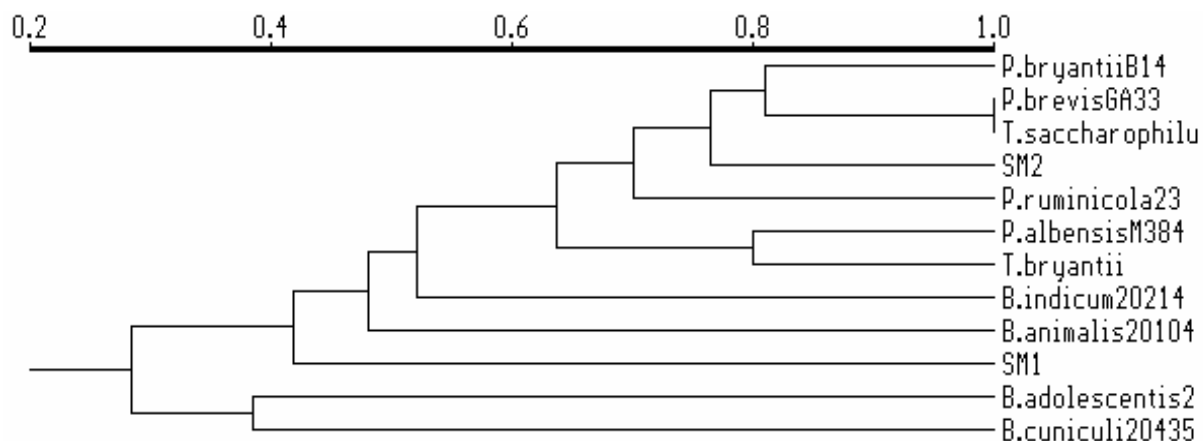
Preglednica 1. Rezultati razkroja ogljikovih hidratov (API 50 CH). Testi so bili odčitani po 48 urni inkubaciji v anaerobni komori pri 39° C

Table 1. The results of carbohydrate utilisation (API 50 CH). Tests were obtained after 48 hours incubation at 39° C in an anaerobic chamber

Ogljikov hidrat Carbohydrate	Sev SM1 Strain SM1	Sev SM2 Strain SM2	<i>T. bryantii</i> ‡	<i>T. saccharophilum</i> ‡
Eritriol / Erythriol	-	-	np	np
L-ksiloza / L-xylose	-	-	np	np
Adonitol / Adonitol	-	-	np	np
β metil-ksilozid / β Methyl-xyloside	-	+	np	np
Dulcitol	-	-	np	-
Inozitol / Inositol	-	-	np	np
Trehaloza / Trehalose	-	+	np	np
D-liksoza / D-lyxose	-	-	np	np
D-fukoza / D-fucose	-	-	np	np
L-fukoza / L-fucose	-	-	np	np
D-arabitol / D-arabitol	-	-	np	-
L-arabitol / L-arabitol	-	-	-	np
2-keto-glukonat / 2-ceto-gluconate	-	-	np	np
5-keto-glukonat / 5-ceto-gluconate	-	-	np	np
D-fruktoza / D-fructose	+	+	-	+
Eskulin / Esculine	-	-	np	np
Laktoza / Lactose	-	+	+	+
D-arabinoza / D-arabinose	-	-	np	np
D-ksiloza / D-xylose	-	+	+	-
D-manoza / D-mannose	-	+	+	+
α-metil-D-glukozid / α-methyl-D-glucoside	-	-	np	np
N-acetil-glukozamin / N-acetyl-glucosamine	-	-	np	np
Amigdalín / Amygdaline	-	+	np	np
Arbutin / Arbutine	-	+	np	np
Salicin / Salicine	-	+	np	np
Maltoza / Maltose	+	+	-	+
Melibioza / Melibiose	-	+	np	np
Inulin / Inuline	-	+	-	+
Melezitoza / Melezitose	-	-	np	np
D-rafinoza / D-raffinose	-	+	-	+
Škrob / Amidon	-	+	np	np
Glikogen / Glycogene	-	-	np	np
β gentobioza / β gentobiose	-	+	np	np
D-turanoza / D-turanose	-	+	np	np
D-tahatoza / D-tagatose	-	-	np	np
Glukonat / Gluconate	-	-	np	np
α-metil-D-manozid / α-metil-D-mannoside	-	-	np	np

Legenda: + : pozitivna reakcija, - : negativna reakcija, np : ni podatka. ‡ : podatki iz literature. Vsi sevi razkrajajo L-arabinozo, galaktozo, D-glukozo, celobiozo in saharozo. Noben sev ne razkrajaja glicerola, riboze, L-sorboze, ramnoze, manitola, sorbitola in ksilitola.

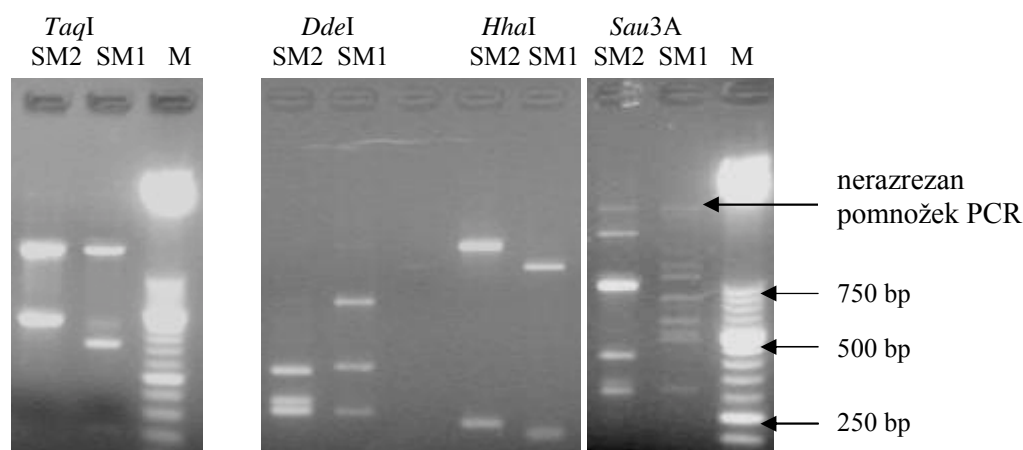
Legend: + : positive reaction, - : negative reaction, np : no data. ‡ : literature data. All strains fermented L-arabinose, galactose, D-glucose, cellobiose and saccharose. None of the strains fermented glycerol, ribose, L-sorbose, rhamnose, mannitol, sorbitol or xylitol.



Slika 2. Dendrogram podobnosti osamljenih sevov spirohet, tipskih sevov *T. bryantii*, *T. saccharophilum* in izbranih tipskih sevov rodov *Prevotella* in *Bifidobacterium*.

Figure 2. Similarity dendrograme of isolated spirochetes strains, type strains *T. bryantii*, *T. saccharophilum* and selected type strains of the genera *Prevotella* and *Bifidobacterium*.

Po encimskem razrezu pomnoženega dela gena za 16S rRNK sevov SM1, SM2 in SM3 smo ugotovili, da imata seva SM1 in SM3 povsem enake profile RFLP, zato smo prikazali rezultate le za en sev. Pri sevu SM1 smo ugotovili tri jasno vidne fragmente s *TaqI*, tri z *DdeI*, dva s *HhaI* in sedem s *Sau3A*. Pri sevu SM2 pa dva s *TaqI*, tri z *DdeI*, dva s *HhaI* in pet s *Sau3A*. Profila RFLP se za oba seva precej razlikujeta.



Slika 3. Encimski razrez pomnožkov PCR genov za 16S rRNK sevov SM1 in SM2 z restrikcijskimi encimi *TaqI*, *DdeI*, *HhaI* in *Sau3A*. Proge; M: velikostni standard DNK (50 bp ladder, Boheringer Mannheim).

Figure 3. Restriction of PCR products 16S rRNA genes of SM1 and SM2 strains with restriction enzymes *TaqI*, *DdeI*, *HhaI* and *Sau3A*. Lanes; M: DNA size marker (50 bp ladder, Boheringer Mannheim).

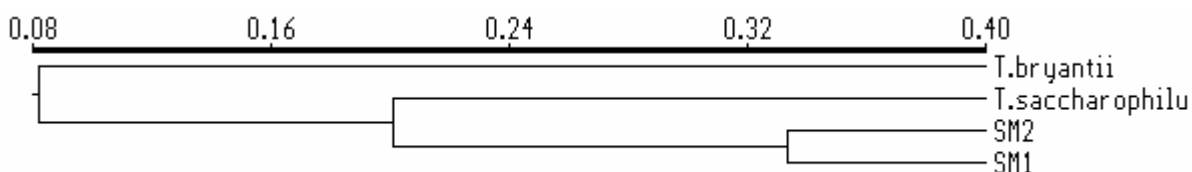
Teoretično in eksperimentalno dobljene podatke o številu in velikosti fragmentov po encimskem razrezu smo vnesli v matriko (preglednica 2).

Preglednica 2. Matrika restrikcijskih profilov sevov *T. bryantii* in *T. saccharophilum*, SM1 in SM2Table 2. Restriction profiles of *T. bryantii*, *T. saccharophilum*, SM1 and SM2 strains.

	<i>T. bryantii</i>	<i>T. sacch</i>	SM2	SM1		<i>T. bryantii</i>	<i>T. sacch</i>	SM2	SM1
TaqI125	0	1	0	0	HhaI215	0	1	0	1
TaqI225	0	1	0	0	HhaI250	0	1	1	0
TaqI375	0	0	0	1	HhaI300	1	0	0	0
TaqI450	1	0	0	0	Sau200	1	0	0	0
TaqI550	0	0	1	1	Sau225	0	0	1	0
DdeI200	1	0	0	0	Sau325	0	0	1	1
DdeI225	1	0	0	0	Sau350	0	1	0	0
DdeI250	0	1	0	0	Sau425	0	0	1	0
DdeI275	1	1	1	1	Sau475	1	0	0	0
DdeI300	0	0	1	0	Sau500	0	0	0	1
DdeI400	0	1	1	1	Sau575	0	0	0	1
DdeI700	0	0	0	1	Sau650	1	0	0	1
					Sau800	0	0	1	1

Za seva SM1 in SM2 smo upoštevali le tiste fragmente, pri katerih smo lahko dokaj natančno ocenili njihovo velikost, za seva *T. bryantii* in *T. saccharophilum* pa fragmente velikosti od 100 do 800 bp. Ker se s horizontalno agarozno gelsko elektroforezo fragmenti, pri katerih je razlika v velikosti manjša kot 30 bp, težko ločijo, smo pripravili prirejeno matriko, v kateri smo velikosti fragmentov zaokrožili na 25 bp (preglednica 2).

Iz podatkov, urejenih v matriko, smo s programom NTSYS-pc izračunali Jaccardov koeficient podobnosti. Po metodi UPGMA smo narisali dendrogram, ki prikazuje podobnost preiskovanih sevov spirohet glede na število in velikost fragmentov po razrezu z različnimi restrikcijskimi encimi (slika 4).



Slika 4. Dendrogram preiskovanih sevov spirohet po analizi sekvence gena za 16S rRNK.

Figure 4. Dendrogram of tested spirochetes strains based on the sequence analysis of 16S rRNA genes.

Rezultati molekulske preiskave kažejo veliko raznolikost med preiskovanimi sevi, saj je stopnja največje podobnosti le približno 0,333 Jaccardovega koeficienta. Vzrok za tako nizko stopnjo podobnosti je deloma lahko tudi primerjava podatkov, pridobljenih s teoretično obdelavo sekvenc, s podatki dejanskega encimskega razreza namnoženih genov. Pri ocenjevanju poskusnih podatkov smo dolžine fragmentov lahko le približno ocenili. Zato nameravamo v nadaljevanju dela sekvencirati gen za 16S rRNK sevov SM1 in SM2, sekvenci računalniško obdelati in rezultate primerjati z rezultati objavljenih sekvenc spirohet. Vsekakor pa rezultati analize RFLP ne podpirajo ugotovitev o podobnosti med sevom SM2 in tipskim sevom *T. saccharophilum*.

Podobno kot morfološke preiskave in rezultati razkroja ogljikovih hidratov, tudi preiskave RFLP kažejo, da smo iz vampnega soka osamili vsaj eno, morda pa dve do sedaj še neopisani vrsti vampnih spirohet. Za potrditev naših domnev in dokončno identifikacijo pa nameravamo izvesti še nadaljnje morfološke, fiziološke in molekulske preiskave osamljenih sevov.

SUMMARY

The spirochetes belong to the least known ruminal bacteria. All of the ruminal spirochetes isolated from rumen to date were identified as the members of the two described species from the genus *Treponema*, i.e. *T. bryantii* and *T. saccharophilum*. In this study we described isolation of three spirochetes strains from cow rumen which could be split into two groups on the basis of morphological, physiological and molecular biological characteristics. The cells of strains SM1 and SM3 were shorter than the SM2 cells, with shorter wavelength and amplitude of single coil too. The SM2 strain utilised 21, whereas SM1 and SM3 strains utilised only seven of the 49 carbohydrates included in API 50CH tests. The comparison of available literature data of physiological activities of *T. bryantii* and *T. saccharophilum* species with the experimental data obtained by testing SM1, SM2 and SM3 strains, made possible the conclusion that isolated strains SM1 and SM3 differ substantially from the described species, whereas the SM2 strain was partially similar to the type strain of *T. saccharophilum*. The RFLP analysis of the amplified 16S rRNA genes cut with restriction enzymes *TaqI*, *HhaI*, *DdeI* and *Sau3A* showed, however, that the SM2 strain was quite different from *T. saccharophilum* too. We need to mention, however, that the fragments lengths following the restriction were compared to the computer simulated restriction analysis of the 16S rRNA genes from *T. bryantii* and *T. saccharophilum* strains which could introduce a certain degree of unreliability to these analysis.

VIRI

- Avguštin, G./ Wallace, R.J./ Flint, H.J. Phenotypic diversity among ruminal isolates of *Prevotella ruminicola*: proposal of *Prevotella brevis* sp. nov., *Prevotella bryantii* sp. nov., and *Prevotella albensis* sp. nov. and redefinition of *Prevotella ruminicola*. International journal of systematic bacteriology, 47(1997)2, 284-288.
- Bridge, P.D. Classification. V: Biological data analysis, A practical approach (Ed.: Fry, J.C.). London, Oxford University Press, 1993, 219-242.
- Bryant, M.P. Commentary on the Hungate technique for culture of anaerobic bacteria. Am. J. Clin. Nutr., 25(1972), 1324-1328.
- Fanedl, L./ Avguštin G. Sugar fermentation profiles of *Bifidobacteria* from rat gut. Zb. Biotehniške fak. Univ. v Ljubljani. Kmetijstvo. Zootehnika, 70(1997), 55-61.
- Kudo, H/ Cheng, K.J./ Costerton, J.W. Interactions between *Treponema bryantii* and cellulolytic bacteria in the *in vitro* degradation of straw cellulose. Canadian journal of microbiology, 33(1987)3, 244-248.
- Olsen, G.J./ Lane, D.J./ Giovannoni, S.J./ Pace, N.R./ Stahl, D.A. Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. Annual review of microbiology, 40(1986), 337-365.
- Paster, B.J./ Canale-Parola, E. Physiological diversity of rumen spirochetes. Applied and environmental microbiology, 43(1982)3, 686-693.
- Paster, B.J./ Canale-Parola, E. *Treponema saccharophilum* sp. nov., a large pectinolytic spirochete from the bovine rumen. Applied and environmental microbiology, 50(1985)2, 212-219.
- Paster, B.J./ Dewhirst, F.E./ Weisburg, W.G./ Tordoff, L.A./ Fraser, G.J./ Hespell, R.B./ Stanton, T.B./ Zablen, L./ Mandelco, L./ Woese, C.R. Phylogenetic analysis of the spirochetes. Journal of bacteriology, 173(1991)19, 6101-6109.
- Rohlf, F.J. Numerical taxonomy and multivariate analysis system. New York, Applied Biostatistic Inc., 1993, 168 s.
- Stanton, T.B./ Canale-Parola, E. Enumeration and selective isolation of rumen spirochetes. Applied and environmental microbiology, 38(1979)5, 965-973.
- Stanton, T.B./ Canale-Parola, E. *Treponema bryantii* sp. nov., a rumen spirochete that interacts with cellulolytic bacteria. Archives of microbiology, 127(1980)2, 145-156.

- Tepšič, K./ Avguštin, G. Competitive PCR and detection and quantification of ruminal prevotellas. V: 2nd joint INRA-RRI Gastrointestinal tract Mycrobiology Symposium. Clemont-Ferrand, France. *Reproduction Nutrition Development*, 40(2000), 183.
- Tepšič, K./ Avguštin, G. Specific detection bacterial species in the gut of domestic animals with in situ hybridization and epifluorescent microscopy. *Zb. Biotehniške fak. Univ. v Ljubljani. Kmetijstvo. Zootehnika*, 70(1997), 47-53.
- Weisburg, W.G./ Barns, S.M./ Pelletier, D.A./ Lane, D.J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of bacteriology*, 173(1991), 697-703.
- Wojciechowicz, M./ Ziolecki, A. Pectinolytic enzymes of large rumen treponemes. *Applied and environmental microbiology*, 37(1997)1, 136-142.
- Ziolecki, A. Isolation and characterization of large treponemes from the bovine rumen. *Applied and environmental microbiology*, 37(1979)1, 131-135.