

ANALIZA SEKVENC GENOV ZA 16S rRNA IZOLATOV BIFIDOBAKTERIJ IZ TANKEGA ČREVEESA PODGAN *

Lijana FANEDL ^{a)}, Franc Viktor NEKREP ^{b)} in Gorazd AVGUŠTIN ^{c)}

^{a)} Univ. v Ljubljani, Biotehniška fak., Odd. za zootehniko, Groblje 3, SI-1230 Domžale, Slovenija, dr., mag.,
e-pošta: lijana.fanedl@bfro.uni-lj.si.

^{b)} Isti naslov kot ^{a)}, prof., dr., mag.

^{c)} Isti naslov kot ^{a)}, izr. prof., dr., mag.

Delo je prispelo 10. oktobra 2002, sprejeto 15. novembra 2002.

Received October 10, 2002, accepted November 15, 2002.

IZVLEČEK

Pri šestih izbranih izolatih bifidobakterij iz tankega črevesa podgan smo sekvencirali prvi del gena za manjšo ribosomsko podenoto (16S rRNA) in sekvence primerjali z že znanimi sekvencami drugih bifidobakterij in bakterij sorodnih rodov. S filogenetsko analizo smo ugotovili, da izolati tvorijo svojo skupino z dvema podskupinama in da so najbolj sorodni vrsti *B. pseudolongum*. Skupaj z njo in še nekaterimi drugimi bifidobakterijami se uvrščajo v širšo skupino *B. lactis*. Stopnja podobnosti med sekvencami 16S rRNA izolatov se giblje med 91,4–95,8 odstotki, kar kaže na precejšnjo genetsko raznolikost znotraj skupine. Stopnja podobnosti do najbližje opisane vrste *B. pseudolongum* pa je med 94 in 97 odstotki. Rezultati predhodnih fenotipskih in genotipskih študij ter filogenetske ugotovitve na osnovi analiz sekvenc 16S rRNA predstavljajo osnovo za nadaljne raziskave, ki bi lahko potrdile, da opisani izolati predstavljajo eno ali več novih bifidobakterijskih vrst.

Ključne besede: mikrobiologija / bakterije / *Bifidobacterium* / molekularna genetika / 16S rDNK / sekvence / filogenija / taksonomija / podgane / tanko črevo

16S rRNA ANALYSIS OF BIFIDOBACTERIAL ISOLATES FROM RAT SMALL INTESTINE †

ABSTRACT

The amplified 16S rRNA genes from 6 isolates of bifidobacteria from rat small intestine and two isolates of lactobacilli were directly sequenced. A phylogenetic tree was constructed using the determined sequences and sequences of related genera from DNA databases. All bifidobacterial isolates belonged to the *B. lactis* group and formed two subgroups. The similarity levels between 16S rRNA sequences of isolates ranged from 91.4 to 95.8 %, showing great genetic variability among isolates. With similarity levels from 95 to 97 %, the phylogenetic analysis also showed that sequences of our isolates were closely related to *B. pseudolongum*. The results of previous phenotypic and genotypic studies and results obtained from the phylogenetic analysis of 16S rRNA sequences form the foundation for further analysis to confirm that our isolates represent one or more new bifidobacterial species.

Key words: microbiology / bacteria / *Bifidobacterium* / molecular genetics / 16S rDNA / sequences / phylogeny / taxonomy / rats / small intestine

* Prispevek je del doktorske disertacije Lijane Fanedl 'Osamitev in molekularna identifikacija bifidobakterij iz tankega črevesa podgan, krmljenih s surovim fižolom (*Phaseolus vulgaris* L.)', mentor prof. dr. Franc V. Nekrep, somentor izr. prof., dr. Gorazd Avguštin.

† The article is a part of doctoral thesis 'Isolation and molecular identification of bifidobacteria from small intestine of rats fed with raw kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.)', issued by Lijana Fanedl, supervisor prof. Franc V. Nekrep, Ph.D., co-advisor assoc. prof. Gorazd Avguštin, Ph.D.

UVOD

Bifidobakterije so sestavni del avtohtone mikrobne populacije humanega in živalskega dihalnega, prebavnega in genitalnega trakta, v naravi pa jih zasledimo tam, kjer je omogočena fermentacija ogljikovih hidratov. Zaradi svojega pozitivnega delovanja opravljajo v prebavnem sistemu preventivno in terapevtsko funkcijo (Mitsuoka, 1990). Metabolna produkta, očetna in mlečna kislina ter specifični protimikrobni produkti so pomembni regulatorji intestinalne evbioze. V zadnjem času raziskujejo posredno in neposredno protitumorsko delovanje bifidobakterij (Hosono in sod., 1990; Fujimori in sod., 2002). Ker so bifidobakterije sposobne vplivati na ravnovesje mikroflore in s tem posredno na zdravstveno stanje gostiteljskega organizma, je zanje veliko zanimanje v humani medicini, pri tehnologiji priprave živalske krme in v živilski industriji. V komercialne namene jih v mlekarški industriji uporabljajo kot probiotične bakterije (Fuller, 1992).

Bakterije iz rodu *Bifidobacterium* so po Gramu pozitivne, negibljive, največkrat podobne ukrivljenim palčkam ali so amforastih oblik. So pleomorfne, pogosto imajo razcepljene konce, ki jim dajejo specifično obliko črke V, X ali Y. Značilen pleomorfizem ni odvisen le od vrste bifidobakterij, temveč tudi od sestave gojišča, v katerem jih gojimo. Ne tvorijo spor. Večina bifidobakterij je striktno anaerobnih in le nekatere vrste so deloma tolerantne za kisik (Bezkorovainy in Miller-Catchpole, 1989). Fermentacija heksoz poteka pri bifidobakterijah po edinstveni poti fruktoze-6-fosfata, ki sta jo opisala Scardovi in Trovatelli (1965). Teoretično nastaneta po fermentaciji dveh molov glukoze kot primarna metabolna produkta očetna in mlečna kislina (le izomer L+) v razmerju 3:2, vendar tega komaj kdaj doseže kakšna kultura bifidobakterij. Nekateri sevi proizvajajo majhne količine jantarne kisline. Maslene in propionske kisline ne proizvajajo, tudi ogljikov dioksid ne nastaja, razen v primeru, kadar fermentirajo glukonsko kislino (Scardovi, 1986).

Tipska vrsta rodu *Bifidobacterium* (Scardovi, 1986) je *Bifidobacterium bifidum* (Tissier 1900). Na seznam odobrenih bakterijskih vrst in njihovih imen je trenutno uvrščenih 34 vrst bifidobakterij, ki so jih osamili iz različnih ekoloških niš: iz prebavil, ustne votline in urogenitalnega trakta človeka, iz prebavil živali in čebel, prav tako pa so jih zasledili še v odpadnih vodah ter kliničnih vzorcih (Euzéby, 2002). Na podlagi primerjave sekvenc genov za 16S rRNA (van Esbroeck in sod., 1996; Stackebrandt in sod., 1997) in biokemičnih značilnosti (Piot in sod., 1980) so v družino *Bifidobacteriaceae* uvrstili še rod *Gardnerella* s tipsko vrsto *Gardnerella vaginalis* (Gardner in Dukes 1955).

V filogenetskem smislu je rod dokaj enoten. V primerjalnih analizah sekvenc genov za 16S rRNA se rod *Bifidobacterium* jasno loči od ostalih rodov. Na filogenetskih drevesih, ki prikazujejo filogenetska razmerja med grampozitivnimi bakterijami, zavzema eno prvih ločenih vej (Schleifer in Ludwig, 1995; Holzappel in sod., 2001). Znotraj skupine bifidobakterij kažejo sekvence genov za 16S rRNA več kot 90 odstotno podobnost in manj kot 87 odstotno podobnost z ostalimi primerjanimi sekvencami. Filogenetsko skupino bifidobakterij delimo v dve skupini. V prvo, večjo skupino se uvršča večina bifidobakterijskih vrst in *Gardnerella vaginalis*. Drugi skupini pripadata le dve vrsti, *B. denticolens* in *B. inopinatum*, izolirani iz ustne votline človeka, ki so ju pred nedavnim premestili v nova rodova, t.j. *Parascardovia denticolens* gen. nov., comb. nov. in *Scardovia inopinata* gen. nov., comb. nov. (Jian in Dong, 2002).

Taksonomski položaj vrst znotraj rodu *Bifidobacterium* je še vedno neuskkljen, zlasti zaradi različnih ugotovitev po primerjavi rezultatov hibridizacij DNA-DNA s fenotipskimi značilnostmi posameznih vrst. Poleg tega se v zadnjem času že pojavljajo predlogi za združevanje nekaterih zelo sorodnih bifidobakterijskih vrst in/ali premestitev nekaterih vrst v nove rodove (Jian in Dong, 2002; Sakata in sod., 2002).

V predstavljenem delu smo želeli ugotoviti taksonomsko filogenetski položaj šestih izolatov bifidobakterij iz tankega črevesa podgan, ki so bile v predhodnih poskusih krmljene s surovim

fižolom (Fanedl, 1994; Fanedl in sod., 1998). Ker filogenetski odnosi med predstavniki rodu *Bifidobacterium* še vedno niso povsem pojasnjeni, smo v filogenetsko analizo vključili tudi tipske seve vseh trenutno poznanih bifidobakterijskih vrst.

MATERIAL IN METODE

Bakterijski sevi

Izolate *Bifidobacterium* sp. 64, 69, 72, 175, 200, 211 in *Lactobacillus* sp. L73 smo osamili iz vsebine tankega črevesa podgan, krmljenih s surovim fižolom (Fanedl, 1994; Fanedl in sod., 1998).

Izolacija genomske DNA in pomnoževanje bakterijskih genov za 16S rRNA

Iz čistih kultur izolatov bifidobakterij in laktobacilov smo izolirali genomsko DNA po predhodno opisanem postopku (Fanedl in sod., 1998). Izolirano DNA smo uporabili kot matrico v verižni reakciji s polimerazo DNA (PCR), v kateri smo uporabili univerzalna bakterijska začetna oligonukleotida, ki nalegata na začetek in konec gena za 16S rDNA. Uporabljena začetna oligonukleotida sta bila fD1 (5'-ccgaattcgctcgacaacaacAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; mesta 8–27 po štetju pri *E. coli*) (Weisburg in sod., 1991) in 1492r (5'-aagcttgccggccgcTACGGYTACCTTGTTACGACTT-3', Y = C/T; mesta 1513–1492 po štetju pri *E. coli*) (Lane, 1991). V 0,5-mililitrskih mikrocentrifugirkah smo pripravili 20 µl reakcijske mešanice, sestavljene iz: 1/10 volumna 10-kratnega reakcijskega pufra, 200 µM posameznih deoksinukleotidov (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 2 mM MgCl₂, 6 pM posameznega začetnega oligonukleotida, 2 enot polimeraze *Taq* in 20 ng matrične DNA. V kontrolne mešanice nismo dodali matrične DNA bakterij temveč dH₂O. Pomnoževanje v verižni reakciji s polimerazo je potekalo po naslednji temperaturni shemi: 5 minutni začetni denaturaciji DNA pri 95 °C je sledilo 30 ciklov (40 sekundna denaturacija pri 94 °C, 60 sekundno prileganje začetnih oligonukleotidov pri 52 °C, 110 sekundno podaljševanje pri 72 °C) in sedem minutno podaljševanje pri 72 °C. Vsa pomnoževanja z reakcijo PCR smo izvedli na cikličnem termostatu »GeneAmp PCR System 2400« (Perkin Elmer, ZDA). Pomnožke PCR smo pregledovali v horizontalnem 1-odstotnem agaroznem gelu v 1-kratnem pufru TBE. Agarozne gele smo predhodno obarvali po standardni recepturi z etidijevim bromidom.

Sekvenciranje genov za 16S rRNA

Pomnožke gena za 16S rDNA smo očistili s kolonami »Microcon 100« (Amicon, 42412) po navodilih proizvajalca in jih uporabili kot matrico za ciklično sekvenciranje (cycle sequencing). V reakciji smo uporabili ustrezni začetni oligonukleotid (pregl. 1), glede na to, kateri del gena za 16S rDNA in v kateri verigi DNA smo želeli ugotoviti sekvenco.

Za pripravo 20 µl reakcijske mešanice smo potrebovali: 4 pM ustreznega začetnega oligonukleotida, 8 µl mešanice s fluorescentno označenimi in neoznačenimi dNTP-ji ter polimerazo »AmpliTaq® FS« iz sekvencijskega kompleta »ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit« (Perkin Elmer, 402080), DNA v koncentraciji 20 ng µl⁻¹ in ustrezen volumen sterilne vode.

Reakcija PCR je potekala po naslednji temperaturni shemi v cikličnem termostatu »DNA Thermal Cycler Model 480« (Perkin Elmer, ZDA): 5 minutni začetni denaturaciji DNA pri 95 °C je sledilo 25 ciklov pomnoževanja (30 sekundna denaturacija pri 95 °C, 15 sekundno prileganje začetnega oligonukleotida pri 50 °C, 4 minutno podaljševanje pri 60 °C).

Preglednica 1. Uporabljeni začetni oligonukleotidi za sekvenciranje 16S rDNA. (Po naročilu sintetizirani v MWG Biotech, Ebersberg, Nemčija)

Table 6. 16S rDNA sequencing primers. (Ordered and synthesized at MWG Biotech, Ebersberg, Germany)

Začetni oligonukleotid	Sekvenca	Vir
27f	5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3'	Lane, 1991
519f	5' CAG CMG CCG CGG TAA TWC 3'	Lane, 1991
519r	5' GWA TTA CCG CGG CKG CTG 3'	Lane, 1991
907f	5' AAA CTY AAA KGA ATT GAC GG 3'	Lane, 1991
907r	5' CCG TCA ATT CMT TTR AGT TT 3'	Lane, 1991
1100f	5' CAA CGA GCG CAA CCC 3'	Lane, 1991
1100r	5' GGG TTG CGC TCG TTG 3'	Lane, 1991
1392r	5' ACG GGC GGT GTG TRC3'	Lane, 1991

M = C/A, R = A/G, Y = C/T, K = G/T, W = A/T

Nastali produkt smo oborili z dvema mikrolitroma 3 M natrijevega acetata (pH = 5,2) in 50 µl ledeno mrzlega 96-odstotnega etanola, mešanico premešali na stresalniku in jo pustili 10 min na ledu. Mešanico smo nato centrifugirali 30 min pri 11.000 x g, zatem previdno odstranili etanol in usedlino sprali z 250 µl 70-odstotnega etanola. Po 5 minutnem centrifugiranju pri 11.000 x g smo previdno odlili etanol in usedlino posušili na zraku. Pomnožke PCR smo ločevali z elektroforezo v denaturirajočem 6-odstotnem poliakrilamidnem gelu v avtomatskem sekvenatorju »373 DNA Sequencing System« po navodilih proizvajalca (Applied Biosystems, ZDA) na Rowett Research Institute v Aberdeenu (Velika Britanija).

Analiza sekvenčnih podatkov

Za primerjalno analizo sekvenc smo z iskalcem Entrez Browser (National Center for Biotechnology Information) v bazah podatkov (GenBank, EBI, DDBJ, RDP) poiskali sekvence genov za 16S rRNA tipskih sevov bifidobakterij (pregl. 2) in sorodne bakterijske vrste ter jih uporabili v filogenetskih analizah. Sekvence smo obdelovali z orodji BCM Search Launcher (Smith in sod., 1996), Infobiogen (Huang, 1992) in Ribosomal Database Project (RDP II) (Maidak in sod., 2001).

S programi programskega paketa ClustalX 1.8 (Higgins in sod., 1988; Thompson in sod., 1997) smo primerjali in poravnali preiskovane sekvence genov za 16S rRNA. V analizo smo vključili sekvence naših izbranih izolatov (64, 69, 72, 175, 200, 211 in L73), sekvence 32-tih tipskih sevov bifidobakterij in 11 sekvenc bakterijskih vrst izbranih sorodnih rodov (pregl. 2). Za t.i. zunanjo skupino smo izbrali sekvenco gena za 16S rRNA bakterije *E. coli* (J01695). Število vstavljenih vrzeli je bilo v našem primeru omejeno na največ 10 nukleotidov.

Za filogenetsko analizo smo uporabili programe iz paketa Phylip 3.57c (<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>). Za izračun sorodnosti preučevanih sekvenc smo uporabili Kimurin dvoparametrični model in iz matrike izračunanih razdalj z metodo povezovanja sosedov (Neighbour-joining) generirali filogenetsko drevo. Z metodo vezanja (bootstrapping), ki jo je v filogenetske raziskave uvedel Felsenstein (1985), smo ocenili kvaliteto filogenetskih dreves in vrednosti analize bootstrap vpisali na vozlišča dreves, kjer prikazujejo odstotek ponovljivosti posameznega vozlišča pri 2000 ponovitvah.

Preglednica 2. Sekvence gena za 16S rRNA bakterij rodu *Bifidobacterium* in sorodnih bakterijskih vrst, uporabljene v filogenetski analizi

Table 7. 16S rRNA sequences of the genus *Bifidobacterium* and related microorganisms used for phylogenetic analysis

Vrsta	Izvor	Pristopna številka Accession no.
<i>Bifidobacterium</i> sp. 64, 69, 72, 175, 200, 211	tanko črevo podgan	-
<i>B. adolescentis</i>	črevo odraslega človeka	M58729
<i>B. angulatum</i>	črevo odraslega človeka	D86182
<i>B. animalis</i>	blato podgane in piščancev	D86185
<i>B. asteroides</i>	prebavila čebel	M58730
<i>B. bifidum</i>	blato dojenčka, blato človeka	S83624
<i>B. boum</i>	vamp govedi	D86190
<i>B. breve</i>	črevo dojenčka, blato človeka	AB006658
<i>B. catenulatum</i>	blato odraslega človeka	M58732
<i>B. choerinum</i>	blato prašiča	D86186
<i>B. coryneforme</i>	prebavila čebel	M58733
<i>B. cuniculi</i>	blato kunca	M58734
<i>B. dentium</i>	zobni karies	D86183
<i>B. gallicum</i>	črevo odraslega človeka	D86189
<i>B. gallinarum</i>	slepo črevo piščancev	D86191
<i>B. indicum</i>	prebavila čebel	D86188
<i>B. infantis</i>	črevo dojenčka	D86184
<i>B. lactis</i>	fermentirani mlečni izdelki	X89513
<i>B. longum</i>	črevo odraslega človeka	M58739
<i>B. magnum</i>	blato kunca	D86193
<i>B. merycicum</i>	vamp govedi	D86192
<i>B. minimum</i>	odpadna voda	M58741
<i>B. pseudocatenulatum</i>	blato dojenčka, odpadna voda	D86187
<i>B. pseudolongum</i> subsp. <i>pseudolongum</i>	vamp govedi	D86195
<i>B. pseudolongum</i> subsp. <i>globosum</i>	blato prašiča, miši in podgan	D86194
<i>B. pullorum</i>	blato piščancev	D86196
<i>B. ruminantium</i>	vamp govedi	D86197
<i>B. saeculare</i>	blato kunca	D89328
<i>B. subtile</i>	odpadna voda	D89379
<i>B. suis</i>	blato prašiča	M58743
<i>B. thermophilum</i>	blato prašiča	U10151
<i>Parascardovia denticolens</i> , gen. nov., comb. nov. (<i>B. denticolens</i>)*	zobni karies	D89331
<i>Scardovia inopinata</i> , gen. nov., comb. nov. (<i>B. inopinatum</i>)*	zobni karies	D89332
<i>Gardnerella vaginalis</i>	vaginalni izcedek	M58744
Sorodne vrste		
<i>Propionibacterium propionicus</i>		AJ315953
<i>Propionibacterium jensenii</i>		X53219
<i>Lactobacillus</i> sp. L73		-
<i>Lactobacillus acidophilus</i>		M58802
<i>Lactobacillus acidophilus johnsonii</i>		M99704
<i>Lactobacillus gasseri</i>		AF243165
<i>Frankia</i> sp.		L11307
<i>Nocardia otitidiscaviarum</i>		X80611
<i>Nocardia asteroides</i>		Z36934
<i>Actinomyces israelii</i>		X82450
Predstavnik zunanje skupine		
<i>Escherichia coli</i>		J01695

* Jian in Dong, 2002

REZULTATI IN RAZPRAVA

V pričujočem delu smo primerjali taksonomsko filogenetski položaj tipskih sevov bifidobakterij z izolati bifidobakterij, ki smo jih v predhodnih prehranskih poskusih osamili iz tankega črevesa podgan. Za omenjene študije se je kot najbolj uporabna izkazala prav molekula 16S rRNA, saj izpolnjuje večino zahtev, ki so ključnega pomena pri ocenjevanju sorodnosti med organizmi: je dovolj velika, ima mozaično strukturo, je starinska in ubikvitarna, pri vseh organizmih ima enak biološki pomen in se najverjetneje ne prenaša horizontalno (Woese, 1987).

Na osnovi razporeditve izolatov bifidobakterij v dendrogramu, izdelanem na osnovi predhodne analize naključno pomnožene polimorfne DNA (RAPD) (Fanedl in sod. 1998; Fanedl, 2002), smo za sekvenciranje genov za 16S rRNA izbrali šest bifidobakterijskih izolatov (64, 69, 72, 175, 200 in 211) in izolat laktobacilov (L73). Za sekvenciranje smo uporabili različne kombinacije univerzalnih bakterijskih začetnih oligonukleotidov (pregl. 1), ki prilegajo na evlucijsko ohranjene regije molekule 16S rRNA (Lane, 1991) in s tem dobili krajše odseke sekvenc skoraj celotnega gena. Posamezne odseke sekvenc izolatov smo združili v daljše enotne sekvence, dolge okoli 1300 bp. V nadaljevanju smo s primerjalno analizo sekvenc skušali šest pridobljenih sekvenc bifidobakterij filogenetsko uvrstiti med 32 tipskih sevov trenutno znanih bifidobakterijskih vrst. V filogenetsko analizo bifidobakterij smo vključili skupaj še 10 sekvenc predstavnikov sorodnih rodov *Actinomyces*, *Frankia*, *Nocardia*, *Propionibacterium* in *Lactobacillus*.

Preglednica 3. Odstotek podobnosti med sekvencami gena za 16S rRNA izolatov bifidobakterij in njihovih najbližjih tipskih sevov iz rodu *Bifidobacterium*.

Table 8. Levels of similarity for portions of the 16S rRNA sequences of bifidobacterial isolates and some closely related type strains of the genus *Bifidobacterium*.

Sevi	69	72	200	175	211	64	<i>B. pseudolongum</i> subsp. <i>globosum</i>	<i>B. pseudolongum</i> subsp. <i>pseudolongum</i>
72	95,72	-						
200	95,77	95,89	-					
175	91,79	93,24	93,02	-				
211	93,35	94,11	93,72	94,1	-			
64	91,4	92,22	92,6	91,89	94,0	-		
<i>B. pseudolongum</i> subs. <i>globosum</i>	96,29	96,96	97,24	95,23	95,7	94,64	-	
<i>B. pseudolongum</i> subsp. <i>pseudolongum</i>	95,75	96,43	96,71	94,67	95,15	93,98	99,43	-

Avtorji predhodnih filogenetskih raziskav ugotavljajo, da se bifidobakterije uvrščajo v dve skupini (Jian in Dong, 2002). V prvo, večjo skupino se uvršča večina bifidobakterijskih vrst in *Gardnerella vaginalis*. Z našo filogenetsko analizo smo potrdili predhodne ugotovitve. Iz genetskih razdalj smo izračunali odstotke podobnosti med sevi, vključenimi v analizo in ugotovili, da se odstotek podobnosti sekvenc genov za 16S rRNA znotraj prve skupine giblje med 90 in 99,9 odstotki (pregl. 3 in 4). Med njimi kažejo štiri podskupine bifidobakterijskih vrst več kot 99 odstotno podobnost (1. podsk.: *B. indicum* in *B. coryneforme*; 2. podsk.: *B. catenulatum* in *B. pseudocatenulatum*, 3. podsk.: *B.ulare*, *B. gallinarum* in *B. pullorum*; 4. podsk.: *B. suis*, *B. longum* in *B. infantis*). Drugi skupini pripadata le dve vrsti, *Parascardovia*

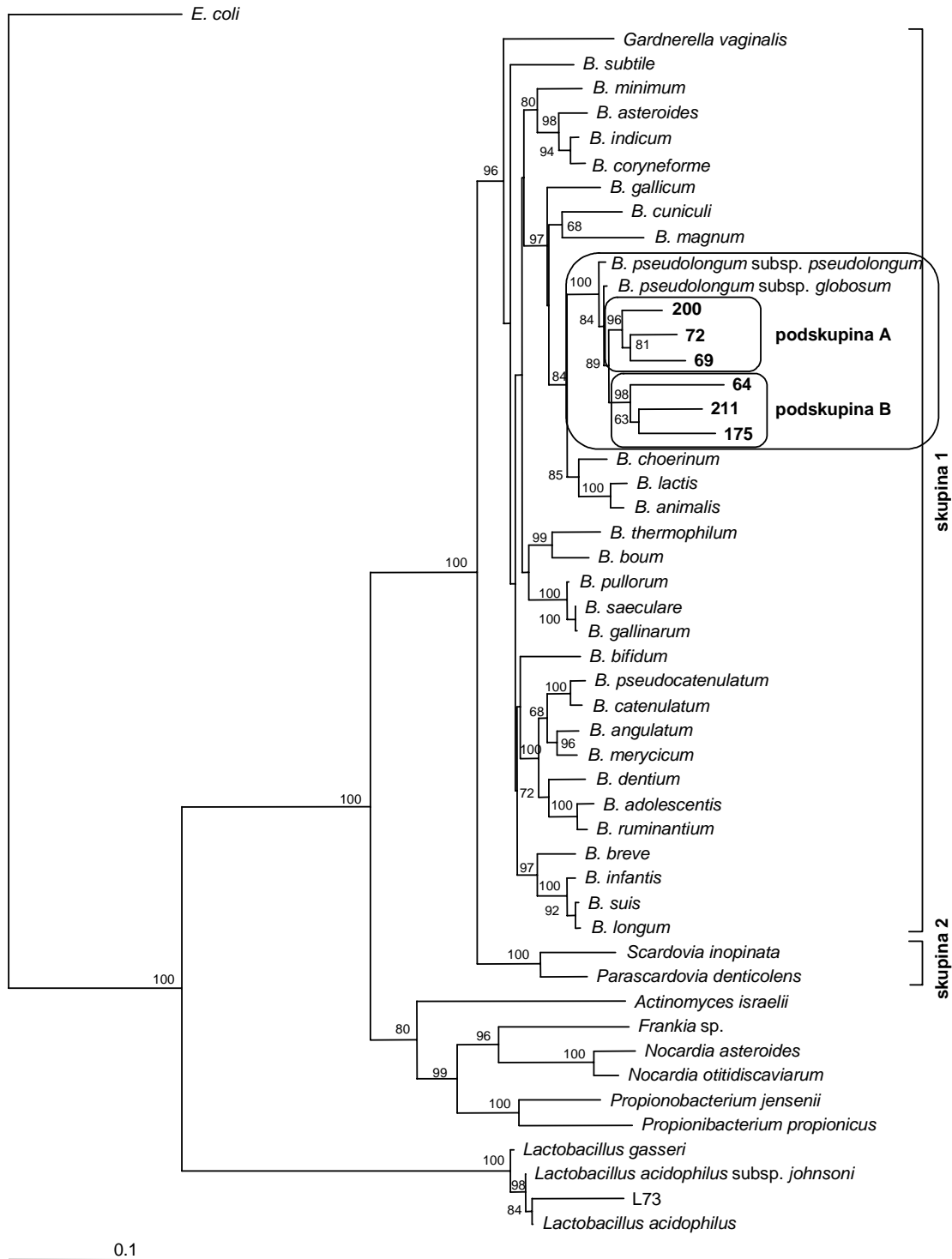
denticolens gen. nov., comb. nov. (prej *B. denticolens*) in *Scardovia inopinata* gen. nov., comb. nov. (prej *B. inopinatum*), izolirani iz ustne votline človeka (Jian in Dong, 2002). Rodova tvorita samostojno vejo, ki je nekoliko bolj oddaljena od ostalih bifidobakterij.

Naši izolati bifidobakterij so se uvrstili v dve podskupini večje skupine 1 (slika 1) (Jian in Dong, 2002). V podskupino, ki smo jo imenovali A, so se uvrstili izolati 69, 72 in 200, v podskupino B pa izolati 64, 211 in 175. Za obe podskupini so značilne majhne filogenetske razlike. Sekvence se med seboj razlikujejo od 4 do 8 odstotkov. Največji odstotek podobnosti med sekvencami izolatov smo izračunali pri podskupini A (95,7 do 95,9), kar pomeni zelo majhne razlike med sekvencami. Znotraj podskupine B se izolati nekoliko bolj razlikujejo (od 5,9 do 8,1 odstotka). Med sekvencami izolatov 211 in 175 ter 64 in 211 je 94 odstotna podobnost, med sekvencama izolatov 64 in 175 pa znaša podobnost 91,9 odstotkov (pregl. 3). Podskupini A in B sta filogenetsko najbližje vrstama *B. pseudolongum* subsp. *globosum* in *B. pseudolongum* subsp. *pseudolongum*. Izračunani odstotek podobnosti se giblje od 94,6 do 97,2 odstotka. Sekvenci omenjenih vrst se med seboj razlikujeta le za 0,57 odstotka (pregl. 3). Skupaj z *B. choerinum*, *B. lactis*, *B. animalis*, *B. magnum*, *B. cuniculi* in *B. gallicum* se filogenetsko uvrščajo v t.i. podskupino *B. lactis* (po Ribosomal Database Project).

Ugotovili smo, da se odstotki podobnosti sekvenc izolatov bifidobakterij gibljejo na meji, ki omogoča razvrščanje izolatov v nove vrste. Mikrobni taksonomi se strinjajo, da lahko samo na osnovi informacij iz 16S rRNA seve uvrščamo v že obstoječe vrste, ne moremo pa predlagati novih vrst ali premestitve oz. preimenovanja starih brez dodatnih analiz. Običajno v neko vrsto uvrstijo seve, ki imajo s tipskim sevom najmanj 70 odstotno homologijo DNA-DNA (Wayne in sod., 1987; Lauer in Kandler, 1983). Na osnovi študij, ki so vključevale primerjavo sekvenc gena za 16S rRNA in hibridizacij DNA-DNA, so ugotovili, da 50 odstotno parjenje DNA-DNA ustreza približno 99 odstotni podobnosti med rRNA (Amann in sod., 1992). Glede na to, da se sekvence gena za 16S rRNA nekaterih bifidobakterijskih vrst ne razlikujejo niti za odstotek (npr. *B. longum* in *B. infantis*; *B. suis* in *B. infantis*; *B. suis* in *B. longum*; *B. pullorum* in *B. gallinarum*; *B. pullorum* in *B. saeculare*; *B. pseudocatenulatum* in *B. catenulatum*) bi v našem primeru lahko razmišljali o novi ali novih vrstah bifidobakterij. Poleg tega so izolati iz specifičnega ekosistema – prebavil podgan, kjer nekaterih vrst bifidobakterij ne zasledimo.

Rezultate filogenetske analize sekvenc genov za 16S rRNA smo primerjali še z rezultati predhodnih raziskav, ki so temeljile na ugotavljanju fermentacijskih profilov in analizi naključno pomnožene polimorfne DNA (RAPD) izbranih bifidobakterijskih izolatov (Fanedl in sod., 1998; Fanedl, 2002). Ugotovili smo, da se v vseh primerih izolati uvrščajo v dokaj enotno skupino in da nobenega izmed izolatov nismo mogli uvrstiti med že znane bifidobakterijske vrste. Po primerjavi fermentacijskih profilov omenjene skupine bifidobakterij nekoliko izstopa le izolat 69, ki se od ostalih izolatov razlikuje v razgradnji treh različnih sladkorjev, medtem ko se ostali razlikujejo med seboj le v razgradnji enega sladkorja od 49 preverjenih (Fanedl, 1994; Fanedl in Avguštin 1997).

Za dokončne uvrstitve naših izolatov v obstoječe ali morebitne nove vrste bi morali opraviti še dodatne analize, najprimerneje hibridizacije DNA-DNA in morda ob že znanih fermentacijskih profilih sladkorjev in rezultatov analize RAPD pridobiti še nekatere kemotaksonomske podatke. Vsekakor pa nam primerjalna analiza sekvenc genov za 16S rRNA omogoča iskanje specifičnih odsekov, primernih za začetne oligonukleotide ali oligonukleotidne sonde. Z njimi lahko v vzorcih iz kompleksnih ekosistemov z *in situ* hibridizacijskimi poskusi ali reakcijami PCR specifično prepoznavamo in sledimo tarčne mikroorganizme – v našem primeru bifidobakterije iz prebavil.



Slika 1. Filogenetska razvrstitev bifidobakterijskih izolatov in njim najbolj podobnih bakterijskih vrst, izdelana na podlagi sekvenc genov za 16S rRNA. Filogenetsko drevo je koreninjeno z *E. coli* in izdelano z metodo Neighbour-joining. Številka nad vozliščem pomeni odstotek ponovljivosti vozlišča pri 2000 ponovitvah (vrednosti nižje od 60 niso prikazane). Daljica prikazuje 0,1 spremembo na mestu nukleotida.

Figure 1. Phylogenetic arrangement of six bifidobacterial isolates and related bacterial strains based on 16S rRNA sequences. The tree was rooted with *E. coli* and constructed by using the neighbour-joining method with bootstrap values calculated from 2000 trees. Each number on a branch indicates bootstrap values based on 2000 resamplings (values below 60 are not shown). The scale bar represents 0.1 substitution per nucleotide position.

SKLEPI

S primerjalno analizo sekvenc gena za 16S rRNA smo pridobljene sekvence izolatov bifidobakterij iz tankega črevesa podgan filogenetsko uvrstili med že znane bifidobakterijske vrste. V filogenetsko analizo smo vključili pridobljene sekvence lastnih izolatov, 32 sekvenc tipskih predstavnikov bifidobakterijskih vrst in 11 sevov sorodnih rodov iz zbirk sekvenčnih podatkov in izdelali filogenetsko drevo. Vsi izolati so se uvrstili v dve podskupini večje skupine *B. lactis*. V podskupino A so se uvrstili izolati 69, 72 in 200, v podskupino B pa izolati 64, 211 in 175. Med sekvencami izolatov se giblje stopnja podobnosti med 91,4 in 95,8 odstotki. Filogenetska raziskava je pokazala, da so sekvence podskupine A in B filogenetsko najbližje vrstama *B. pseudolongum* subsp. *pseudolongum* in *B. pseudolongum* subsp. *globosum* (94,6 do 97,2 odstotka). Ugotovili smo, da se odstotki podobnosti sekvenc med izolati bifidobakterij in najsorodnejšo vrsto *B. pseudolongum* gibljejo na meji, ki odloča o razvrščanju izolatov v nove vrste. Zaradi tega bomo za končno uvrstitev izolatov v nadaljnjih preiskovanjih pridobili še dodatne kemotaksonomske podatke.

SUMMARY

In order to contribute to our understanding of *Bifidobacterium* taxonomy, we studied *Bifidobacterium* phylogeny by performing 16S rRNA sequence analysis. On the basis of the RAPD dendrogram, six isolates of bifidobacteria and one isolate of lactobacilli were chosen for sequencing. 16S rRNA sequences were aligned with the 16S rRNA sequences of 32 type strains of *Bifidobacterium* species and 11 strains of related genera and a phylogenetic tree was constructed. All bifidobacterial isolates belonged to a *B. lactis* group and formed two subgroups. The four isolates, 200, 69, 72 in 31, formed a subgroup A; the other isolates, 175, 211, 64 in 32, formed a subgroup B. The similarity levels between 16S rRNA sequences of isolates ranged from 91,4 to 95,8 %. Phylogenetic analysis also showed that sequences of our isolates were closely related to *B. pseudolongum* subsp. *pseudolongum* and *B. pseudolongum* subsp. *globosum* (94,6–97,2 %).

VIRI

- Amann, R./ Ludwig, W./ Schleifer, K-H. Identification and *in situ* detection of individual bacterial cells. FEMS Microbiol Lett., 100(1992), 45–50.
- Bezkorovainy, A./ Miller-Catchpole, R. Biochemistry and physiology of *Bifidobacteria*. Boca Raton, Florida, CRC Press, 1989, 226 str.
- Euzéby, J.P. List of bacterial names with standing in nomenclature – genus *Bifidobacterium*. Int. J. Syst. Bacteriol., 47(1997), 590–592, <http://www.bacterio.cict.fr/b/bifidobacterium.html>, (30. sept. 2002).
- Fanedl, L. Izolacija *Bifidobacterium* spp. iz tankega črevesa podgan, krmljenih s krmo z dodatkom fižola (*Phaseolus vulgaris*). Magistrsko delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fak., Odd. za zootehniko, 1994, 103 str.
- Fanedl, L. Osamitev in molekularna identifikacija bifidobakterij iz tankega črevesa podgan, krmljenih s surovim fižolom (*Phaseolus vulgaris* L.). Doktorska disertacija. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fak., 2002, 132 str.
- Fanedl, L./ Avguštin G. Uporaba tehnike naključnega pomnoževanja polimorfne DNK (RAPD) za ugotavljanje genetskih raznolikosti pri mikroorganizmih. Zb. Bioteh. fak. Univ. Ljublj., Kmet. Zooteh., 66(1995), 169–177.
- Fanedl, L./ Avguštin, G. Sugar fermentation profiles of bifidobacteria from rat gut. Zb. Bioteh. fak. Univ. Ljublj., Kmet. Zooteh., 70(1997), 55–61.
- Fanedl, L./ Nekrep, F.V./ Avguštin, G. Random amplified polymorphic DNA analysis and demonstration of genetic variability among bifidobacteria isolated from rats fed with raw kidney beans. Can. J. Microbiol., 44(1998), 1094–1101.
- Felsenstein, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using bootstrap. Evolution, 39(1985), 783–791.
- Fujimori, M./ Amano, J./ Taniguchi, S. The genus *Bifidobacterium* for cancer gene therapy. Curr. Op. Drug Disc. Develop., 5(2002), 200–203.

- Fuller, R. Probiotics, the scientific basis. London, Chapman and Hall, 1992, 398 str.
- Higgins, D.G./ Sharp, P.M. CLUSTAL – a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. *Gene*, 73(1988), 237–244.
- Holzappel, W./ Haberer, P./ Giesen, R./ Björkroth, J./ Schillinger, U. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.*, 73(suppl.)(2001), 365S–373S.
- Hosono, A./ Wardojo, R./ Otani, H. Inhibitory effect of lactic acid bacteria from fermented milk on the mutagenicities of volatile nitrosamines. *Agric. Biol. Chem.*, 54(1990), 1639.
- Huang, X.Q. A contig assembly program based on sensitive detection of fragment overlaps. *Genomics*, 14(1992)1, 18–25.
- Jian, W./ Dong, X. Transfer of *Bifidobacterium inopinatum* and *Bifidobacterium denticolens* to *Scardovia inopinata* gen. nov., comb. nov., and *Parascardovia denticolens* gen. nov., comb. nov., respectively. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 52(2001), 809–812.
- Lane, D.J. 16S/23S rRNA sequencing. V: Nucleic acids techniques in bacterial systematic. (Eds.: Stackebrandt E./ Goodfellow, M.). Chichester, John Wiley and Sons, 1991, 115–148.
- Lauer, E./ Kandler, O. DNA-DNA homology, murein types and enzyme patterns in the type strain of the genus *Bifidobacterium*. *Syst. Appl. Microbiol.*, 4(1983), 42–64.
- Maidak, B.L./ Cole, J.R./ Lilburn, T.G./ Parker, C.T. Jr./ Saxman, P.R./ Farris, R.J./ Garrity, G.M./ Olsen, G.J./ Schmidt, T.M./ Tiedje, J.M. The RDP-II (Ribosomal Database Project). *Nuc. Acids Res.* 29(2001)1, 173–174.
- Mitsuoka, T. *Bifidobacteria* and their role in human health. *J. Ind. Microbiol.*, 6(1990), 263–267.
- Piot, P./ van Dyck, E./ Goodfellow, M./ Falkow, S. A taxonomic study of *Gardnerella vaginalis* (*Haemophilus vaginalis*) Gardner in Dukes 1955. *J. Gen. Microbiol.*, 119(1980), 373–396.
- Sakata, S./ Kitahara, M./ Sakamoto, M./ Mayshi, H./ Fukuyama, M./ Benno, Y. Unification of *Bifidobacterium infantis* and *Bifidobacterium longum*. 2002. IUMS. <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.02221-0> (16. maj 2002)
- Scardovi, V. Genus *Bifidobacterium*. V: Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 2. (Eds.: Sneath, P.H.A./ Mair, N.S./ Sharpe, M.E./ Holt, J.D.). Baltimore, Williams and Wilkins, 1986, 1418–1434.
- Scardovi, V./ Trovatielli, L.D. The fructose-6-phosphate shunt as peculiar pattern of hexose degradation in the genus *Bifidobacterium*. *Ann. Microbiol.*, 15(1965), 19–29.
- Schleifer, K.H./ Ludwig, W. Phylogeny of the genus *Lactobacillus* and related genera. *Syst. Appl. Microbiol.*, 18(1995), 461–467.
- Smith, R.F./ Wiese, B.A./ Wojzynski, M.K. BCM Search Launcher – An integrated interface to molecular biology data base search and analysis services available on the World Wide Web. *Genome Res.*, 6(1996)5, 454–462.
- Stackebrandt, E./ Rainey, F.A./ Ward-Rainey, N.L. Proposal for a new hierarchic classification system, Actinobacteria classis nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 47(1997), 479–491.
- Thompson, J.D./ Higgins, D.G./ Gibson, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nuc. Acids Res.*, 22(1997)22, 4673–4680.
- Wayne, L.G./ Brenner, D.J./ Colwell, R.R./ Grimont, P.A.D./ Kandler, O./ Krichevsky, M.I./ Moore, L.H./ Moore, W.E.C./ Murray, R.E.G./ Stackebrandt, E./ Starr, M.P./ Trüper, H.G. Report of the Ad Hoc Committee on reconciliation of approaches to bacterial systematic. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 37(1987), 463–464.
- Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A., Lane D.J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.*, 173(1991), 697–703.
- Woese, C.R. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.*, 51(1987), 221–271.
- van Esbroeck, M./ Vandamme, P./ Falsen, E./ Vancanneyt, M./ Moore E./ Pot, B./ Gavini, F./ Kersters, K./ Goossens H. Polyphasic approach to the classification and identification of *Gardnerella vaginalis* and unidentified *Gardnerella vaginalis*-like coryneforms present in bacterial vaginosis. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 46(1996), 675–682