

М.А. Шукишина, Е.Н. Бирюк, к.с.-х.н., М.О. Радиончик  
Институт мясо-молочной промышленности, Минск, Республика Беларусь

## СИКВЕНС-ТИПИРОВАНИЕ *LACTOBACILLUS HELVETICUS* И *LACTOBACILLUS ACIDOPHILLUS* НА ОСНОВАНИИ 3 ГЕНОВ ДОМАШНЕГО ХОЗЯЙСТВА

M. Shukshyna, E. Biruk, M. Radzivonchyk  
Institute for Meat and Dairy Industry, Minsk, Republic of Belarus

## SEQUENCE TYPING OF *LACTOBACILLUS HELVETICUS* AND *LACTOBACILLUS ACIDOPHILLUS* BASED ON 3 HOUSEKEEPING GENES

e-mail: shucshina.margarita@yandex.by, biohimbel@rambler.ru, martaclarke93@gmail.com

В статье представлены результаты исследований сиквенс-типирования штаммов *Lactobacillus helveticus* и *Lactobacillus acidophilus* с использованием 3 пар праймеров (TestGB, Sgro и SrplB), сконструированных к генам «домашнего хозяйства» *gyrB*, *groEL* и *rplB*, которые позволяют достоверно идентифицировать бактерии *Lactobacillus helveticus* и *Lactobacillus acidophilus* и типировать штаммы внутри видов.

This article presents the results of research on sequence-typing of *Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus acidophilus* using 3 primer sets (TestGB, Sgro, SrplB), designed based on the housekeeping genes *gyrB*, *groEL* and *rplB*, which allow reliable identification of *Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus acidophilus* and typing of strains within species.

**Ключевые слова:** сиквенс-типирование; *Lactobacillus acidophilus*; *Lactobacillus helveticus*; гены домашнего хозяйства.

**Key words:** sequence typing; *Lactobacillus acidophilus*; *Lactobacillus helveticus*; housekeeping genes.

**Введение.** Род *Lactobacillus* представляет собой самый большой и разнообразный род молочнокислых бактерий (LAB). Входящие в него виды находят применение в промышленности, биотехнологии и медицине [1]. Из-за своих метаболических особенностей некоторые представители этого рода играют важную роль в процессах ферментации молока, сохранении пищевых продуктов, обладают пробиотическими свойствами [2], а также используются в производстве биологически активных добавок. Виды рода *Lactobacillus* используют при производстве функциональных продуктов питания и пищевых добавок.

На сегодняшний день для видовой идентификации микроорганизмов широко используется метод секвенирования последовательности 16S рНК, но также известно, что некоторые близкородственные виды не могут быть дифференцированы этим методом. Поскольку виды *Lb. helveticus* и *Lb. acidophilus* широко используются в сфере биотехнологических производств, необходима дальнейшая работа в области их классификации и разработки быстрых и точных методов идентификации. Молекулярные методы позволяют установить таксономические связи между штаммами и усовершенствовать бактериальную систематику. Коммерческая ценность лактобацилл зависит от специфичных свойств штаммов и правильная идентификация позволяет оценить безопасность культуры, правильно промаркировать продукцию, а также даёт возможность для мониторинга штамма в промышленном производстве [3].

Использование молекулярных методов для идентификации лактобацилл позволило реклассифицировать то, что раньше считалось группой *Lb. delbrueckii* в

отдельный род *Lactobacillus*, в который в настоящее время входит 23 вида, в том числе *Lb. acidophilus*, *Lb. helveticus*, *Lb. gallinarum*, *Lb. johnsonii* и др. [4]. Молекулярные методы позволяют лучше понять генетические взаимоотношения молочнокислых бактерий, и способствуют определению экологической роли этих микроорганизмов в пищевых продуктах. Применение методов молекулярного типирования к более широкому кругу видов микроорганизмов, позволяет различать микроорганизмы, принадлежащие к очень близким таксономическим группам [5].

Изначально лактобактерии идентифицировали основываясь на фенотипических признаках, таких как оптимальная температура роста, утилизация сахаров и перечень вырабатываемых метаболитов [6]. Позднее, в XX в., для определения видов бактерий стали использовать генотипические и химико-таксономические критерии – ДНК-ДНК гибридизация, определение процентного состава пар гуанина и цитозина и химическая структура пептидогликана. С 1983 г. в качестве основы для классификации и определения видов стали использовать секвенирование гена 16S рРНК, представляющего собой связку консервативных последовательностей, соединённых между собой связками гипервариабельных участков [7]. Однако данный метод не позволяет различить некоторые виды бактерий рода *Lactobacillus*, и в частности *Lb. helveticus* и *Lb. acidophilus*. В 2013 году, при сравнении методов идентификации *Lb. acidophilus* и родственных им бактерий выявлено, что результаты именно мультилокусного сиквенс-типирования (MLST) являются самыми информативными среди всех исследованных методов. Этот метод можно использовать как для идентификации видовой принадлежности исследуемого изолята, так и для определения подвида [8]. Сам метод основан на определении нуклеотидной последовательности консервативных генов, экспрессия которых влияет на протекание основных метаболических реакций [9]. Такие гены, необходимые для поддержания важнейших жизненных функций организма, называют генами домашнего хозяйства. Они характеризуются относительно низкой скоростью накопления мутаций, что делает их отличной мишенью для изучения эволюции геномов и идентификации. Согласно литературным данным, для филогенетического анализа бактерий используют несколько генов или белков, таких как *groEL*, *rplB*, *rpoB*, *recA*, *tuf*, *aroE*, *ddl*, *dnaE*, *fusA*, *ftsZ*, *glnA*, *glpF*, *gltX*, *gyrB*, *gpd*, *gdh*, *hemN*, *ileS*, *lepA*, *leuS*, *ldhL*, *mutS*, *mutL*, *metRS*, *nrdD*, *pepV*, *pgm*, *polA*, *recG*, *recP*, *xpt*, *yqil*, *tkt* и *tpi* [10]. С использованием этих генетических маркеров и метода MLST возможно идентифицировать виды семейства *Lactobacillaceae* с той же или даже лучшей точностью и чувствительностью, чем с помощью секвенирования гена 16S рРНК [11]. А главное, результаты секвенирования являются однозначными, достоверными, воспроизводимыми и сопоставимыми в рамках разных лабораторий, что позволяет на основе секвенированных аллелей создавать глобальные, общемировые базы данных, анализировать их и сравнивать между собой.

**Материалы и методы исследований.** В качестве объектов исследований использовали:

- референтные сиквенсы генов *Lb. helveticus* и *Lb. acidophilus* из нуклеотидной онлайн базы данных NCBI GenBank;

- изоляты *Lactobacillus helveticus*, выделенные из природных источников: (p1717/1-1; p1717/1-5);

- бактериальные культуры *Lb. helveticus* и *Lb. acidophilus* (производственные штаммы и штаммы для научных исследований) из Республиканской коллекции промышленных штаммов заквасочных культур и их бактериофагов РУП «Институт мясо-молочной промышленности» (2649 TL-O; 356 LA-AVF; 2389 TL-AV; 1175 LA-AVF; 1178 LA-AVF; 1185 LA-AV; 1186 LA-AF; 1187 LA-AVF; 1191 TL-AF);

- бактериальные культуры, выделенные из молочнокислых продуктов: acid (*Lactobacillus acidophilus*); helv (*Lactobacillus helveticus*).

Для мультилокусного сиквенс-типирования были использованы 3 пары праймеров (таблица 1), сконструированные в рамках выполнения НИР 2 «Разработка способа дифференциации бактерий *Lactobacillus helveticus* и *Lactobacillus acidophilus* с использованием метода мультилокусного секвенирования» задания 5.1. «Разработка эффективных биотехнологических приемов, обеспечивающих получение высокопродуктивных заквасочных микроорганизмов и их консорциумов для пищевых продуктов» ГПНИ «Сельскохозяйственные технологии и продовольственная безопасность».

Таблица 1 – Последовательности праймеров, использованных в работе

Название праймера	Ген	Последовательность праймера 5'→3'	Положение участка в гене	Температура отжига, °С	Время элонгации, сек	Размер ПЦР продукта
Sgro	groEL	F:ATTCGTCGCGGTATTGAAA	413-1228	53	50	815
		R:TTCAGTTTCAGTAGCAGCA				
TestGB	gyrB	F:GCTTTGCAATATACAAATGG	826-1442	51	45	616
		R:CGATCCATTGAAGCTTTTTC				
SrplB	rplB	F:ACTGTAAGACACCGTGG	148-713	54	40	565
		R:TTACCTTCACCACCACC				

Источник данных: собственная разработка.

Полученные сиквенсы были соотнесены с данными международной базы нуклеотидных последовательностей GenBank при помощи онлайн-инструмента Nucleotide BLAST. Для более детального изучения сиквенсов использовали программу MEGA 6. Положение нуклеотидных замен указано относительно соответствующих генов *Lb. acidophilus* La-14 (код доступа NCBI GenBank: NC 021181.2). Указаны значения бутстрапа  $\geq 70$ .

**Результаты и их обсуждение.** Проведено секвенирование изолятов молочнокислых лактобацилл с 3 парами праймеров (TestGB, Sgro и SrplB). Секвенирование проводили как с прямым, так и с обратным праймером, с целью получения полной последовательности гена. Анализ результатов секвенирования в программе Nucleotide BLAST показал высокий процент подобия полученных сиквенсов референтным последовательностями (95–100%), что свидетельствует о возможности использования праймеров TestGB, Sgro и SrplB для идентификации *Lb. acidophilus* и *Lb. helveticus* до вида. Помимо этого, с помощью праймеров Sgro и SrplB возможно идентифицировать виды *Lactobacillus johnsonii* и *Lactobacillus delbrueckii* до подвида. Также, праймеры TestGB и Sgro позволяют различить близкородственные виды *Lb. gallinarum* и *Lb. helveticus*.

На основании кластерного анализа участков генов gyrB, groEL и rplB, были сгенерированы дендрограммы филогенетических отношений (рисунки 1–3).

С праймером TestGB исследуемые культуры *Lb. helveticus* распределились на четыре группы (рисунок 1). К группе 1А относятся штаммы с одной нуклеотидной заменой в позиции 1220. Группа 1В также выделяется одной заменой в позиции 1377. Для культур *Lb. acidophilus* (группа 1Г) различий в нуклеотидных последовательностях не найдено.

С праймером Sgro исследуемые культуры *Lb. helveticus* также формируют четыре группы (рисунок 2).

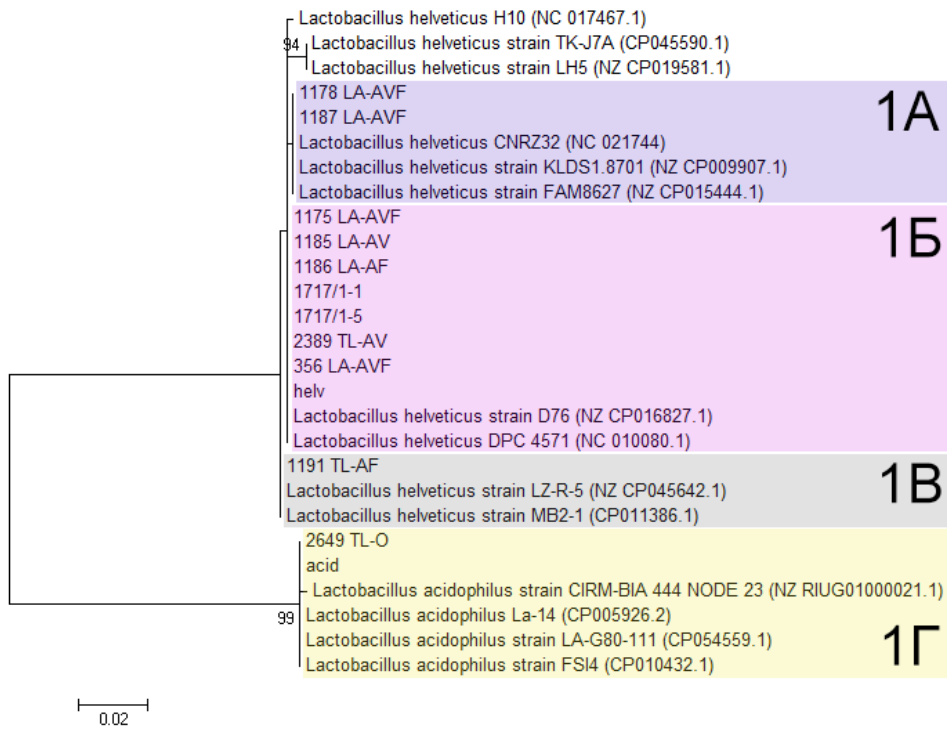


Рисунок 1 – Дендрограмма филогенетических отношений исследованных *Lb. acidophilus* и *Lb. helveticus* по участку гена *gyrB*  
 Источник данных: собственная разработка и NCBI GenBank.

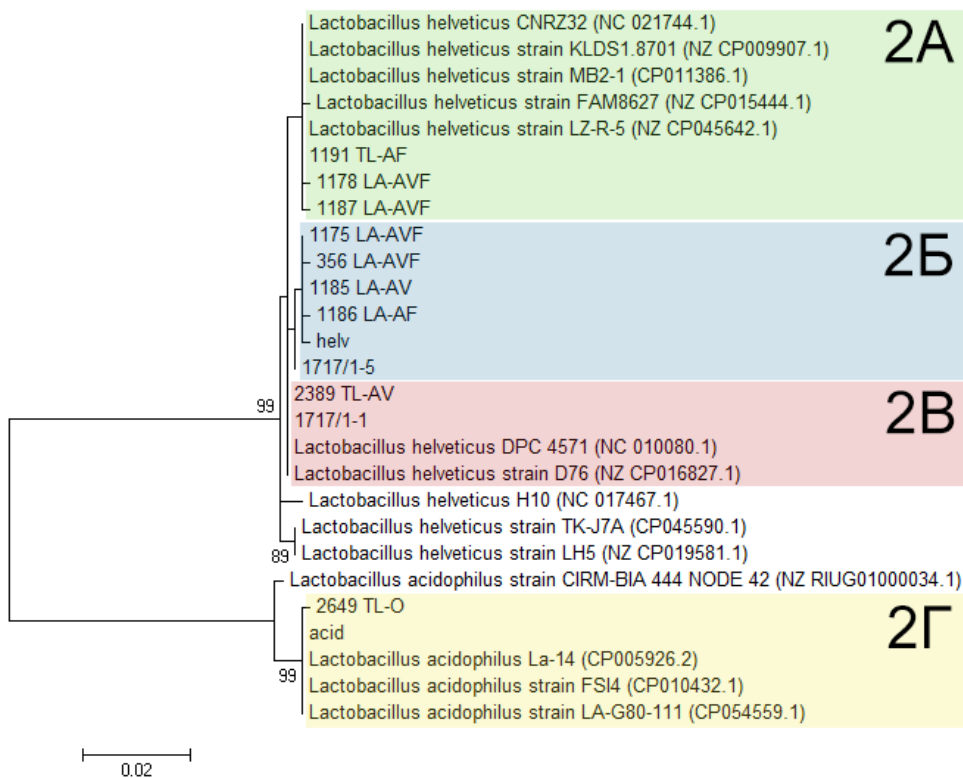


Рисунок 2 – Дендрограмма филогенетических отношений исследованных *Lb. acidophilus* и *Lb. helveticus* по участку гена *groEL*  
 Источник данных: собственная разработка и NCBI GenBank.

Группа 2А выделилась на основе замен по нуклеотидным позициям 466 и 995. В группе 2Б присутствуют замены в позициях 1094 и 1123. Помимо этого, потенциальная замена присутствует в коллекционном штамме 356 LA-AVF в позиции 1075, однако несмотря на её повторение в цепях форвард- и реверс-праймера, однозначно утверждать её наличие нельзя, так как она расположена на участке, подверженном появлению большого числа ошибок (начало цепи форвард-праймера, конец цепи реверс-праймера). Для культур *Lb. acidophilus* различий в нуклеотидных последовательностях участка гена *groEL* не найдено.

С праймером SrplB, исследуемые культуры распределились на три группы (рисунок 3). Группа 3А выделена на основании замен в нуклеотидных позициях 429 и 588. Также присутствует единичная замена у штамма 1191 TL-AF в позиции 449. Так как эта замена наблюдается как с форвард-, так и с реверс-праймером, а также находится в середине полученного сиквенса (участок менее подверженный появлению ошибок), предположительно, эта замена является действительной. Для культур *Lb. acidophilus* различий в нуклеотидных последовательностях участка гена *grlB* не найдено.

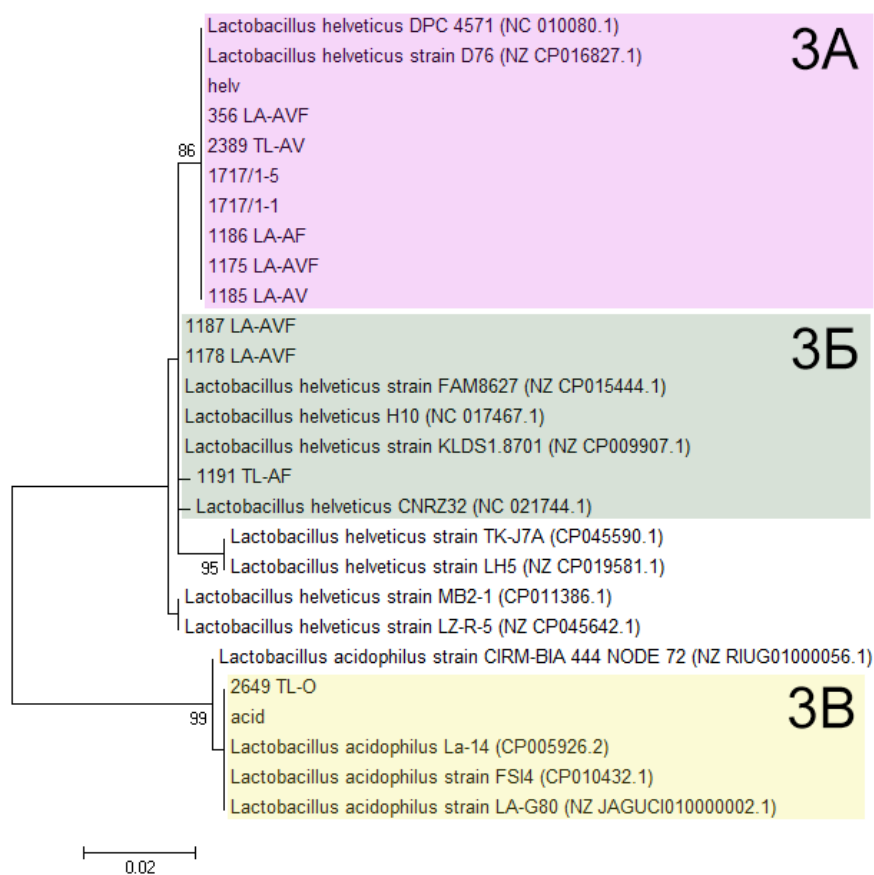


Рисунок 3 – Дендрограмма филогенетических отношений исследованных *Lb. acidophilus* и *Lb. helveticus* по участку гена *grlB*  
 Источник данных: собственная разработка и NCBI GenBank.

Как видно из выше представленных филем, бактерии вида *Lb. acidophilus* практически объединились в одну группу. Поэтому, для проверки типизирующей способности праймеров, мы проанализировали сиквенсы генов 67 референтных культур *Lb. acidophilus* из базы данных NCBI GenBank. На основании их выравнивания была построена дендрограмма филогенетических отношений. 57 референтных культур и 2 штамма, исследованные в рамках данной работы (acid и 2649

TL-O), образовали единый кластер: их последовательности идентичны. Остальные 10 референтных культур на основании 15 замен разделились на 4 кластера (рисунок 4).



Рисунок 4 – Дендрограмма филогенетических отношений культур *Lb. acidophilus*  
 Источник данных: собственная разработка и NCBI GenBank.

Такая высокая степень генетического сходства культур *Lb. acidophilus*, согласно данным М.Ж. Bull et al. (2014) объясняется тем, что вид *Lb. acidophilus* является монофилетичным и характеризуется низким уровнем внутривидового

разнообразия, а коммерческие изоляты очень похожи на уровне геномов. Вероятно, коммерческий успех штаммов *Lb. acidophilus* при производстве пробиотиков и ферментированных молочных продуктов способствовал ведению производителями постоянного контроля качества культур, в результате чего в промышленности использовали генетически стабильные, инвариантные штаммы. Таким образом, коммерческое использование «одомашнило» *Lb. acidophilus* в глобальном масштабе, привело к генетической стабильности, подкреплённой отсутствием экстрахромосомной ДНК и эффективной резистентностью к фагам [12].

В свою очередь, исследуемые культуры *Lb. helveticus* разделились на разные филогенетические группы, что согласуется данными A. Fontana et al. (2019) о неоднородности пангенома *Lb. helveticus*. Это предполагает значительный диапазон фенотипической изменчивости между штаммами, обусловленный наличием штамм-специфических генов. Такая неоднородность связана, вероятно, с адаптацией штаммов *Lb. helveticus* к различным экологическим нишам, таким как кишечник и молочные продукты [13].

**Заключение.** Разрешающая сила того или иного метода генотипирования напрямую связана с вариабельностью используемых маркеров. Метод MLST широко используется как метод дифференцирования близкородственных видов или крупных групп штаммов микроорганизмов. В данной работе для мультилокусного секвенирования использованы 3 пары праймеров (TestGB, Sgro и SrplB), сконструированные к генам «домашнего хозяйства» *gyrB*, *groEL* и *gplB*, которые позволяют достоверно идентифицировать бактерии *Lb. acidophilus* и *Lb. helveticus* и типировать штаммы внутри вида *Lb. helveticus*. Кроме того, праймеры Sgro и SrplB можно использовать для установления подвидов *Lb. delbrueckii*, а использование праймеров TestGB и Sgro позволяет различать близкородственные виды *Lb. gallinarum* и *Lb. helveticus*.

### Список использованных источников

1. Stefanovic, E. Advances in the genomics and metabolomics of dairy *Lactobacilli*: A review / E. Stefanovic, G. Fitzgerald, O. McAuliffe // Food Microbiol., 2017. – Vol. 61 – P. 33-49.
2. Felis, G. E. Taxonomy of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria* / G. E. Felis, F. Dellaglio // Curr Issues Intest Microbio. – 2007. – Vol. 8, № 2. – P. 44-61.
3. Accuracy of species identity of commercial bacterial cultures intended for probiotic or nutritional use / G. Huys [et al.] // Research in Microbiology. – 2006. – Vol. 157, № 9. – P. 803-810.
4. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae* / J. Zheng [et al.] // Int J Syst Evol Microbiol. – 2020. – Vol. 70, № 4. – P. 2782-2858.
5. Molecular diversity within *Lactobacillus helveticus* as revealed by genotypic characterization / G. Giraffa [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 2000. – Vol. 66, № 4. – P. 1259-1265.
6. Gatti, M. Effectiveness of chemometric techniques in discrimination of *Lactobacillus helveticus* biotypes from natural dairy starter cultures on the basis of phenotypic characteristics / M. Gatti, G. Contarini, E. Neviani // Appl Environ Microbiol. – 1999. – Vol. 65, № 4. – P. 1450-1454.

7. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study / W.G. Weisburg [et al.] // J Bacteriol. – 1991. – Vol. 173, № 2. – P. 697-703.
8. Development of a Tiered Multilocus Sequence Typing Scheme for Members of the *Lactobacillus acidophilus* Complex / P. Ramachandran [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 2013. – Vol. 79, № 23. – P. 7220-7228.
9. Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms / M. C. J. Maiden [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1998. – Vol. 95, № 6. – P. 3140-3145.
10. Lifestyles in transition: evolution and natural history of the genus *Lactobacillus* / R. M. Duar [et al.] // FEMS Microbiology Reviews. – 2017. – Vol. 41, № Supp\_1. – P. S27-S48.
11. Goldstein, E. J. C. *Lactobacillus* Species: Taxonomic Complexity and Controversial Susceptibilities / E. J. C. Goldstein, K. L. Tyrrell, D.M. Citron // Clinical Infectious Diseases. – 2015. – Vol. 60, № suppl\_2. – P. S98-S107.
12. The domestication of the probiotic bacterium *Lactobacillus acidophilus* / M. J. Bull [et al.] // Sci Rep, 2014. – Vol. 4 – P. 7202.
13. Genomic Comparison of *Lactobacillus helveticus* Strains Highlights Probiotic Potential / A. Fontana [et al.] // Front. Microbiol, 2019. – Vol. 10 – P. 1380.