

Małgorzata Łyszcz¹, Anna Gałązka^{1*}¹Zakład Mikrobiologii Rolniczej, Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa, Państwowy Instytut BadawczyWpłynęło w listopadzie 2015 r.
Zaakceptowano w lutym 2016 r.

1. Wstęp. 2. Metody klasyczne stosowane do identyfikacji bakterii. 3. Metody molekularne stosowane do identyfikacji mikroorganizmów glebowych. 4. Analiza zawartości zasad G+C w DNA. 5. Hybrydyzacja kwasów nukleinowych. 6. Analiza sekwencji kwasów nukleinowych. 7. Podsumowanie

Selected molecular methods used in assessing the biodiversity of soil organisms

Abstract: Biodiversity and the identification of new important features of microorganisms is crucial for the development of biotechnology. The current knowledge about microbes in natural environments is limited, thus the analysis of the microbial diversity in nature is not an easy task. So far, only a small percentage of prokaryotic microorganisms has been identified. It is believed that the soil environment is one of the richest reservoirs of microorganisms, as approximately 2 000 to 18 000 prokaryotic genomes can be isolated from one gram of soil. In this publication the selected methods used to identify microorganisms are presented. The first molecular marker used in the genetic identification of soil microorganisms was the analysis of the G+C base content, since microorganisms exhibit differences in the (G+C)/(A+T) relative factor. Another method used to identify bacteria is the nucleic acid hybridization. This technique involves a determination of the degree of similarity of DNA-DNA between two organisms. One of the most frequently used hybridization technique is FISH – fluorescent in situ hybridization. The most precise method for analyzing the nucleic acids is sequencing, i.e. determining the order of nucleotides which form the genetic information of the microorganism studied. Very often in molecular studies the 16S rDNA molecule is subjected to sequencing.

1. Introduction. 2. Classical methods used to identify bacteria. 3. Molecular methods used in the identification of soil microorganisms. 4. Analysis of the G+C DNA content. 5. Nucleic acid hybridization. 6. Analysis of nucleic acid sequences. 7. Summary

Słowa kluczowe: bioróżnorodność, hybrydyzacja, sekwencjonowanie, techniki molekularne

Key words: biodiversity, hybridization, sequencing, molecular techniques

1. Wstęp

Dysponujemy wieloma definicjami biologicznej różnorodności, jednak najprościej można określić ją jako całe bogactwo form życia występujących na Ziemi [86]. W 1992 roku na szczycie ONZ w Rio de Janeiro uchwalono Konwencję o Różnorodności Biologicznej (Convention on Biological Diversity, CBD). Pojęcie to definiowane jest jako „różnicowanie wszystkich żywych organizmów pochodzących z ekosystemów lądowych, morskich i innych wodnych oraz zespołów ekologicznych. Dotyczy to różnorodności w obrębie gatunku, pomiędzy gatunkami oraz ekosystemami” [4, 21, 30, 49, 86]. Istnieją trzy aspekty bioróżnorodności, a mianowicie środowisko (ekosystem), gatunki i geny. Różnorodność genetyczna określa różnorodność biologiczną na poziomie molekularnym. Carl Woese [99] schematycznie podzielił wszystkie organizmy żywe są

na trzy domeny: *Archaea*, *Bacteria* i *Eucaryota* dzięki badaniom, które opierały się na analizie sekwencji genu kodującego rybosomalne RNA. Królestwo *Monera* obejmujące dwie domeny: bakterie i archeony sklasyfikowane zgodnie z teorią Woese. Teoria pięciu królestwo koncentruje się na różnorodności gatunkowej, podczas gdy teoria trzech domen koncentruje się na różnorodności genetycznej. Z powodu mikroskopijnych rozmiarów bakterii, trudno jest ocenić ich stopień różnorodności genetycznej, który jest odzwierciedleniem różnorodności cząsteczek budujących komórkę [86]. W dniu 15 maja 2015 roku liczba opisanych i umieszczonych na oficjalnej liście gatunków, obejmujących bakterie i archeony wynosiła 15 974 [58]. Isaac Newton powiedział „Co my wiemy to tylko kropelka. Czego nie wiemy, to cały ocean” [15]. Zgodnie z tym, obecnie poznane gatunki mikroorganizmów stanowią zaledwie niewielki procent różnorodności form żywych.

* Autor korespondencyjny: Zakład Mikrobiologii Rolniczej, Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa, Państwowy Instytut Badawczy, ul. Czartoryskich 8, 24-100 Puławy; tel. 81 478 69 50; e-mail: agalazka@iung.pulawy.pl

Uważa się, że do chwili obecnej udało się scharakteryzować i wyhodować w warunkach laboratoryjnych zaledwie jedną setną lub też dużo mniejszą ilość organizmów prokariotycznych. Jak podaje literatura poznano około 12% bakterii i 5% grzybów [17, 19, 20, 29]. Niska liczba dotychczas sklasyfikowanych mikroorganizmów wynika po pierwsze z trudności w ich izolacji w postaci czystych kultur, a po drugie z ograniczonej wiedzy na temat metod oznaczania genomowych i fenotypowych cech osobniczych [36, 65].

Najbogatszym rezerwuarem mikroorganizmów jest środowisko naturalne ze szczególnym uwzględnieniem gleby. Jeden gram gleby leśnej zawiera szacunkowo 4×10^7 prokariotycznych komórek podczas gdy jeden gram uprawianej gleby i łąki zawiera około 2×10^9 prokariotycznych komórek. Genomowe DNA wyizolowane bezpośrednio z gleby, wskazuje na to, iż w 1 gramie gleby znajduje się około 2 000 do 18 000 genomów prokariotycznych [16, 91, 92].

Gleba jest układem wysoce złożonym i bogatym pod względem liczebności i różnorodności mikroorganizmów. Mikroorganizmy odgrywają kluczową rolę w prawidłowym przebiegu większości procesów zachodzących w glebie m.in. w obiegu podstawowych pierwiastków, rozkładzie ksenobiotyków, przebiegu podstawowych cykli biogeochemicznych. Mikroorganizmy stanowią wysoce zróżnicowaną grupę organizmów żywych, stanowiącą blisko 60% całej ziemskiej biomasy z czego 5×10^{30} komórek występuje w środowisku glebowym. Stanowi to ogromny i nie do końca poznany, bardzo zróżnicowany genetycznie świat drobnoustrojów [35, 68].

Wszystkie wyżej wymienione aspekty oraz genetyczna różnorodność drobnoustrojów glebowych stwarzają duże pole do działania dla mikrobiologów poszukujących nowych szczepów o różnych właściwościach metabolicznych [17, 29].

2. Metody klasyczne stosowane do identyfikacji bakterii

Rozwój technik badawczych umożliwił precyzyjne klasyfikowanie i właściwe identyfikowanie badanych drobnoustrojów. Obecnie taksonomia bakterii oparta jest na badaniach wielokierunkowych, które dotyczą danych uzyskanych z analizy cech fenotypowych, genomowych, a także z analizy filogenetycznej [13, 14, 29, 82, 94].

Dane fenotypowe identyfikacji mikroorganizmów glebowych służą do:

- cech morfologicznych np. kształt czy wynik barwienia metodą Grama;
- cech fizjologicznych i biochemicznych np. zdolność do wzrostu w różnych zakresach pH, obecność lub brak aktywności enzymów;

- danych z analiz serologicznych np. różnice w budowie antygenów rzęskowych, somatycznych i powierzchniowych;
- danych z analiz chemotaksonomicznych np. skład chemiczny ściany komórkowej, skład kwasów tłuszczowych [36, 41, 71, 82, 94].

Z kolei źródłem informacji genomowych są kwasy nukleinowe DNA i RNA, a najczęściej wykorzystywanymi markerami filogenetycznymi są konserwatywne sekwencje DNA: 16S rDNA i 23S rDNA oraz sekwencje genów podstawowych szlaków metabolicznych tj.: *dnaK*, *amoA*, *gyrA*, *rpoD*, *recA* [6, 16, 31, 34, 55, 82, 96, 98].

W badaniach taksonomicznych wykorzystywane są zarówno klasyczne techniki hodowlane jak i techniki molekularne. Obowiązuje określony schemat trójpoziomowej piramidy przedstawiającej trzy etapy obecnie przeprowadzanych badań w identyfikacji drobnoustrojów (rys. 1) [34, 64, 97]. W niniejszej piramidzie wyróżniamy trzy poziomy badań, a każdy kolejny jej poziom dostarcza bardziej szczegółowych informacji i zawęża liczbę izolatów poddawanych analizie [34, 63, 64, 94, 97].



Rys. 1. Trzy etapy badań wykorzystywane w celu ustalenia pozycji taksonomicznej badanych szczepów [34] (zmodyfikowano).

DDH – hybrydyzacja DNA-DNA

Podstawą piramidy są metody przesiewowe tzw. screening. Mają one na celu szybkie zróżnicowanie dużej liczby izolatów mikroorganizmów glebowych i pogrupowanie ich w zależności od stopnia podobieństwa. W tym celu do badań użyte są testy biochemiczne, fizjologiczne oraz metody typowania oparte o analizę DNA [34, 64, 94]. Kolejnym szczeblem piramidy jest ustalenie pozycji filogenetycznej poszczególnych grup (scharakteryzowanych na podstawie poprzedniego poziomu) w oparciu o analizę porównawczą sekwencji genu 16S rRNA. Ostatni etap badań to oznaczenie metodą hybrydyzacji stopnia podobieństwa DNA-DNA i oznaczenie przynależności gatunkowej badanego szczepu [34, 65, 94, 97].

3. Metody molekularne stosowane do identyfikacji mikroorganizmów glebowych

Przez wiele lat identyfikacja mikroorganizmów dotyczyła metod opartych na podłożach hodowlanych [52]. W latach osiemdziesiątych XX wieku wraz z rozwojem technik molekularnych nastąpił intensywny postęp w badaniach z zakresu mikrobiologii. Okazało się, że w przypadku bakterii glebowych jedynie około 0,1% do 1% może wyrosnąć na tradycyjnych podłożach mikrobiologicznych [46, 87, 91].

Znaczna większość aktywnych metabolicznie mikroorganizmów glebowych jest niezdolna do wzrostu w postaci kolonii na selektywnych podłożach agarowych. Szacuje się że zaledwie ok. 1% z 10^9 komórek bakteryjnych występujących w 1 g gleby jest zdolnych do wzrostu na sztucznych podłożach mikrobiologicznych. W latach 90. XX wieku po raz pierwszy w literaturze pojawiło się określenie mikroorganizmów „żywych, lecz niedających się hodować” (VBNC – viable but nonculturable) [31, 64, 65]. Istnieje zatem potrzeba opracowania szybkich, czułych i rzetelnych metod dających możliwość zarówno bezpośredniej oceny pełnego obrazu mikrobiologicznego z pominięciem etapu hodowli, jak i identyfikacji wcześniej wyhodowanego drobnoustroju. Stosowanie bowiem klasycznych metod mikrobiologicznych opartych na analizie cech fenotypowych drobnoustrojów pozwala jedynie na określenie zaledwie 1–10% składu populacji mikroorganizmów glebowych [31].

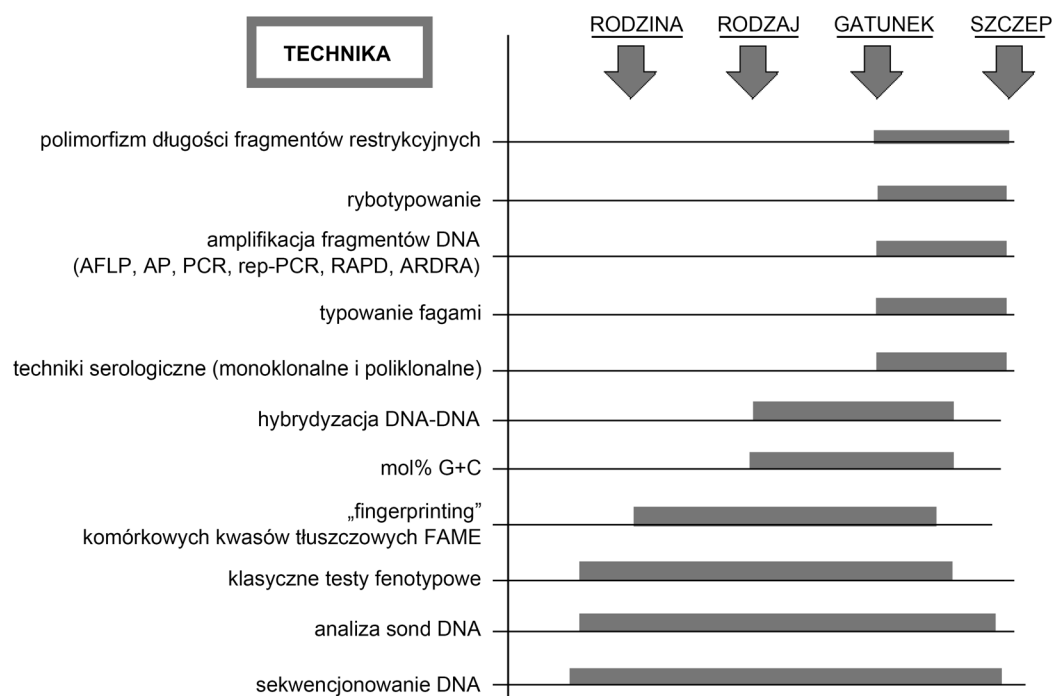
Badanie genomu drobnoustrojów stało się dopełnieniem metod fenotypowych, a nawet nadrzędnym narzędziem w identyfikacji bakterii. Metody geno-

mowe oparte na technologii badań molekularnych, nie zależą od warunków hodowli i są bardziej powtarzalne w porównaniu do metod klasycznej analizy fenotypowej. Dodatkowym aspektem przemawiającym za przewagą metod genomowych jest fakt, iż kwasy nukleinowe występują u wszystkich żywych organizmów [36, 82, 94].

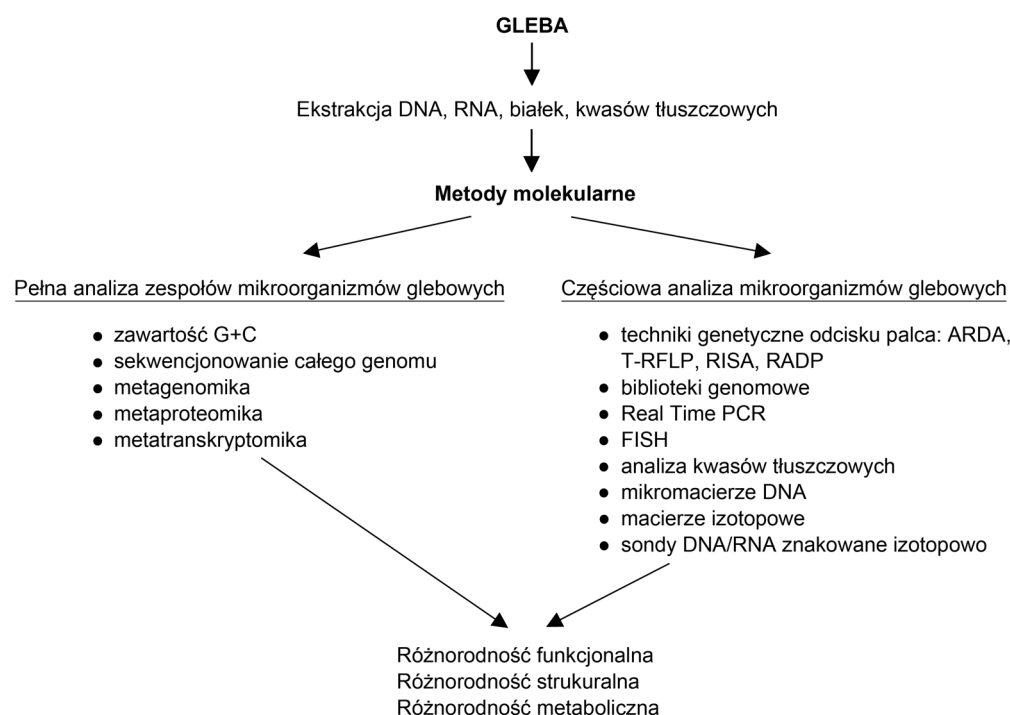
U podstaw metod molekularnych leży detekcja makrocząsteczek (kwasów nukleinowych, białek, kwasów tłuszczowych) występujących w organizmach żywych [31]. Dodatkową zaletą tych metod jest możliwość bezpośredniej ekstrakcji tych cząstek z gleby, bez konieczności hodowli mikroorganizmów. Ilościowe lub jakościowe zmiany w obrębie tych cząsteczek świadczą o bezpośrednich zmianach w zespołach mikroorganizmów w reakcji na biotyczne i abiotyczne czynniki środowiska [31, 65].

Wykorzystywane w identyfikacji drobnoustrojów glebowych metody molekularne charakteryzują się zróżnicowaną rozdzielczością, czyli umożliwiają klasyfikowanie szczepów na różnych poziomach taksonomicznych tzn. od szczepu, przez gatunek do rodzaju i rodziny. Przykładowo sekwencjonowanie rDNA pozwala przyporządkować szczep do rodzaju, hybrydacja DNA-DNA klasyfikuje do rangi gatunku, a w obrębie gatunku szczepy różnicuje się w oparciu np. o polimorfizm długości amplifikowanych fragmentów restrykcyjnych (AFLP – Amplified Fragment Length Polymorphism), (rys. 2) [13, 94].

Na przełomie ostatnich dziesięcioleci obserwuje się ogromny postęp w ocenie zróżnicowania drobnoustrojów. Jest to związane z intensywnym rozwojem szeregu



Rys. 2. Rozdzielczość metod stosowanych w identyfikacji bakterii [94], zmodyfikowano



Rys. 3. Metody molekularne stosowane w analizie zróżnicowania genetycznego mikroorganizmów glebowych [31]

zaawansowanych metod diagnostycznych opartych na analizie kwasów nukleinowych. Metody te umożliwiają charakterystykę mikroorganizmów na poziomie funkcjonalnym i filogenetycznym. Metody molekularne stosowane w analizie mikroorganizmów glebowych umożliwiają pełną analizę zespołu mikroorganizmów lub też częściową analizę charakterystycznej puli drobnoustrojów w oparciu o wybrane geny metabolizmu podstawowego (rys. 3) [31].

4. Analiza zawartości zasad G+C w DNA

W DNA występują cztery zasady azotowe: dwie puryny: adenina (A) i guanina (G) oraz dwie pirymidyny: cytozyna (C) i tymina (T), których kolejność wyznacza informację genetyczną zawartą w genomie danego mikroorganizmu [82]. Określenie zawartości zasad guaniny i cytozyny (G+C) w DNA było jedną z pierwszych metod molekularnej charakterystyki mikroorganizmów [6, 26, 56, 90]. W połowie XX wieku opisano reguły dotyczące składu nukleotydowego DNA tzw. reguły Chargraffa [10]. Z przeprowadzonych badań wynikało, że: suma puryn (adenina – A i guanina – G) równa się sumie pirymidyn (cytozyna – C i tymina – T), stosunek molarny adeniny do tyminy równa się 1, a guaniny do cytozyny także wynosi 1, czyli zasady azotowe występujące w DNA znajdują się w równoważnych ilościach: stosunek A:T = 1 oraz G:C = 1 [10, 12, 28, 82].

Jednakże, względny współczynnik (G+C)/(A+T) wykazuje różnice w stosunku do badanych mikroorga-

nizmów, a dla danego gatunku jest on stały. Zawartość zasad G+C wyrażana jest w mol% a oblicza następującego wzoru [6, 82]:

$$\text{mol\% G+C} = \frac{\text{mol (G+C)}}{\text{mol (A+T+C+G)}} \times 100\%$$

Różnice zawartości zasad guaniny i cytozyny (G+C). jest wykorzystywana do badania różnorodności mikroorganizmów środowisk glebowych [48, 70]. W DNA prokaryota zawartość G+C waha się w granicach od 25 mol% do 75 mol% [26, 90]. Z gleby uprawnej zawierającej 2,3% substancji organicznej i 12% łu wyizolowano DNA różniący się zawartością zasad G+C, po czym porównano te wartości do znanych rodzajów drobnoustrojów glebowych i określono, iż zawartość zasad G+C równa 65% oznacza, że w glebie znajdowały się bakterie nie należące do rodzajów *Arthrobacter*, *Agrobacterium* i *Pseudomonas*, 69% wskazuje na *Streptomyces*, z kolei 45% wyróżnia *Bacillus* i *Streptococcus* [73]. Natomiast Nusslein i Tiedje [70] analizowali bioróżnorodność pastwisk i gleb leśnych używając metody określenia zawartości zasad G+C w połączeniu z techniką ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) i sekwencjonowaniem rDNA. Każda z zastosowanych metod pokazała, iż rośliny mają duży wpływ na kształtowanie się drobnoustrojów w środowisku glebowym. Autorzy stwierdzili, że wszystkie trzy metody badań społeczności mikroorganizmów charakteryzowały się innym poziomem rozdzielczości oraz, że metody te tworzą komplementarną grupę testów do dokładnego badania mikrobiologicznej różnorodności [29, 48].

Przyjęto, że organizmy ściśle ze sobą spokrewnione różnią się zawartością zasad G+C od 3 do 5 mol%, co wskazuje, że należą do tego samego gatunku [48, 56, 64, 65, 70, 82]. Natomiast w obrębie rodzaju różnica ta nie może przekraczać 10 mol% [64, 65, 82]. Teoretycznie im większa różnica w zawartości zasad G+C w DNA między dwoma organizmami, tym mniej są one ze sobą powiązane. Jednakże, należy zauważyć, że jakiegokolwiek różnice w mol% G+C są ważne w taksonomicznym określaniu grup, to podobieństwo zawartości zasad G+C niekoniecznie wskazuje na bliskie pokrewieństwo organizmów, ponieważ w oznaczeniach nie brane są po uwagę liniowe sekwencje w cząsteczkach. Z kolei niektóre rodzaje jak np. *Clostridium* (21–54 mol%) i *Bacillus* (32–69 mol%) wykazują dużą rozpiętość zawartości zasad G+C [6, 64, 65, 82]. Aspektem przemawiającym za metodą oznaczania zawartości zasad G+C jest fakt, że jest to analiza niezależna od techniki PCR, obejmuje cały wyizolowany DNA oraz jest to metoda ilościowa, która pozwala wykryć unikalne gatunki drobnoustrojów, jednak wymagane są duże ilości wyizolowanego genomowego DNA (do 50 µg) [26, 29, 56, 90].

5. Hybrydyzacja kwasów nukleinowych

Hybrydyzacja DNA jest miarą stopnia złożoności genetycznej drobnoustrojów i jest stosowana w celu oszacowania bioróżnorodności mikroorganizmów [91]. Hybrydyzacja kwasów nukleinowych to proces łączenia dwóch nici DNA lub RNA-DNA na podstawie komplementarności zasad. W metodzie oznaczania stopnia podobieństwa DNA-DNA pomiędzy dwoma organizmami wykorzystuje się właściwości fizykochemiczne dwuniciowych kwasów nukleinowych. Wiązania wodorowe w dwuniciowej cząsteczce kwasu nukleinowego mogą ulec rozerwaniu. Dwie nici mogą być rozdzielone do form jednoniciowych drogą denaturacji (wysoką temperaturą) lub w warunkach alkalicznego pH. Reakcja ta jest odwracalna, tzn. pojedyncze nici mogą ponownie zostać połączone (reasocjacja) na zasadzie komplementarności nukleotydów po powrocie do optymalnej temperatury (rys. 4) [63, 82]. Warunkiem reasocjacji jednoniciowych cząsteczek jest fakt, że różnica w sekwencji nukleotydowej nie może być większa niż 20% – a więc musi być spełniony warunek identyczność sekwencji sięgającej przynajmniej 80% [13, 63, 82].

W doświadczeniach, w których przeprowadzana jest hybrydyzacja dwóch cząsteczek, jedna z nich jest wyznakowana i tworzy tzw. sondę molekularną, która służy do identyfikacji sekwencji komplementarnych w materiale genetycznym wyizolowanym z mikroorganizmów. Sondy najczęściej znakuje się fluorescencyjnie np. fluoresceiną lub rodaminą ale, także można znakować radioaktywnym izotopem np. ³²P

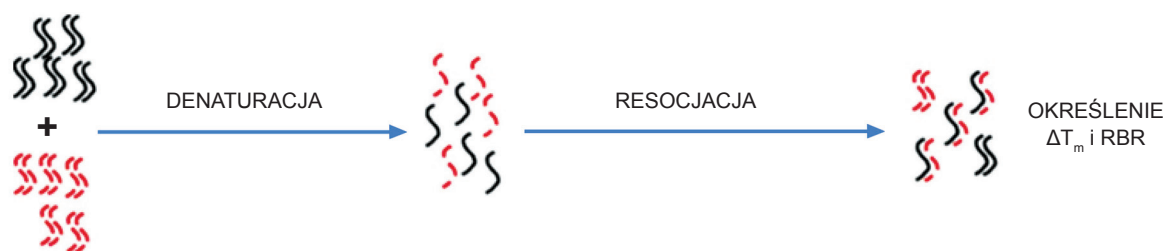
lub ³H lub nieradioaktywnie np. digoskygeniną [6, 25, 27, 40, 73, 85, 89].

Wszystkie techniki hybrydyzacyjne używane do określania względnego podobieństwa drobnoustrojów, pomimo różnic metodycznych opierają się na tych samych podstawach. Izolaty DNA pochodzące z próbek środowiskowych miesza się ze sobą i denaturuje w celu uzyskania jednoniciowych struktur DNA. W ściśle określonych warunkach reakcji następuje reasocjacja i tworzenie cząsteczek hybrydowych. Im wyższe podobieństwo genetyczne dwóch badanych organizmów, tym więcej mają one wspólnych sekwencji nukleotydowych, a co za tym idzie powstaje więcej struktur hybrydowych. Porównanie wyników uzyskanych dla heterodupleksów z tymi dla referencyjnego DNA (homodupleksu), daje nam stopień podobieństwa DNA-DNA [27, 82, 89].

Wyróżniamy dwa główne parametry, które służą do pomiaru stopnia podobieństwa cząsteczek DNA: RBR oraz ΔT_m .

- RBR (Relative Binding Ratio – względny współczynnik wiązania) to wskaźnik ilości heterodupleksów względem homodupleksów, które są wzorcem 100% reasocjacji.
- ΔT_m (różnica w temperaturze denaturacji termicznej dupleksów) to wskaźnik stabilności termicznej dupleksów DNA, czyli jest to różnica w temperaturze denaturacji homodupleksów i heterodupleksów. Stopień denaturacji DNA zależy od zawartości w nim zawartości G+C, siły jonowej roztworu oraz temperatury. Wartość T_m wskazuje na temperaturę, przy której 50% DNA znajduje się w stanie denaturowanym [39, 64, 82].

Hybrydyzacja genomowego DNA jest podstawą do klasyfikacji mikroorganizmów do rangi gatunku [64, 82]. Do jednego gatunku genomowego zaliczamy szczepy o wartości hybrydyzacji 70% i więcej oraz charakteryzujące się ΔT_m mniejszą niż 5°C [20, 82, 94, 97]. Metodą hybrydyzacji oceniono różnorodność drobnoustrojów w 1 gramie różnych gleb i oszacowano ją na poziomie od 500 tysięcy do nawet 10 milionów genomów organizmów prokariotycznych [33]. Obecnie stosowanych jest kilka technik hybrydyzacji DNA-DNA, m.in. wprowadzona w latach 70. XX wieku hybrydyzacja w roztworze tzw. metoda De Ley'a, czy opisana pod koniec lat 80. metoda hybrydyzacji DNA wyznakowanego np. biotyną z DNA związanym kowalencyjnie do powierzchni specjalnej mikro płytki [18, 25, 63]. Hybrydyzacja może być również przeprowadzona na poziomie komórkowym i może być wykonana *in situ*. Ta metoda dostarcza cennych informacji dotyczących rozkładu przestrzennego mikroorganizmów w próbkach środowiskowych [42]. Jednym z najbardziej popularnych sposobów hybrydyzacji DNA jest technika FISH (fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ*



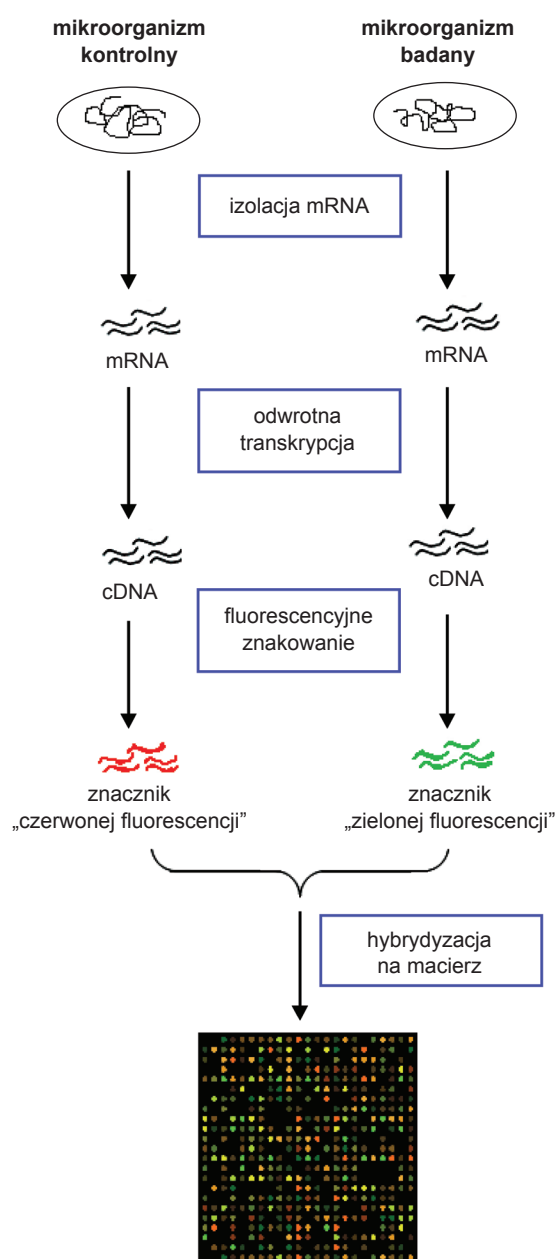
Rys. 4. Schemat przedstawiający hybrydyzację kwasów nukleinowych [82] (zmodyfikowano)

– fluorescent in situ hybridization). Za pomocą techniki FISH możemy określać rozkład przestrzenny bakterii w różnych środowiskach, takich jak np. biofilm [85]. Ograniczeniem hybrydyzacji FISH jest fakt, że bezpośrednio badanie próbek środowiskowych wyka-

zuje niską czułość. Związane jest to z obecnością małej liczby kopii sekwencji pochodzących z gatunków dominujących, które prawdopodobnie nie zostaną wykryte. Rozwiązaniem problemu jest technika PCR, gdzie DNA uzyskany bezpośrednio ze środowiska będzie stanowił matrycę w reakcji PCR i zostanie zamplifikowany [48].

W identyfikacji mikroorganizmów i badaniu bioróżnorodności coraz częściej używa się metody łączącej hybrydyzację DNA-DNA z mikromacierzami DNA z ang. microarray (inaczej DNA chip). Metoda mikromacierzy DNA opiera się na klasycznych technikach hybrydyzacyjnych używanych do analizy ekspresji genów. Wyznakowana próbka (badany materiał mikrobiologiczny) jest umieszczana na płytce zawierającej sondy DNA o znanej sekwencji nukleotydowej. Następnie płytka taka poddawana jest skanowaniu przez czytnik laserowy, co w efekcie daje punkty świecące z różną intensywnością co spowodowane jest występowaniem charakterystycznych sond dla określonych genów. Następnym etapem jest przyporządkowanie każdemu punktowi liczby określającej natężenie fluorescencji. Uzyskane w ten sposób dane liczbowe poddawane są analizie bioinformatycznej [5, 11, 44, 56, 62].

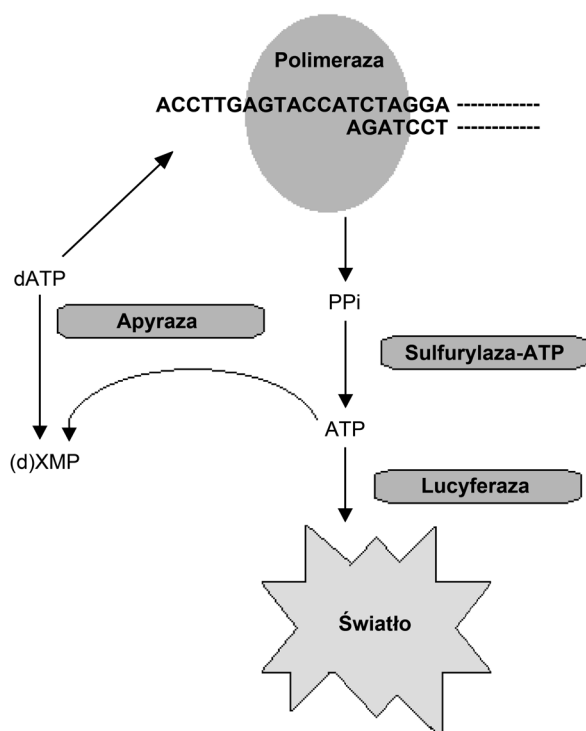
Mikromacierze DNA określane są jako uporządkowane zbiory fragmentów genów (sond molekularnych) (rys. 5). Zbiory te występują w postaci jednoniciowych odcinków DNA, charakteryzujących się różną długością, skorelowaną z typem mikromacierzy [44]. Mikromacierze zbudowane są z kilku tysięcy punktów unieruchomionych w określonych miejscach na podłożu, z których każdy zawiera fragmenty DNA, czyli pojedyncze sondy. Obecnie używane technologie wytwarzania mikromacierzy zawierają sondy oligonukleotydowe lub sondy cDNA [44, 56, 62, 100]. Technika ta umożliwia porównanie profili ekspresji genów komórek, tkanek, organizmów pod wpływem różnych czynników. Metoda charakteryzuje się możliwością jednoczesnego analizowania tysięcy genów [22, 62, 84]. Mikromacierze mogą posiadać charakterystyczne geny tzw. tarcze w postaci np. reduktazy azotanowej czy też nitrogenazy, dzięki czemu możliwe jest precyzyjne określenie różnorodności mikrobiologicznej. Macierze mogą, także zawierać fragmenty DNA, pochodzące od referencyjnych gatunków występujących w próbkach środowiskowych [38, 56].



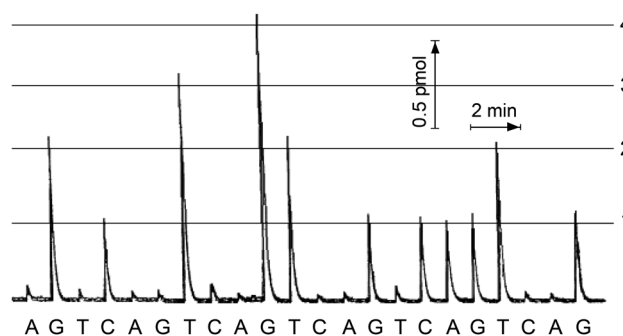
Rys. 5. Schemat techniki z wykorzystaniem mikromacierzy [5, 95] (zmodyfikowano)

6. Analiza sekwencji kwasów nukleinowych

Sekwencjonowaniem nazywamy ustalenie kolejności nukleotydów, które stanowią informację genetyczną o badanym organizmie, o budowie genów ich funkcjonowaniu oraz o regulacji ich ekspresji [53]. Genom spełnia kluczową rolę w funkcjonowaniu organizmu, a jego znajomość ma decydujący wpływ na rozwój wielu dziedzin nauki. Duże znaczenie analizy sekwencyjnej odzwierciedla się w wzrastającym rozwoju technik sekwencjonowania. Metody sekwencjonowania bazują zasadniczo na dwóch metodach: metodzie terminacji łańcucha zwanej inaczej dideoksy sekwencjonowaniem i metodzie Maxama i Gilberta opartej na chemicznej degradacji DNA [54, 66, 75, 79, 83]. Wiele grup badawczych na całym świecie prowadziło badania na rzecz rozwoju alternatywnych zasad sekwencjonowania DNA. Trzy metody, które wydają się być bardzo obiecujące to sekwencjonowanie przez hybryzację [47, 72], sekwencjonowanie oparte równolegle na ligacji i rozszczepieniu [9] oraz pirosekwencjonowanie [80, 81]. Stosunkowo nową ale powszechnie stosowaną technologią oznaczania sekwencji kwasów nukleinowych jest pirosekwencjonowanie [79] (rys. 6). Metoda ta nazywana jest też sekwencjonowaniem w czasie rzeczywistym. Podstawą metody jest pomiar ilości pirofosforanu (PP_i), uwalnianego w momencie wbudowywania komplementarnej zasady do nowosyntetyzowanej nici DNA. Detekcji dokonuje się pośrednio, poprzez rejestrację sygnału świetlnego, będącego wynikiem serii



Rys. 6. Schemat procedury pirosekwencjonowania, X – jeden z czterech nukleotydów [80, 81], zmodyfikowano



Rys. 7. Przykładowy pyrogram [80], zmodyfikowano

reakcji enzymatycznych. Reakcja przeprowadzana jest w obecności specyficznego startera i czterech enzymów: fragmentu Klenowa polimerazy DNA, sulfurylaza ATP, lucyferazy i apyrazy oraz substratów (dNTP). Sulfurylaza ATP katalizuje przekształcenie PP_i w ATP w obecności adenosyno-5'-fosfościarczanu. ATP przy udziale lucyferazy indukuje konwersję lucyferyny do oksylucyferyny czego efektem jest emisja światła o natężeniu proporcjonalnym do liczby wbudowywanych nukleotydów. Jest ono rejestrowane przez kamerę CCD i uwidaczniane w postaci pyrogramu. Ostatni etap to degradacja nadmiaru dNTP i ATP przez apyrazę (rys. 6 i rys. 7) [3, 7, 27, 43, 53, 79, 88].

Dzięki szybkiemu postępowi w analizie bioinformatycznej, informacje uzyskane z metod sekwencjonowania, każdy badacz może przeanalizować samodzielnie wykorzystując powszechnie dostępne bazy danych, w których zgromadzono sekwencje genomowe organizmów. Istnieją dwa główne serwery, w których przechowywane są sekwencje genomowe: europejski EMBL oraz amerykański GenBank [34, 69]. Obecnie obserwujemy wykładniczy wzrost liczby kompletnie zsekwencjonowanych genomów. Na początku 2015 roku liczba zsekwencjonowanych genomów wynosiła 63 170 (wg bazy danych GOLD) w tym z królestwa (domeny) *Archaea* – 1 078, *Bacteria* – 45 076, *Eukaryota* – 9 059 [45, 60]. Zsekwencjonowane zostały także genomy bakterii glebowych. W pełni poznany jest chociażby genom *Bradyrhizobium* sp. BTAi1, *Bradyrhizobium* sp. ORS278, *Pseudomonas putida* F1, *Pseudomonas stutzeri* A1501, *Sinorhizobium meliloti* 1021, *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 3841, *Nitrosomonas eutropha* C91, *Bacillus subtilis* TPK 210909 [45].

Porównawcza charakterystyka (molekularna) izolatów bakterii i dokładna ich identyfikacja jest jednym z głównych problemów w mikrobiologii. Dla wielu gatunków mikroorganizmów technika MLST – Multilocus Sequence Typing uważana jest za „złoty standard” [57, 74]. Metoda ta polega na analizie zazwyczaj siedmiu sekwencji genów metabolizmu podstawowego (housekeeping genes) rozproszonych na chromosomie i powszechnie występujących u wszystkich badanych

organizmów. Technika ta charakteryzuje się bardzo wysoką powtarzalnością, ponieważ opiera się na analizie zmian (mutacji punktowych) w sekwencji nukleotydowej genów metabolizmu podstawowego [1, 23, 61, 93]. Sekwencje każdego fragmentu są porównywane ze wszystkimi wcześniej zidentyfikowanymi sekwencjami (allelami) w tym *locus* [1]. Allele siedmiu *loci* tworzą profil alleliczny, a następnie typ sekwencyjny ST (Sequence Type). Technika MLST pozwoliła utworzyć dwie główne sieci ogólnodostępnych międzynarodowych baz danych znajdujących się w Imperial College w Londynie [67] i Oxford University [1, 24, 76].

Badania nad identyfikacją mikroorganizmów dotyczą, także pomiaru średniego podobieństwa sekwencji nukleotydowych ANI (Average Nucleotide Identity) pomiędzy wspólnymi genami dwóch szczepów, których genom został zsekwencjonowany [51]. Szczepy z co najmniej 95% ANI należą do tego samego gatunku. Parametr ten jest rzetelnym i niezawodnym kryterium określania pokrewieństwa mikroorganizmów. Technika ANI jest wyjątkowo czułą metodą pomiaru ewolucyjnego pokrewieństwa pomiędzy ściśle spokrewnionymi szczepami bakterii, czyli takimi, które wykazują większe niż 60% ANI, większy niż 97% stopień identyczności sekwencji genu 16S rRNA [50, 51]. W badaniach Gorisa i wsp. stwierdzono zbieżność 95% ANI i 70% DDH (hybrydyzacja DNA-DNA, ponadto wykazano, że parametr ANI wskazuje największą korelację z wartościami DDH, spośród kilku badanych parametrów [37].

Analiza sekwencji rRNA jest jednym z najczęściej stosowanych parametrów umożliwiających ustalenie powiązań filogenetycznych pomiędzy mikroorganizmami [94]. Część rRNA spełnia jednocześnie kilka ważnych kryteriów, a mianowicie występuje powszechnie u wszystkich badanych organizmów, jest funkcjonalnie stała (wchodzi w skład rybosomu, którego podstawową funkcją jest synteza białka), zawiera domeny konserwowane i zmienne oraz posiada odpowiednią wielkość, niosącą wystarczającą ilość informacji [64, 82, 94]. W ciągu ostatnich 25 lat, metody obejmujące analizę rRNA lub geny kodujące rRNA (rDNA) zrewolucjonizowały taksonomię organizmów prokariotycznych [82]. Rybosomy *Procaroyota* zbudowane są z trzech typów rRNA o stałych sedymentacji 5S rRNA (120 nukleotydów), 16S rRNA (1 650 nukleotydów) i 23S rRNA (3 300 nukleotydów) [8, 82]. Obecnie ze względu na niewielką ilość informacji genetycznej niesionej przez cząsteczkę 5S rRNA nie jest ona stosowana przy identyfikacji mikroorganizmów. Sekwencjonowanie cząsteczki 23S rRNA ze względu na jej wielkość, także nie jest powszechnie stosowane w analizach filogenetycznych. Natomiast sekwencjonowanie cząsteczki 16S rRNA stało się obecnie standardem w badaniach taksonomicznych bakterii [94]. Bazy danych zawierające znaczne ilości

sekwencji 16S rDNA z pewnością przyczyniły się do częstego stosowania tego markera w badaniach porównawczych mikroorganizmów [82, 94]. Przykładowo na stronie internetowej Ribosomal Database Project *Relasae* zgromadzono 3 224 600 sekwencji 16S rDNA bakterii i archeonów (stan na dzień 26 maj 2015 rok) [78]. Jednakże istnieją pewne ograniczenia w zastosowaniu genu 16S rDNA w identyfikacji mikroorganizmów. Należy pamiętać, że ze względu na wolne tempo ewolucji, które charakteryzuje 16S rDNA, że nie powinna być stosowana do klasyfikacji blisko spokrewnionych organizmów [59, 94]. Dodatkowym problemem może być fakt, że genomy bakteryjne mogą zawierać kilka kopii genów rDNA, które w obrębie jednego organizmu mogą różnić się sekwencją np. u *Sinorhizobium meliloti* 1021 i *Rhizobium etli* CFN42 jest ich trzy [2, 64]. Gdy stopień podobieństwa sekwencji 16S rDNA dwóch szczepów wynosi przynajmniej 95%, wówczas organizmy zaliczane są do tego samego rodzaju. Z kolei, gdy identyczność sekwencji 16S rDNA wynosi więcej niż 97%, wówczas organizmy można uznać za ten sam gatunek [13, 77, 82, 94].

7. Podsumowanie

W pracy przedstawiono wybrane metody molekularne wykorzystywane do badań mikroorganizmów glebowych. Analiza bioróżnorodności środowiska glebowego jest ważna nie tylko dla podstawowych badań naukowych, ale także dla badań dotyczących poszukiwania nowych szczepów. Liczba dotychczas zidentyfikowanych mikroorganizmów jest niska. Ograniczeniem w klasyfikacji drobnoustrojów są problemy w izolacji w postaci czystych kultur i ograniczona wiedza na temat cech fenotypowych i genomowych. Metody molekularne stosowane w identyfikacji drobnoustrojów glebowych mają przewagę nad klasycznymi metodami fenotypowymi, ponieważ są niezależne od warunków hodowli, są bardziej powtarzalne i czułe. Genomika w sposób znaczący weryfikuje dotychczasową analizę bioróżnorodności oraz rozbudza olbrzymie nadzieje na dotarcie do mikroorganizmów niehodowanych. Wykorzystywane metody molekularne umożliwiają klasyfikowanie szczepów. I tak analiza zawartości zasad G+C wyznacza granice gatunku, podobnie jest w przypadku metody hybrydyzacji. Sekwencjonowanie DNA pozwala różnicować szczepy od gatunku przez rodzaj, aż do rodziny. Natomiast analiza sekwencji 16S rRNA umożliwia klasyfikację mikroorganizmów na poziomie gatunku i rodzaju. Postęp technologiczny i malejące koszty analiz genomowych są czynnikiem zachęcającym do coraz powszechniejszego stosowania metod molekularnych. Wyzwaniem dla mikrobiologów jest udoskonalanie i rozpowszechnienie metod genomowych.

Podziękowania

Opracowanie wykonano w ramach realizacji zadania I.4. *Ocena i kształtowanie bioróżnorodności środowiska glebowego oraz aktywności mikrobiologicznej gleb z uwzględnieniem różnych warunków siedliskowych i systemów gospodarowania*. Program Wieloletni IUNG-PIB na lata (2016–2020).

Piśmiennictwo

- Aanensen D.M., Spratt B.G.: The multilocus sequence typing network: mlst.net. *Nucleic Acids Res.* **33**, 728–733 (2005)
- Acinas S.G., Marcelino L.A., Klepac-Ceraj V., Polz M.F.: Divergence and redundancy of 16S rRNA sequences in genomes with multiple rrn operons. *J. Bacteriol.* **186**, 2629–2635 (2004)
- Ahmadian A., Ehn M., Hober S.: Pyrosequencing: History, biochemistry and future. *Clin. Chim. Acta*, **363**, 83–94 (2006)
- Andren O., Bengtsson J., Clarholm M.: Biodiversity and species redundancy among litter decomposers (w) *The Significance and Regulation of Soil Biodiversity*, red. H.P. Collins, G.P. Robertson, M.J. Klug, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1995, s. 141–151
- Babu M.M.: An Introduction to Microarray Data Analysis (w) *Computational Genomics: Theory and Application*, red. R.G. Grant, Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, UK, 2004, s. 225–249
- Baj J., Markiewicz Z.: Pozycja filogenetyczna bakterii i zasady ich taksonomii (w) *Biologia molekularna bakterii*, K. Mostowik, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2006, s. 4–18
- Benkovic S.J., Cameron C.E.: Kinetic analysis of nucleotide incorporation and disincorporation by Klenow fragment of *Escherichia coli* DNA polymerase I. *Method. Enzymol.* **262**, 257–269 (1995)
- Biodiversity and Microorganisms, http://csls-text3.c.u-tokyo.ac.jp/inactive/01_08.html (19.10.2015)
- Brenner, S., Albrecht G. i wsp.: *In vitro* cloning of complex mixtures of DNA on microbeads: Physical separation of differentially expressed cDNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**, 1665–1670 (2000)
- Chargraff E.: *The Miracle of Complementarity* (w) *Heraclitean Fire: Sketches from a Life Before Nature*, The Rockefeller University Press, New York, 1978, s. 96
- Cho J.C., Tiedje J.M.: Bacterial species determination from DNA-DNA hybridization by using genome fragments and DNA microarrays. *Appl. Environ. Microb.* **67**, 3677–3682 (2001)
- Choraży M.: Gen strukturalny – ewolucja pojęcia i dylematy. *Nauka*, **3**, 57–108 (2009)
- Coenye T., Gevers D., Van de Peer Y., Vandamme P., Swings J.: Towards a prokaryotic genomic taxonomy. *FEMS Microbiol. Rev.* **29**, 147–167 (2006)
- Colwell R.R.: Polyphasic Taxonomy of the Genus *Vibrio*: Numerical Taxonomy of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and Related *Vibrio* Species. *J. Bacteriol.* **104**, 410–433 (1970)
- Cytaty.info, <http://www.cytaty.info/autor/isaacnewton.htm> (19.10.2015)
- Daniel R.: The metagenomics of soil. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 470–478 (2005)
- Daniel R.: The soil metagenome – a rich resource for the discovery of novel natural products. *Curr. Opin. Microbiol.* **15**, 199–204 (2004)
- De Ley, J., Cattoir, H., Reynaerts, A.: The quantitative measurement of DNA hybridization from renaturation rates. *Eur. J. Biochem.* **12**, 133–142 (1970)
- DeLong E.F., Pace N.R.: Environmental diversity of Bacteria & Archaea. *Systematic Biol.* **50**, 1–9 (2001)
- Dykhuizen D.E.: Santa Rosalia revisited: why are there so many species of bacteria? *Anton. van Leeuw. J. Microb.* **73**, 25–33 (1998)
- Dz.U. 2002 Nr 184, poz. 1532, Konwencja o różnorodności biologicznej sporządzona w Rio de Janeiro dnia 5 czerwca 1992 r. (Dz.U. z dnia 6 listopada 2002 r.)
- Eisen M.B., Brown P.O.: DNA arrays for analysis of gene expression. *Method. Enzymol.* **303**, 179–205 (1999)
- Enright M.C., Spratt B.G.: A multilocus sequence typing scheme for *Streptococcus pneumoniae*: identification of clones associated with serious invasive disease. *Microbiology*, **144**, 3049–3060 (1998)
- Enright M.C., Spratt B.G.: Multilocus sequence typing. *Trends Microbiol.* **7**, 482–487 (1999)
- Ezaki, T., Hashimoto, Y., Yabuuchi, E.: Fluorometric deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization in microdilution wells as an alternative to membrane later hybridization in which radioisotopes are used to determine genetic relatedness among bacterial strains. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **39**, 224–229 (1989)
- Fakruddin M., Mannan K.S.B.: Methods for Analyzing Diversity of Microbial Communities in Natural Environments. *Ceylon J. Sci.* **42**, 19–33 (2013)
- Fakruddin M., Mazumdar M.R., Chowdhury A., Hossain N., Mahajan S., Islam S.: Pyrosequencing – A Next Generation Sequencing Technology. *World Appl. Sci. J.* **24**, 1558–1571 (2013)
- Forsdyke D.R., Mortimer J.R.: Chargaff's legacy, *Gene*, **261**, 127–137 (2000)
- Frąc M., Jezierska-Tys S.: Różnorodność mikroorganizmów środowiska glebowego. *Post. Mikrobiol.* **40**, 47–58 (2010)
- Gabryelska M.M., Szymański M., Barciszewski J.: DNA – cząsteczka, która zmieniła naukę. Krótka historia odkryć. *Nauka*, **2**, 111–134 (2009)
- Gałązka A.: From basic research to practical applications in soil study” ISBN 978-83-933173-8-7 “Advantages and limitations of molecular-based methods used for bacterial diversity in soils contaminated with PAH's” pp. 455–472 (2011)
- Gałązka A., Gawryjolek K.: Glomalina – glikoproteina produkowana przez grzyby mykoryzy arbuskularnej. *Post. Mikrobiol.* **54**, 331–343 (2015)
- Gans J., Wolinsky M., Dunbar J.: Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. *Science*, **309**, 1387–1390 (2005)
- Gevers D., Dawyndt P., Vandamme P., Willems A., Vancanneyt M., Swings J., De Vos P.: Stepping stones towards a new prokaryotic taxonomy. *Philos. T.R. Soc. B.* **361**, 1911–1916 (2006)
- Giller K.E., Beare M.H., Lavelle P., Izac A.M.N., Swift M.J.: Agricultural intensification, soil biodiversity and agroecosystem function. *Appl. Soil Ecol.* **6**, 3–16 (1997)
- Goodfellow M., O'Donnell A.G.: Roots of bacterial systematic (w) *Handbook of New Bacterial Systematics*, red. M. Goodfellow, A.G. O'Donnell, Academic Press, Harcourt Brace & Company, Publishers, London, 1993, s. 3–54
- Goris J., Konstantinidis K.T., Klappenbach J.A., Coenye T., Vandamme P., Tiedje J.M.: DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**, 1: 81–91 (2007)
- Greene E.A., Voordouw G.: Analysis of environmental microbial communities by reverse sample genome probing. *J. Microbiol. Meth.* **53**, 211–219 (2003)
- Grimont P.A.D., Popoff M.Y., Grimont F., Coynault C., Lemin M.: Reproducibility and correlation study of three deoxyribonucleic acid hybridization procedures. *Curr. Microbiol.* **4**, 325–330 (1980)

40. Guo C., Sun W., Harsh J.B., Ogram A.: Hybridization analysis of microbial DNA from fuel oil-contaminated and noncontaminated soil. *Microb. Ecol.* **34**, 178–187 (1997)
41. Gupta R.S.: Protein Phylogenies and Signature Sequences: A Reappraisal of Evolutionary Relationships among *Archaeobacteria*, *Eubacteria*, and *Eukaryotes*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 1435–1491 (1998)
42. Head I.M., Saunders J.R., Pickup R.W.: Microbial evolution, diversity and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microb. Ecol.* **35**, 1–21 (1998)
43. Hyman E.D.: A new method of sequencing DNA. *Anal. Biochem.* **174**, 423–436 (1988)
44. Jaros S.: Mikromacierze DNA i ich wykorzystanie w parazytologii i medycynie. *Wiad. Parazytol.* **52**, 13–29 (2006)
45. JGI GOLD, Joint Genome Institute Genomes Online Database, <https://gold.jgi-psf.org> (19.10.2015)
46. Kellenberger E.: Exploring the unknown: the silent evolution of microbiology. *EMBO Rep.* **2**, 5–7 (2001)
47. Khrapko K.R., Lysov Yu. P., Khorlyn A.A., Shick V.V., Florentiev V.L., Mirzabekov A.D.: An oligonucleotide hybridization approach to DNA sequencing. *FEBS Lett.* **256**, 118–122 (1989)
48. Kirk J.L., Beaudette L.A., Hart M., Moutoglou P., Klironomos J.N., Lee H., Trevors J.T.: Methods of studying soil microbial diversity. *J. Microbiol. Meth.* **58**, 169–188 (2004)
49. Klimek B., Stefanowicz A.M., Woch M.W., Jaźwa M.: Czy istnieje związek między bioróżnorodnością roślin i mikroorganizmów glebowych? *Kosmos*, **59**, 589–598 (2010)
50. Konstantinidis K.T., Ramette A., Tiedje J.M.: The bacterial species definition in the genomic era. *Philos. T.R. Soc. B.* **361**, 1929–1940 (2006)
51. Konstantinidis K.T., Tiedje J.M.: Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 2567–2572 (2005)
52. Kozdrój J.: Metagenom – źródło nowej informacji o mikroorganizmach glebowych. *Post. Mikrobiol.* **52**, 185–200 (2013)
53. Krawczyk B., Kur J.: Sekwencjonowanie DNA (w) Diagnostyka molekularna w mikrobiologii, red. R. Szymkiewicz, Wydawnictwo Politechniki Gdańskiej, Gdańsk, 2008, s. 108–109
54. Krawczyk B.: Diagnostyka molekularna w zakażeniach szpitalnych. *Post. Mikrobiol.* **46**, 367–378 (2007)
55. Kumada Y., Benson D.R., Hillemann D., Husted T.J., Rocheford D.A., Tompson J., Wohlleben W., Taten Y.: Genus *Rhizobium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 3009–3013 (1993)
56. Kumar R., Joshi S.R.: Microbial Ecology of Soil: Studying the diversity of microorganisms in the most complex of the environments – A review. *Adv. Appl. Microbiol.* **19**, 267–279 (2015)
57. Larsen M.V., Lunda O. i wsp.: Multilocus Sequence Typing of Total-Genome-Sequenced Bacteria. *J. Clin. Microbiol.* **50**, 1355–1361 (2012)
58. LPSN List of prokaryotic names with standing in nomenclature, <http://www.bacterio.net> (19.10.2015)
59. Ludwig, W., Schleifer K.-H.: Phylogeny of Bacteria beyond the 16S rRNA standard. *ASM News*, **65**, 752–757 (1999)
60. Mackiewicz P., Zakrzewska-Czerwińska J., Cebat S.: Genomika – dziedzina wiedzy XXI wieku. *Biotechnologia*, **30**, 7–21 (2005)
61. Maiden M.C.J., Spratt B.G. i wsp.: Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 3140–3145 (1998)
62. Majtan T., Bukovska G., Timko J.: DNA Microarrays – Techniques and Applications in Microbial System. *Folia Microbiol.* **49**, 635–664 (2004)
63. Małek W., Wdowiak S.: Współczesna systematyka bakterii. *Post. Mikrobiol.* **35**, 119–137 (1996)
64. Małek W., Wdowiak-Wróbel S., Kalita M., Szlachetka M.: Dylematy związane z koncepcją i definicją gatunku bakteryjnego. *Post. Mikrobiol.* **47**, 177–182 (2008)
65. Małek W., Wdowiak-Wróbel S., Kalita M., Święcicka I., Studzińska B.: W poszukiwaniu koncepcji gatunku bakteryjnego. *Post. Mikrobiol.* **44**, 323–32 (2005)
66. Maxam A. & Gilbert W.: A new method of sequencing DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 560–564 (1977)
67. MLST Multi Locus Sequence Typing, <http://www.mlst.net> (19.10.2015)
68. Nannipieri P., Ascher J., Ceccherini M.T., Landi L., Pietrameller G., Renella G.: Microbial diversity and soil functions. *Eur. J. Soil Sci.* **54**, 655–670 (2003)
69. National Center for Biotechnology Information, NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (19.10.2015)
70. Nusslein K., Tiedje J.M.: Soil bacteria community shift correlated with change from forest to pasture vegetation in a tropical soil. *Appl. Environ. Microb.* **65**, 3622–3626 (1999)
71. On, S.L., Holmes W.B.: Reproducibility of tolerance tests that are useful in the identification of *Campylobacter*. *J. Clin. Microbiol.* **1**, 1785–1788 (1991)
72. Parinov S., Barsky V., Yershov G., Kirillov E., Timofeev E., Belgovskiy A., Mirzabekov A.: DNA sequencing by hybridization to microchip octa- and decanucleotides extended by stacked Pentanucleotides. *Nucleic Acids Res.* **24**, 2998–3004 (1996)
73. Paul E.A., Clark F.E.: Metody badań mikroorganizmów glebowych (w) Mikrobiologia i biochemia gleb, red. M. Jędrzych, Wydawnictwo Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin, 2000, s. 81–84
74. Platonov A.E., Shipulin G.A., Platonova O.V.: Multilocus sequencing – a new method of genotyping bacteria and first results of its use. *Genetika*, **36**, 597–605 (2000)
75. Przybecki Z., Pawełkiewicz M.E., Wóycicki R.: Sekwencjonowanie genomów i rozwój biotechnologii. *Biotechnologia*, **4**, 9–23 (2010)
76. PubMLST – Public databases for molecular typing and microbial genome diversity, <http://pubmlst.org> (19.10.2015)
77. Ramasamy D., Mishra K., Lagier J.-Ch., Padhmanabhan R., Rossi M., Sentaosa M., Raoult D., Fournier P.: A polyphasic strategy incorporating genomic data for the taxonomic description of novel bacterial species. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* **64**, 384–391 (2014)
78. Ribosomal Database Project Relasae, <http://rdp.cme.msu.edu> (19.10.2015)
79. Ronaghi M.: Pyrosequencing Sheds Light on DNA Sequencing. *Genome Res.* **7**, 3–11 (2015)
80. Ronaghi M., Karamohamed S., Pettersson B., Uhlen M., Nyren P.: Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. *Anal. Biochem.* **242**, 84–89 (1996)
81. Ronaghi M., Uhlen M., Nyren P.: A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science*, **281**, 363–365 (1998)
82. Rossello-Mora R., Amann R.: The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* **25**, 39–67 (2001)
83. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R.: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 12: 5463–5467 (1977)
84. Schena M., Shalon D., Davis R.W., Brown P.O.: Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, **270**, 467–470 (1995)
85. Schramm A., Larsen L.H., Revsbech N.P., Ramsing N.B., Amann R., Schleifer K.-H.: Structure and function of a nitrifying biofilm as determined by in situ hybridization and the use of microelectrodes. *Appl. Environ. Microb.* **62**, 4641–4647 (1996)
86. Sienkiewicz J.: Koncepcje bioróżnorodności – ICH wymiary i miary w świetle literatury. *Ochr. Śr. Zasobów Nat.* **45**, 7–29 (2010)

87. Staley J.T., Konopka A.: Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Ann. Rev. Microbiol.* **39**, 321–346 (1985)
88. Sztuba-Solińska J.: Systemy markerów molekularnych i ich zastosowanie w hodowli roślin. *Kosmos*, **54**, 227–239 (2005)
89. Theron J., Cloete T.E.: Molecular techniques for determining microbial diversity and community structure in natural environments. *Crit. Rev. Microbiol.* **26**, 37–57 (2000)
90. Tiedje J.M., Asuming-Brempong S., Nusslein K., Marsh L., Flynn S.J.: Opening the black box of soil microbial diversity. *Appl. Soil Ecol.* **13**, 109–122 (1999)
91. Torsvik V., Sorheim R., Goksoyr J.: Total bacterial diversity in soil and sediment communities – a review. *J. Ind. Microbiol.* **17**, 170–178 (1996)
92. Torsvik V., Daae F.L., Sandaa R.-A., Øvreås L.: Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Curr. Opin. Microbiol.* **5**, 240–245 (2002)
93. Urwin R., Maiden M.C.J.: Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. *Trends Microbiol.* **11**, 479–487 (2003)
94. Vandamme P., Pot B., Gillis M., de Vos P., Kersters K., Swings J.: Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematic. *Microbiol. Rev.* **60**, 407–438 (1996)
95. Vermeeren V., Michiels L.: Evolution Towards the Implementation of Point-Of-Care Biosensors, <http://www.intechopen.com/books/biosensors-for-health-environment-and-biosecurity/evolution-towards-the-implementation-of-point-of-care-biosensors> (19.10.2015)
96. Waleron M., Waleron K., Łojkowska E.: Systematyka bakteryjnych patogenów roślin. *Post. Mikrobiol.* **42**, 193–214 (2003)
97. Wayne L.G., Truper H.G. i wsp.: Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *The International Committee On Systematic Bacteriology*, **37**, 463–464 (1987)
98. Webster G., Embley T.M., Posser J.L.: Grassland management regimens reduce small-scale heterogeneity and species diversity of β -proteobacterial ammonia oxidisers. *Appl. Environ. Microb.* **68**, 20–30 (2002)
99. Woese C.R., Fox G.E.: Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5088–5090 (1977)
100. Zawada M., Czekalska S., Sacha T., Skotnicki A.B.: Technika mikromacierzy – podstawy metody oraz możliwość zastosowania w hematologii, *Acta Hematol. Pol.* **35**, 505–523 (2004)