

MAŁGORZATA ŁYSZCZ, ANNA GAŁĄZKA

Zakład Mikrobiologii Rolniczej
Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa
Państwowy Instytut Badawczy
Czartoryskich 8, 24-100 Puławy
E-mail: mlyszcz@iung.pulawy.pl
agalazka@iung.pulawy.pl

METODY OPARTE O AMPLIFIKACJĘ DNA TECHNIKĄ PCR WYKORZYSTYWANE W OCENIE BIORÓŻNORODNOŚCI MIKROORGANIZMÓW GLEBOWYCH

WSTĘP

Bioróżnorodność mikrobiologiczna może być zdefiniowana jako zespół różnych gatunków bakterii w ekosystemie oraz jako zmienność genetyczna poszczególnych gatunków. Przyjmuje się, że w 1 g gleby znajduje się 10^9 mikroorganizmów (GAŁĄZKA i współaut. 2012). Z powodu tak dużej różnorodności fenotypowej i genomowej drobnoustroje glebowe są jednymi z najtrudniejszych do opisanania i scharakteryzowania. Mikroorganizmy mają bardzo duży wpływ na funkcjonowanie ekosystemów, w tym środowiska glebowego. Odpowiadają między innymi za ciągły obieg pierwiastków odżywczych i rozkład ksenobiotyków różnego pochodzenia (ŁYSZCZ i GAŁĄZKA 2016). W ostatnich latach obserwuje się dynamiczny rozwój metod molekularnych służących do analiz DNA i RNA. Coraz częściej powszechnie stosowane techniki są wspierane przez nowe, umożliwiające tańsze i szybsze genotypowanie mikroorganizmów. Testy oparte o amplifikację kwasów nukleinowych (ang. nucleic acid amplification tests, NAATs) stały się bardzo pomocne w identyfikowaniu mikroorganizmów. Zaliczamy do nich techniki bazujące na reakcji PCR (ang. polymerase chain reaction; łańcuchowa reakcja polimerazy). Jest to reakcja mająca na celu amplifikację (powielenie) specyficznego dla danego gatunku fragmentu DNA *in vitro* (MULLIS i FALOONA 1987, KON-

DAK 2009). Techniki bazujące na amplifikacji DNA oraz metody oparte na PCR w czasie rzeczywistym, w tym metody umożliwiające połączenie kilku reakcji w jedną (amplifikacja kilku sekwencji jednocześnie), są wciąż najpopularniejszymi technikami genotypowania mikroorganizmów glebowych. Celem tych badań jest jak najszybsza analiza stanu określonego środowiska, podlegającego ciągłym zmianom pod wpływem czynników biotycznych i abiotycznych. W badaniach bioróżnorodności środowiska glebowego na szczególną uwagę zasługują metody biologii molekularnej, które pozwalają na poznanie procesów biologicznych na poziomie materiału genetycznego. Metody molekularne mają istotną przewagę nad tradycyjnymi technikami, gdyż nie są uzależnione od hodowli mikroorganizmów na podłożach mikrobiologicznych. Cecha ta znacznie przyspiesza procesy badawcze. Ponadto, analiza materiału genetycznego charakteryzuje się dużą czułością i powtarzalnością (ŁYSZCZ i GAŁĄZKA 2016). Nowe metody przesiewowe (skriningowe) (ang. screening) pozwalają na badanie dużej liczby prób stosunkowo niskim kosztem. Pojawienie się wielofunkcyjnych robotów używanych w izolacji, normalizacji DNA, przygotowaniu reakcji PCR itp., znacznie ułatwia pracę w laboratorium, skraca czas analizy, a zarazem zmniejsza ryzyko zanieczyszczenia próbek. Dostępność metod molekularnych jest obecnie bardzo szeroka i często wybór

*Pracę przygotowano w ramach realizacji zadanie 1.4. 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).

Słowa kluczowe: ARDRA, PCR-RFLP, RAPD, REP-PCR, TRFLP

odpowiedniej techniki i dotarcie do podstaw teoretycznych może stanowić jedną z pierwszych trudności jej stosowania. Wybór odpowiedniej metody badawczej w typowaniu genetycznym powinien być uzależniony od: powtarzalności i odtwarzalności metody, stabilności, potencjału różnicującego i zgodności systemu typowania (KRAWCZYK 2007). Na wybór metody genotypowania i zróżnicowania genetycznego wpływają także inne czynniki takie jak: właściwości fizyko-chemiczne i biologiczne próby badanej (gleby), właściwości mikroorganizmu, z którego izolowany jest materiał genetyczny, cel badania molekularnego oraz szereg innych (Tabela 1). Niniejsza publikacja jest próbą uporządkowania wiedzy na temat metod bazujących na amplifikacji PCR.

PODSTAWY TECHNIKI PCR

Przełomowym wydarzeniem w dziedzinie biologii molekularnej było wynalezienie w 1983 r. przez Kary'ego Mullisa łańcuchowej reakcji polimerazy. Technika ta umożliwia kopiowanie określonych sekwencji genomowego DNA. Dziesięć lat później (1993 r.) Mullis został uhonorowany Nagrodą Nobla za swoje odkrycie (MULLIS i FALOONA 1987, SAIKI i współaut. 1988, STUDZIŃSKA i współaut. 2008, KONDAK 2009). Podstawą metody PCR jest reakcja replikacji DNA *in vitro* przy pomocy termostabilnej polimerazy DNA, która może przetrwać przedłużoną inkubację w temperaturze 95°C. Początkowo używano fragmentu Klenowa polimerazy I pochodzącej z *Escherichia coli*, jednak proces wymagał ciągłego dodawania kolejnych porcji enzymu w trakcie każdego cyklu. Obecnie najczęściej używanym enzymem jest polimeraza Taq DNA, pochodząca z bakterii *Thermus aquaticus*,

żyjącej w gorących źródłach wulkanicznych. Ta zmiana nie tylko upraszcza procedurę, dzięki czemu stała się ona możliwa do automatyzacji, ale także znacznie poprawia ogólną wydajność reakcji. Matrycę stanowi badany materiał genetyczny, a jedynym warunkiem jest znajomość sekwencji DNA na obu końcach regionu, który ma być poddany amplifikacji (powieleniu; dosł. wzmocnieniu) (SAIKI i współaut. 1988, HOLAND i współaut. 1991, ROSSELLO-MORA i AMANN 2001, KONDAK 2009, BROWN 2012).

Mieszanina reakcyjna w PCR składa się ze wspomnianego enzymu, czyli termostabilnej polimerazy, matrycowego DNA, który zawiera powielaną sekwencję, wolnych trifosforanów deoksyrybonukleotydów (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), dwóch starterów (ang. forward, reverse primers), których sekwencja jest komplementarna do końców sekwencji ampifikowanego DNA oraz z buforu zapewniającego odpowiednie pH reakcji i zawierającego m.in. jony Mg^{2+} , które są kofaktorem dla polimerazy (FERREIRA i współaut. 2004, STUDZIŃSKA i współaut. 2008, KONDAK 2009). Klasyczny proces powielania sekwencji matrycowego DNA składa się z wielokrotnie (około 20–40 razy) powtarzających się i następujących po sobie trzech etapów, które przebiegają w różnych, ściśle kontrolowanych temperaturach w aparacie zwanym termocyklerem. Zamplifikowane produkty z każdego poprzedniego cyklu służą jako matryce do następnego cyklu amplifikacji, co czyni tę metodę wysoce czułą techniką do wykrywania specyficznych sekwencji kwasów nukleinowych (SAIKI i współaut. 1988, FERREIRA i współaut. 2004, ŻAGALSKA-NEUBAUER i DUBIEC 2007, KONDAK 2009) (Ryc. 1):

- denaturacja – wysoka temperatura około 94-95°C powoduje rozrywanie wiązań

Tabela 1. Czynniki wpływające na wybór metody molekularnej (Krawczyk 2007, zmodyfikowana).

Czynniki wpływające na wybór metody molekularnej		
właściwości próby np. gleby	właściwości mikroorganizmu lub cel badania: zespołu mikroorganizmów:	
właściwości fizyko-chemiczne	ilość w próbce badanej	DNA/RNA
właściwości biologiczne	odporność na lizę	jednoniciowy/dwuniciowy
objętość próby	patogeniczność	kontaminacje (np. próby RNA wolne od zanieczyszczeń DNA)
homologiczność DNA		
obecność inhibitorów reakcji w próbce		

Inne: pobór próbki i jej przechowywanie, unikanie dodatkowych czynności w metodyce tj.: dodatkowe wirowania, rozcieńczenia, podgrzewania itp., odpowiednia objętość, stężenie DNA, czułość metody, wydajność procesu amplifikacji, stabilność materiału podczas przeprowadzania badania i przechowywania do późniejszych analiz.

wodorowych podwójnej helisy, co prowadzi do otrzymania dwóch cząsteczek jednoniciowych;

- przyłączanie starterów, tzw. annealing – obniżenie temperatury do około 54–60°C, startery przyłączają się w odpowiednich pozycjach do komplementarnych sekwencji matrycowego DNA. Temperatura ta zależy od sekwencji nukleotydowej starterów;

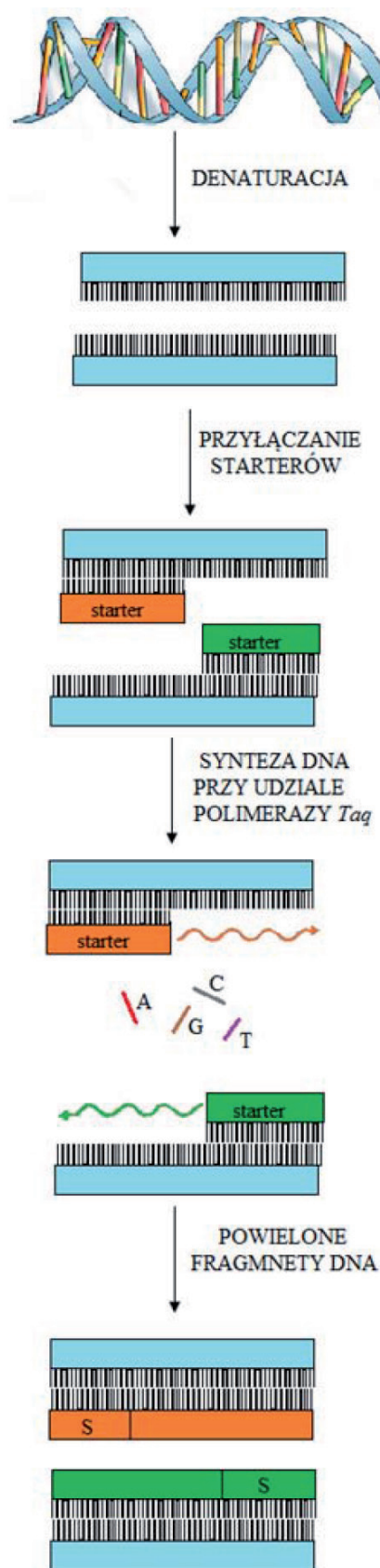
- elongacja, czyli wydłużanie łańcucha DNA – ponowne podniesienie temperatury do około 72°C (optimum dla polimerazy Taq); następuje wydłużanie starterów poprzez katalityczne przyłączanie dNTP (wolne trifosforany czterech deoksyrybonukleotydów) i synteza nowej nici DNA na ograniczonym starterami fragmencie (w kierunku 5'→3') (WRIGHT i WYNFORD-THOMAS 1990, HOLAND i współaut. 1991, FERREIRA i współaut. 2004, ZAGALSKA-NEUBAUER i DUBIEC 2007, STUZIŃSKA i współaut. 2008, KONDAK 2009, BROWN 2012).

Proces ten jest powtarzany cyklicznie, w rezultacie liczba zamplifikowanych fragmentów DNA rośnie w postępie wykładniczym 2^n (gdzie n to liczba powtórzeń cyklu), dzięki czemu możliwe jest otrzymanie w krótkim czasie wielu kopii analizowanego fragmentu (SAIKI i współaut. 1988, WRIGHT i WYNFORD-THOMAS 1990, FERREIRA i współaut. 2004, KAZUBEK i współaut. 2010).

Metoda łańcuchowej reakcji polimerazy PCR jest wysoce czułą i dokładną techniką, która charakteryzuje się powtarzalnością wyników. Dodatkowo, do jej zalet należy szybkość przeprowadzania analizy i fakt, że do jej przeprowadzenia wystarczająca jest niewielka ilość DNA. PCR jest bardzo ważną techniką, która znalazła szerokie zastosowanie w wielu dziedzinach takich jak np. biologia molekularna, diagnostyka, kryminalistyka, medycyna, badania filogenetyczne i wiele innych. Różnorodność wysoce udanych zastosowań technologii PCR i szybkość z jaką PCR może być przeprowadzane, nie powinno być błędnie interpretowane jako dowód, że PCR jest łatwym procesem. W rzeczywistości jest zupełnie odwrotnie. Pojedynczy cykl reakcji PCR jest złożonym procesem wymagającym dokładnego oddziaływania kilku elementów (OCHAMAN i współaut. 1988, HOLAND i współaut. 1991, KAZUBEK i współaut. 2010, MARCINAK i ROBAK 2012). Obecnie istnieje wiele odmian omawianej klasycznej techniki PCR, które są wykorzystywane do identyfikacji i różnicowania organizmów (MARCINIAK i ROBAK 2012).

PCR MULTIPLEX

Techniki analizy DNA oparte na metodzie PCR umożliwiają wykrywanie mutacji w



Ryc. 1. Schemat klasycznej reakcji PCR (wg FERREIRA i współaut., 2004, zmodyfikowana).

sekwencji DNA, dzięki czemu znalazły one szerokie zastosowanie w badaniach chorób dziedzicznych. Do najprostszych wariantów metody PCR należy technika PCR multipleks. Polega ona na amplifikacji kilku matryc (sekwencji) różniących się wielkością, w jednej reakcji PCR. Technika ta wymaga użycia kilku par starterów w jednej mieszaninie reakcyjnej i użycia większej ilości polimerazy oraz trifosforanów deoksyrybonukleotydów. Reakcja PCR multipleks jest bardzo często wykorzystywana w diagnostyce molekularnej do wykrywania delecji eksonów w genach (DE BUIJN 1992). Ocenę przydatności metody PCR multipleks zastosowano między innymi do identyfikacji i różnicowania drobnoustrojów z grupy *Bacillus cereus*. Identyfikacja i różnicowanie międzygatunkowe jest utrudnione ze względu na duże podobieństwo w obrębie całego genomu. Szczepki te wykazują wysoki stopień podobieństwa rDNA. Zastosowano wiele metod do rozróżnienia gatunków w obrębie grupy *B. cereus*. Pomimo licznych badań identyfikacja w obrębie grupy *B. cereus* stanowi wciąż spory problem. Metoda PCR multipleks wydała się ciekawą alternatywą dla molekularnej identyfikacji grupy *B. cereus* oraz poszczególnych gatunków wchodzących w jej skład. Przeprowadzone badania pokazały, że najważniejszym z poszukiwanych markerów był fragment genu *groEL*, pozwalający określić przynależność szczepu do grupy *B. cereus*. Ze starterami dla *groEL* otrzymano produkt dla wszystkich badanych szczepów, z wyjątkiem szczepów należących do gatunku *B. weihenstephanesis*.

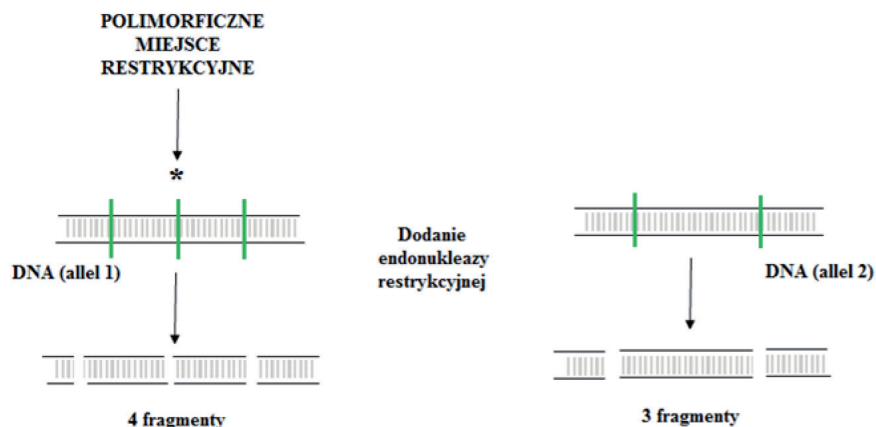
PCR-RFLP – POLIMORFIZM DŁUGOŚCI FRAGMENTÓW RESTRYKCYJNYCH

Metoda PCR-RFLP (ang. polymerase chain reaction – restriction fragments length

polymorphism; polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych) polega na amplifikowaniu wybranego fragmentu DNA, specyficznego dla badanego organizmu. Kolejnym krokiem jest trawienie enzymami restrykcyjnymi powielonego fragmentu DNA. Enzymy dobierane są w oparciu o znajomość sekwencji nukleotydowej kopiowanego fragmentu DNA. Fragmenty DNA powstałe w wyniku trawienia restrykcyjnego są następnie rozdzielane elektroforetycznie. Analiza uzyskanych fragmentów (wzorców restrykcyjnych) pozwala ocenić ich liczbę i wielkość, a kolejnym krokiem jest porównanie tych fragmentów z wzorcami charakterystycznymi dla danych gatunków mikroorganizmów (LIU i współaut. 2010, PEREZ-DE-MORA i współaut. 2011, MARCINIAK i ROBAK 2012).

Polimorfizm RFLP wyraża się zanikiem lub utworzeniem miejsca restrykcyjnego. W cząsteczkach genomowego DNA pewne miejsca restrykcyjne są polimorficzne, co oznacza, że występują w postaci dwóch różnych alleli. W przypadku, gdy miejsce restrykcyjne jest obecne w analizowanym genie, to allel posiada prawidłową sekwencję miejsca restrykcyjnego, zatem jest skutecznie cięty podczas trawienia enzymem, co w obrazie elektroforetycznym uwidacznia się w postaci dwóch fragmentów DNA. W przypadku braku miejsca rozpoznawanego przez endonukleazę restrykcyjną, allel ma zmienioną sekwencję (miejsce restrykcyjne jest zniszczone przez mutację), co podczas elektroforezy objawia się w postaci tylko jednego fragmentu DNA (Ryc. 2) (LICZBAŃSKA i współaut. 2006, BROWN 2012).

W ciągu ostatnich kilku lat technika RFLP jest wykorzystywana do oceny różnorodności i struktury zespołów różnych mikroorganizmów. Stwierdzono, że metoda ta jest bardzo przydatna, szczególnie w połącze-



Ryc. 2. Polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP) (wg BROWN 2012, zmodyfikowana).

niu z hybrydyzacją DNA-DNA i elektroforezą, w różnicowaniu ściśle związanych szczepów, do wyznaczenia zmienności wewnątrzgatunkowej (FAKRUDDIN i MANNAN 2013). Technika RFLP może stanowić proste i skuteczne narzędzie do identyfikacji szczepów bakterii na poziomie gatunku i poniżej (LIU i współaut. 1997; FAKRUDDIN i MANNAN 2013).

PÓLY i współaut. (2001) wykorzystali metodę RFLP do oceny zróżnicowania genetycznego mikroorganizmów glebowych na podstawie genów *nifH*. Porównanie gleby uprawnej z trwałymi użytkami zielonymi udowodniło wyraźne ich zróżnicowanie pod względem genu *nifH*. Metodą RFLP z zastosowaniem trzech enzymów HaeIII, NdeII i MnlI określono czyste szczepy mikroorganizmów wiążących N₂. Wykazano nieznaczne różnice między profilami *Azospirillum irakense* i *Azoarcus tolulyticus* oraz *Rhizobium leguminosarum* i *Mesorhizobium loti*, spowodowane obecnością niewielkich fragmentów (<40 bp). Różnice w profilach uwidoczniły się nie tylko między ściśle spokrewnionymi rodzajami jak *Rhizobium*, *Sinorhizobium* i *Mesorhizobium*, ale również u gatunków z tych samych rodzajów, takich jak *Azospirillum brasilense*, *A. lipoferum* i *A. irakense*.

Rybotypowanie to jedna z najczęściej używanych odmian techniki PCR-RFLP, obejmująca szereg metod opartych na analizie genów kodujących rybosomalny RNA (rRNA), zlokalizowanych w operonach *rrn*. Analiza *rrn* zawiera amplifikację: regionu zmiennego pomiędzy genami kodującymi 16S i 23S rRNA, regionu zmiennego wewnątrz genu kodującego 16S RNA, regionu zawierającego geny kodujące 16S i 23S rRNA (KRAWCZYK 2007).

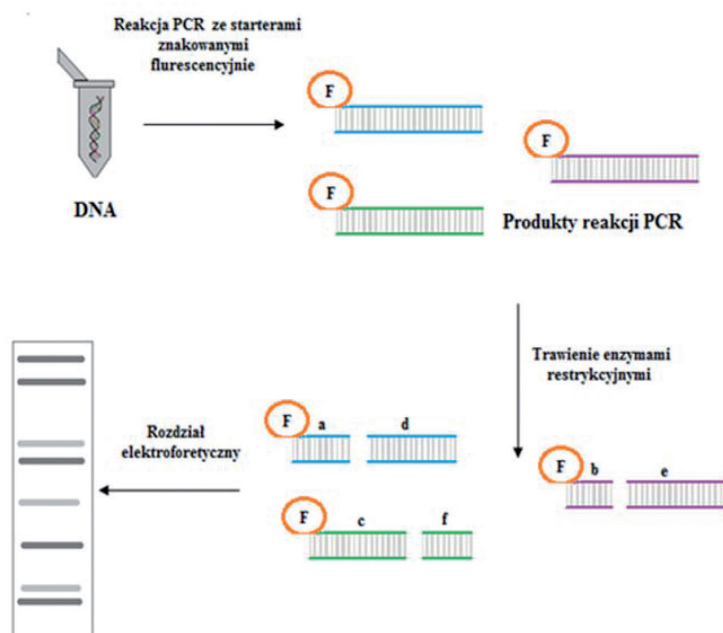
Analiza genów kodujących rRNA pozwala ustalić pokrewieństwo filogenetyczne pomiędzy mikroorganizmami, ponieważ geny kodujące rRNA występują powszechnie u wszystkich mikroorganizmów oraz zawierają domeny konserwowane i zmienne (ROSSELLO-MORA i AMANN 2001, BAJ i MARKIEWICZ 2006, KRAWCZYK 2007). Między sekwencjami odpowiedzialnymi za kodowanie poszczególnych podjednostek rybosomalnych występują regiony polimorficzne, które charakteryzują się wysokim stopniem zmienności pomiędzy gatunkami, zarówno pod względem ich długości, jak i sekwencji. Są to regiony ITS (ang. internal transcribed spacer). Fakt, że bakterie posiadają wiele kopii (alleli) rybosomalnego operonu w swoim genomie, zwiększa prawdopodobieństwo, że region ITS będzie zawierał znaczną liczbę zmiennych sekwencji, nawet wśród szczepów tego samego gatunku. Te regiony operonów stanowią doskonały cel molekularny wykorzystywany w badaniach filogenetycz-

nych (Gürtler i STANISICH 1996, OSORIO i współaut. 2005, KRAWCZYK 2007). W coraz większym stopniu technika ITS stosowana jest do oceny bioróżnorodności i analizy genetyki populacyjnej mikroorganizmów (BROWN i FUHRMAN 2005, STEWART i CAVANAUGH 2007).

CHRIKI-ADEEB i CHRIKI (2015) poddali badaniom cztery szczepy ryzobiów wyizolowanych z brodawek korzeni tunezyjskich roślin strączkowych *Sulla*, uprawianych na glebach prawie pustynnych i suchych (mała wilgotność). Analizy miały na celu oszacowanie powiązań filogenetycznych tych szczepów i ocenę zastosowania regionu ITS jako markera molekularnego. Badania polegały na sekwencjonowaniu genu 16S rRNA i regionu ITS ze szczepów analizowanych oraz porównaniu ze szczepami referencyjnymi, poprzez skonstruowanie filogramów opartych na dwóch typach sekwencji. Wskaźniki ewolucyjne i rozbieżność czasową pomiędzy różnymi gatunkami ryzobiów oszacowano stosując wnioskowanie filogenetyczne Bayesa (wnioskowanie bayesowskie korzysta z twierdzenia Bayesa; poszukiwane jest drzewo filogenetyczne o największym prawdopodobieństwie *a posteriori*) (SPALIK i PIWCZYŃSKI 2009). Zarówno w przypadku analizy sekwencji genu 16S rRNA i regionu ITS, szczepy tunezyjskich ryzobiów umieszczano w różnych grupach. Analiza Bayesa wykazała, że drzewa filogenetyczne były spójne i wykazywały wyraźny podział pomiędzy gatunkami *Agrobacterium* i *Rhizobium*. W badaniach potwierdzono, że region ITS jest lepszym markerem molekularnym, służącym analizie systematycznej i filogenetycznej klasyfikacji ryzobiów.

T-RFLP – POLIMORFIZM DŁUGOŚCI TERMINALNYCH FRAGMENTÓW RESTRYKCYJNYCH

T-RFLP (ang. terminal restriction fragment length polymorphism; polimorfizm długości terminalnych fragmentów restrykcyjnych) jest to technika, która rozwiązuje niektóre z ograniczeń RFLP (TIEDJE i współaut. 1999, KIRK i współaut. 2004, KUMAR i JOSHI 2015). Jest ona rozszerzeniem analizy RFLP i zapewnia szybką analizę różnorodności mikrobiologicznej. Opiera się na tej samej zasadzie co technika RFLP, z wyjątkiem tego, że jeden starter w reakcji PCR jest wyznakowany barwnikiem fluorescencyjnym, takim jak np. TET (4,7,2,7'-tetrachloro-6-karboksylofluoresceina) albo 6-FAM (fosforoamidyt 6-karboksylofluoresceina) (LIU i współaut. 1997, KIRK i współaut. 2004, RASTOGI i SANI 2011, KUMAR i JOSHI 2015). Amplifikowane podczas reakcji PCR znakowane fragmen-



Ryc. 3. Schemat techniki T-RFLP (wg CETECIOGLU i współaut. 2012, zmodyfikowano).

ty są następnie trawione przy użyciu enzymów restrykcyjnych i rozdzielane drogą elektroforezy agarozowej, a kolejnym etapem jest analizowanie z zastosowaniem automatycznego analizatora sekwencji (Ryc. 3) (LIU współaut. 1997, RASTOGI i SANI 2011, FAKRUDDIN i MANNAN 2013, RINCON-FLOREZ i współaut. 2013).

Ograniczeniem metody T-RFLP jest ekstrakcja DNA oraz dobór uniwersalnych starterów. Powszechnie dostępne startery nie są w stanie zamplifikować wszystkich sekwencji eukariotycznych, prokariotycznych i archeonów, gdyż sekwencje tych starterów opierają się na istniejących, zdeponowanych sekwencjach 16S rRNA i 18S rRNA mikroorganizmów tworzących kultury, a zatem nie mogą być reprezentatywne dla zróżnicowania drobnoustrojów w próbkach środowiskowych (LIU i współaut. 1997, KUMAR i JOSHI 2015).

Mimo tych ograniczeń, niektórzy badacze są zdania, że po znormalizowaniu T-RFLP może być użytecznym narzędziem do badania bioróżnorodności i uznawane jest za doskonałe narzędzie do porównania zależności między różnymi próbkami (LIU i współaut. 1997, TIEDJE i współaut. 1999, DUNBAR i współaut. 2000, OSBORN i współaut. 2000, KIRK i współaut. 2004, FAKRUDDIN i MANNAN 2013).

Metoda T-RFLP została wykorzystana do badania zmienności mikroorganizmów, złożonych społeczności bakteryjnych, wykrywania populacji i ich monitorowania oraz w celu zróżnicowania grzybów mikoryzy arbuskularnej (AGM) w ryzosferze *Viola calaminaria*,

w glebie zanieczyszczonej metalami (MOESENEDER i współaut. 1999, TIEDJE i współaut. 1999, TONIN i współaut. 2001, FAKRUDDIN i MANNAN 2013).

HILTON i współaut. (2013) analizowali przyczynę spadku plonu rzepaku uprawianego w monokulturze, w porównaniu do płodozmian z pszenicą. Za główną przyczynę obniżenia plonów przyjęli występowanie drobnoustrojów patogennych, które identyfikowano przy użyciu techniki T-RFLP. Badanie to wykazało, że spadek plonu, spowodowany był przede wszystkim wzrostem liczebności dwóch grzybów, które wykazały 100% i 95% identyczności DNA z patogenami roślinnymi *Olpidium brassicae* i *Pyrenochaeta lycopersici*. Analizy potwierdziły, że istnieje znacznie więcej tych grzybów w rzepaku uprawianym w monokulturze niż w płodozmianie.

FIERER i JACKSON (2006) zastosowali technikę T-RFLP, aby zrozumieć rozkład biogeograficzny bakterii glebowych oraz zbadać biotyczne i abiotyczne czynniki, które kształtują skład i różnorodność społeczności bakteryjnych. Zebrali 98 próbek gleby z Ameryki Północnej i Południowej, reprezentujących szeroki zakres temperatury, pH i innych warunków geograficznych. Wykazano, że różnorodność bakterii była wyższa w glebach obojętnych, w stosunku do gleb kwaśnych, i nie było to związane z takimi czynnikami jak temperatura, szerokość geograficzna i innymi zmiennymi, które zazwyczaj działają jako dobry wskaźnik różnorodności zwierząt i roślin.

Badania TIEDJE i współaut. (1999) wykazały, że T-RFLP charakteryzuje się pięć razy większym sukcesem w wykrywaniu i śledzeniu konkretnych rybotypów niż technika DGGE (ang. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis; elektroforeza w gradiencie denaturującym).

ARDRA – ANALIZA RESTRYKCYJNA ZAMPLIFIKOWANYCH FRAGMENTÓW RDNA

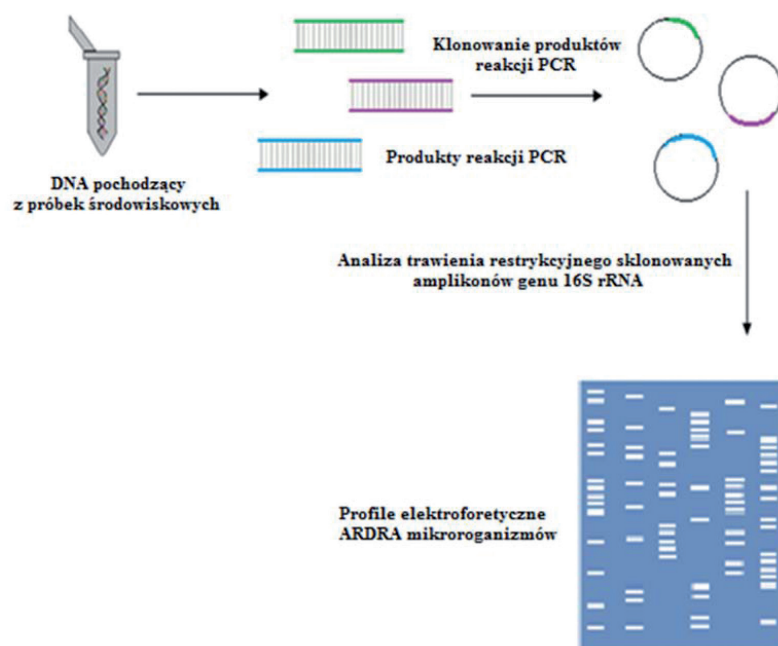
ARDRA (ang. amplified ribosomal DNA restriction analysis) to analiza restrykcyjna zamplifikowanych fragmentów rDNA. W zasadzie jest ona podobna do metod RFLP i T-RFLP (FAKRUDDIN i MANNAN 2013). Jest to technika genetycznego odcisku palca (ang. fingerprinting) na bazie rybosomów, używana do oceny zróżnicowania drobnoustrojów (FISHER i TRIPLETT 1999, KIRK i współaut. 2004, KUMAR i JOSHI 2015). Stała się ona powszechnie stosowaną techniką molekularną mającą na celu analizę populacji mikroorganizmów w próbkach środowiskowych (SLABBERT i współ. 2010). ARDRA jest także jedną z najczęściej stosowanych metod służących do określania struktury i dynamiki mikroorganizmów (FERNANDEZ i współaut. 1999, GICH i współaut. 2000, ORAVECZ i współaut. 2004, PANDEY i współaut. 2009).

Metoda ta oparta jest na amplifikacji techniką PCR genów 16S rRNA z całkowitego DNA pochodzącego z próbek środowiskowych. W kolejnym kroku następuje

trawienie otrzymanego fragmentu kilkoma wybranymi endonukleazami restrykcyjnymi (VANECHOUTTE i współaut. 1992, 1995; INGIANNI i współaut. 1997; JAMPACHAISRI i współaut. 2005; PANDEY i współaut. 2009; RASTOGI i SANI 2011; CETECIOGLU i współaut. 2012). Dodatkowym etapem, występującym przed trawieniem enzymami restrykcyjnymi, jest klonowanie fragmentu DNA powstałego w wyniku amplifikacji (amplikonu) genu 16S rRNA, z zastosowaniem odpowiedniego wektora (Ryc. 4). Zapobiega to wzajemnemu zanieczyszczeniu fragmentów genu 16S rRNA pochodzących z różnych drobnoustrojów. Następnie, powielone fragmenty poddaje się rozdziałowi elektroforetycznemu i klasyfikuje według wzoru trawienia restrykcyjnego. Dzięki temu możliwe jest zaobserwowanie zróżnicowania między ściśle spokrewnionymi grupami mikroorganizmów (FRIEDRICH i współaut. 2002, PANDEY i współaut. 2009).

Technika ARDRA, w połączeniu z automatycznym sekwencjonowaniem DNA i metodami statystycznymi/programami komputerowymi, może być bardzo przydatna w ocenie dynamiki struktury społeczności drobnoustrojów, np. podczas bioremediacji *in situ*. W badaniach gleb zanieczyszczonych węglowodarami aromatycznymi znacznie zwiększa się aktywność i liczebność drobnoustrojów glebowych zdolnych do rozkładu składników zanieczyszczenia (GAŁAZKA i współaut. 2012, GAŁAZKA i GAŁAZKA 2015).

Technikę ARDRA uznaje się za potencjalnie najdokładniejszą spośród wszystkich



Ryc. 4. Schemat techniki ARDRA (wg PANDEY i współaut. 2009).

metod odcisków palców. W niektórych badaniach porównawczych zbadano działanie różnych metod odcisków palców, które wykazały, że ARDRA jest skuteczniejszą techniką niż RAPD (ang. randomly amplified polymorphic DNA; polimorfizm przypadkowo amplifikowanego DNA) i AFLP (ang. amplified fragment length polymorphism; polimorfizm długości amplifikowanych fragmentów) (JAWAD i współaut. 1998, DHERBECOURT i współaut. 2006, PANDEY i współaut. 2009).

Technika ARDRA charakteryzująca się szerokim zakresem zastosowań, została użyta do identyfikacji różnych gatunków bakterii (HALL i współaut. 1999, DELGADO i MAYO 2004, PANDEY i współaut. 2009), do scharakteryzowania znaczących mikroorganizmów z różnych nisz ekologicznych (PICARD i współaut. 2000, PANDEY i współaut. 2009), analizy struktury społeczności bakteryjnych pochodzących ze środowisk naturalnych i zaburzonych (OVREAS i TORSVIK 1998, SETTE i współaut. 2007, PANDEY i współaut. 2009). PAUL i współaut. (2006) zastosowali technikę ARDRA do scharakteryzowania ogólnej struktury drobnoustrojów w zanieczyszczonej pestycydami uprawnej glebie rolniczej. Analiza restrykcyjna zamplifikowanych fragmentów rDNA pokazała zmiany w strukturze mikroorganizmów w procesie bioremediacji. Dodatkowo, sekwencjonowanie reprezentatywnych szczepów wykazało, że struktura społeczności gleby skażonej pestycydami była utworzona głównie przez Proteobacteria i Actinobacteria. SMIT i współaut. (1997) zastosowali technikę ARDRA do oceny wpływu zanieczyszczenia miedzią na drobnoustroje w glebie. Wyraźne różnice w strukturze społecznej i mniejszą różnorodność mikrobiologiczną uzyskano w glebie zanieczyszczonej miedzią, w porównaniu z glebą kontrolną, bez zanieczyszczeń.

SEKWENCJE REPETYTYWNE

Genomy organizmów prokariotycznych i eukariotycznych mogą zawierać powtarzal-

ne sekwencje (Tabela 2), które oddzielają dłuższe sekwencje pojedynczych kopii DNA (VERSALOVIC i LUPSKI 1998, HAUBOLD i WIEHE 2006). Na początku „ery genomiki”, czyli około 1990 r. stwierdzono, że w genomach bakterii można znaleźć niespodziewanie dużą liczbę sekwencji powtarzalnych, które mogą stanowić nawet więcej niż 10% całego genomu, co w konsekwencji wywołało lawinę badań dotyczących znaczenia funkcjonalnego i ewolucyjnego tych elementów (HAUBOLD i WIEHE 2006).

Istnieje szereg wyraźnych powodów teoretycznych i dobrze udokumentowanych przykładów, które pokazują, że powtarzalne sekwencje DNA pełnią wiele ważnych funkcji w genomie. Elementy te wpływają na ekspresję unikatowych sekwencji kodujących oraz na dodatkowe funkcje niezbędne do replikacji genomu i dokładnego przekazania do komórek potomnych. Powtarzające się elementy DNA mają także fundamentalne znaczenie w oddziaływaniach molekularnych tworzących kompleksy nukleoproteinowe (SHAPIRO i VON STERNBERG 2005). W badaniach oceniono, że powtórzone sekwencje mogą mieć wpływ na plastyczność genomu i doprowadzać do zmian struktury DNA z powodu rekombinacji wewnątrzgenowej (HAUBOLD i WIEHE 2006, TREANGEN i współaut. 2009, DZIEWIT i BARTOSIK 2011). Dodatkowo, naukowcy wnioskują, że powtórzone sekwencje mogą mieć pozytywny wpływ na zdolności adaptacyjne bakterii (HAUBOLD i WIEHE 2006).

Wykorzystując nowoczesne metody i narzędzia współczesnej bioinformatyki stwierdzono, że genomy mikroorganizmów mogą zawierać nawet 40% sekwencji powtórzonych. Przykładowo, w genomie *Orientia tsutsugamushi* str. Ikeda jest aż 42,2% sekwencji powtórzonych (1000 kopii sekwencji o wielkości 770 bp). Występują także gatunki bakterii z małą liczbą sekwencji powtórzonych w genomie, do których należą np. *Buchnera aphidicola* Sg i *Candidatus Blochmannia floridanus* (TREANGEN i współaut.

Tabela 2. Sekwencje repetytywne występujące w genomach mikroorganizmów prokariotycznych.

Sekwencja repetytywna	Wielkość	Organizm w którym pierwotnie zidentyfikowano sekwencje	Literatura
REP	~35 pz	<i>Enterobacteriaceae</i>	STERN i współaut. 1984
ERIC	~127 pz	<i>Enterobacteriaceae</i>	HULTON i współaut. 1991
BOX	~67–637 pz	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	MARTIN i współaut. 1992
YAPL/RU-2	~168 pz	<i>Yersinia</i> sp.	DE GREGORIO i współaut. 2006
Correia	~157 pz	<i>Neisseria</i> sp.	CORREIA i współaut. 1988
MaeMITE	~150–435 pz	<i>Microcystis aeruginosa</i>	KANEKO i współaut. 2007
Chunjie	~178–235 pz	<i>Geobacter uraniireducens</i> Rf4	CHEN i współaut. 2008

2009, DZIEWIT i BARTOSIK 2011). Perspektywa dalszych badań powtarzalnego DNA prowadzi do nowych sposobów myślenia o organizacji genomów komórkowych i zapewnia szereg nowych możliwości reorganizacji genomu z udziałem powtórzonych elementów. Idee te mogą ułatwić interpretację porównawczą zsekwencjonowanych genomów, w których występują elementy powtarzalne DNA (SHAPIRO i VON STERNBERG 2005).

Powtarzającymi się elementami w DNA prokariotycznym są sekwencje REP (ang. repetitive extragenic palindromic; pozagenowe powtórzone elementy palindromowe). Termin „sekwencje REP” obejmuje stale powtarzające się sekwencje palindromiczne o długości między 21 a 65 par zasad, które znajdują się w zewnątrzgenowych przestrzeniach genomów bakteryjnych (TOBES i PAREJA 2006). Elementy REP zostały po raz pierwszy opisane w *Escherichia coli*, jako sekwencje o długości około 35 pz, składające się z wysoce konserwowanego odwróconego powtórzenia, które potencjalnie tworzy strukturę pnia z pętlą (ARANDA-OLMEDO i współaut. 2002). Sekwencje REP mogą występować jako pojedyncze jednostki, w wielu sąsiednich kopiach lub jako części innych typów klastrów, a więc BIMEs (ang. bacterial interspersed mosaic elements) (STERN i współaut. 1984, ARANDA-OLMEDO i współaut. 2002). Sekwencje REP obecne u *E. coli* i *S. typhimurium* występują w około 500 kopiach (HULTON i współaut. 1991).

Funkcja elementów REP nie jest całkowicie określona. Niektórzy badacze przypuszczają, że biorą one udział w hamowaniu transkrypcji, a inni, że nie są specyficznymi terminatorami. Sugeruje się, że pełnią rolę stabilizatorów mRNA oraz, że są zaangażowane w regulację ekspresji genów. Sekwencje REP są miejscem wiązania polimerazy DNA I, gyrazy DNA i czynnika IHF (ang. integration host factor) (ESPELI i współaut. 2001, ARANDA-OLMEDO i współaut. 2002, TOBES i PAREJA 2006).

Badania DE BRUJIN (1992) wykazały, że sekwencje (elementy) REP są obecne w genomach Gram-ujemnych bakterii glebowych, takich jak *Rhizobium* i *Agrobacterium*, jak również bakterii z rodzaju *Pseudomonas*. W technice REP-PCR w wyniku amplifikacji powtarzających się elementów DNA otrzymujemy wzory specyficznych prążków, tzw. „fingerprinting”, co pozwala na różnicowanie szczepów bakteryjnych (OLIVE i BEAN 1999). Elementy REP mogą stać się potężnym narzędziem w analizie molekularno-genetycznej bakterii i w taksonomii, gdyż pozwalają na otrzymanie „odcisków palców” poszczególnych rodzajów, gatunków i szczepów i mogą

przyczynić się do określenia powiązań filogenetycznych (DE BRUJIN 1992).

Więszymi powtarzającymi się elementami, które występują głównie w niekodujących regionach w genomie mikroorganizmów prokariotycznych są sekwencje ERIC (ang. enterobacterial repetitive intragenic consensus; międzygenowe konsensusowe sekwencje powtórzone enterobakterii) (VERSALOVIC i LUPSKI, 1998, HULTON i współaut. 1991). Sekwencje ERIC zostały po raz pierwszy znalezione u *E. coli*, *Salmonella typhimurium* (obecnie *Salmonella enterica* serowar *typhimurium*), a także u innych gatunków z rodziny Enterobacteriaceae, jak i *Vibrio cholerae* (HULTON i współaut. 1991, WILSON i SHARP 2006). Elementy ERIC są niedoskonałymi palindromami o długości około 130 par zasad (WILSON i SHARP 2006). W wyniku delekcji wewnętrznych powstają również krótsze sekwencje, a ze względu na insercje „wstawek” o długości około 70 pz, zostały opisane sekwencje dłuższe (WILSON i SHARP 2006). Liczba kopii sekwencji ERIC waha się pomiędzy gatunkami. Szacuje się, że w genomie *E. coli* K-12 występuje około 30 kopii sekwencji ERIC, w *S. enterica typhimurium* LT2 jest ich 150, natomiast sekwencja genomowa *Photobacterium luminescens* zawiera ponad 700 kopii (HULTON i współaut. 1991, WILSON i SHARP 2006). Sekwencje ERIC mogą wykazywać większy potencjał w badaniach dotyczących ewolucji bakterii, ponieważ są dłuższe i występują w dużej liczbie gatunków, a tym samym niosą więcej informacji do analiz porównawczych (WILSON i SHARP 2006). Łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR) z zastosowaniem odpowiednio zaprojektowanych starterów, komplementarnych do sekwencji ERIC, które służą amplifikacji genomowego DNA położonego pomiędzy sekwencjami powtarzającymi się, wskazuje, że sekwencje ERIC mogą być obecne w całym królestwie bakterii. Jest to także technika stosowana do analizy bardzo szerokiego zakresu gatunków bakteryjnych (HULTON i współaut. 1991, WILSON i SHARP 2006, ZULKIFLI i współaut. 2009).

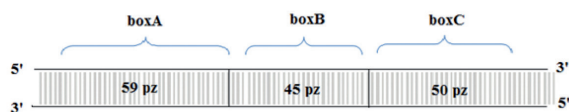
JARABO-LORENZO i współaut. (2003) analizowali różnorodność genetyczną 45 izolatów *Bradryhizobium*, które wywołują powstawanie brodawek u kilku gatunków *Lupinus* i *Ornithopus* w różnych lokalizacjach geograficznych. Analizę przeprowadzono z użyciem techniki ERIC-PCR, a także 16S rDNA PCR-RFLP – analiza sekwencji międzygenowego regionu 16S-23S rDNA (IGS) PCR-RFLP. Analiza 16S rRNA zróżnicowała 9 genotypów spośród izolatów pochodzących z łubinu, grupa 14 izolatów przedstawiała identyczny lub bardzo podobny genotyp restrykcyjny jak szczep referencyjny *Bradryhizobium ja-*

ponicum, podczas gdy dwie kolejne, główne grupy izolatów (69%) przedstawiają genotypy wyraźnie różniące się od referencyjnych szczepów występujących na soi. Technika 16S-23S IGS PCR-RFLP wykazała wysoki poziom zróżnicowania, gdyż spośród 30 izolatów wyodrębniono 19 genotypów. Metoda ERIC-PCR posłużyła do wykrycia ogromnego zróżnicowania, gdyż wskazuje ona na inne wzory genotypowe dla prawie wszystkich (z wyjątkiem dwóch) izolatów. Analizę w oparciu o sekwencje ERIC do różnicowania szczepów ryzobiowych stosowali także w swoich badaniach DE BRUJIN (1992), JUDD i współaut. (1993) i NIEMANN i współaut. (1999).

Poza sekwencjami REP i ERIC, w genomie bakterii występują również powtarzalne sekwencje BOX. Sekwencje BOX stanowią pierwszy opisany element powtarzalny występujący w genomie bakterii Gram-dodatnich. Sekwencja BOX została wykorzystana do różnicowania szczepów *Streptococcus pneumoniae* (MARTIN i współaut. 1992, KOEUTH i współaut. 1995, VERSALOVIC i LUPSKI 1998, OLIVE i BEAN 1999). Elementy BOX znajdują się w regionach międzygenowych. Sekwencje te mogą tworzyć strukturę pnia-pętli, ponieważ posiadają podwójną symetrię (OLIVE i BEAN 1999). Elementy BOX składają się z różnych kombinacji trzech podjednostek: boxA (59 pz), boxB (45 pz) i boxC (50 pz) (Ryc. 5) (MARTIN i współaut. 1992, VERSALOVIC i LUPSKI 1998).

Startery projektuje się w oparciu o sekwencje konsensusowe DNA podjednostek boxA, boxB i boxC. Badania łączące hybrydyzację DNA i reakcję PCR wskazują, że sekwencje oligonukleotydowe w podjednostce boxA wydają się konserwatywne wśród różnych gatunków bakterii (KOEUTH i współaut. 1995, VERSALOVIC i LUPSKI 1998).

Celem pracy CORNEA i współaut. (2011) było zbadanie wpływu niektórych czynników na lokalnie występujące ryzobia w glebie uprawianej w różnych systemach. Oceniano różnorodność genetyczną szczepów *Rhizobium* wyizolowanych bezpośrednio z gleby (tzw. wolnożyjące ryzobia) lub z brodawek korzeniowych. Gleba była pobrana z ryzosfery trzech zielnych wieloletnich roślin



Ryc. 5. Model struktury powtarzających się elementów BOX (KOEUTH i współaut. 1995, zmodyfikowano).

strączkowych *Trifolium repens*, *T. pratense* i *Lotus corniculatus*. Badanie prowadzono na polach doświadczalnych znajdujących w Moara Domneasca i w Brasov (Rumunia). Charakterystyczna czerwono-brązowa gleba była analizowana pod względem zawartości azotu i węgla organicznego oraz pH. Charakterystykę i różnorodność bakterii z rodzaju *Rhizobium* przeprowadzono przy użyciu technik BOX-PCR, ERIC-PCR i DGGE, opierających się na zasadzie „fingerprinting” DNA. Wykazano, że różnorodność bakterii była znacząco niższa w glebie ze zwiększonym nawożeniem azotowym. Niskie zróżnicowanie wewnątrzgatunkowe zaobserwowano u szczepów wyizolowanych z tego samego gatunku rośliny (*Trifolium* spp.), niezależnie od jej pochodzenia (Moara Domneasca lub Brasov). Wyraźne różnice pojawiły się w związku z pochodzeniem brodawek korzeniowych (czerwona lub biała koniczyna).

RAPD – POLIMORFIZM PRZYPADKOWO AMPLIFIKOWANEGO DNA

RAPD (ang. randomly amplified polymorphic DNA; polimorfizm przypadkowo amplifikowanego DNA) to metoda po raz pierwszy opisana w 1990 r. przez WILLIAMS i współaut. oraz WELSHA i MCCLELLANDA. Jej podstawą jest reakcja PCR z wykorzystaniem starterów o przypadkowo dobranej sekwencji. Startery są krótkie, mają około 9-10 par zasad, hybrydują w różnych miejscach genomowego DNA, generując produkty PCR o różnych długościach, które następnie rozdzielają się w żelu agarozowym lub akrylamidowym, w zależności od złożoności genetycznej społeczności mikrobiologicznej (OLIVE i BEAN 1999, RANJARD i współaut. 2000, RASTOGI i SANI 2011). Proces przyłączania starterów prowadzi się w stosunkowo niskiej temperaturze, dzięki czemu hybrydują w wielu miejscach badanego genomu, jednocześnie prowadząc do amplifikacji kilku lub kilkunastu różnych fragmentów (OLIVE i BEAN 1999). Jeśli dwa startery RAPD przyłączają się we właściwej orientacji w odległości kilku tysięcy par zasad od siebie, to produkt reakcji PCR będzie miał długość odpowiadającą odległości pomiędzy starterami. Liczba i rozmieszczenie tych przypadkowych miejsc wiązania się starterów jest różna dla różnych gatunków bakterii. W ten sposób, po oddzieleniu produktów amplifikacji drogą elektroforezy otrzymujemy wzór prążków, który teoretycznie jest charakterystyczny dla poszczególnych szczepów bakteryjnych (OLIVE i BEAN 1999, WELSH i MCCLELLAND 1990, WILLIAMS i współaut. 1990, RINCON-FLOREZ i współaut. 2013).

Amplifikacja losowych fragmentów DNA ze starterami o arbitralnej sekwencji nukleotydowej wykorzystana jest jako potężne narzędzie do badań obejmujących molekularną zmienność genetyczną mikroorganizmów (DEVI i współaut. 2014). Markery RAPD znalazły szereg zastosowań w mapowaniu genów, genetyce populacyjnej, ewolucji molekularnej, genetyce i hodowli roślin, zwierząt i mikroorganizmów. Wynika to przede wszystkim z szybkości wykonywania analizy, niskich kosztów i wysokiej wydajności. Technika ta pozwala na wytworzenie dużej liczby markerów w krótkim czasie, w porównaniu z poprzednimi sposobami. Dlatego metodę RAPD można przeprowadzić w prawie każdym laboratorium (RINCON-FLOREZ i współaut. 2013, DEVI i współaut. 2014).

Technikę RAPD z losowo wybranymi starterami zastosowano w celu oceny zmian różnorodności drobnoustrojów w próbkach gleby, które były traktowane pestycydami triazolowymi i nawozami chemicznymi (wodorowęglan amonu). Analiza wykazała, że gleby traktowane pestycydami charakteryzują się prawie identycznym poziomem różnicowania DNA jak próbka gleby kontrolnej (czyli bez zanieczyszczeń). W przeciwieństwie do tego, nawozy chemiczne spowodowały spadek różnorodność DNA w porównaniu do kontroli (RASTOGI i SANI 2011).

Streszczenie

Mikroorganizmy glebowe, pod względem cech genowych i fenotypowych, stanowią wysoce zróżnicowaną grupę organizmów żywych. Z powodu tak dużej różnorodności ważne jest dobranie odpowiednich metod, dających największy stopień różnicowania mikroorganizmów. Narzędziami umożliwiającym analizę zmienności genetycznej mikroorganizmów są techniki genetyczne, a wśród nich jedną z najważniejszych jest łańcuchowa reakcja polimerazy, czyli PCR (Polymerase Chain Reaction), technika opracowana w latach 1980. Niniejsza praca stanowi przegląd podstawowych zagadnień dotyczących badania zmienności genetycznej mikroorganizmów glebowych w oparciu o markery molekularne z wykorzystaniem technik bazujących na reakcji PCR tj. PCR-RFLP, TRFLP, ARDRA, RAPD.

LITERATURA

- ARANDA-OLMEDO I., TOBES R., MANZANERA M., RAMOS J. L., MARQUES S., 2002. *Species-specific repetitive extragenic palindromic (REP) sequences in Pseudomonas putida, nucleic. Acids. Res.* 30, 1826-1833.
- BAJ J., MARKIEWICZ Z., 2006. *Pozycja filogenetyczna bakterii i zasady ich taksonomii*. [W:] *Biologia molekularna bakterii*. MOSTOWIK K. (red.). Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 4-18.
- BROWN M. V., FUHRMAN J. A., 2005. *Marine bacterial microdiversity as revealed by internal transcribed spacer analysis*. *Aquat. Microb. Ecol.* 41, 15-23.
- BROWN T. A., 2012. *Analiza DNA; Mapowanie genomów*. [W:] *Genomy*. WĘGLEŃSKI P. (red.). Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 55-57 i 67.
- CETECIOGLU Z., INCE O., INCE B., 2012. *Gel electrophoresis based genetic fingerprinting techniques on environmental ecology*. [W:] *Gel electrophoresis – advanced techniques*. MAGDELDIN S. (red.). Rijeka, Croatia, 51-66.
- CHEN Y., ZHOU F., LI G., XU Y., 2008. *A recently active miniature inverted-repeat transposable element, Chunjie, inserted into an operon without disturbing the operon structure in Geobacter uraniumreducens Rf4*. *Genetics* 179, 2291-2297.
- CHRIKI-ADEEB R., CHRIKI A., 2015. *BAYESIAN PHYLOGENETIC ANALYSIS OF RHIZOBIA ISOLATED FROM ROOT-NODULES OF THREE TUNISIAN WILD LEGUME SPECIES OF THE GENUS SULLA*. *J. Phylogen. Evolut. Biol.* 3, 1-9.
- CORNEA C. P., VOAIDE C., CIUCA M., STAN V., GAMENT E., RAZEC I., DUSA M., 2011. *Molecular methods for assesement the bacterial communities from different type of soils in Romania*. *Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj.* 39, 64-70.
- CORREIA F. F., INOUE S., INOUE M., 1988. *A family of small repeated elements with some transposon-like properties in the genome of Neisseria gonorrhoeae*. *J. Biol. Chem.* 263, 12194-12198.
- DE BRULJN F. J., 1992. *Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergeneric consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of Rhizobium meliloti isolates and other soil bacteria*. *Appl. Environ. Microb.* 58, 2180-2187.
- DE GREGORIO E., SILVESTRO G., VENDITTI R., CARLOMAGNO M. S., DI NOCERA P. P., 2006. *Structural organization and functional properties of miniature DNA insertion sequences in yersinia*. *J. Bacteriol.* 188, 7876-7884.
- DELGADO S., MAYO B., 2004. *Phenotypic and genetic diversity of Lactococcus lactis and Enterococcus spp. strains isolated from Northern Spain starter-free farmhouse cheeses*. *Int. J. Food. Microbiol.* 90, 309-319.
- DEVI M., NITHYANANTHI M. J. T., NITHYA R., ROMAULD S. I., NITHYA R., JAYASHREE R., 2014. *Genetic variability among protease producing microorganism using RAPD technique*. *Int. J. Chem. Tech. Res.* 6, 4312-4317.
- DHERBECOURT J., THIERRY A., MADEC M. N., LORTAL S., 2006. *Comparison of amplified ribosomal DNA restriction analysis, peptidoglycan hydrolase and biochemical profiles for rapid dairy propionibacteria species identification*. *Res. Microbiol.* 157, 905-913.
- DUNBAR J., TICKNOR L. O., KUSKE C.R., 2000. *Assessment of microbial diversity in four southwestern United States soils by 16S rRNA gene terminal restriction fragment analysis*. *Appl. Environ. Microb.* 66, 2943-2950.
- DZIEWIT Ł., BARTOSIK D., 2011. *Genomy prokariotyczne w świetle analiz gnomicznych*. *Post. Mikrobiol.* 50, 87-96.
- ESPELI O., MOULIN L., BOCCARD F., 2001. *Transcription attenuation associated with bacterial repetitive extragenic BIME elements*. *J. Mol. Biol.* 314, 375-386.
- FAKRUDDIN M., MANNAN K. S. B., 2013. *Methods for analyzing diversity of microbial communities in natural environments*. *Ceylon J. Sci. (Biol. Sci.)* 42, 19-33.
- FERNANDEZ A., HUANG S., SESTON S., XING J., HICKEY R., CRIDDLE C., TIEDJE J., 1999. *How*

- stable is stable? *Function versus community composition*. *Appl. Environ. Microb.* 65, 3697-3704.
- FERREIRA DOS SANTOS C., SAKAI V. T., APARECIDA DE ANDRADE M., MACHADO M., SCHIPPERS D. N., GREENE A.S., 2004. *REVERSE TRANSCRIPTION AND POLYMERASE CHAIN REACTION: PRINCIPLES AND APPLICATIONS IN DENTISTRY*. *J. Appl. Oral. Sci.* 12, 1-11.
- FIERER N., JACKSON R. B., 2006. *The diversity and biogeography of soil bacterial communities*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 626-631.
- FISHER M. M., TRIPLETT E. W., 1999. *Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities*. *Appl. Environ. Microb.* 65, 4630-4636.
- FRIEDRICH U., PRIOR K., ALTENDORF K., LIPSKI A., 2002. *High bacterial diversity of a waste gas-degrading community in an industrial biofilter as shown by a 16S rDNA clone library*. *Environ. Microbiol.* 4, 721-773.
- GALĄZKA A., GALĄZKA R., 2015. *Phytoremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils artificially polluted using plant-associated-endophytic bacteria and *Dactylis glomerata* as the bioremediation plant*. *Pol. J. Microbiol.* 64, 239-250.
- GALĄZKA A., KRÓL M., PERZYŃSKI A., 2012. *The efficiency of rhizosphere bioremediation with *Azospirillum* sp. and *Pseudomonas stutzeri* in soils freshly contaminated with PAHs and diesel fuel*. *Pol. J. Environ. Stud.* 21, 345-353.
- GICH F. B., AMER E., FIGUERAS J. B., ABELLA C. A., BALAGUER M. D., POCH M., 2000. *Assessment of microbial community structure changes by amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA)*. *Int. Microbiol.* 3, 103-106.
- Gürtler V., Stanisich V. A., 1996. *New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region*. *Microbiology* 142, 3-16.
- HALL V., O'NEILL G. L., MAGEE J. T., DUERDEN B. I., 1999. *Development of amplified 16S ribosomal DNA restriction analysis for identification of Actinomyces species and comparison with pyrolysis-mass spectrometry and conventional biochemical tests*. *J. Clin. Microbiol.* 37, 2255-2261.
- HAUBOLD B., WIEHE T., 2006. *How repetitive are genomes?* *BMC Bioinformatics* 7, 1-10.
- HILTON S., BENNETT A. J., KEANE G., BENDING G. D., CHANDLER D., STOBART R., MILL, P., 2013. *Impact of shortened crop rotation of oilseed rape on soil and rhizosphere microbial diversity in relation to yield decline*. *PLoS One* 8, 1-12.
- HOLLAND P. M., ABRAMSON R. D., WATSON R., GELFAND D. H., 1991. *Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 7276-7280.
- HULTON C. S. J., HIGGINS C. F., SHARP P. M., 1991. *ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other Enterobacteria*. *Mol. Microbiol.* 5, 825-834.
- INGIANNI A., PETRUZZELLI S., MORANDOTTI G., POMPEI R., 1997. *Genotypic differentiation of *Gardnerella vaginalis* by amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA)*. *FEMS Immunol. Med. Mic.* 18, 61-66.
- JAMPACHAISRI K., VALINSKY L., BORNEMAN J., PRESS S. J., 2005. *Classification of oligonucleotide fingerprints: application for microbial community and gene expression analyses*. *Bioinformatics* 21, 3122-3130.
- JARABO-LORENZO A., PÉREZ-GALDONA R., DONATE-CORREA J., RIVAS R., VELÁZQUEZ E., HERNÁNDEZ M., TEMPRANO F., MARTINEZ-MOLINA E., RUIZ-ARGÜESO T., LEÓN-BARRIOS M., 2003. *GENETIC DIVERSITY OF BRADYRHIZOBIAL POPULATIONS FROM DIVERSE GEOGRAPHIC ORIGINS THAT NODULATE LUPINUS SPP. AND ORNITHOPUS SPP.* *Syst. Appl. Microbiol.* 26, 611-623.
- JAWAD A., SNEILING A. M., HERITAGE J., HAWKEY P. M., 1998. *Comparison of ARDRA and recA-RFLP analysis for genomic species identification of *Acinetobacter* spp.* *FEMS Microbiol. Lett.* 165, 357-362.
- JUDD A. K., SCHNEIDER M., SADOWSKY M. J., DE BRUJN F. J., 1993. *Use of repetitive sequences and the polymerase chain reaction technique to classify genetically related *Bradyrhizobium japonicum* Serocluster 123 Strainst*. *Appl. Environ. Microb.* 59, 1702-1708.
- KANEKO T., NAKAJIMA N., OKAMOTO S. i współaut., 2007. *Complete genomic structure of the bloom-forming toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* NIES-843*. *DNA Res.* 14, 247-256.
- KAZUBEK M., DŁUGOSZ A., PAWLK K., 2010. *Zastosowanie technik PCR w toksykologii*. *Postepy Hig. Med. Dosw.* 64, 482-489.
- KIRK J. L., BEAUDETTE L. A., HART M., MOUTOGLIS P., KLIRONOMOS J. N., LEE H., TREVORS J. T., 2004. *Methods of studying soil microbial diversity*. *J. Microbiol. Meth.* 58, 169-188.
- KOEUTH T., VERSALOVIC J., LUPSK J. R., 1995. *Differential subsequence conservation of interspersed repetitive *Streptococcus pneumoniae* BOX elements in diverse bacteria*. *Genome Res.* 5, 408-418.
- KONDAK K., 2009. *Molekularne metody diagnostyki mikrobiologicznej*. *J. Labor. Diagnost.* 45, 325-331.
- KRAWCZYK B., 2007. *Diagnostyka molekularna w zakażeniach szpitalnych*. *Post. Mikrobiol.* 46, 367-378.
- KUMAR R., JOSHI S. R., 2015. *Microbial Ecology of Soil: Studying the diversity of microorganisms in the most complex of the environments. A review*. *Adv. Appl. Microbiol.* 19, 267-279.
- LICZBAŃSKA A., WOŹNIAK A., WAWROCKA A., KRAWCZYŃSKI M.R., 2006. *Techniki wykorzystywane w diagnostyce molekularnej chorób jednogenowych*. *Nowiny Lekarskie* 75, 486-490.
- LIU H. J., YANG C. Y., TIAN Y., LIN G. H., ZHENG T. L., 2010. *Screening of PAH-degrading bacteria in a mangrove swamp using PCR-RFLP*. *Mar. Pollut. Bul.* 60, 2056-2061.
- LIU W., MARSH T. L., CHENG H., FORNEY L. J., 1997. *Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA*. *Appl. Environ. Microb.* 63, 4516-4522.
- ŁYSZCZ M., GALĄZKA A., 2016. *Wybrane metody molekularne wykorzystywane w ocenie bioróżnorodności mikroorganizmów glebowych*. *Post. Mikrobiol.* 55, 309-319.
- MARCINIAK M., ROBAK M., 2012. *PCR jako narzędzie do identyfikacji i różnicowania drobnoustrojów*. *Acta Sci. Pol. Biotechnol.* 11, 5-16.
- MARTIN B., HUMBERT O., CAMARA M., GUENZI E., WALKER J., MITCHELL T., ANDREW P., PRUDHOMME M., ALLOING G., HAKENBECK R., MORRISON D. A., BOULNOIS G. J., CLAVERYS J. P., 1992. *A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae**. *Nucleic Acids Res.* 20, 3479-3483.

- MOESENEDER M. M., ARRIETA J. M., MUYZER G., WINTER C., HERNDL G. J., 1999. Optimization of terminal-restriction fragment length polymorphism analysis for complex marine bacterioplankton communities and comparison with denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microb.* 65, 3518-3525.
- MULLIS K. B., FALOONA F. A., 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Method. Enzymol.* 155, 335-350.
- NIEMANN S., DAMMANN-KALINOWSKI T., NAGEL A., PÜHLER A., SELBITSCHKA W., 1999. Genetic basis of enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)-PCR fingerprint pattern in *Sinorhizobium meliloti* and identification of *S. meliloti* employing PCR primers derived from an ERIC-PCR fragment. *Arch. Microbiol.* 172, 22-30.
- OCHMAN H., GERBER A. S., HART D. L., 1988. Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics* 120, 621-623.
- OLIVE D. M., BEAN P., 1999. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J. Clin. Microbiol.* 37, 1661-1669.
- ORAVECZ O., ELHOTTOVA D., KRISTUFEK V., SUSTR V., FROUZ J., TRISKA J., MARIALIGETI K., 2004. Application of ARDRA and PLFA analysis in characterizing the bacterial communities of the food, gut and excrement of saprophagous larvae of *Penthetria holosericea* (Diptera: Bibionidae): a pilot study. *Folia Microbiol.* 49, 83-93.
- OSBORN A. M., MOORE E. R. B., TIMMIS K. N., 2000. An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphisms (TRFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. *Environ. Microbiol.* 2, 39-50.
- Osorio C. R., Collins M. D., Romalde J. L., Toranzo A. E., 2005. Variation in 16S-23S rRNA intergenic spacer regions in *Photobacterium damsela*: a mosaic-like structure. *Appl. Environ. Microb.* 71, 636-645.
- OVREAS L., TORSVIK V. V., 1998. Microbial diversity and community structure in two different agricultural soil communities. *Microbiol. Ecol.* 36, 303-315.
- PANDEY J., CHAUHAN A., JAIN R. K., 2009. Integrative approaches for assessing the ecological sustainability of in situ bioremediation. *Fems. Microbiol. Rev.* 33, 324-375.
- PAUL D., SINGH R., JAIN R. K., 2006. Chemotaxis of *Ralstonia* sp. SJ98 towards p-nitrophenol in soil. *Environ. Microbiol.* 8, 1797-1804.
- PEREZ-DE-MORA A., ENGEL M., SCHLOTTER M., 2011. ABUNDANCE AND DIVERSITY OF N-ALKANE-DEGRADING BACTERIA IN A FOREST SOIL COCONTAMINATED WITH HYDROCARBONS AND METALS: A MOLECULAR STUDY ON ALKB HOMOLOGOUS GENES. *Microbiol. Ecol.* 62, 959-972.
- PICARD C., DI CELLO F., VENTURA M., FANI R., GUCKERT A., 2000. Frequency and biodiversity of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing bacteria isolated from the maize rhizosphere at different stages of plant growth. *Appl. Environ. Microb.* 66, 948-955.
- POLY F., MONROZIER L. J., BALLY R., 2001. Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of nifH genes in communities of nitrogen fixers in soil. *Res. Microbiol.* 152, 95-103.
- RANJARD L., POLY F., NAZARET S., 2000. Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. *Res. Microbiol.* 151, 167-177.
- RASTOGI G., SANI R. K., 2011. Molecular techniques to assess microbial community structure, function, and dynamics in the environment. [W:] *Microbes and microbial technology agricultural and environmental applications*. AHMAD I., AHMAD F., PICHTEL J. (RED.). SPRINGER SCIENCE+BUSINESS, NEW YORK DORDRECHT HEIDELBERG LONDON, 29-57.
- RINCON-FLOREZ V. A., CARVALHAIS L. C., SCHENK P. M., 2013. Culture-independent molecular tools for soil and rhizosphere microbiology. *Diversity* 5, 581-612.
- ROSSELLO-MORA R., AMANN R., 2001. The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* 25, 39-67.
- SAIKI R., GELFAND D., STOFFEL S., SCHARF S., HIGUCHI R., HORN G., MULLIS K., ERLICH H., 1988. Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.
- SETTE L. D., SIMIONI K. C., VASCONCELLOS S. P., DUSSAN L. J., NETO E. V., OLIVEIRA V. M., 2007. Analysis of the composition of bacterial communities in oil reservoirs from a southern offshore Brazilian basin. *Anton. Leeuw.* 91, 253-266.
- SHAPIRO J. A. VON STERNBERG R., 2005. Why repetitive DNA is essential to genome function. *Biol. Rev.* 80, 1-24.
- SLABBERT E., VAN HEERDEN C. J., JACOBS K., 2010. Optimisation of automated ribosomal intergenic spacer analysis for the estimation of microbial diversity in fynbos soil. *S. Afr. J. Sci.* 106, 1-4.
- SMIT E., LEEFLANG P., WERNARS K., 1997. Detection of shifts in microbial community structure and diversity in soil caused by copper contamination using amplified ribosomal DNA restriction analysis. *FEMS Microbiol. Ecol.* 23, 249-261.
- SPALIK K., PIWCZYŃSKI M., 2009. Rekonstrukcja filogenezy i wnioskowanie filogenetyczne w badaniach ewolucyjnych. *Kosmos* 58, 485-498.
- Stern M. J., Ames G. F., Smith N. H., Robinson E. C., Higgins C. F., 1984. Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome. *Cell* 37, 1015-1026.
- STEWART F. J., CAVANAUGH C. M., 2007. Intragenomic variation and evolution of the internal transcribed spacer of the rRNA operon in *Bacteria*. *J. Mol. Evol.* 65, 44-67.
- STUDZIŃSKA A., TYBURSKI J., DACA P., TRETYN A., 2008. PCR w czasie rzeczywistym. Istota metody i strategie monitorowania przebiegu reakcji. *Biotechnologia* 1, 71-85.
- TIEDJE J. M., ASUMING-BREMPOG S., NUSSLEIN K., MARSH T. L., FLYNN S. J., 1999. Opening the black box of soil microbial diversity. *Appl. Soil. Ecol.* 13, 109-122.
- TOBES R., PAREJA E., 2006. Bacterial repetitive extragenic palindromic sequences are DNA targets for Insertion Sequence elements. *BMC Genomics* 7, 1-12.
- TONIN C., VANDENKOORNHUYSE P., JONER E. J., STRACZEK J., LEYVAL C., 2001. Assessment of arbuscularmycorrhizal fungi diversity in the rhizosphere of *Viola calaminaria* and effect of these fungi on heavy metal uptake by clover. *Mycorrhiza* 10, 161-168.
- TREANGEN T. J., ABRAHAM A. L., TOUCHON M., ROCHA E. P., 2009. Genesis, effects and fates of repeats in prokaryotic genomes. *FEMS Microbiol. Rev.* 33, 539-571.

- VANEECHOUTTE M., ROSSAU R., DE VOS P., GILLIS M., JANSSENS D., PAEPE N., DE ROUCK A., FIERS T., CLAEYS G., KERSTERS K., 1992. *Rapid identification of bacteria of the Comamonadaceae with amplified ribosomal DNA-restriction analysis (ARDRA)*. FEMS Microbiol. Lett. 15, 227-233.
- VANEECHOUTTE M., RIEGEL P., DE BRIEL D., MONTEIL H., VERSCHRAEGEN G., DE ROUCK A., CLAEYS G., 1995. *Evaluation of the applicability of amplified rDNA-restriction analysis (ARDRA) to identification of species of the genus Corynebacterium*. Res. Microbiol. 146, 633-641.
- VERSALOVIC J., LUPSKI J. R., 1998. *Interspersed repetitive sequences in bacterial genomes*. [W:] *Bacterial genomes: physical structure and analysis*. BRUIJN F. DE., LUPSKI J. R., WEINSTOCK G. M. (RED.). SPRINGER SCIENCE & BUSINESS MEDIA, NEW YORK, 38-48.
- WELSH J., MCCLELLAND M., 1990. *Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers*. Nucleic Acids Res. 18, 7213-7218.
- WILLIAMS J. G., KUBELIK A. R., LIVAK K. J., RASFALSKY J. A., TINGEY S. V., 1990. *DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful genetic markers*. Nucleic Acids Res. 18, 6531-6535.
- WILSON L. A., SHARP P. M., 2006. *Enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) sequences in Escherichia coli: evolution and implications for ERIC-PCR*. Mol. Biol. Evol. 23, 1156-1168.
- WRIGHT P. A., WYNFORD-THOMAS D., 1990. *The polymerase chain reaction: miracle or mirage? A critical review of its uses and limitations in diagnosis and research*. J. Pathol. 162, 99-117.
- ZAGALSKA-NEUBAUER M., DUBIEC A., 2007. *Techniki i markery molekularne w badaniach zmienności genetycznej ptaków*. Notatki Ornitologiczne 48, 193-206.
- ZULKIFLI Y., ALITHEEN N. B., SON R., RAHA A. R., SAMUE L., YEAP S. K., NISHIBUCHI M., 2009. *RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA-PCR AND ERIC PCR ANALYSIS ON VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS ISOLATED FROM COCKLES IN PADANG, INDONESIA*. Int. Food Res. J. 16, 141-150.

KOSMOS Vol. 66, 2, 193-206, 2017

MALGORZATA ŁYSZCZ, ANNA GAŁĄZKA

Department of Agricultural Microbiology, Institute of Soil Science and Plant Cultivation, State Research Institute, Czartoryskich 8, 24-100 Pulawy, E-mail: mlyszcz@iung.pulawy.pl, agalazka@iung.pulawy.pl

METHODS BASED ON DNA PCR-AMPLIFICATION FOR EVALUATION OF THE SOIL MICROBIAL DIVERSITY

Summary

Soil microorganisms represent a highly diverse group of living organisms in terms of genomic and phenotypic characteristics. Due to such a large diversity, it is important to select appropriate identification methods which would secure its most complete determination. Genetic techniques are proper tools of choice for analyzing genetic variability of microorganism, the most important of which is the polymerase chain reaction (PCR), developed in the 1980s. This work presents an overview of the basic issues concerning studies on genetic variability of soil microorganisms with help of molecular markers and application of PCR techniques such as PCR-RFLP, TRFLP, ARDRA, RAPD.

Key words: soil microorganism, genetic diversity, molecular markers, PCR based methods, ARDRA, PCR-RFLP, RAPD, REP-PCR, TRFLP