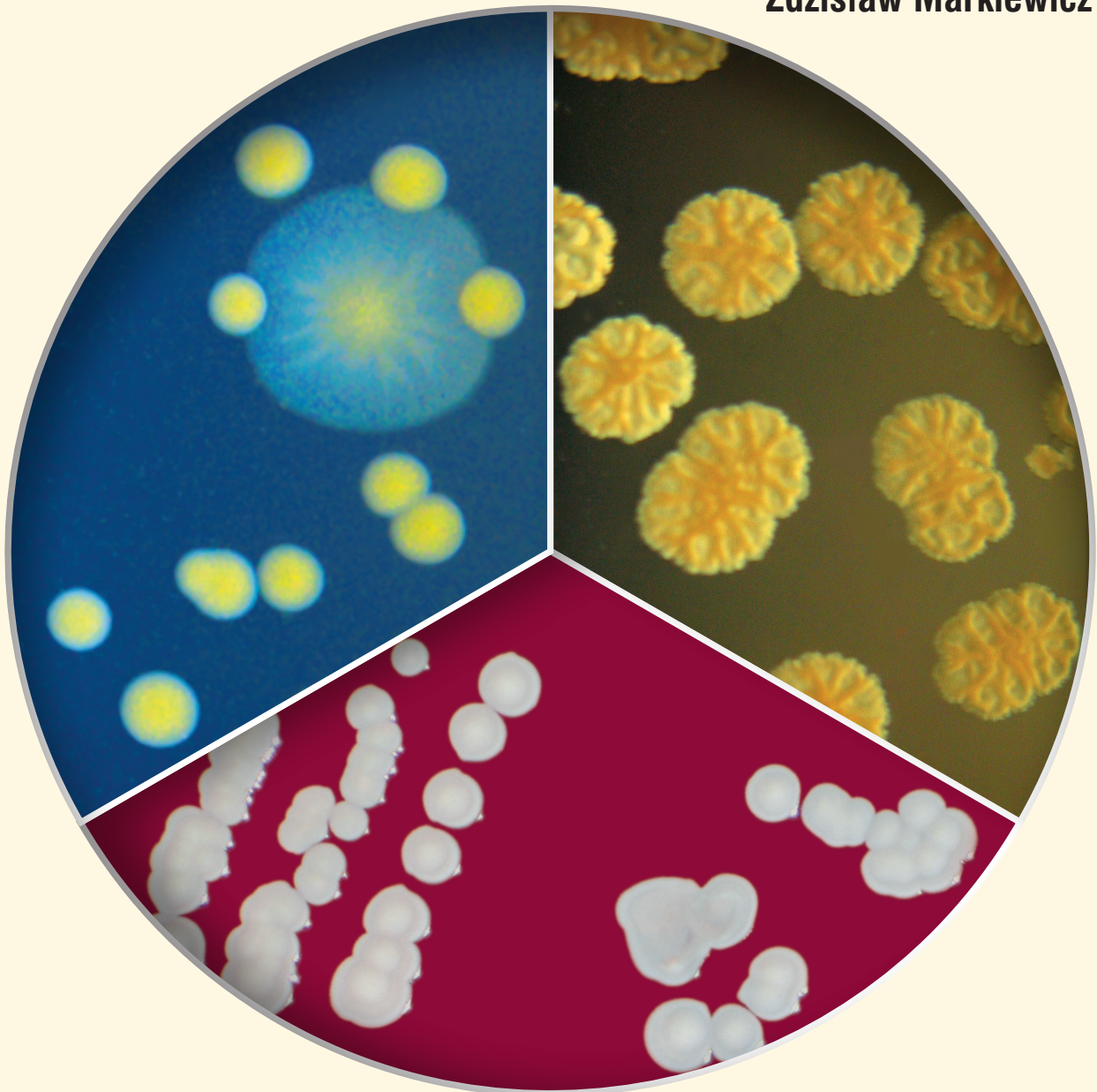


BIOLOGIA MOLEKULARNA BAKTERII

NOWE WYDANIE

Redaktorzy naukowi **Jadwiga Baj**
Zdzisław Markiewicz



AUTORZY

Jadwiga Baj wykaz skrótów, podrozdz. 2.4.13, rozdz. 3
Dariusz Bartosik podrozdz. 4.1, 6.2–6.8 (oprócz 6.8.1 i 6.8.2), 6.9, 6.10
Łukasz Dziewit część rozdz. 1
Elżbieta K. Jagusztyn-Krynicka rozdz. 8
Zdzisław Markiewicz rozdz. 2 (oprócz podrozdz. 2.4.13)
Andrzej Piekarowicz podrozdz. 6.8.3, rozdz. 7
Mirosława Włodarczyk część rozdz. 1, podrozdz. 4.4, 6.1, 6.8.1
Krystyna I. Wolska podrozdz. 4.2–4.6, rozdz. 5, podrozdz. 6.8.2

Autorzy są pracownikami naukowo-dydaktycznymi Instytutu Mikrobiologii
Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego

Projekt okładki i stron tytułowych **Przemysław Spiechowski**

Ilustracje na okładce **Lakeview Image/Shutterstock**

Wydawca **Małgorzata Nawrot**

Redaktor **Krystyna Kruczyńska**

Produkcja **Mariola Grzywacka**

Łamanie **Grafini, Brwinów**

Książka, którą nabyłeś, jest dziełem twórcy i wydawcy. Prosimy, abyś przestrzegał praw, jakie im przysługują. Jej zawartość możesz udostępnić nieodpłatnie osobom bliskim lub osobiście znanym. Ale nie publikuj jej w internecie. Jeśli cytujesz jej fragmenty, nie zmieniaj ich treści i koniecznie zaznacz, czyje to dzieło. A kopiując jej część, rób to jedynie na użytek osobisty.

Szanujmy cudzą własność i prawo

Więcej na www.legalnakultura.pl

Polska Izba Książki

Copyright © by Wydawnictwo Naukowe PWN SA
Warszawa 2006, 2015

ISBN 978-83-01-18183-3

Wydanie 2 zmienione
Warszawa 2015

Wydawnictwo Naukowe PWN SA
infolinia 801 33 33 88
tel. 22 69 54 321; faks 22 69 54 288
e-mail: pwn@pwn.com.pl; www.pwn.pl
Druk i oprawa: OSDW Azymut Sp. z o.o

PRZEDMOWA

Pierwsze wydanie *Biologii molekularnej bakterii* ukazało się w roku 2006, czyli 9 lat temu. Od tego czasu w badaniach mikrobiologicznych dokonano ogromnego postępu, co było możliwe dzięki dynamicznemu rozwojowi metod molekularnych, a w szczególności opracowaniu i upowszechnieniu wysokoprzepustowych technik sekwencjonowania DNA. W roku 1995 zsekwencjonowano pierwszy genom bakteryjny. Dziesięć lat później znaleźliśmy już sekwencje nukleotydowe blisko 300 genomów, a w kolejnym dziesięcioleciu – ponad 30 tysięcy, w tym ponad 2200 genomów różnych szczepów *Escherichia coli*! Analizy tak dużej ilości danych uzyskanych w projektach genomowych i metagenomowych są kopalnią wiedzy o mikroorganizmach, w tym takich, których nie potrafimy jeszcze hodować w warunkach laboratoryjnych.

Wymiernym efektem rozwoju badań z dziedziny mikrobiologii było pojawienie się wielu nowych naukowych czasopism międzynarodowych, publikujących prace na temat prokariotów, znajdujących się na prestiżowej liście ISI – Journal Citation Reports. Ich liczba wzrosła z 89 w roku 2006 do 119 w roku 2014. Na tej liście, co nas bardzo cieszy, znajdują się obecnie trzy polskie czasopisma, w tym dwa poświęcone bakteriologii.

W połowie 2014 roku Wydawnictwo Naukowe PWN zwróciło się do nas, redaktorów pierwszego wydania, z propozycją przygotowania nowego, zmienionego wydania *Biologii molekularnej bakterii*. Wydanie to miało uzyskać bardziej nowoczesny format. Odpowiedź była oczywiście pozytywna, bo

choć podstawowe informacje o bakteriach, przede wszystkim dotyczące ich budowy i metabolizmu, zmieniły się stosunkowo nieznacznie, to w innych dziedzinach wydarzyło się wiele nowego. Tak powstało obecne, drugie wydanie, w którym uaktualniono większość informacji, a także wprowadzono niezbędne uzupełnienia, chociaż zakres tych zmian był nieco ograniczony objętością książki.

Do grona autorów dołączył dr Łukasz Dziewit, adiunkt w Instytucie Mikrobiologii UW, który w rozdziale 1 opisał zagadnienia związane z metagenomiką oraz molekularnymi metodami identyfikacji i klasyfikacji mikroorganizmów. W rozdziale 2 szeroko omówione zostały nowe odkrycia dotyczące wielokomórkowych społeczności bakteryjnych, w rozdziale 3 zaś, na podstawie wyników najnowszych badań, na nowo opisano metylo- i metanotrofię, a także uzupełniono wiadomości o metabolizmie bezwzględnych beztlenowców. W rozdziale 4 przedstawiono nowe spojrzenie na strukturę genomów bakteryjnych, z uwzględnieniem chromidów, niedawno wyróżnionej grupy replikonów o mozaikowej strukturze, a w 5 – omówiono ostatnie odkrycia dotyczące udziału sRNA w regulacji ekspresji genów.

Największe zmiany w porównaniu z pierwszym wydaniem są w rozdziale 6, który przedstawia zarówno zaktualizowaną klasyfikację, jak i charakterystykę poszczególnych grup ruchomych elementów genetycznych, w tym elementów integrujących z DNA oraz mobilnych intronów i intein, a także nowo poznane mechanizmy i bariery

horyzontalnego transferu genów. W rozdziale 7, dotyczącym wirusów bakteryjnych, przedstawiono podstawy nowej taksonomii bakteriofagów. W rozdziale 8 wprowadzono pojęcie mikrobiomu i opisano pokrótce Human Microbiome Project (w ostatnich 10 latach opublikowano prawie 16 tysięcy prac na temat zespołów mikroorganizmów zamieszkujących organizm człowieka). Dodatkowo zamieszczono w nim najnowsze informacje na temat układów sekrecji bakterii patogennych, a także

dotyczące oddziaływania patogenów z komórkami organizmu gospodarza.

Na koniec, chcielibyśmy serdecznie podziękować dr hab. Nadziei Dreli za konsultację terminów z zakresu immunologii i mgr. Jakubowi Czarneciemu za jego twórczy wkład do podrozdziału dotyczącego metylotrofii.

Warszawa i Seattle, kwiecień 2015
Jadwiga Baj i Zdzisław Markiewicz

SPIS TREŚCI

NAJWAŻNIEJSZE STOSOWANE SKRÓTY	XI	
1. POZYCJA FILOGENETYCZNA BAKTERII I ZASADY ICH TAKSONOMII	1	
Wprowadzenie	1	
1.1. Prokarioty i eukarioty	1	
1.1.1. Miejsce bakterii we wczesnych systemach klasyfikacji organizmów	2	
1.1.2. Trzy domeny świata żywego i „uniwersalne drzewo życia”, pozycja filogenetyczna bakterii według koncepcji Woese’a	2	
1.2. Ogólna charakterystyka domen	3	
1.2.1. <i>Bacteria</i> i <i>Archaea</i> – podobieństwa i różnice	4	
1.3. Klasyfikacja i nazewnictwo bakterii	6	
1.3.1. Koncepcja gatunku u prokariotów	6	
1.3.2. Zasady nazewnictwa	8	
1.3.3. Najważniejsze typy i klasy taksonomiczne bakterii	8	
1.4. Metody identyfikacji i klasyfikacji bakterii i archeonów	10	
1.4.1. Analizy fenotypowe	10	
1.4.2. Analizy DNA	11	
1.4.3. Analiza porównawcza białek	15	
1.5. Bakterie i archeony w dobie metagenomiki	15	
1.6. <i>Bergey’s manual of systematic bacteriology</i> i <i>The prokaryotes</i>	16	
Literatura uzupełniająca	16	
2. BUDOWA I FUNKCJE KOMÓRKI BAKTERYJNEJ	18	
Wprowadzenie	18	
2.1. Morfologia i cykle życiowe bakterii	18	
2.1.1. Kształt bakterii i układy komórek	19	
2.1.2. Cykle życiowe bakterii	20	
2.2. Barwienie Grama – bakterie gramodatnie i gramujemne	20	
2.3. Cytozol i jego elementy składowe	23	
2.3.1. Rybosomy	23	
2.3.2. Białka cytoszkieletu	23	
2.3.3. Materiały zapasowe	27	
2.3.4. Magnetosomy	29	
2.3.5. Karboksosomy i enterosomy	30	
2.3.6. Przedziały komórkowe u przedstawicieli <i>Planctomycetes</i>	31	
2.3.7. Pęcherzyki gazowe	33	
2.3.8. Systemy błon wewnątrzcytoplazmatycznych u bakterii	33	
2.4. Budowa i funkcje osłon bakteryjnych	33	
2.4.1. Błona cytoplazmatyczna	33	
2.4.2. Udział białek błony cytoplazmatycznej w procesach energetycznych	35	
2.4.3. Procesy transportu przez błonę cytoplazmatyczną	37	
2.4.4. Antybiotyki działające na błonę cytoplazmatyczną	41	
2.4.5. Przestrzeń peryplazmatyczna	42	
2.4.6. Mureina ściany komórkowej	46	
2.4.7. Polimery związane z mureiną	51	
2.4.8. Bakterie pozbawione sakulusa	57	
2.4.9. Błona zewnętrzna bakterii gramujemnych	59	
2.4.10. Warstwa S	66	
2.4.11. Białka amyloidalne	68	
2.4.12. Otoczki bakteryjne	68	
2.4.13. Biosynteza związków budujących osłonę komórkową bakterii	72	
2.5. Struktury zewnątrzkomórkowe	81	
2.5.1. Rzęski i chemotaksja	81	
2.5.2. Inne sposoby poruszania się bakterii	86	
2.5.3. Fimbrie	88	
2.5.4. Celulosomy	90	
2.5.5. Pęcherzyki błonowe	90	
2.5.6. Fibryle	92	
2.5.7. Spinae	92	
2.6. Formy przetrwalnikowe bakterii	93	

2.6.1. Endospory	93
2.6.2. Inne formy przetrwalnikowe	95
2.7. Wielokomórkowe społeczności bakteryjne	96
2.7.1. Biofilmy	97
2.7.2. Maty mikroorganizmów	100
Literatura uzupełniająca	101
3. METABOLIZM	103
Wprowadzenie	103
3.1. Ogólna charakterystyka metabolizmu	104
3.1.1. Typy pokarmowe	104
3.1.2. Pierwiastki biogenne	105
3.1.3. Azot	106
3.1.4. Siarka	114
3.1.5. Fosfor	116
3.1.6. Czynniki wzrostowe	117
3.2. Metabolizm chemoorganoheterotrofów	117
3.2.1. Rozkład polimerów	117
3.2.2. Wykorzystanie węglowodorów alifatycznych i związków aromatycznych	123
3.2.3. Glikoliza	125
3.2.4. Szlak heksozomonofosforanowy	128
3.2.5. Szlak Entnera–Doudoroffa	128
3.2.6. Cykl kwasu cytrynowego	130
3.2.7. Cykl glioksalowy	132
3.2.8. Fermentacje – fosforylacja substratowa i endogenne akceptory elektronów	133
3.3. Metabolizm chemolitotrofów	139
3.3.1. Nitryfikacja i anamoks	140
3.3.2. Utlenianie związków siarki	145
3.3.3. Metabolizm wodoru	150
3.3.4. Utlenianie tlenku węgla	152
3.3.5. Bakterie utleniające żelazo	153
3.3.6. Wykorzystanie innych związków nieorganicznych w metabolizmie chemolitotroficznym	154
3.4. Metabolizm fototrofów	155
3.4.1. Barwniki uczestniczące w fotosyntezie	156
3.4.2. Bakterie fototroficzne	159
3.4.3. Fotosynteza anoksygenna	159
3.4.4. Fotosynteza oksygenna	165
3.4.5. Inny sposób wykorzystania światła przez bakterie	167
3.5. Metabolizm tlenowy i beztlenowy	168
3.5.1. Metabolizm tlenowy	168
3.5.2. Oddychanie	171
3.5.3. Oddychanie beztlenowe	173
3.5.4. Inne sposoby generowania siły protonomotorycznej	182
3.6. Asymilacja dwutlenku węgla i metabolizm związków C1	183
3.6.1. Cykl Calvina	183
3.6.2. Redukcyjny cykl kwasów trikarboksylowych	186
3.6.3. Redukcyjny szlak acetylo-CoA (szlak Ljungdahla–Wooda)	187
3.6.4. Szlak 3-hydroksypropionowy	189
3.6.5. Metylotrofia – wykorzystanie związków C1	190

3.6.6. Asymilacja węgla u metylotrofów	193
Literatura uzupełniająca	197

4. CHROMOSOM BAKTERYJNY 198

Wprowadzenie	198
4.1. Struktura genomów bakteryjnych	198
4.2. Struktura chromosomu bakteryjnego	201
4.2.1. Podwójna helisa	201
4.2.2. Forma kolistą, kowalencyjnie zamkniętą i forma liniową	202
4.2.3. Superhelisa	203
4.2.4. Pofałdowany chromosom	203
4.2.5. Białka histonopodobne, budowa i funkcja	204
4.3. Replikacja chromosomu	206
4.3.1. Podstawowe reguły replikacji	206
4.3.2. Inicjacja replikacji	208
4.3.3. Elongacja replikacji	211
4.3.4. Terminacja replikacji i segregacja chromosomów	214
4.3.5. Antybiotyki hamujące syntezę DNA	216
4.4. Rekombinacja homologiczna	217
4.4.1. Typy rekombinacji u bakterii i podstawowe warunki wymagane do zajścia rekombinacji homologicznej	217
4.4.2. Modele rekombinacji homologicznej	218
4.4.3. Molekularny mechanizm rekombinacji homologicznej	219
4.4.4. Rola rekombinacji homologicznej w naprawie DNA	222
4.4.5. Związek między rekombinacją homologiczną i replikacją	222
4.5. Zmienność mutacyjna	224
4.5.1. Typy mutacji, kryteria klasyfikacji	224
4.5.2. Mutacje spontaniczne	225
4.5.3. Mutacje indukowane	226
4.5.4. Supresja mutacji	228
4.6. Naprawa uszkodzeń DNA	230
4.6.1. Prosta rewersja błędu	230
4.6.2. Naprawa przez wycinanie	231
4.6.3. Naprawa rekombinacyjna	234
4.6.4. Regulon SOS	235
Literatura uzupełniająca	236

5. EKSPRESJA GENÓW 237

Wprowadzenie	237
5.1. Transkrypcja	237
5.1.1. Transkrypcyjna organizacja bakteryjnego DNA – operony	238
5.1.2. Rodzaje RNA, ich funkcje w komórce	238
5.1.3. Polimeraza RNA	240
5.1.4. Inicjacja transkrypcji i jej regulacja	243
5.1.5. Elongacja transkrypcji i jej regulacja	249
5.1.6. Terminacja transkrypcji i jej regulacja	250
5.1.7. Potranskrypcyjna modyfikacja RNA i jego stabilność	256
5.1.8. Antybiotyki hamujące transkrypcję	257

5.2. Translacja	257	6.3.1. Klasyfikacja i nazewnictwo elementów integrujących z DNA	323
5.2.1. Budowa rybosomów i ich rola w syntezie białek	258	6.3.2. Struktura genetyczna i właściwości Tn916	324
5.2.2. Inicjacja translacji i jej regulacja	259	6.3.3. Integrony i kasety genowe	326
5.2.3. Elongacja translacji i jej regulacja	260	6.4. Mobilne introny i inteiny	328
5.2.4. Terminacja translacji	261	6.4.1. Introny I grupy	328
5.2.5. Aminoacylacja tRNA	262	6.4.2. Introny II grupy	328
5.2.6. Kod genetyczny	262	6.4.3. Inteiny	330
5.2.7. Fałdowanie się białek i udział białek opiekuńczych w tym procesie	264	6.5. Ruchome elementy genetyczne o hybrydowej strukturze	330
5.2.8. Potranslacyjna obróbka i degradacja białek	266	6.6. Wyspy genomowe	331
5.2.9. Antybiotyki hamujące syntezę białek	268	6.7. Rola ruchomych elementów genetycznych w horyzontalnym transferze genów	332
5.3. Globalne systemy regulacji ekspresji genów	269	6.8. Mechanizmy horyzontalnego transferu genów	333
5.3.1. Regulon cAMP–CRP	270	6.8.1. Koniugacja	334
5.3.2. Regulon azotowy	272	6.8.2. Transformacja bakteryjna	346
5.3.3. Regulon szoku cieplnego	275	6.8.3. Transdukcja	349
5.3.4. Odpowiedź ścisła	277	6.8.4. Inne mechanizmy HGT	352
5.4. Ryboregulacja	279	6.9. Bariery horyzontalnego transferu genów	354
5.4.1. Znaczenie ryboregulacji w kontroli ekspresji genów	279	6.9.1. Systemy restrykcji i modyfikacji	354
5.4.2. Antysensowny sRNA kodowany w pozycji <i>cis</i>	279	6.9.2. Systemy CRISPR	355
5.4.3. Regulatorowy sRNA kodowany w pozycji <i>trans</i>	281	6.10. Wpływ HGT na zmienność i ewolucję bakterii	357
5.4.4. sRNA wiążący białka i sRNA dwufunkcyjny	281	Literatura uzupełniająca	358
5.4.5. Rola białka Hfq w ryboregulacji	282		
5.4.6. Ryboprzełączniki	282		
Literatura uzupełniająca	284		
6. RUCHOME ELEMENTY GENETYCZNE BAKTERII I HORYZONTALNY TRANSFER GENÓW	285	7. BAKTERIOFAGI	359
Wprowadzenie	285	Wprowadzenie	359
6.1. Plazmidy bakteryjne	285	7.1. Taksonomia i nazewnictwo bakteriofagów	359
6.1.1. Definicja plazmidu	285	7.2. Budowa cząstek fagowych	363
6.1.2. Struktura cząsteczki plazmidu	287	7.2.1. Cząstki o strukturze helikalnej	363
6.1.3. Standardowa charakterystyka, klasyfikacja i nazewnictwo plazmidów	289	7.2.2. Cząstki o strukturze izometrycznej	363
6.1.4. Replikacja plazmidów	290	7.2.3. Cząstki o złożonej strukturze wirionu	363
6.1.5. Regulacja procesu replikacji	298	7.3. Organizacja i struktura genomowych kwasów nukleinowych	364
6.1.6. Mechanizmy zapobiegające utracie plazmidów przez komórki bakteryjne	301	7.3.1. Bakteriofagi typu (+)RNA	365
6.1.7. Molekularne podstawy niezgodności plazmidów i zakresu gospodarzy	304	7.3.2. Bakteriofagi posiadające jako genom dwuniciowy RNA	365
6.1.8. Funkcje fenotypowe bakterii determinowane przez plazmidy	306	7.3.3. Struktura i organizacja genetyczna genomu bakteriofagów typu DNA	366
6.2. Elementy transpozycyjne	312	7.4. Namnażanie się bakteriofagów	370
6.2.1. Transpozony I grupy	315	7.4.1. Etapy procesu namnażania	370
6.2.2. Transpozony II grupy	317	7.4.2. Adsorpcja i penetracja	370
6.2.3. Nieautonomiczne TE i kasety transpozycyjne	319	7.4.3. Losy DNA fagowego w komórce	372
6.2.4. Bakteriofag Mu	320	7.5. Ekspresja materiału genetycznego bakteriofagów	374
6.2.5. Regulacja częstości transpozycji	320	7.5.1. Ekspresja materiału genetycznego prokariotycznych wirusów typu (+)RNA	374
6.2.6. Rodzaje zmian w DNA wywołanych transpozycją	322	7.5.2. Ekspresja materiału genetycznego faga dsRNA	375
6.3. Elementy integrujące z DNA	323	7.5.3. Regulacja ekspresji genomu bakteriofagów typu DNA	376
		7.5.4. Ekspresja genów bakteriofagów zawierających genom w postaci ssDNA	376
		7.5.5. Ekspresja genów bakteriofagów zawierających genom w postaci dsDNA	378
		7.6. Replikacja genomów bakteriofagów	387
		7.6.1. Replikacja genomowego RNA o dodatniej polarności	387

7.6.2. Replikacja DNA bakteriofagów	388
7.6.3. Replikacja DNA fagów posiadających jako genom ssDNA	390
7.6.4. Replikacja DNA fagów posiadających jako genom dsDNA	392
7.7. Składanie i dojrzewanie cząstek bakteriofagów	397
7.7.1. Składanie bakteriofagów o strukturze helikalnej i izometrycznej	397
7.7.2. Składanie bakteriofagów o złożonej strukturze	398
7.8. Uwalnianie cząstek fagowych z komórki	400
7.9. Zastosowanie i rola bakteriofagów	401
7.9.1. Zastosowanie bakteriofagów w technice <i>phage display</i>	401
7.9.2. Zastosowanie bakteriofagów w leczeniu zakażeń bakteryjnych (terapia fagowa)	401
7.9.3. Rola bakteriofagów w patogenności bakterii	402
Literatura uzupełniająca	403

8. MOLEKULARNE PODSTAWY BAKTERYJNEJ PATOGENEZY 404

Wprowadzenie	404
8.1. Choroby infekcyjne	405
8.1.1. Definicje, klasyczne i molekularne postulaty Kocha	405
8.1.2. Zachorowalność, śmiertelność	406
8.2. Zmienność genomów bakterii patogennych	408
8.2.1. Horyzontalny transfer genów	408
8.2.2. Globalne mutatory	409
8.2.3. Rearanżacje genomów	410
8.2.4. Analizy porównawcze genomów; pangenomy bakterii patogennych	410
8.2.5. Analizy porównawcze transkryptomów	415
8.3. Projekt HMP – <i>Human Microbiome Project</i>	416
8.4. Przewyciężanie mechanizmów obronnych organizmu gospodarza	417
8.4.1. Mechanizmy obronne we wrotach zakażenia (skóra i błony śluzowe)	418
8.4.2. Mechanizmy nieswoiste działające na poziomie krwi i tkanek	419
8.4.3. Peptydy antybakteryjne	426
8.4.4. Mechanizmy swoiste	427
8.5. Sekrecja czynników wirulencji	428
8.5.1. Białka powierzchniowe bakterii gramodatnich	429

8.5.2. Sekrecja czynników wirulencji bakterii gramujemnych	430
8.5.3. Systemy sekrecji typu VII charakterystyczne dla bakterii rodzajów <i>Mycobacterium</i> i <i>Corynebacterium</i>	440
8.5.4. Pęcherzyki błonowe – MV i OMV	440
8.5.5. Niesklasyfikowane systemy sekrecji (ang. <i>non-classically secreted</i>)	441
8.6. Adhezja	441
8.6.1. Mediatorzy adhezji – fimbrie	442
8.6.2. Adhezyny niefimbrylarne	443
8.6.3. Procesy adhezji w jamie ustnej	444
8.6.4. Skutki procesów adhezji	446
8.7. Patogeny wewnątrzkomórkowe	447
8.7.1. Wykorzystanie białek G (GTPaz)	448
8.7.2. Wpływ wewnątrzkomórkowych patogenów na procesy ubiquitynacji białek gospodarza – rola w patogeniezie	449
8.7.3. Inwazyjność bakterii rodzaju <i>Salmonella</i>	449
8.7.4. Inwazyjność bakterii rodzaju <i>Shigella</i>	453
8.7.5. Oddziaływanie enteropatogennych <i>Escherichia coli</i> z komórkami nabłonkowymi	456
8.8. Modulacja procesów przeżywalności komórek eukariotycznych przez bakterie patogenne	460
8.8.1. <i>Salmonella</i>	461
8.8.2. <i>Helicobacter pylori</i>	463
8.9. Regulacja wytwarzania czynników wirulencji	464
8.9.1. Zmienność antygenowa, zmienność fazowa	464
8.9.2. Regulacja ekspresji genów kodujących czynnik wirulencji przez czynniki środowiska na poziomie transkrypcji	468
8.9.3. Regulacja syntezy czynników wirulencji na poziomie RNA (małe RNA, ryboprzełączniki, antysensowne RNA)	473
8.9.4. Przykłady kaskadowej regulacji ekspresji genów kodujących czynniki wirulencji	474
8.10. Toksyny bakteryjne	477
8.10.1. Egzotoksyny	478
Literatura uzupełniająca	482

SŁOWNICZEK 484

SKOROWIDZ 496

1

POZYCJA FILOGENETYCZNA BAKTERII I ZASADY ICH TAKSONOMII

WPROWADZENIE

Głównym celem taksonomii organizmów żywych jest ich porządkowanie, czyli klasyfikacja na podstawie wybranych właściwości. Taksonomia każdej grupy organizmów powinna być filogenetyczna, a więc odzwierciedlająca ewolucyjne pokrewieństwa między nimi. Identyfikacja i klasyfikacja prokariotów przez długi czas była oparta głównie na kryteriach morfologicznych, fizjologiczno-biochemicznych, immunologicznych i w niewielkim tylko stopniu na analizie DNA. Była to klasyfikacja sztuczna i choć bardzo przydatna w praktyce, nie odzwierciedlała w pełni zależności filogenetycznych między taksonami ani nie lokowała tej grupy w prawidłowej pozycji tzw. uniwersalnego drzewa filogenetycznego organizmów żywych. Współczesna taksonomia prokariotów, dzięki wykorzystaniu szerokiego wachlarza metod molekularnych, jest taksonomią filogenetyczną. Największe znaczenie ma w niej analiza sekwencji genu 16S rRNA kodującego składnik małej podjednostki rybosomowej. Analiza porównawcza sekwencji 16S rDNA prokariotów i 18S rDNA eukariotów pozwoliła skonstruować uniwersalne drzewo filogenetyczne wszystkich organizmów, a ponadto udokumentować istnienie dwóch odmiennych grup prokariotów – bakterii i archeonów (domen *Bacteria* i *Archaea*), z których każda jest równocześnie domeną *Eukarya*, grupującej wszystkie organizmy eukariotyczne.

W rozdziale przedstawiono ogólną charakterystykę porównawczą wymienionych domen, ze zwróceniem uwagi na cechy odróżniające archeony od bakterii, a wspólne z organizmami

eukariotycznymi. Zaprezentowane są też techniki biologii molekularnej wykorzystywane w nowoczesnych badaniach taksonomii bakterii.

1.1. PROKARIOTY I EUKARIOTY

Mikroorganizmy (drobnoustroje) to kategoria bardzo różnorodna, zarówno pod względem strukturalnym, jak i taksonomicznym. Zalicza się do niej bowiem wszystkie **prokarioty**, jak również **eukarioty** o budowie jednokomórkowej lub występujące w postaci skupisk komórek.

W podręcznikach mikrobiologii zwyczajowo omawiane są także wirusy. Jednak wirusy, mimo że są zdolne do zachowania „ciągłości genetycznej” poprzez powielanie swego materiału genetycznego, nie spełniają definicji organizmu, gdyż nie mają budowy komórkowej ani nie przeprowadzają własnego metabolizmu energetycznego. Wirusy nie są zatem objęte przedstawioną niżej klasyfikacją.

Terminy **prokariotyczny** i **eukariotyczny** wprowadził E. Chatton w latach trzydziestych XX wieku dla rozróżnienia dwóch typów budowy komórek. Pierwotnym kryterium tego rozróżnienia była struktura aparatu jądrowego, co odzwierciedla zastosowana przez niego terminologia (*karyon* to po grecku jądro, *eu-* oznacza prawdziwy, zaś *pro-* pierwotny). Jednak prostsza budowa aparatu jądrowego prokariotów (określanego mianem **nukleoidu**, s. 23) nie jest jedyną cechą odróżniającą prokarioty od eukariotów. Różnic tych jest wiele, a najważniejsze z nich przedstawiono w tabeli 1.1.

Tabela 1.1. Przykłady różnic między komórkami prokariotycznymi i eukariotycznymi

Komórki prokariotyczne	Komórki eukariotyczne
Prosta struktura aparatu jądrowego w formie nukleoidu nieotoczonego błoną*	Występuje jądro otoczone dwuwarstwową błoną, zawierające chromosomy, zwykle liczne
Struktura chromosomu, częściej kolistego niż liniowego, jest stosunkowo prosta. DNA związany z białkami histonopodobnymi	Struktura chromosomu złożona, DNA związany z białkami histonowymi (nukleosomy)
Organizmy haploidalne, mitozy i mejozy nie występują	Organizmy diploidalne, podział komórki wymaga mitozy bądź mejozy
Ściana komórkowa występuje u większości przedstawicieli; u bakterii zawiera zwykle mureinę (peptydoglikan), u archeonów ma budowę zróżnicowaną – może być zbudowana z tzw. pseudomureiny, polisacharydów, białek lub glikoprotein	Ściana komórkowa, jeśli występuje, zawiera składniki strukturalne w postaci celulozy lub chityny; nigdy nie zawiera mureiny
Nie występują mitochondria i plastydy	Występują mitochondria, a u organizmów fotosyntezujących także chloroplasty
Komórki zawierają tylko rybosomy 70S	Dwa typy rybosomów 80S (cytoplazmatyczne) i 70S (organellowe)
U bakterii ruchliwych najczęściej występują rzęski o budowie odmiennej niż u eukariotów	Mogą występować wici lub rzęski o złożonej strukturze (typu 2+9)

* Istnieją wyjątki od tej reguły wśród bakterii zaliczanych do typu *Planctomycetes* (np. *Gemmata obscuriglobus*; s. 31)

1.1.1. Miejsce bakterii we wczesnych systemach klasyfikacji organizmów

Karol Linneusz w swoim systemie klasyfikacji organizmów wyróżniał dwa królestwa – roślin i zwierząt. Odkrycie mikroorganizmów (w tym bakterii) spowodowało, że w roku 1866 Ernst Haeckel wprowadził system trzech królestw: *Plantae*, *Animalia* i *Protista*, zaliczając do *Protista* „bakterie, śluzowce i inne organizmy jednokomórkowe”. On też skonstruował pierwsze drzewo filogenetyczne, próbując wykazać, jak organizmy mogły wyewoluować od wspólnego przodka. Systemy klasyfikacji organizmów ulegały kolejnym modyfikacjom. W roku 1938 amerykański biolog H. Copeland zaproponował stworzenie oddzielnego królestwa *Monera*, obejmującego wszystkie znane wówczas prokarioty, a więc bakterie i sinice, które nazywano wtedy glonami niebieskozielonymi. Kolejna zmiana to wydzielenie z królestwa *Plantae* grzybów i stworzenie dla nich oddzielnego królestwa *Fungi*. Tak powstał, wprowadzony oficjalnie w roku 1969 przez R.H. Whittakera, system pięciu królestw: *Monera*, *Protista*, *Plantae*, *Fungi* i *Animalia*. W systemie Whittakera bakterie były zaklasyfikowane do królestwa *Monera*, a mikroorganizmy o eukariotycznym typie budowy komórki – do *Protista*. System pięciu królestw nie oddawał w żadnym stopniu filogenetycznych zależności

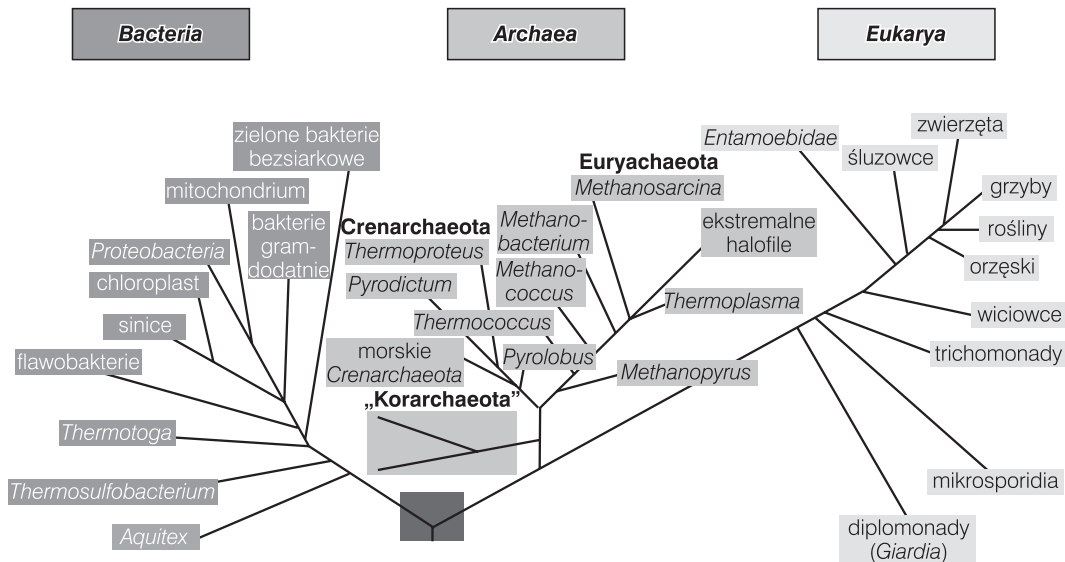
między organizmami (zatem wciąż nie był systemem naturalnym).

W ósmym wydaniu *Bergey's manual of determinative bacteriology* (1974) pojawiła się nowa nazwa taksonu *Monera* – **królestwo Prokaryotae**, w którego obrębie wyróżniono dwa działy: pierwszy grupujący sinice (*Cyanobacteria*), a drugi „organizmy prokariotyczne, które nie są sinicami”. Do taksonu tego z czasem zaliczono również archebakterie (nazywane dziś archeonami).

1.1.2. Trzy domeny świata żywego i „uniwersalne drzewo życia”, pozycja filogenetyczna bakterii według koncepcji Woese

W momencie gdy poza wykorzystywanymi powszechnie w taksonomii klasycznymi kryteriami fenotypowymi możliwe stało się zastosowanie kryteriów molekularnych, a szczególnie porównywanie sekwencji stabilnych makrocząsteczek (kwasów nukleinowych i białek), powstały podstawy do weryfikacji dotychczasowych systemów klasyfikacji organizmów oraz nadzieja na wykazanie rzeczywistych zależności filogenetycznych między nimi.

Badania nad stworzeniem naturalnego systemu klasyfikacji wszystkich organizmów żywych, z wykorzystaniem kryteriów analizy molekularnej,



Ryc. 1.1. Uniwersalne drzewo filogenetyczne świata żywego. Drzewo to skonstruowano na podstawie analizy porównawczej sekwencji 16S i 18S rDNA (szczegóły w tekście) (wg: Madigan, Martinko, Parker. 2000. *Brock biology of microorganisms* (9. wyd.), Prentice Hall)

podjęła w latach siedemdziesiątych ubiegłego wieku grupa badawcza pod kierunkiem Carla Woesego z USA. Prowadzona przez kolejne lata analiza porównawcza sekwencji nukleotydowych genów kodujących rRNA małych podjednostek rybosomowych prokariotów i eukariotów (odpowiednio 16S rDNA i 18S rDNA, s. 239) doprowadziła do wyróżnienia przez Woesego w roku 1987 trzech wyraźnie odmiennych linii ewolucyjnych organizmów, z których dwie obejmowały organizmy o prokariotycznej strukturze komórki, a jedna – o strukturze eukariotycznej. Woese przedstawił uniwersalne drzewo filogenetyczne wszystkich organizmów żywych, obejmujące trzy królestwa: **Eubacteria** (bakterie właściwe), **Archaeobacteria** (archebakterie) i **Eukaryota** (wszystkie eukarioty). Drzewo to było „nieukorzenione”, gdyż ówczesny stan wiedzy nie pozwalał na określenie pozycji uniwersalnego przodka. Nazwa „Prokaryota” straciła znaczenie taksonomiczne, a termin „prokariotyczny” miał służyć (tak jak pierwotnie) wyłącznie do opisywania typu budowy komórki. W roku 1990 Woese przedstawił nową wersję uniwersalnego drzewa filogenetycznego (ryc. 1.1), gdyż jego „ukorzenienie” stało się możliwe dzięki analizie porównawczej sekwencji 16S rDNA i 18S rDNA znacznie większej liczby przedstawicieli wszystkich trzech królestw. Ponieważ wyniki tych badań wykazały, że archebakterie są bliżej spokrewnione z eukariotami niż z eubakteriami, Woese zaproponował zmianę nazw najwyższych rangą taksonów na – **Bacteria**

(bakterie), **Archaea** (archeony) i **Eukarya** (wszystkie eukarioty), a także, by najwyższy rangą takson nosił nazwę **domeny**.

Jak widać na rycinie 1.1, pierwotne organizmy, charakteryzujące się najprawdopodobniej prokariotycznym typem budowy komórki, bardzo wcześnie podzieliły się na dwie odmienne linie ewolucyjne, z których jedna dała początek domenie **Bacteria**, a z drugiej wyewoluowały **Archaea** oraz organizmy eukariotyczne (**Eukarya**). Tak więc **Archaea** i **Eukarya** mają bezpośredniego wspólnego przodka, a archeony nie powinny być uznawane (mimo prokariotycznego typu budowy komórki) za „bliższych krewnych” bakterii niż eukariotów.

Zgodnie z tym w aktualnym nazewnictwie termin „bakterie” oznacza reprezentantów domeny **Bacteria** i w takim znaczeniu będzie używany w tym podręczniku. Jeżeli pewne omawiane zagadnienia będą dotyczyły reprezentantów domeny **Archaea** (czyli archeonów), będzie to wyraźnie zaznaczone.

1.2. OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA DOMEN

Trzy domeny, najwyższe jednostki taksonomiczne świata żywego, **Bacteria**, **Archaea** i **Eukarya**, jak już wspomniano, zostały wyróżnione na podstawie analizy porównawczej sekwencji kodujących

Tabela 1.2. Najważniejsze właściwości domen prokariotycznych (*Bacteria* i *Archaea*), z odniesieniem do *Eukarya*

Właściwość (cecha)*	<i>Bacteria</i>	<i>Archaea</i>	<i>Eukarya</i>
Forma aparatu jądrowego	nukleoid**	nukleoid	obłonione jądro
Plazmidy	powszechne	powszechne	rzadko występują
Ściana komórkowa	zawiera mureinę	brak typowej mureiny	brak mureiny
Typ lipidów w błonie	z wiązaniami estrowymi	z wiązaniami eterowymi	z wiązaniami estrowymi
Białka histonowe	tylko histonopodobne	obecne	obecne
Rybosomy	70S	70S	cytoplazmatyczne 80S, organelle 70S
Operony	występują	występują	brak
Inicjatorowy tRNA	formylometionina	metionina	metionina
Wrażliwość rybosomów na toksynę błoniczą	niewrażliwe	wrażliwe	wrażliwe
Polimeraza RNA zależna od DNA	jedna (4 podjednostki)	kilka, 8–12 jednostek	trzy, wielojednostkowe
Wrażliwość na chloramfenikol, streptomycynę, ryfamicynę i kanamycynę	wrażliwe	niewrażliwe	niewrażliwe
Czynniki transkrypcyjne	niepotrzebne	wymagane	wymagane
Struktura promotora	sekwencje –10 i –35	TATA box	TATA box
Metanogeneza	nie występuje	występuje	nie występuje
Nitryfikacja	występuje	występuje	nie występuje
Fotosynteza z udziałem chlorofilu	występuje	nie występuje	występuje (chloroplasty)
Patogeny	występują	dotychczas nie wykryto	stosunkowo nieliczne
Zdolność do życia w warunkach ekstremalnych	występuje	powszechna	rzadka

* Uwaga: pewne cechy metaboliczne charakteryzują tylko niektórych przedstawicieli odpowiedniej domeny.

** Istnieją wyjątki od tej reguły wśród bakterii zaliczanych do typu *Planctomycetes* (np. *Gemmata obscuriglobus*; s. 31).

rybosomowy RNA. Każdą z domen charakteryzuje zespół pewnych dodatkowych właściwości. Niektóre z nich są unikatowe i występują tylko w jednej domenie, inne zaś są wspólne dla dwóch spośród porównywanych domen. Zestawienie zbiorcze podstawowych cech charakteryzujących poszczególne domeny, a zwłaszcza różniących domeny *Bacteria* i *Archaea*, przedstawiono w tabeli 1.2. Szczególną uwagę zwraca różnorodność zawartych w niej cech – od dotyczących struktury komórki, poprzez właściwości metaboliczne, do różnic na poziomie molekularnym. Ważne jest także, aby uświadomić sobie, że pewne cechy, podane jako charakterystyczne dla danej domeny, są powszechne, jak np. obecność peptydoglikanu (mureiny) w ścianie komórkowej bakterii, a inne (np. fotosynteza) charakteryzują jedynie pewne grupy danej domeny. Niektóre spośród analizowanych cech mają szczególną wartość dla analiz filogenetycznych. Należą do nich:

- obecność lub brak ściany komórkowej i jej struktura;
- chemiczna natura lipidów zawartych w błonach i liczba ich typów;
- stopień złożoności polimerazy RNA zależnej od DNA, co przekłada się na różnice w mechanizmach syntezy białek, a także na zróżnicowaną wrażliwość translacji na inhibitory syntezy białek.

1.2.1. *Bacteria* i *Archaea* – podobieństwa i różnice

Domeny *Bacteria* i *Archaea* grupują wszystkie znane organizmy o prokariotycznym typie budowy komórki. Najważniejsze cechy łączące oraz różniące dwie domeny prokariotyczne może czytelnik odnaleźć w tabeli 1.2, gdzie jednocześnie zawarto ich odniesienie do odpowiednich cech

charakterystycznych dla domeny *Eukarya*. Na kilka z tych cech należy zwrócić szczególną uwagę.

Ściana komórkowa

Ściana komórkowa występuje niemal u wszystkich prokariotów (s. 57), a skład chemiczny tego elementu strukturalnego jest czynnikiem różniącym porównywane domeny. Związkiem charakterystycznym dla ściany komórkowej bakterii jest mureina. Ściana komórkowa archeonów nigdy nie zawiera mureiny, lecz może się składać z tzw. pseudomureiny, polisacharydów, białek lub glikoprotein. Brak typowej mureiny powoduje niewrażliwość *Archaea* na antybiotyki działające na biosyntezę tego heteropolimeru u bakterii, np. na penicylinę i cefalosporynę. Tylko mureinę uważa się za przydatną w analizie filogenetycznej.

Błona cytoplazmatyczna

Budowa chemiczna lipidów błony cytoplazmatycznej jest najbardziej użytecznym niegenetycznym kryterium różniącym *Bacteria* i *Archaea*. U bakterii kwasy tłuszczowe wchodzące w skład błony są połączone z resztą glicerolową **wiązaniem estrowym** (o wyjątkach wspomniano na s. 32), u archeonów natomiast nie ma kwasów tłuszczowych, glicerol zaś jest połączony wiązaniami eterowymi z izoprenoidami lub hydroksyizoprenoidami.

Operony i introny

W genomach wszystkich prokariotów występują operony, czyli grupy genów położonych obok siebie i podlegających wspólnej regulacji, u eukariotów zaś operony nie są spotykane. Różnica ta wiąże się bezpośrednio z występowaniem u eukariotów genów nieciągłych (zawierających sekwencje niekodujące, introny typu GU-AG i AU-AC), które muszą zostać usunięte z pierwotnego transkryptu (pre-mRNA) przed translacją. U bakterii i archeonów również spotykamy introny, jednak występują one znacznie rzadziej.

W przypadku bakterii wyróżniamy introny grupy I i II. Elementy te mogą się wycinać z mRNA, tRNA i rRNA gospodarza. Introny grupy I zidentyfikowano w obrębie genów dla tRNA wielu gatunków bakterii należących do *Cyanobacteria* i *Proteobacteria* oraz genów rRNA niektórych gatunków należących do rodzaju *Thermotoga* (*Thermotogae*), jak również w genomach licznych bakteriofagów. Introny grupy I mają zdolność samowycinania się

(ang. *self-splicing*) dzięki aktywności tzw. endonukleaz ukierunkowanych (ang. *homing endonuclease*). Częściej spotykane w genomach bakteryjnych są introny grupy II. Są one zarówno rybozymami, gdyż mają zdolności katalityczne wobec mRNA, jak i mobilnymi retroelementami, ponieważ są zdolne do retrotranspozycji. Oba te procesy są katalizowane przez kompleks rybonukleoproteinowy (RNP), na który składają się kodowana w obrębie intronu odwrotna transkryptaza oraz wycięty RNA intronu.

Introny zidentyfikowane w archeonach są zasadniczo odmienne od bakteryjnych i eukariotycznych, a ich mechanizm wycinania opiera się na działaniu endorybonukleazy, która działa w miejscu tzw. wybrzuszenia (ang. *bulge*), powstałego w obszarze połączenia intronu i egzonu.

Replikacja

Istotną cechą replikacji DNA bakteryjnego jest jej inicjacja z jednego, unikatowego punktu w replikującej się jednostce (chromosomie, plazmidzie), zwanego *oriV*. Ta właściwość procesu replikacji jest zachowana w replikonach archeonów, jednak ich enzymatyczna „maszyna replikacyjna” bardziej przypomina eukariotyczną (gdzie punktów startu replikacji w obrębie jednego chromosomu jest wiele) niż bakteryjną. W kompleksie białkowym ORC (ang. *origin recognition complex*), rozpoznającym archeonowy origin replikacji, zidentyfikowano białka homologiczne do kilku białek eukariotycznych (np. ORC1 i ORC6). To samo dotyczy wielu innych białek uczestniczących w procesie replikacji (np. helikaz, prymaz, białek usuwających startery).

Najbardziej wyróżniającym się składnikiem kompleksu replikacyjnego archeonów jest polimeraza DNA. Poza występującą u nich polimerazą typu β (analog polimerazy DNA III *E. coli*) odkryto (u *Pyrococcus furiosus*) nowy typ polimerazy DNA, nazwany DP2. Enzym ten występuje u wszystkich archeonów należących do typu *Euryarchaeota*, których genomy dotychczas zsekwencjonowano.

Polimeraza RNA i aparat syntezy białek

Wobec braku błony jądrowej procesy transkrypcji i translacji u obu grup prokariotów mogą przebiegać jednocześnie, jednak istnieje wiele znaczących różnic między aparatem translacyjno-transkrypcyjnym u bakterii i archeonów. Różna jest np. liczba i struktura podjednostkowa polimeraz RNA zależnych od DNA, przeprowadzających proces transkrypcji.

Polimeraza archeonów jest ogólnie znacznie bardziej złożona od polimerazy bakteryjnej, a ponadto jej budowa jest zróżnicowana w obrębie różnych grup taksonomicznych tych mikroorganizmów. Transkrypcja u *Archaea* wymaga także, w odróżnieniu od transkrypcji bakteryjnej, a podobnie jak u eukariotów, udziału wielu dodatkowych czynników transkrypcyjnych, np. TFII. Struktura promotorów u archeonów i eukariotów jest podobna – miejscem przyłączenia polimerazy RNA jest sekwencja TATA box w pozycji –25, zamiast typowej dla bakterii sekwencji –10. Także, mimo jednakowego współczynnika sedymentacji rybosomów prokariotycznych (70S zarówno u bakterii, jak i u archeonów, w odróżnieniu od 80S u eukariotów), sekwencja nukleotydomowa rybosomowego 16S rRNA i 5S rRNA archeonów różni się znacząco od rRNA bakteryjnych. Różnice istnieją także na etapie inicjacji translacji; u bakterii inicjacja wymaga przyłączenia do kodonu inicjatorowego (AUG) zmodyfikowanej formy metioniny (*N*-formylometioniny), u archeonów zaś, podobnie jak u eukariotów, inicjatorowy tRNA niesie niezmodyfikowaną metioninę. Te i inne różnice powodują, że odmienna jest wrażliwość translacji reprezentantów omawianych domen na antybiotyki hamujące syntezę białka (np. chloramfenikol, streptomycynę czy kanamycynę, a także na toksynę błoniczą; p. tab. 1.2).

Cechy fizjologiczne

Zwracając uwagę właściwością gatunków należących do *Archaea* jest ich zdolność do życia w ekstremalnych warunkach środowiska. Są wśród tych organizmów liczne hipertermofile (które wśród bakterii są rzadkością), halofile, a także alkalofile i acydofile.

Wiele ważnych cech metabolicznych odróżnia obie domeny prokariotyczne. Jedną z nich jest spotykana wyłącznie u archeonów (w typie *Euryarchaeota*) zdolność do metanogenezy, czyli biosyntezy metanu z różnych substratów – dwutlenku węgla i wodoru, dwutlenku węgla i mrówczanu, metanolu, metyloamin lub octanu w warunkach bezwzględnie beztlenowych.

Stwierdzono również, że wśród archeonów nie występują fotoautotrofy (wykorzystujące związki typu chlorofilu), spotykane u bakterii. Ciekawe jest też, że wśród dotychczas poznanych archeonów nie zidentyfikowano ani jednego patogenu.

Ponieważ liczba poznanych gatunków archeonów, w stosunku do liczby gatunków bakterii,

jest niewielka, nie można ostatecznie przesądzać, że podane wyżej informacje dotyczące ich właściwości fizjologicznych (zwłaszcza braku pewnych typów reakcji metabolicznych) są ostateczne. Warto też nadmienić, że niektóre gatunki zidentyfikowano i zaklasyfikowano do domeny *Archaea* jedynie na podstawie analizy 16S rDNA obecnego w próbkach środowiskowych, natomiast nigdy nie zostały one wyizolowane w postaci czystych kultur (odnosi się to głównie do typów *Korarchaeota* i *Nanoarchaeota*).

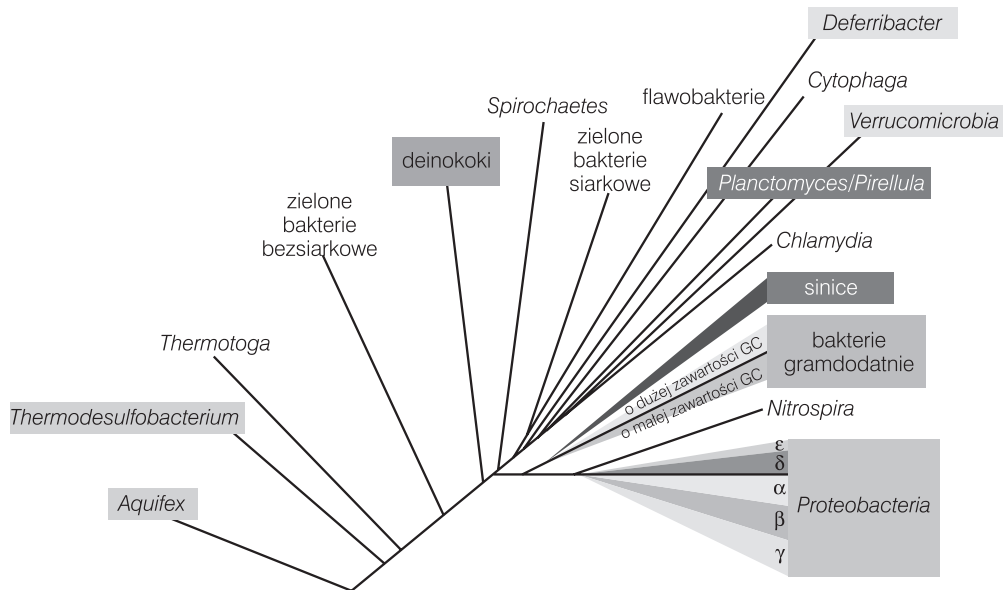
1.3. KLASYFIKACJA I NAZEWNICTWO BAKTERII

Podobnie jak inne organizmy, bakterie są klasyfikowane w kategoriach ułożonych hierarchicznie, poczynając od gatunków, poprzez rodzaje, rodziny, rzędy, klasy, typy aż do domen. Do niedawna klasyfikacja bakterii nie odzwierciedlała w pełni ewolucyjnego pokrewieństwa między tymi organizmami. Sytuacja zmieniła się radykalnie dzięki zastosowaniu kryteriów molekularnych. Drugie wydanie *Bergey's manual of systematic bacteriology* grupuje i przedstawia bakterie oraz archeony z uwzględnieniem ich nowoczesnej taksonomii filogenetycznej. Dodatkowo, dane taksonomiczne bakterii (ale również archeonów i eukariota) zostały zgromadzone w internetowej bazie NCBI – *The National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy>).

1.3.1. Koncepcja gatunku u prokariotów

W świecie roślin i zwierząt **gatunek** definiujemy jako zbiór (grupę) osobników, w którego obrębie może zachodzić proces rozmnażania płciowego, dający płodne potomstwo, a który jest reprodukcyjnie izolowany od innych grup organizmów. Taka definicja jest najpowszechniej akceptowana, aczkolwiek ma pewne ograniczenia (np. przypadki rozmnażania partenogenetycznego). Niestety nie można jej odnieść do prokariotów, które są haploidalne i rozmnażają się aseksualnie. Niemniej jednak pojęcie gatunku (*species*) w mikrobiologii istnieje, chociaż brak jest oficjalnej, ogólnie zaakceptowanej definicji gatunku u bakterii i archeonów.

Definicja gatunku prokariotycznego, podobnie jak współczesne poglądy na organizację taksonomiczną i filogenezę tej grupy organizmów, ulega



Ryc. 1.2. Drzewo filogenetyczne domeny Bacteria, z zaznaczeniem najważniejszych typów (phyla). Drzewo skonstruowano na podstawie analizy sekwencji 16S rRNA. Wskazanych jest kilkanaście spośród ponad 30 zdefiniowanych typów domeny Bacteria (wg: Madigan, Martinko, Parker. 2000, *Brock biology of microorganisms* (9. wyd.), Prentice Hall)

nieustannym zmianom. Do niedawna podstawą definiowania gatunków prokariotycznych był odpowiedni stopień podobieństwa zespołu istotnych cech strukturalnych i właściwości fizjologicznych (czyli cech fenotypowych), który pozwalał pewną grupę szczepów odróżnić od innej, charakteryzującej się odmiennym zespołem cech. Taka definicja jest dość subiektywna i możemy ją stosować do opisu gatunków, które potrafimy izolować w postaci czystych kultur i hodować w warunkach laboratoryjnych, a należy pamiętać, że większość prokariotów istniejących na Ziemi to organizmy, których hodować nie potrafimy (ang. *nonculturable organisms*).

W momencie wprowadzenia do taksonomii metod biologii molekularnej, a zwłaszcza porównywania sekwencji najbardziej konserwowanych makrocząsteczek (RNA, DNA i białek), możliwe stało się znaczące zobiektywizowanie analizy porównawczej i zaproponowanie definicji gatunku prokariotycznego uwzględniającej parametry analizy molekularnej (dokładniejsze omówienie wykorzystania metod biologii molekularnej w taksonomii i analizie filogenetycznej jest przedstawione w podrozdz. 1.4).

Gatunek, w odniesieniu do prokariotów, to grupa organizmów, które:

- wykazują nie więcej niż 1% różnic w sekwencji nukleotydowej 16S rDNA,

- charakteryzują się co najmniej 70% podobieństwem sekwencji DNA, mierzonym poziomem hybrydyzacji DNA/DNA,
- różnią się od innych gatunków zespołem istotnych cech fenotypowych.

W skład gatunku wchodzi różne **szcypy bakterii**, które, różniąc się od siebie nieznacznie (mogą to być niezależne naturalne izolaty bakterii zaklasyfikowane do tego samego gatunku lub „odmiany” bakterii z jedną, celowo wyselekcjonowaną bądź sztucznie wprowadzoną mutacją), spełniają jednak podstawowe kryteria molekularne przynależności do jednego gatunku. W obrębie niektórych gatunków wyróżnia się dodatkowo **podgatunki** (*subspecies*, np. *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*), a także **odmiany** (nie będące jednostkami taksonomicznymi), które wskazują na odrębne właściwości fenotypowe określonych szczepów. Właściwości te mogą być bliżej nieokreślone (ang. *biovar* lub *biotype*) lub dotyczyć konkretnych cech, takich jak zdolność do infekowania pewnych gospodarzy (ang. *pathovar* lub *pathotype*), wrażliwość na infekcję fagiem (ang. *phagovar* lub *phagotype*), właściwości serologiczne (ang. *serovar* lub *serotype* – np. *Salmonella enterica* sv. Typhimurium; s. 412) i inne.

Gatunki wykazujące większe różnice w sekwencji nukleotydowej 16S rDNA (stopień podobieństwa pomiędzy 97 a 99%) oraz poziom

Tabela 1.3. Taksonomiczna hierarchia wybranych bakterii

Gatunek (<i>Species</i>)	Rodzaj (<i>Genus</i>)	Rodzina (<i>Family</i>)	Rząd (<i>Order</i>)	Klasa (<i>Class</i>)	Typ (<i>Phylum</i>)	Domena (<i>Domain</i>)
<i>Escherichia coli</i> (pałeczka okrężnicy)	<i>Escherichia</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Enterobacteriales</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Proteobacteria</i>	<i>Bacteria</i>
<i>Bacillus subtilis</i> (pałeczka sienna)	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillales</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacteria</i>
<i>Micrococcus luteus</i> (pakietowiec żółty)	<i>Micrococcus</i>	<i>Micrococcaceae</i>	<i>Actinomycetales</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Bacteria</i>

W pewnych przypadkach wyróżniane są dodatkowe podjednostki, np. podklasy (*Actinobacteridae*), podrzędy (*Micrococcineae*).

Uwaga: w tej książce przyjęto konwencję pisania nazw wszystkich taksonów kursywą (wg: *Bergey's manual of systematic bacteriology*).

hybrydyzacji DNA od 20 do 70% będą zaliczane do tego samego **rodzaju**. Rodzaje są grupowane w rodziny, te z kolei w rzędy, następnie klasy i tak aż do najwyższej jednostki taksonomicznej – domeny. Przykłady taksonomicznej hierarchii wybranych bakterii przedstawiono w tabeli 1.3.

1.3.2. Zasady nazewnictwa

Nazewnictwo binominalne, wprowadzone przez Linneusza w odniesieniu do zwierząt i roślin, obowiązuje również w mikrobiologii. Oznacza to, że każdemu gatunkowi bakterii lub archeona nadaje się dwuczłonową nazwę (tradycyjnie jest to nazwa pochodzenia łacińskiego lub greckiego). Składa się ona z nazwy rodzaju, do którego należy dany organizm, i następującego po niej „specyficznego epitetu” – identyfikującego gatunek w obrębie rodzaju.

W tej książce, zgodnie z regułami przyjętymi w *Bergey's manual of systematic bacteriology*, nazwy wszystkich typów taksonów są pisane kursywą, co nie jest jednak powszechnie akceptowane, i w innych źródłach (szczególnie brytyjskich) czytelnik może się spotkać z zapisem kursywą jedynie nazw trzech najniższych taksonów. Nazwy niektórych taksonów mają **standardowe końcówki**: np. **rodzina** „-aceae” (np. *Enterobacteriaceae*, *Chromatiaceae*), a **rząd** „-ales” (*Enterobacteriales*, *Chromatiales*).

Bywa, że bakteria została scharakteryzowana w stopniu pozwalającym zaklasyfikować ją do któregoś ze znanych rodzajów, ale nie do gatunku w obrębie rodzaju. O takiej sytuacji informuje nas nazwa podana w następującej formie – *Thiobacillus* sp.; z kolei zapis *Thiobacillus* spp. oznacza różne gatunki z rodzaju *Thiobacillus* lub wszystkie gatunki z tego rodzaju.

Jeżeli zostanie odkryta nieznana dotychczas bakteria i uznana za nowy gatunek (lub rodzaj), obowiązkiem odkrywcy jest nadanie jej nazwy zgodnie z zaleceniami Międzynarodowego Kodu Nomenklatury Bakterii (ang. *International Code of Nomenclature of Bacteria*), zwanego też Kodem Bakteriologicznym (ang. *Bacteriological Code*), i opublikowanie jej opisu w czasopiśmie naukowym (najlepiej *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *IJSEM*), a także zdeponowanie czystej kultury w dwóch autoryzowanych kolekcjach szczepów. Zdeponowany szczep jest określany mianem **szczepu typowego**, czyli wzorcowego w obrębie gatunku (ang. *type strain*). Otrzymuje on swój numer identyfikacyjny w każdej z kolekcji szczepów (np. ATCC 1234^T). Z nim właśnie będą porównywane kolejne, izolowane niezależnie szczepy tego gatunku, otrzymujące inne numery identyfikacyjne. Jeżeli nowy gatunek został opisany w innym czasopiśmie naukowym niż *IJSEM*, to kopia tego artykułu musi zostać wysłana do *IJSEM*, gdzie nazwa nowego organizmu zostanie uprawomocniona, zanim zostanie zaakceptowana jako nowy takson. Czasopismo *IJSEM* publikuje okresowo zaaprobowaną listę nazw nowych bakterii i archeonów.

Jeśli nie da się spełnić wyżej wymienionych warunków (gdyż np. nie udaje się otrzymać czystej kultury tej bakterii), nazwę nowego gatunku pisze się w cudzysłowie, prostym drukiem, poprzedzając ją słowem *Candidatus* (np. „*Candidatus* Kuenenia stuttgartiensis”).

1.3.3. Najważniejsze typy i klasy taksonomiczne bakterii

Podręcznik zawiera informacje dotyczące bakterii należących do 15 typów taksonomicznych (*phyla*),

spośród 23 wyróżnionych w *Bergey's manual of systematic bacteriology* (2001–2012). Niżej przedstawiono, w porządku alfabetycznym, bardzo krótką ich charakterystykę, przygotowaną na podstawie tego dzieła.

- **Actinobacteria.** Bakterie gramdodatnie, o grubej mureinowej ścianie komórkowej i genomach o dużej zawartości par G+C. Są zaliczane do sześciu klas: *Actinobacteria*, *Acidimicrobiia*, *Coriobacteriia*, *Nitriliruptoria*, *Rubrobacteria*, *Thermoleophilia*. Barwią się gramdodatnio lub gramzmiennie. Znakomita większość to chemoorganoheterotrofy. Są wśród nich tlenowce, warunkowe tlenowce i beztlenowce. Morfologia komórek jest zróżnicowana, od ziarniaków po bakterie tworzące strzępki i rosnące w formie grzybni (promieniowce). Większość to saprofity, ale są też patogeny roślin i zwierząt.
- **Aquificae.** Umiarkowanie termofilne pałeczki, o metabolizmie chemoorganoheterotroficznym lub chemolitoautotroficznym (utleniają wodór). Typ zawiera jedną klasę („Aquificae”).
- **Bacteroidetes.** Chemoorganoheterotroficzne, gramujemne pałeczki, zróżnicowane fenotypowo. Typ dzieli się na cztery klasy: *Bacteroidia*, *Cytophagia*, *Flavobacteria* i *Sphingobacteria*.
- **Chlamydiae.** Nieruchliwe, bezwzględnie pasożyty wewnątrzkomórkowe, namnażające się w komórkach eukariotycznych (zwierząt, w tym człowieka, i pierwotniaków). Wyróżniono dotychczas tylko jedną klasę – *Chlamydia*. Wykazują cykl rozwojowy, w którym można wyróżnić stadia charakteryzujące się określoną morfologią i fizjologią. Mają małe genomy i są auksotrofami, wymagającymi do wzrostu nukleotydów, aminokwasów i kofaktorów. Ściana komórkowa typu gramujemnego, lecz u większości gatunków nie można wykryć woreczka mureinowego. Nie mają białka cytoszkieletu FtsZ. Proponuje się, aby *Planctomycetes*, *Chlamydiae* i *Verrumicrobia* zaliczyć do wspólnego nadtypu (ang. *superphylum*).
- **Chlorobi.** Gramujemne bakterie o różnych kształtach; bezwzględnie beztlenowe i bezwzględnie fototroficzne. Najlepiej rosną fotoorganoheterotroficznie, asymilując proste związki organiczne. Niektóre gatunki wykorzystują siarczki bądź tiosiarczany jako donor elektronów. Globule powstającej siarki są gromadzone na zewnątrz komórek. Typ zawiera jedną klasę („Chlorobia”).
- **Chloroflexi.** Gramujemne bakterie nitkowate, zdolne do ruchu ślizgowego. Nie mają błony zewnętrznej zawierającej LPS, a ich mureina występuje w kompleksie z polisacharydem. Niektóre gatunki są bezwzględnymi lub względnymi fototrofami, inne są tlenowymi chemoorganoheterotrofami. Typ zawiera jedną klasę (*Chloroflexia*).
- **Cyanobacteria.** Typ jest bardzo jednorodny metabolicznie, grupuje bowiem fotolitoautotrofy oksygenne, zwane sinicami. Zawierają one chlorofile, dwa fotosystemy (PS I i PS II), a donorem elektronów w czasie fotosyntezy jest woda.
- **Firmicutes.** To drugi z najliczniej reprezentowanych typów. Zawiera dwie klasy bakterii gramdodatnich („Clostridia” i „Bacilli”) o małej zawartości % par G+C. Bakterie te mają grubą ścianę komórkową, zbudowaną z mureiny i zawierającą kwasy tejchojowe. Większość barwi się gramdodatnio. Niektóre wytwarzają endospory. Większość to chemoorganoheterotrofy (tlenowe i beztlenowe), ale niektóre są fotoorganoheterotrofami anoksygennymi.
- **Nitrospirae.** Gramujemne bakterie przypominające kształtem przecinkowce lub śrubowce. Są bardzo zróżnicowane metabolicznie, większość to chemolitoautotrofy (w tym nitryfikatory), niektóre redukują siarczany. Typ zawiera jedną klasę („Nitrospira”).
- **Planctomycetes.** Jedna klasa *Planctomycetia*, zawierająca dwa rzędy – *Planctomycetales* i „*Candidatus Brocadiales*”. Rozmnażają się przez pączkowanie. Niewiele szczepów otrzymano w czystej kulturze. Zawierają wydzielone błonami przedziały komórkowe.
- **Proteobacteria.** To najliczniej reprezentowany typ bakterii, grupujący bakterie gramujemne, wytwarzające błonę zewnętrzną, zawierającą LPS. Są zaliczane do 6 klas: *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria*, *Epsilonproteobacteria*, *Zetaproteobacteria*. Charakteryzują się niezwykle zróżnicowanym metabolizmem. Są wśród nich chemoorganoheterotrofy, chemolitoautotrofy i fototrofy anoksygenne; tlenowce i beztlenowce.
- **Spirochaetes.** Chemoorganoheterotrofy cechujące się helikalnym kształtem komórek, zaopatrzonych w rzęski peryplazmatyczne, wychodzące z dwóch biegunów komórki w kierunku jej środka. Są wśród nich tlenowce (w tym

mikroaerofile) i beztlenowce, żyjące swobodnie lub związane z pewnymi zwierzętami (stawnogi, mięczaki i kręgowce, w tym ludzie). Niektóre są patogenami człowieka. Typ zawiera jedną klasę *Spirochaetia*.

- **Tenericutes.** Typ zawiera jedną klasę – *Mollicutes*, która do roku 2009 była zaliczana do typu *Firmicutes*. Małe, pleomorficzne bakterie gramujemne, pozbawione ściany komórkowej i nie zawierające genów związanych z biosyntezą peptydoglikanu (mureiny). Ich genom charakteryzuje mała zawartość par G+C (23–34%). Są komensalami bądź pasożytami kręgowców, w tym człowieka.
- **Thermotogae.** Ekstremalnie termofilne pałeczki gramujemne, wyposażone w osłonę podobną do pochewki (przypominającą togę, stąd nazwa typu). Są beztlenowcami o metabolizmie fermentacyjnym. Typ zawiera jedną klasę („Thermotogae”).
- **Verrumicrobia.** Typ zawiera trzy klasy (*Verrumicrobiae*, *Opitutae* i *Spartobacteria*). Bakterie barwią się gramujemnie. Wiele gatunków ma błony wewnątrzcytoplazmatyczne, wydzielające przedziały komórkowe. Większość to chemoorganoheterotrofy, preferencyjnie wykorzystujące węglowodany, w tym naturalne polisacharydy o złożonej budowie.

1.4. METODY IDENTYFIKACJI I KLASYFIKACJI BAKTERII I ARCHEONÓW

Identyfikacja i klasyfikacja bakterii może się opierać na bardzo różnych kryteriach, w tym na szeroko pojętych analizach fenotypowych oraz analizach przeprowadzanych na poziomie DNA i białek. Poszczególne metody znajdują zastosowanie w różnych dyscyplinach nauki i medycyny. W rozdziale przedstawiono zestawienie najpopularniejszych technik identyfikacji i klasyfikacji mikroorganizmów.

1.4.1. Analizy fenotypowe

Metody identyfikacji mikroorganizmów związane z analizą fenotypową są coraz rzadziej stosowane, przede wszystkim ze względu na ich zawodność, czasochłonność oraz kosztochłonność. Niemniej jednak nadal znajdują one swych zwolenników (np. diagnostyka kliniczna), a ponadto, niezaprzeczalnie

dostarczają cennych danych dotyczących ogólnej charakterystyki fenotypowej badanych mikroorganizmów.

Analizy aktywności enzymatycznych

Poszczególne grupy mikroorganizmów cechują się specyficznymi właściwościami, które wynikają z aktywności enzymów przez nie wytwarzanych. Właściwości te wykorzystuje się w identyfikacji mikroorganizmów, przy czym stosowane są bardzo różne testy diagnostyczne.

W diagnostyce klinicznej stosunkowo często stosuje się wystandaryzowane zestawy testów biochemicznych (np. testy API), które umożliwiają identyfikację grup lub gatunków bakterii i grzybów, głównie jednak znanych patogenów (np. paciorkowców i enterokoków). Test API składa się z paska z dwudziestoma miniprobówkami, w których znajdują się odwodnione substraty i odpowiedni wskaźnik umożliwiający odczytanie reakcji. Do poszczególnych probówek dodawana jest zawiesina badanego mikroorganizmu, po czym przeprowadza się inkubację całego paska testowego w odpowiedniej temperaturze. Zmiany barwy w poszczególnych probówkach są wyznacznikiem aktywności enzymatycznej. Uzyskane wyniki tworzą specyficzny kod, który jest następnie odczytywany za pomocą dostarczonego przez producenta klucza diagnostycznego.

Metodą dostarczającą znacznie większej ilości danych są mikromacierze fenotypowe PM Biolog (ang. *Biolog Phenotype MicroArrays*). Stanowią one, obok mikromacierzy DNA i proteomiki, trzecią technikę analizy ekspresji genów i pozwalają na jednoczesne badanie setek cech fenotypowych komórki. Dostępne są liczne testy pozwalające badać zdolność do wykorzystywania różnych źródeł węgla, azotu, fosforu oraz siarki (łącznie ok. 800 substratów), wzrostu w różnym pH, wrażliwości osmotycznej i wrażliwości na działanie substancji chemicznych, np. antybiotyków. Metoda pomiaru bazuje na analizie zmian potencjału oksydoredukcyjnego (na skutek oddychania komórkowego), co powoduje zmianę koloru znacznika (chlorek trifenyloctetrazoliowy), która jest odnotowywana przez specjalne urządzenie. Mimo że uzyskane dane mają ograniczone znaczenie w identyfikacji bakterii ze względu na brak odpowiednich kluczy czy też baz danych do porównań, to są one niezwykle cenne podczas ogólnej charakterystyki mikroorganizmów.

Ponadto mogą zostać wykorzystane do analizy różnorodności fenotypowej mikroorganizmów.

Analiza kwasów tłuszczowych – FAME

Cennych informacji przydatnych do klasyfikacji prokariotów dostarczają badania lipidów, szczególnie określanie jakościowej i ilościowej zawartości kwasów tłuszczowych w błonie cytoplazmatycznej, a u bakterii gramujemnych także w błonie zewnętrznej. Ze względu na wielkie zróżnicowanie struktury kwasów tłuszczowych (przejawiające się różną długością łańcucha węglowego, obecnością lub brakiem grup nienasyconych w pierścieniowych i liniowych podstawnikach, obecnością grup hydroksylowych itp.) analiza profilu kwasów tłuszczowych określonych szczepów może być ważną cechą diagnostyczną. Ogólnie, profil taki otrzymujemy w wyniku ekstrakcji kwasów tłuszczowych spośród wszystkich lipidów (uzyskanych z komórek hodowanych w wystandaryzowanych warunkach) i ich chemicznej modyfikacji, prowadzącej do utworzenia estrów metylowych, które jako związki lotne mogą być identyfikowane za pomocą chromatografii gazowej. Wynik pochodzący z analizy nieznanego szczepu może być porównywany z informacjami zgromadzonymi w odpowiedniej bazie danych. Opisana technika nazywana jest analizą **FAME** (ang. *fatty acid methyl ester*) i może być wykorzystywana w laboratoriach jako element identyfikacji bakterii. Należy jednak pamiętać, że wiarygodność wyników wymaga ścisłej standaryzacji warunków zarówno hodowli, jak i samej analizy.

1.4.2. Analizy DNA

Najpowszechniej stosowane obecnie metody identyfikacji i klasyfikacji prokariotów opierają się na analizie DNA. Obecnie stosowane metody bazują na różnych technikach biologii molekularnej (np. sekwencjonowaniu DNA), nadal wykorzystywane są jednak również inne, „bardziej klasyczne” metody. Analiza otrzymanych danych umożliwia wgląd w filogenetykę danej grupy mikroorganizmów i pozwala wnioskować na temat dróg ich ewolucji.

Oznaczanie zawartości par G+C

Zawartość par G+C w DNA prokariotów obejmuje bardzo szeroki zakres, od wartości około 20% do prawie 80%. Parametr ten był elementem molekularnej charakterystyki mikroorganizmów najwcześniej

zastosowanym w taksonomii. Zawartość G+C jest wyrażana jako:

$$\%GC = \frac{G + C}{A + T + G + C} \times 100$$

Zastosowanie oznaczania zawartości par G+C w DNA badanych organizmów w taksonomii ma ograniczone znaczenie. Podczas gdy różne wartości zawartości G+C świadczą o braku pokrewieństwa badanych szczepów (różnica większa niż 5% nie pozwala zaliczyć szczepów do jednego gatunku), to wartości zbliżone, a nawet identyczne nie mogą być jedynym kryterium świadczącym o ich pokrewieństwie, mogą bowiem być przypadkowe. Na przykład zbliżoną zawartość G+C mają tak odległe filogenetycznie rodzaje bakterii, jak *Helicobacter* (*Epsilonproteobacteria*): 35–38% i *Rickettsia* (*Alphaproteobacteria*): 29–33%. Z kolei niektóre rodzaje charakteryzuje bardzo duży rozrzut zawartości G+C w DNA poszczególnych gatunków (przykładem może być rodzaj *Bacillus* 32–69% lub *Clostridium* 21–54%).

Najdokładniej zawartość G+C w DNA obliczamy bezpośrednio ze znanej sekwencji nukleotydowej DNA. Można również zastosować technikę HPLC (ang. *high-performance liquid chromatography*) (wysokosprawna chromatografia cieczowa) po hydrolizie DNA.

Hybrydyzacja DNA:DNA

Technika ta jest stosowana w odniesieniu do całkowitego DNA zawartego w komórce i pozwala na bezpośrednie porównywanie podobieństwa między genomami. Pozwala ona stwierdzić, czy podobieństwo pomiędzy sekwencjami nukleotydowymi genomów jest tak duże, aby możliwe było utworzenie między nimi heterodupleksowych cząsteczek DNA. Początkowo do analizy cząsteczek heterodupleksowych wykorzystywano głównie technikę mikroskopii elektronowej. Obecnie porównywane są cząsteczki DNA, z których jedna jest wyznakowana (np. radioizotopem ^{32}P , ^3H lub ^{14}C). Preparaty DNA dwóch badanych szczepów denaturuje się termicznie, następnie miesza ze sobą i powoli schładza w warunkach umożliwiających ich renaturację, czyli odtworzenie dwuniciowych struktur hybrydowych. Kolejny etap to pomiar poziomu radioaktywności cząsteczek hybrydowych. Technicznych wariantów przeprowadzenia takiego eksperymentu jest wiele. Analiza hybrydyzacyjna nieznanego (heterologicznego) układu musi być uzupełniona, przeprowadzoną

w identycznych warunkach, analizą kontrolną systemu homologicznego. Stopień podobieństwa dwóch różnych DNA oblicza się ze wzoru:

$$\% \text{podobieństwa} = \frac{\text{radioaktywność (cpm) w systemie heterologicznym}}{\text{radioaktywność (cpm) w systemie homologicznym}} \times 100$$

Stwierdzono, że organizmy wykazujące więcej niż 70% podobieństwa zasad w DNA mogą być zaliczone do jednego gatunku, a więcej niż 20% – do jednego rodzaju, mniejsze wartości wskazują na brak pokrewieństwa.

Hybrydyzacja DNA-DNA z wykorzystaniem specyficznych sond molekularnych

Jest to technika przydatna do szybkiego wykrywania określonych mikroorganizmów w próbkach materiału klinicznego lub pobranych ze środowiska. Jako **sonda molekularna** stosowany jest fragment DNA specyficzny dla interesującej nas grupy mikroorganizmów. Najczęściej jest to syntetyczny oligonukleotyd, zaprojektowany na podstawie znajomości sekwencji wybranego genu markerowego, np. kodującego czynnik wirulencji. Taki oligonukleotyd zostaje odpowiednio wyznakowany i wykorzystany w reakcji **hybrydyzacji DNA-DNA typu Southern**. Jest to więc forma typowania molekularnego, szczególnie przydatna w sytuacji, gdy należy szybko wykryć i zidentyfikować bakterię chorobotwórczą w materiale pobranym od chorego, oczekującego na rozpoczęcie leczenia lub na potwierdzenie diagnozy i prawidłowości podjętej terapii.

Wykorzystanie sond molekularnych do identyfikacji mikroorganizmu (ale także np. genu w chromosomie organizmu eukariotycznego) metodą hybrydyzacji bezpośrednio w badanym materiale nazywamy zwykle hybrydyzacją *in situ* (ISH, ang. *in situ hybridization*). Jej odmianą jest hybrydyzacja fluorescencyjna *in situ*, tzw. **technika FISH** (ang. *fluorescence in situ hybridization*), gdzie sonda oligonukleotydowa jest wyznakowana fluorescencyjnie, a identyfikacja następuje dzięki stwierdzeniu fluorescencji powstałego hybrydu.

Analiza wzorów restrykcyjnych DNA

Zastosowanie analizy restrykcyjnej do celów identyfikacji i klasyfikacji mikroorganizmów sprowadza się do porównywania wzorów restrykcyjnych ich genomów z wykorzystaniem zasady, że wzór

restrykcyjny każdej cząsteczki DNA jest dla niej charakterystyczny i poprzez swoją unikatowość charakteryzuje ją tak samo, jak odcisk palca charakteryzuje każdego człowieka. Dlatego też wzór restrykcyjny genomowego DNA mikroorganizmów został nazwany „**genetycznym odciskiem palca**” (ang. *DNA fingerprint*). Istnieje wiele technicznych odmian tej metody.

W oryginalnej metodzie, nazywanej analizą polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych DNA (**RFLP**, ang. *restriction fragment length polymorphism*), DNA genomowy danego szczepu jest cięty określonymi enzymami restrykcyjnymi (s. 372) i powstałe różnej długości fragmenty restrykcyjne są rozdzielane przez elektroforezę w odpowiednim żelu, a otrzymany wzór fragmentów (odcisk DNA) porównywany ze wzorem innego szczepu. Przy bardzo dużej liczbie fragmentów (prążków w żelu) precyzyjne porównanie wzorów restrykcyjnych może być trudne lub wręcz niewykonalne. Jednym z rozwiązań tego problemu jest zastosowanie tzw. rzadko tnących endonukleaz restrykcyjnych, co powoduje zmniejszenie liczby fragmentów.

Alternatywnym rozwiązaniem jest wykorzystanie techniki RFLP do analizy mniejszych regionów DNA (zamplifikowanych w reakcji PCR), obejmujących geny, które zostały określone mianem markerów molekularnych, np. sekwencja 16S rDNA (przykłady takich markerów zostały opisane niżej).

Analizy wykorzystujące technikę PCR

Łańcuchowa reakcja polimerazy (**PCR**, ang. *polymerase chain reaction*) została zastosowana w biologii molekularnej po raz pierwszy w roku 1983 przez K. Mullisa (uhonorowanego Nagrodą Nobla w roku 1993). Obecnie jest ona stosowana z powodzeniem również w badaniach klasyfikacyjno-taksonomicznych oraz w diagnostyce klinicznej podczas typowania szczepów bakterii patogennych (np. metody RAPD, MLST, AP-PCR, RT-PCR, MLVA itd.).

Technika PCR pozwala stwierdzić, czy interesująca nas sekwencja jest obecna w analizowanej próbce. Jeżeli tak, to stanowiąc matrycę w łańcuchowej reakcji polimerazy, z zastosowaniem odpowiednich starterów, zostanie powielona (zamplifikowana). Uzyskany produkt amplifikacji (fragment dwuniciowego DNA o długości od kilkudziesięciu par zasad do kilku tysięcy par zasad) może być następnie w różnorodny sposób analizowany.

Czynnikiem decydującym o przynależności taksonomicznej może być obecność, brak lub

wielkość danego fragmentu DNA. Technika diagnostyczną wykorzystującą taki system klasyfikacji jest np. metoda **MLVA** (ang. *multiple-locus variable number tandem repeat analysis*) umożliwiająca typowanie bakterii na podstawie badania zmian liczby tandemowych powtórzeń (VNTR, ang. *variable number tandem repeats*). W metodzie tej amplifikowane są regiony zawierające powtórzenia, a następnie z zastosowaniem elektroforezy kapilarnej szacowana jest dokładna wielkość każdego produktu PCR. Znając wielkość produktu amplifikacji, można oszacować liczbę powtórzeń w każdym z analizowanych *loci*. Otrzymane informacje tworzą kod liczbowy, który może być łatwo porównany z bazą referencyjną. Metoda ta jest z powodzeniem stosowana podczas typowania bakterii patogennych, np. *Bacillus anthracis*, *Legionella pneumophila* oraz *Salmonella enterica*.

Inne analizy wykorzystujące technikę PCR do identyfikacji organizmów prokariotycznych bazują na porównaniu uzyskanego produktu amplifikacji z fragmentem wzorcowym, poprzez np. analizę restrykcyjną (technika RFLP). Alternatywnie porównaniu mogą podlegać kompletne sekwencje nukleotydowe uzyskanych produktów amplifikacji. Na podstawie porównania zamplifikowanych sekwencji nukleotydowych homologicznych genów z kilku organizmów, określając **poziom ich identyczności i podobieństwa**, możemy wnioskować o stopniu ich pokrewieństwa. Dla analiz filogenetycznych szczególnie przydatne jest porównywanie podobieństwa sekwencji genów kodujących rRNA małej podjednostki rybosomu (16S rRNA u prokariotów i 18S rRNA u eukariotów).

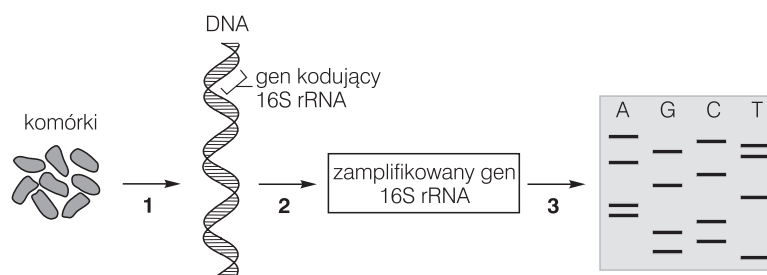
Analizy z wykorzystaniem markerów molekularnych

W chwili obecnej uznaje się, że najbardziej wiarygodne wyniki dają analizy taksonomiczne

i filogenetyczne bazujące na poznaniu sekwencji nukleotydowej genów markerowych – tzw. identyfikacja molekularna. Wśród powszechnie stosowanych markerów molekularnych najczęściej wykorzystuje się sekwencję 16S rDNA, która koduje gen 16S rRNA, czyli składnik małej podjednostki rybosomu prokariotów. Częsteczką ta spełnia podstawowe wymogi stawiane markerom molekularnym stosowanym w badaniach filogenetycznych, tj.:

- występuje we wszystkich znanych bakteriach i archeonach,
- pełni w tych organizmach równoważne funkcje,
- zawiera zarówno sekwencje w wysokim stopniu konserwowane, jak i sekwencje zmienne,
- charakteryzuje się tempem zmienności proporcjonalnym do mierzonych dystansów (odległości) ewolucyjnych (tzn. nie podlega drastycznym i szybkim zmianom mutacyjnym).

Sekwencja genu 16S rRNA obejmuje fragment DNA o długości około 1500 pz. W jego obrębie wyróżnia się 9 regionów o dużej zmienności (odpowiednio V1–V9, ang. *variable regions*), które mają kluczowe znaczenie podczas analiz filogenetycznych. Pomiedzy regionami zmiennymi znajdują się obszary DNA ściśle konserwowane, które wykorzystano do zaprojektowania odpowiednich par starterów. Opracowane zestawy starterów do PCR specyficzne dla bakterii i archeonów są stosowane do amplifikacji prawie całego genu 16S rRNA, a otrzymane produkty amplifikacji są poddawane sekwencjonowaniu. Ostatecznie, uzyskane sekwencje nukleotydowe porównywane są z danymi zgromadzonymi w odpowiednich bazach danych [np. RDP (*Ribosomal Database Project*) – <http://rdp.cme.msu.edu/> oraz NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>], co pozwala zaklasyfikować organizm do danej grupy taksonomicznej (ryc. 1.3).



Ryc. 1.3. Schemat eksperymentu mającego na celu identyfikację organizmu prokariotycznego. (1) Izolacja DNA z komórek bakterii lub archeona. (2) Amplifikacja techniką PCR fragmentu DNA niosącego gen kodujący 16S rRNA. (3) Sekwencjonowanie produktu PCR. Analiza otrzymanej sekwencji DNA