

VILNIAUS UNIVERSITETAS
GAMTOS MOKSLŲ FAKULTETAS
Augalų fiziologijos ir mikrobiologijos katedra

Džiugintos Jasinskytės

***Geobacillus* genties bakterijų kamienų giminingumo nustatymas visų ląstelės baltymų
analizės metodu**

Magistro darbas

Darbo vadovas:
Prof. habil. dr. (hp) Donaldas Čitavičius

Vilnius
2007

TURINYS

SUTRUMPINIMŲ SĄRAŠAS	4
ĮVADAS	5
1. LITERATŪROS APŽVALGA	6
1.1. POLIFAZINĖ PROKARIOTŲ TAKSONOMIJA	6
1.1.1. Genotipiniai metodai.....	6
1.1.2. Fenotipiniai metodai.....	8
1.2. BAKTERIJŲ KAMIENŲ IDENTIFIKAVIMAS WCPP IR KITAIŠ METODAIS	11
1.2.1. <i>Shewanella putrefaciens</i> ir <i>Shewanella alga rūšių atskyrimas remiantis visų ląstelės baltymų analize, ribotipavimu, fenotipine charakteristika ir 16S rRNR geno sekvenavimu.</i>	11
1.2.2. Kamienų, panašių į <i>Pseudomonas aeruginosa</i> tyrimas.....	12
1.2.3. <i>Vagococcus fluvialis</i> rūšies tyrimai.	13
1.2.4. <i>Gemella bergeriae</i> sp. nov. <i>Gemella sanguinis</i> sp. nov. rūšių identifikavimas.	13
1.2.5. <i>Corynebacterium</i> genties naujos rūšies atradimas.	14
1.2.6. <i>Faklamia ignava</i> sp. nov. ir <i>Faklamia languida</i> sp. nov. rūšių identifikavimas.....	14
1.2.7. Pienarūgščių bakterijų identifikavimas.....	15
1.2.8. Pienarūgščių bakterijų greitas identifikavimas.....	16
1.2.9. Neidentifikuojamos <i>Helicobacterijos: Helicobacter cinaedi</i> pavyzdys.	17
1.2.10. Naujos <i>Helicobacter</i> genties rūšies identifikavimas.....	17
1.2.11. <i>Actinomyces radidentis</i> sp. nov.	18
1.2.12. <i>Enterococcus gilvus</i> sp. nov. ir <i>Enterococcus pallens</i> sp. nov. išskirti iš žmogaus mėginių.	18
1.2.13. Naujų enterokokų identifikavimas.....	19
1.2.14. <i>Varibaculum cambriensis</i> gen. nov., sp. nov.	19
1.2.15. <i>Bifidobakterijų</i> , išskirtų iš kiaulių aklosios žarnos, genetinė įvairovė ir giminingumas.....	20
1.2.16. <i>Campylobacter lari</i> genetinių grupių identifikavimas pagal amplifikuotų fragmentų ilgio polimorfizmą ir visų ląstelės baltymų analizę.....	21
1.2.17. <i>Stenotrophomonas africana</i> ir <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> priskirimas vienai rūšiai.....	21
1.2.18. <i>Streptococcus marimammalium</i> sp. nov. išskirtas iš ruonių organizmo.	22
1.2.19. <i>Arcobacter cibarius</i> sp. nov. išskirta iš broilerių skerdienos.	22
1.2.20. <i>Staphylococcus equorum</i> ir <i>Staphylococcus succinus</i> izoliuoti iš žmonių organizmo.....	23
1.3. GEOBACILLUS GENTIES BAKTERINIŲ KAMIENŲ IDENTIFIKACIJA.	23
1.3.1. <i>Geobacillus jurassicus</i> sp. nov., naujos termofilinių bakterijų, išskirtų iš aukštos temperatūros naftos grėžinių, rūšies identifikavimas.....	24
1.3.2. <i>Geobacillus lituanicus</i> sp. nov.	25
APIBENDRINIMAS	26
2. MEDŽIAGOS IR METODAI	27
2.1. MEDŽIAGOS	27
2.1.1. Reagentai	27
2.1.2. Darbe naudoti <i>Geobacillus</i> genties kamienai	27
2.1.3. Terpės.....	28
2.1.4. Tirpalai ir buferiai	29
2.2. METODAI	31
2.2.1. Bakterijų auginimas	31
2.2.1.1. Bakterijų auginimas ant MA terpės.....	31
2.2.1.2. Bakterijų auginimas skystoje terpėje.....	31
2.2.2. Sporuliacijos pradžios laiko nustatymas.....	31
2.2.3. Bakterijų biomasės auginimas	31
2.2.4. Beląstelinio ekstrakto paruošimas	32
2.2.5. Baltymų koncentracijos nustatymas Bradfordo metodu.....	32
2.2.6. NDS - poliakrilamidinio gelio elektroforezė (PAGE)	32
2.2.7. Gelio dažymas sidabru.....	33

2.2.8. Visų ląstelės baltymų elektroforetinių profilių palyginimas.....	33
IŠVADOS	34
SANTRAUKA.....	35
SUMMARY	36

Sutrumpinimų sąrašas

AFLP (amplified fragment length polymorphism) – amplifikuotų fragmentų ilgio polimorfizmas

ARDRA (angl. amplified rDNA restriction analysis) – amplifikuotos rDNR restrikcijos analizė

C – citozinas

G – guaninas

kb – kilobazė (1000 bazių porų)

OD₅₉₅ – optinis tankis matuojamas prie 595 nm bangos

PFGE (angl. pulsed field gel electrophoresis) – pulsuojančio lauko elektroforezė

RAPD PGR (angl. random amplification of polymorphic DNA polymerase chain reaction) – atsitiktinai amplifikuotos polimorfinės DNR polimerazinė grandininė reakcija

rDNR – ribosominę RNR koduojantis genas

rRNR – ribosominė RNR

NDS (angl. sodium dodecyl sulphate) – natriodocilsulfatas

NDS-PAGE (angl. Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis) – natriodocilsulfato poliakrilamidinio gelio elektroforezė

TEMED – N,N,N,N-tetrametiletildiaminas

Tris – (hidroksimetil)-amino metanas

WCPP (angl. whole cell protein profile) – visų ląstelės baltymų analizė

Ivadas

Rūšies samprata ir rūšies apibūdinimas yra dvi tarpusavyje glaudžiai susijusios problemos. Prokariotų lygmenyje rūšies apibrėžimas yra susijęs su filo-fenetine rūšies koncepcija. Ja remiantis rūšies identifikavimui šiuo metu plačiausiai naudojama polifazinė taksonomija. Ji apjungia genotipinės ir fenotipinės analizės duomenis į vieningą sistemą. Ši sistema apima tyrimus, kurių rezultatais remiantis identifikuojamos bakterijų rūšys. Norint nustatyti prokariotų rūšis būtini trys pagrindiniai genotipinės analizės metodai – 16S rRNR geno sekvenavimas, DNR-DNR hibridizacija ir G-C sąsąstato tyrimai. Gauti rezultatai papildomi fenotipinės analizės duomenimis, lyginamas jų suderinamumas ir užtikrinamas tiriamų kamienų identitetas. Pastaruoju metu literatūroje daug rašoma apie fenotipinės analizės tyrimo - visų ląstelės baltymų analizės WCPP (angl. whole-cell protein profiling) reikšmę prokariotų taksonomijoje. Šiuo atveju visų ląstelės baltymų elektroforetinis profilis lyginamas su kitų kamienų profiliais ir sudaromas panašumo medis. Panašumas išreiškiamas procentais. Dėl šio metodo paprastumo ir pakankamai didelės skiriamosios gebos literatūroje vysta diskusija apie jo patikimumą prokariotų rūšių identifikacijai. Galima manyti, kad pilnam bakterinių kamienų priskyrimui žinomai rūšiai šis metodas nėra pakankamas, tačiau kamienų tarpusavio panašumo analizės lygmenyje bei pirminiam panašumui su žinomomis rūšimis nustatymui skiriamoji šio metodo geba yra pakankama.

Šio darbo tikslas – patikrinti visų ląstelės baltymų analizės metodo patikimumą, charakterizuojant *Geobacillus* genties bakterinių kamienų rūšinę priklausomybę ir nustatyti panašumą tarp šios genties kamienų pagal visų ląstelės baltymų analizės metodą.

Šio darbo uždaviniai :

- Standartizuoti visų ląstelės baltymų analizės metodą, pritaikant jį *Geobacillus* genties bakterinių kamienų identifikavimui.
- Nustatyti *Geobacillus* genties bakterijų kamienų giminingumą pagal visų ląstelės baltymų analizės metodą.

1. Literatūros apžvalga

1.1. Polifazinė prokariotų taksonomija

Praeitame dešimtmetyje tapo galutinai priimtina, kad bakterijų klasifikacija turi kiek įmanoma atspindėti natūralius ryšius tarp bakterijų, tai yra filogenetinius ryšius, kurie koduojami 16S ar 23S rRNR genuose. Rūšis – tai pagrindinis bakterijų taksonomijos vienetas, kuris apibrėžiamas kaip kamienų grupė, įskaitant ir tipinį kamieną, kuriuos sieja didesnis kaip 70% DNR-DNR hibridizacijos panašumas. Fenotipiniai ir chemotaksonominiai požymiai turėtų sutapti su šiuo apibrėžimu. Tačiau egzistuoja praktinės problemos, nes DNR-DNR hibridizacijai naudojami skirtingi metodai, dėl to gaunami skirtingi rezultatai. Taigi 70% riba turėtų būti vertinama ne kaip absoliuti, o tik orientacinė, todėl gautus rezultatus reikėtų lyginti su kitų polifazinės taksonomijos metodų rezultatais.

Bakterijų polifazinėje taksonomijoje naudojamos skirtingos informacijos rūšys. Čia gali būti panaudota praktiškai visa genotipinė, fenotipinė ir filogenetinė informacija. Genotipinė informacija gaunama iš nukleorūgščių (DNR ir RNR) esančių ląstelėje, tuo tarpu fenotipinė – iš baltymų ir jų funkcijų, skirtingų chemotaksonominių žymenų ir daugelio kitų ekspresuotų požymių.

Taksonominiuose tyrimuose naudojamų molekulių skaičius yra didžiulis, o jų, kaip žymenų pritaikymas – įvairus. Keli metodai yra tapę klasikiniai ir taikomi visoms bakterijoms, kiti pritaikomi tik tam tikroms grupėms. Skirtingi metodai skiriasi savo sudėtingumu ir patikimumu, pagrindiniai metodai ir jų pritaikymas trumpai išdėstyti toliau.

1.1.1. Genotipiniai metodai

Genotipiniai metodai susiję su DNR ar RNR molekulėmis. Neabejotinai šie metodai dabar dominuoja kaip šiuolaikinių technologijų pasekmė.

DNR bazių kiekio nustatymas (G-C molių procentais).

Guanozino su citozino molių procento nustatymas yra vienas iš klasikinių genotipinių metodų. Rūšies viduje kiekis nesvyruoja daugiau kaip 3%, genties viduje - 10%. Bakterijų pasaulyje G+C kiekis svyruoja nuo 24% iki 76%.

DNR-DNR hibridizacija.

DNR-DNR hibridizacijos procentas ir hibridinių molekulių temperatūrinio stabilumo mažėjimas yra naudojami bakterijų rūšims apibrėžti. DNR-DNR hibridizacijos lygis netiesiogiai atspindi dviejų genomų panašumą. Buvo nustatyta, kad temperatūrinis stabilumas mažėja nuo 1 iki 2,2 % kiekvienam 1% nesutampančių porų. Ši informacija nėra visiškai patikima, kadangi bandymai atlikti su trumpais oligonukleotidais, todėl šiuo metu neįmanoma susieti hibridizacijos lygio su geno sekos panašumu.

rRNR homologijos tyrimai.

rRNR – yra geriausias taikinytis studijuojantiems organizmų filogenetinius ryšius, nes ji yra visose bakterijose, yra funkcionaliai konstatuoti. Yra dvi 16S rRNR geno sekvenavimo strategijos: tiesioginis geno sekvenavimas, prieš tai jį klonavus; PGR metodo naudojimas parenkant tinkamus pradmenis ir atvirkštinę transkriptazę. Šiuo metu šias technikas pakeitė tiesioginis geno sekvenavimas naudojant PGR su tinkamais pradmenimis. Rezultatai gaunami šiais metodais yra panašūs, tačiau kiekvienas turi savo specifikos. Akivaizdu, kad kuo didesni konservatyvūs fragmentai, tuo daugiau informacijos jie teikia ir tuo patikimesnes išvadas galima daryti remiantis tokių genų sekomis.

DNR paremtos tipavimo metodikos.

DNR paremtos metodikos – tai būdas suskirstyti rūšis į tam tikrus tipus. Klasikinis subtipavimo būdas yra atliekamas remiantis fenotipinių analizių rezultatais, tokių kaip biocheminių ar serologinių testų, atsparumo antibiotikams tyrimo ir kt. Praeitam dešimtmetyje atsirado su DNR susijusių tipavimo metodų. Šios techniškos yra universalios, pritaikomos daugumai bakterijų, jų atkartojamumas didelis, o skiriamoji geba aukšta. Taip pat šie metodai yra paprastai atliekami. Patys pirmieji iš genotipavimo metodų buvo viso geno ir plazmidžių restriktinės analizės. DNR išskiriama ir sukarponoma tam tikromis restriktazėmis, gauti fragmentai išskirstomi agarozės gelyje. Lyginami gauti rezultatai. Šio metodo trūkumas yra tas, kad dažnai gaunami komplikuoti DNR fragmentai, kuriuos sunku lyginti. Plazmidžių analizės atveju išskyla sunkumų dėl plazmidžių pametimo ar jų nebuvimo. Vėliau šios metodikos buvo tobulinamos. Parenkamos restriktazės, atpažįstančios 6-8 nt sekas ir kerpančias retai. Tokiu būdu gaunama mažiau fragmentų. Tačiau čia

iškyla nauja problema – didelius fragmentus sunku aiškiai atskirti agarozės gelyje, todėl pasitelkiamas pulsuojančio lauko elektroforezės metodas. Šis metodas nuo įprastos elektroforezės skiriasi tuo, kad čia yra kaitaliojama elektros srovė. Įprastai DNR fragmentai didesni už 30-50 kb juda vienu greičiu ir dėl to neišsiskiria, o PFGE metu fragmentai yra priversti keisti judėjimo kryptį ir dėl to išsiskirsto pagal dydį.

Kitas būdas – perkelti DNR fragmentus ant membranos ir hibridizuoti su žymėtais zondais. Tipiška šio metodo atmaina – ribotipavimas. Taip pat sukurta tipavimo metodų PGR pagrindu, parenkami konservatyvūs arba, atvirkščiai, atsitiktiniai pradmenys ir lyginama produktų įvairovė. Aplikuotos rDNR restrikcinė analizė - tai metodas jungiantis restrikcinę analizę ir PGR. Naudojama tRNR ir kitų molekulių genetinė informacija.

1.1.2. Fenotipiniai metodai

Fenotipiniai metodai susiję su viskuo išskyrus DNR ir RNR, tai pat čia priklauso chemotaksonominės technikos. Chemotaksonomija – tai analitinių metodų pritaikymas surenkant įvairių cheminių ląstelės elementų informaciją ir taip klasifikuojant bakterijas. Kaip ir genotipinių ar fenotipinių metodų atveju kai kurie chemotaksonominiai metodai pritaikomi universaliai, kiti tinka tik tam tikroms bakterijų rūšims. Tam tikroms bakterijoms identifikuoti nepakanka vien genotipinės informacijos – ją būtina papildyti chemotaksonominių metodų rezultatais.

Klasikiniai fenotipiniai metodai.

Klasikiniai fenotipiniai metodai naudojami daugumoje mikrobiologinių laboratorijų sudarant identifikacijos schemas. Tačiau yra bakterijų grupių, kurioms išskirti fenotipinės informacijos nepakanka, taip pat šių metodų neįmanoma pritaikyti nekultivuojamoms ir endosimbiontinėms bakterijoms. Fenotipinė analizė apima morfologiją – ląstelės ar kolonijos forma, spalva, žiuželiai, sporos, dažymas Gramo būdu, įterptiniai kūneliai, fiziologiją ir biocheminius parametrus – augimas skirtingose temperatūrose, pH, druskų koncentracijose, atmosferos sąlygose. Taip pat augimas esant įvairiems antimikrobiniais faktoriams, įvairių fermentų aktyvumai ir kt. Šių metodų trūkumas – labai griežtas sąlygų standartizavimas, norint atkartoti rezultatus skirtingose laboratorijose.

Skaitmeninė analizė.

Fenotipiniai požymiai lyginami tarp daugelio kamienų atskirų porų ir sudaromas panašumo medis. Nustatyta, kad lyginant didelį kiekį fenotipinių požymių gauti panašumo medžiai yra taksonomiškai patikimi.

Tipavimo metodai.

Daugelis įvairių ląstelės komponentų yra naudojami tipavimo sistemose. Vienas iš tokių metodų – serotipavimas. Nustatoma ląstelėse esančių antigenų įvairovė ir lyginama su kitomis rūšimis. Tačiau šis metodas tinka tik tam tikroms bakterijoms ir yra atliekamas tik tam tikrose laboratorijose. Labiau paplitęs metodas – daugialokusinė fermentų elektroforezė. Šis metodas taikomas populiacijų genetikoje, leidžia nustatyti bakterijų kamienų genetinius ryšius.

Ląstelės sienelės sandara.

Šis metodas svarbus Gram-teigiamų tarp bakterijų. Gram-neigiamų bakterijų sienelė yra daugiau pastovi ir neteikia daug informacijos, tačiau Gram-teigiamos bakterijos turi įvairius peptidogliukano tipus, kurie gali būti specifiški gentims ar net rūšims. Taip pat dujinės chromatografijos būdu nustatoma teicho rūgščių įvairovė.

Ląstelės riebalų rūgštys.

Bakterijų ląstelėse yra riebiųjų rūgščių įvairovė. Poliariniai lipidai yra pagrindinė bakterijų membranų lipidinio dvisluoksnio sudedamoji dalis. Jie dažnai tiriami bakterijų identifikavimui ir klasifikacijai. Kitokie lipidai, tokie kaip sfingolipidai, randami tik tam tikrose bakterijų grupėse ir parodyta, kad šiose grupėse jie teikia daug informacijos. Gram-neigiamų bakterijų išorinėje membranoje esančius lipopolisacharidus galima analizuoti elektroforezės būdu ir lyginti įvairovę pagal O-specifinę šoninę grandinę. Riebiosios rūgštys yra pagrindinė lipopolisacharidų ir lipidų sudedamoji dalis ir yra tiriami taksonominiais tikslais. Nustatyta daugiau kaip 300 įvairių cheminių struktūrų. Varijuoja riebiųjų rūgščių grandinių ilgiai, dvigubų jungčių kiekis ir padėtys. Dažniausiai analizuojamos visos ląstelės riebiosios rūgštys, tačiau galima tirti tik tam tikrą jų grupę.

Izopreniniai chinonai.

Izopreniniai chinonai randami daugumos prokariotų citoplazminėje membranoje. Jų paskirtis – elektronų pernaša, oksidacinis fosforilinimas ir, manoma, aktyvi pernaša. Chinonai skirstomi į dvi dideles struktūrines grupes: naftochinonai ir benzochinonai. Pirmieji dar skirstomi į filochinonus ir metachinonus. Pagal jų šonines grandines bakterijas galima charakterizuoti įvairiuose taksonominiuose lygmenyse.

Visų ląstelės baltymų analizė.

Buvo parodyta, kad lyginant visų ląstelės baltymų profilius, gautus griežtai standartizuota NDS-poliakrilamidinio gelio elektroforeze, galima labai patikimai sugrupuoti daug artimų kamienų. Yra duomenų rodančių šio metodo rezultatų koreliaciją su DNR-DNR hibridizacijos rezultatais. Visų ląstelės baltymų analizės metodo naudojimas plačiajai identifikacijai yra apribotas, nes šio metodo teikiama informacija yra tinkama rūšies ar žemesniame lygiuose.

Mikroorganizmai ekspresuoja kelis tūkstančius skirtingų baltymų, kurie gali suteikti daug informacijos jų charakterizavimui. Ląstelės baltymų poliakrilamidinio gelio elektroforezė (PAGE) duoda baltymų profilius, kurie gali būti vertinami kaip tiriamų kamienų pirštų atspaudai. Šio metodo naudojimo priežastis yra ta, kad kamienai turintys bent 70% DNR panašumą, turi panašius ir baltymų profilius. Yra naudojamos kelios skirtingos baltymų elektroforetinių profilių tyrimų metodikos:

- a) tirpių citoplazminių baltymų, ar baltymų paveiktų denatūruojančiu agentu (pvz. NDS) mišinys leidžiamas NDS-PAGE ir dažoma dažais tinkančiais baltymams dažyti. Nėra nustatomi baltymai esantys kiekvienoje elektroforegramos zonoje.
- b) Natyvių baltymų mišinys leidžiamas gelyje (poliakrilamidiniame ar krakmolo) ir dažoma dažais specifiniais tam tikriems fermentams. [Vandamme ir kt., 1996]

Kompiuterinė baltyminių elektroforegramų analizė.

Atlikus visų ląstelės baltymų NDS-PAGE, gelis dažomas, o gauta elektroforegrama fotografuojama arba skanuojama. Baltymų profiliai vertinami kompiuterinėmis programomis. Įvertinama kiekvienos baltyminės zonos vieta gelyje ir jos intensyvumas. Naudojami panašumo koeficientai gali būti įvairūs, tačiau populiariausi yra: **r** (Pearson product moment correlation coefficient) ir **Dice** koeficientas. Pirmasis lygina baltyminių zonų vietą ir jų intensyvumą, antrasis tik vietą. Taip pat vertinant atskirų kamienų baltyminius profilius galima atmesti klaidinančias ar

sunkiai vertinamas baltymines zonas ar lyginti tam tikras profilių atkarpas. Žinoma, visi šie kriterijai vieno tyrimo metu turi būti standartizuoti.

Įvertinus profilių panašumą sudaromas panašumo medis. Panašumas išreiškiamas panašumo ar nepanašumo procentais. Lyginamos visų tiriamų kamienų tarpusavio poros.

Nėra absoliučios panašumo ribos, kuri rodytų kamienų priklausomybę vienai rūšiai, tačiau net to paties kamieno elektroforetiniai visų ląstelės baltymų profiliai gali varijuoti iki 10%. Lyginant daug kamienų reikėtų atsižvelgti į jų susigrupavimą, tačiau orientacinė riba turėtų būti 70 – 80% panašumas. Lyginti atskiruose geliuose esančius visų ląstelės baltymų profilius galima tik esant visiškam molekulinio žymens atitikimui tarp gelių. Atrinkus vizualiai panašiausius kamienus, jų baltymų ekstraktus reikėtų leisti viename gelyje. [Pot ir kt., 1994]

1.2. Bakterijų kamienų identifikavimas WCPP ir kitais metodais

1.2.1. *Shewanella putrefaciens* ir *Shewanella alga* rūšių atskyrimas remiantis visų ląstelės baltymų analize, ribotipavimu, fenotipine charakteristika ir 16S rRNR geno sekvenavimu.

Buvo analizuojami 76 numanomi *Shewanella putrefaciens* kamienai. Jie buvo lyginami tarpusavyje ir su trimis tipiniais kamienais: *Shewanella putrefaciens* (ATCC 8071), *Shewanella alga* (IAM 14159) ir *Shewanella hanedai* (ATCC 33224).

WCPP sugrupavo 79 *Shewanella* kamienus į dvi grupes A ir B. Tarp grupių A ir B buvo tik 56% panašumas. Į A grupę įėjo ir tipinis kamienas *S. alga* (IAM 14159), o į B grupę pateko tipinis kamienas *S. putrefaciens* (ATCC 8071). Tuo tarpu *S. hanedai* (ATCC 33224) nepateko į nė vieną iš jų, nes šio kamieno panašumas su kitais tirtais kamienais siekė tik 50%. A grupė dar gali būti padalinta į keturis pogrupius: A1 pagal 76% panašumą, A2 – 80%, A3 – 85% ir A4 pagal 80% panašumą. B grupė atitinkamai dalijama į penkis pogrupius: B1 ir B2 pogrupiai sudaryti pagal 80% panašumą, B3 pagal 76%, B4 - 82% ir B5 pagal 79% panašumą. Panašiai kamienai pasiskirstė ir po 16S rRNR sekvenavimo. Tipinis kamienas *S. hanedai* (ATCC 33224) ryškiai skyrėsi nuo kitų genotipiškai.

Nors WCPP išskyrė dvi skirtingas grupes, tačiau į A grupę įėjo penki kamienai pagal augimo sąlygas (neaugo 4°C temperatūroje) daug panašesni į mezofilą *S. alga*, o ne į psichofilą *S. putrefaciens*, kaip kiti tos grupės kamienai. Tolesni tyrimai parodė, kad pagal G+C kiekį, toleranciją druskoms ir temperatūrai *S. putrefaciens* dalijasi į dvi grupes. Pirmai grupei priklauso

kamienai, išskirti iš žmogaus ir labai retai iš aplinkos, o kitai grupei priklausantys kamienai išskirti iš pieno produktų, žuvies produktų, o taip pat iš aplinkos. Iki šiol nėra vieningos nuomonės ar kai kurie *S. putrefaciens* kamienai neturėtų būti priskiriami *S. alga* rūšiai. Tai bandoma įrodyti remiantis WCPP ir 16S rRNR koduojančio geno sekvenavimu. Tačiau pagal DNR panašumo tyrimus vis dėlto atrodo, kad įmanomas ir mezofilinių *S. putrefaciens* kamienų egzistavimas. Taigi reikalingi tolimesni tyrimai, norint įrodyti, kad yra galimas šios rūšies skirstymas į grupes. [Vogel ir kt.,1997]

Šiame tyrime WCPP ir 16S rDNR sekvenavimo rezultatai sutapo. Tačiau DNR-DNR hibridizacijos rezultatai nuo jų šiek tiek skyrėsi. Taigi neaišku, kuriais tyrimais galima labiau pasitikėti ar WCPP ir 16S rDNR sekvenavimu.

1.2.2. Kamienų, panašių į *Pseudomonas aeruginosa* tyrimas.

Iš mineralinio vandens buvo išskirti 97 numanomi *Pseudomonas aeruginosa* kamienai. Buvo atlikta WCPP ir kamienai pagal 80% panašumą susiskirstė į keturias grupes:

- Grupę A – susidariusią pagal 81% panašumą. Ji papildomai suskirstyta į du pogrupius A1 – pagal 83% panašumą ir A2 – pagal 85% panašumą. Vizualiai elektroforezėje šių pogrupių baltymai atrodė vienodai.
- Grupę B – susidariusią pagal 80% panašumą. Lyginant WCPP duomenis su žinomų rūšių duomenimis nustatyta, kad B grupės kamienai priklauso *P. putida* rūšiai.
- Grupę C – susidariusią pagal 87% panašumą.
- Grupę D – susidariusią pagal 82% panašumą. Lyginant su žinomomis rūšimis nustatyta, kad tai – *P. aeruginosa* rūšis.
- Taip pat du atskirus tipinius kamienus: *P. resinovorans* ATCC2274 ir *P. alcaligenes* LMG 1224.

WCPP rezultatų nepakako tiriamų kamienų identifikavimui. Todėl reikėjo papildomų tyrimų. Atlikus C grupei priklausančių 84 kamienų 16S rDNR sekvenavimą nustatytas jų 99.3% panašumas su *P. alcaligenes*, tačiau tipinis šios rūšies kamienas pagal WCPP neįėjo į šią grupę. Fiziologiniai tyrimai taip pat rodo, kad *P. alcaligenes* ir C grupė nepriklauso vienai požymių grupei. Visi C grupės kamienai genotipiškai labai panašūs, tačiau pagal biocheminę analizę jie išskiriami į dvi grupes: pirmą, kuri atitinka pogrupį A2 ir antrą, atskirą pogrupį.

16S rRNR koduojančio geno sekvenavimas šiuo atveju papildė WCPP rezultatus, tačiau visų 97 tirtų kamienų identifikuoti nepavyko. [Morais ir kt., 1997]

1.2.3. *Vagococcus fluviatilis* rūšies tyrimai.

Buvo ištirti septyni *Vagococcus fluviatilis* kamienai: keturi iš žmogaus organizmo, du – iš kiaulių ir vienas iš aplinkos. WCPP metodu kamienai buvo palyginti su dviem žinomų *Vagococcus* genties rūšių tipiniais kamienais, ir su *Enterococcus* bei *Lactococcus* gentimis. Su *V. fluviatilis* kamienus siejo 86% panašumas, o su *V. salmoninarum* ir *Enterococcus* sp. 66% ir mažesnis panašumas. Rezultatams patikslinti buvo atlikta DNR-DNR hibridizacija. Nustatytas artimas ryšys (apie 85%) su *V. fluviatilis* rūšimi. Taigi kamienai priskirti *V. fluviatilis* rūšiai. [Teixeira ir kt., 1997]

WCPP rezultatai buvo patikimi, jie buvo patvirtinti DNR-DNR hibridizacija.

1.2.4. *Gemella bergeriae* sp. nov. *Gemella sanguinis* sp. nov. rūšių identifikavimas.

Buvo ištirti šeši iki tol neapibūdinti kamienai išskirti iš žmogaus organizmo. Nustatyta, kad tai yra gram-neigiami kokai, fakultatyviniai anaerobai. Identifikavimui naudoti fenotipavimo ir molekuliniai taksonomijos metodai. WCPP rezultatai parodė, kad visi šeši tirti kamienai sudaro pakankamai homogenišką grupę, kuri labai skiriasi nuo kitų *Gemella* genties rūšių. Tirtus kamienus siejo 78% panašumas, o su kitomis tos pačios genties rūšimis – tik 45% panašumas. Buvo atliktas kamienų 16S rDNR dalies (per 1400 bazių) sekvenavimas. Paaiškėjo, kad kamienų 16S rDNR seka nesiskiria nė viena baze, taigi nustatytas 100% panašumas. Neliko abejonių, kad visi kamienai priklauso tai pačiai rūšiai, ir kadangi duomenys neatitiko jokios jau apibūdintos rūšies, kamienai priskirti naujai rūšiai *Gemella bergeriae* sp. nov. Tirtų kamienų 16S rDNR seka nuo dvių žinomų *Gemella* genties rūšių *G. haemolysans* ir *G. morbillorum* skyrėsi atitinkamai tik 5.6% ir 5.4%. Tai ir lėmė kamienų priskyrimą šiai genčiai. [Collins ir kt., 1998]

Po pusės metų buvo išskirti dar šeši anksčiau neapibūdinti kamienai ir nustatyta, kad tai *Gemellus* genčiai priklausančios bakterijos. Visų šešių kamienų 16S rRNR sekvenavimo rezultatai buvo identiški. Jie neatitiko nė vienos jau žinomos rūšies ir buvo artimiausi *Gemellus* genčiai. WCPP patvirtino tai, kad jie priklauso vienai, anksčiau dar neidentifikuotai rūšiai. Grupės viduje panašumas siekė 78%. Tuo tarpu su kitomis genties rūšimis juos siejo mažesnis nei 60% panašumas. Taigi vėl buvo rasta nauja rūšis pavadinta *Gemella sanguinis*. [Collins ir kt., 1998]

Šiuose tyrimuose WCPP ir 16S rDNR sekvenavimas davė panašius rezultatus. 16S rDNR sekvenavimo rezultatai papildė WCPP duomenis ir padėjo nustatyti naujos rūšies gentį.

1.2.5. *Corynebacterium* genties naujos rūšies atradimas.

Iš šuns organizmo buvo išskirti šeši anksčiau neapibūdinti bakterijų kamienai. Jie buvo identifikuojami remiantis fenotipavimo ir molekulinės genetikos metodais. Pagal chemotaksonominius požymius visi tirti kamienai buvo priskirti *Corynebacterium* genčiai. Atlikta analizė parodė, kad kamienai yra panašūs tarpusavyje, tačiau skiriasi nuo kitų, jau žinomų tos genties rūšių. Šešių kamienų WCPP rezultatai parodė jų tarpusavio 83% panašumą. Tuo tarpu su artimiausių rūšių *C. urealyticum* ir *C. jeikeium* kamienais juos siejo tik 65% panašumas. Taigi remiantis šiais rezultatais kamienai buvo priskirti naujai rūšiai *Corynebacterium auriscanis* sp. nov., o jos tipinis kamienas CCUG 39938^T. Šio kamieno beveik pilnas 16S rRNR koduojantis genas (1452 bazių) buvo sekvenuotas ir rezultatai palyginti su kitomis šios genties atstovų 16S rDNR sekomis. Paaiškėjo, kad kamienas artimiausias trimis rūšims: *C. falcenii* pagal 97% panašumą, *C. jeikeium* pagal 96.5% panašumą ir *C. urealyticum* pagal 96.2% panašumą. Remiantis duomenimis galima teigti, kad tiriamas kamienas priklauso nežinomai rūšiai, nes 16S rRNR homologijos divergencija siekė 3%. Taigi ši analizė tik patvirtino ankstesnes prielaidas. Vėliau buvo sekvenuotos ir likusių kamienų dalis 16S rDNR (apie 800 bazių) ir nustatyta, kad jų panašumas su tipiniu kamieniu CCUG 39938^T siekė net 99.9 – 100%.

WCPP ir 16S rDNR sekos palyginimas šiame tyrime davė analogiškus rezultatus. [Collins ir kt., 1999]

1.2.6. *Faklamia ignava* sp. nov. ir *Faklamia languida* sp. nov. rūšių identifikavimas.

Iš žmogaus organizmo buvo išskirti du iki tol neapibūdinti kamienai. Tai buvo gram-teigiami, sporų neformuojantys kokai. Po beveik visos 16S rDNR sekvenavimo pasirodė, kad abu kamienai yra geneologiškai homogeniški, nes analizė parodė 100% panašumą. Tačiau nuo jau žinomų rūšių šie kamienai skiriasi: *F. hominis* – 3%, *Globicatella sanguinis* – 6% ir *Abiotrophia defectiva* – 8%.

Remiantis WCPP duomenimis buvo iškelta prielaida, kad tiriamieji kamienai priklauso naujai *Faklamia* genties rūšiai. Su šios genties rūšimis tirtus kamienus siejo 55% panašumas, o su kitomis gentimis 50% ir mažesnis panašumas. Tarpusavyje kamienus siejo 75% panašumas.

Atsižvelgus į rezultatus kamienai buvo priskirti naujai rūšiai, kuri buvo pavadinta *Faklamia ignava* sp. nov. [Collins ir kt., 1998]

Po metų iš žmogaus organizmo buvo išskirti dar trys kamienai. Tai buvo gram-teigiami, koko formos fakultatyviniai anaerobai. Pagal WCPP kamienai tarpusavyje buvo panašūs apie 80% ir skyrėsi nuo kitų, žinomų rūšių kamienų: su *Faklamia hominis* nustatytas 56% panašumas, *F. ignava* – 52%, *F. sourekkii*, *Gemella sanguinis* ir *Abiotropha elegans* – 40% panašumas. Remiantis duomenimis nuspręsta, kad kamienai priklauso naujai *Faklamia* genties rūšiai.

Rezultatams patikslinti buvo atliktas 16S rDNR sekvenavimas. Tarp kamienų nustatytas 99-100% panašumas. Sekos buvo palygintos su žinomų rūšių sekomis, kamienų 16S rDNR seka skyrėsi nuo *F. hominis* 44 bazėmis iš 1440 sekvenuotų. Tai atitinka 3%. Su kitomis rūšimis nustatytas dar mažesnis kamienų panašumas. Tai rodo, kad buvo rasta dar viena nauja rūšis, priklausanti *Faklamia* genčiai – *Faklamia languida* sp. nov. [Lawson ir kt., 1999]

16S rDNR sekvenavimo rezultatai rodė, kad tirti kamienai buvo skyrėsi nuo tam tikrų rūšių 3%. Remiantis rezultatais nėra visiškai aišku ar kamienai priklauso toms rūšims. Todėl buvo atlikta WCPP ir palyginti rezultatai. Tai ir lėmė, kad kamienai buvo priskirti naujoms rūšims.

1.2.7. Pienarūgščių bakterijų identifikavimas

Malaizijoje iš maisto produktų buvo išskirti 92 pienarūgščių bakterijų kamienai. Po WCPP jie buvo suskirstyti į devynias grupes:

- I grupė susidarė pagal 86% panašumą ir buvo nustatyta, kad tai *Lactobacillus plantarum*.
- II grupė sudaryta pagal 88% panašumą, buvo panašiausia į *L. brevis*, tačiau nepakankamai, kad būtų priskirta šiai rūšiai.
- III grupė – pagal 90% panašumą ir tai buvo *Enterococcus faecalis*.
- IV grupės narius siejo 87% panašumas ir ji buvo identifikuota kaip *Weissella confusa*.
- V ir VI grupės – neidentifikuotos, o kamienų tarpusavio panašumas siekia 90%.
- VII grupė, *Lactobacillus fermentum*, sudaryta pagal 85% panašumą.
- VIII grupė, *Pediococcus acidilactici*, pagal 74%
- IX grupė pagal 85% panašumą ir nustatyta, kad tai – *Lactobacillus farciminis*.
- Vienas neatpažintas kamienas nepapuołė į jokią grupę.

Norint identifikuoti likusias rūšis, buvo atlikta 16S rRNR 24 – 1492 bazių analizė. Buvo sekvenuota penkių kamienų 16S rDNR ir seka lyginta su žinomų rūšių sekomis. Gauti tokie rezultatai:

- du kamienai iš I grupės sudarė naują grupę, susijusią su *L. casei/Pediococcus*, *Weissella* ir *Carnobacterium* grupėmis.
- du kamienai iš V grupės buvo panašūs į *Weissella paramesenteroides* 93 – 95%, o į *W. viridescens* – 91%.
- vienas kamienas iš II grupės buvo panašus į *Lactobacillus agilis*, *L. aviarius*, *L. salivarius*, *L. ruminis* ir *L. animalis* 89,3 – 91,2%.

Grupių viduje panašumas viršijo 99%. [Leisner ir kt. 1999]

16S rDNR sekvenavimas šiuo atveju papildė WCPP rezultatus. Tačiau visų kamienų identifikuoti nepavyko todėl reikalingi tolesni tyrimai norint įrodyti, kad kamienai priklauso naujai rūšiai ar rūšims.

1.2.8. Pienarūgščių bakterijų greitas identifikavimas.

Lactobacillus delbrueckii subsp. *lactis* ir *L. helveticus* naudojamos kaip startinės kultūros daugelio pieno produktų fermentavimui. Norint gauti aukštos kokybės produktus labai svarbu tiksliai identifikuoti naudojamas bakterijas. Paprastai tai atliekama klasikiniiais fenotipiniais testais, tačiau yra kamienų, kurių nepavyksta priskirti konkrečioms rūšims. Taigi ieškoma patogaus, tikslaus ir greito metodo šioms bakterijoms identifikuoti.

Iš argentinietiško ir itališko kietųjų sūrių buvo išskirti šeši pienarūgščių bakterijų kamienai: CRL 1177, CRL 1178, CRL 1179, CRL 654, CRL 702 ir CRL 581. pagal fenotipinius testus CRL 1177, CRL 1178 ir CRL 1179 buvo identifikuoti kaip *L. helveticus*, CRL 654 ir CRL 702 – kaip *L. delbrueckii* subsp. *lactis*, o CRL 581 kamienas tik iš dalies panašus į *L. helveticus*.

Atlikus 16S rRNR geno sekvenavimą nustatytas CRL 1062, CRL 1177, CRL 1178 ir CRL 1179 kamienų 99% panašumas su *L. helveticus* NCDO 2712, o CRL 581, CRL 654 ir CRL 702 kamienų 99% panašumas su *L. delbrueckii* subsp. *lactis* DSM 20072.

Atlikus ląstelės sienelės ir visų ląstelės baltymų elektroforezes, rezultatai sutapo su 16S rRNR geno sekvenavimo rezultatais. Taigi, nors šiuo metu naudojama PFGE ar RAPD identifikuoti pienarūgštes bakterijas, tačiau baltymų analizė palyginus su minėtais tyrimais yra patikima, nebrangi ir tyrimą galima pakankamai greitai atlikti. [Hébert ir kt., 2000]

1.2.9. Neidentifikuojamos *Helicobacter* genties: *Helicobacter cinaedi* pavyzdys.

Buvo identifikuojami 14 spėjami *Helicobacter* genties atstovai remiantis WCPP, biochemine analize, 16S rDNR sekvenavimu ir DNR-DNR hibridizacija.

14 kamienų WCPP duomenys buvo palyginti su daugiau kaip 1000 jau žinomų *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter* ir *Wolinella* rūšių WCPP duomenimis. Tirti kamienai kartu su jau iki tol žinomais aštuoniais *H. cinaedi* rūšies kamienais sudarė homogenišką grupę. Jos narius siejo 80% panašumas. Taigi padaryta išvada, kad buvo tirti būtent *H. cinaedi* rūšies kamienai.

Rezultatams patikslinti buvo sekvenuotas 16S rRNR koduojantis genas. Rezultatai parodė, kad kai kurie iš tirtų kamienų nepriklauso minėtai rūšiai, nes jų 16S rDNR seka skiriasi nuo *H. cinaedi* rūšies sekos daugiau kaip 4%. Buvo pasiūlyta tuos kamienus priskirti naujai rūšiai "*H. westmeadii*".

Dėl rezultatų nesutapimo buvo atlikta DNR-DNR hibridizacija. Rezultatai parodė, kad visi tirti kamienai neabejotinai priklauso tai pačiai rūšiai, taigi *H. cinaedi*.

Šiuo atveju WCPP rezultatai buvo patikimesni už 16S rDNR sekvenavimo rezultatus. Teigiama, kad negalima visiškai pasitikėti 16S rDNR sekvenavimo rezultatais, nes net skirtingose rūšyse gali būti identiška 16S rDNR, o tuo tarpu toje pačioje rūšyje ji gali diverguoti net daugiau kaip 4%. Taigi sekvenavus 16S rDNR, tyrimo rezultatus reikėtų palyginti su WCPP ar/ir DNR-DNR hibridizacijos rezultatais. [Vandamme ir kt., 2000]

1.2.10. Naujos *Helicobacter* genties rūšies identifikavimas.

Iš mažųjų beždžionių (*Callithrix jacchus*) fekalijų buvo išskirta lėtai augančios mikroaerofilinės helikobakterijos. Tolimesniems tyrimams pasirinkti penki kamienai. Atlikus 16S rDNR sekvenavimą, nustatyta, kad tiriamų kamienų šis genas buvo identiškas, o su kelių žinomų *Helicobacter* genties rūšių kamienais siejo didesnis nei 99% panašumas. Tačiau palyginus šių kamienų fiziologines, morfologines bei biochemines savybes gauti prieštaraujantys rezultatai: tiriami kamienai skyrėsi nuo visų iki šiol identifikuotų *Helicobacter* genties rūšių kamienų. Atlikus visų ląstelės baltymų analizę paaiškėjo, kad tiriami kamienai panašūs į kitus šios genties kamienus tik 63%, tuo tarpu, kai vienos rūšies kamienai pagal šią analizę susiskirstė į grupes, kurias siejo didesnis nei 80% panašumas. Siūlomą šiuos kamienus priskirti naujai *Helicobacter* genties rūšiai, siūlomas pavadinimas *H. callitrichis* sp. nov. [Won ir kt., 2007]

1.2.11. *Actinomyces radidentis* sp. nov.

Iš paciento infekuoto danties kanalo buvo išskirti du bakterijų kamienai, panašūs į *Actinomyces* sp. Biocheminiai tyrimai patvirtino kamienų priklausymą šiai genčiai. Tačiau rūšies lygmenyje šiais metodais jų identifikuoti nepavyko. Atlikus WCPP nustatytas 85% panašumas tarp tirtų kamienų ir tik 50% jų panašumas su artimiausiomis jau žinomomis rūšimis: *Actinomyces howellii* ir *Arcanobacterium phocae*. Rezultatams patvirtinti buvo sekvenuota 16S rDNR dalis (per 1400 nukleotidų). Analizė parodė, kad kamienų 16S rDNR sekos yra beveik identiškos – tarpusavyje skiriasi tik 0.2%. Su kitomis rūšimis juos siejo toks panašumas: *A. bovis* – 95.6%, *A. bowdenii* – 95%, *A. naeslundii* – 95%, *A. viscosus* – 95.2%, *A. slackii* – 96.8%. Teigiama, kad jei mikroorganizmų 16S rDNR seka skiriasi daugiau kaip 3% jie laikomi skirtingomis rūšimis, tai reiškia, kad abu tirti kamienai priklauso vienai naujai rūšiai. Tai patvirtino ir WCPP. Taigi kamienai priskirti naujai rūšiai, pavadintai *Actinomyces radidentis* sp.nov. [Collins ir kt., 2000]

WCPP ir 16S rDNR sekvenavimas davė panašius rezultatus.

1.2.12. *Enterococcus gilvus* sp. nov. ir *Enterococcus pallens* sp. nov. išskirti iš žmogaus mėginių.

Enterococcus genties atstovai pagal morfologines ir biochemines charakteristikas yra suskirstyti į penkias grupes. Iš pacientų buvo išskirti du kamienai šviesiai geltonos spalvos PQ1 ir geltonos spalvos PQ2. Abu jie yra gram-teigiami, neformuojantys sporų, nejudrūs. Fenotipiškai abu organizmai buvo priskirti *Enterococcus* genties pirmajai grupei. Remiantis WCPP ir 16S rDNR sekvenavimo duomenimis buvo nustatyta, kad tai naujos rūšys. Pagal WCCP rezultatus abu kamienai panašūs į žinomas *Enterococcus* genties rūšis tik 70%. Atskirai PQ1 kamienas panašus 60% į *E. raffinosus*, *E. casseliflavus* ir *E. mundtii* rūšis, o PQ2 kamienas pagal 64% panašumą atitiko *E. faecalis* rūšį. Po 16S rDNR sekvenavimo paaiškėjo, kad PQ1 kamienas 99.8% panašumu atitinka dvi rūšis: *E. raffinosus* ir *E. malodoratus*, o PQ2 kamienas 98.7% panašumu atitinka *E. malodoratus* ir 98,6% panašumu – *E. raffinosus*, *E. avium* ir *E. pseudoavium* rūšis. Tirtieji kamienai buvo vieninteliai produkuojantys geltoną pigmentą iš *Enterococcus* genties pirmos grupės. Remiantis šiuo faktu ir WCCP bei 16S rDNR sekvenavimo rezultatais buvo nustatyta, kad tai naujos rūšys *E. gilvus* sp. nov. (PQ1) ir *E. pallens* sp. nov. (PQ2).

Nors PQ1 kamieno 16S rDNR seka nuo *E. raffinosus* ir *E. malodoratus* 16S rDNR sekų skiriasi vos keliomis bazėmis, šis kamienas nebuvo priskirtas minėtoms rūšims. Taip pat PQ2

kamienas nebuvo priskirtas *E. malodoratus*, *E. raffinosus*, *E. avium* ir *E. pseudoavium* rūšis. Tai lėmė žemas visų ląstelės baltymų panašumo lygis ir toms rūšims nebūdinga pigmentacija.

Šiame tyrime kamienai priskirti naujoms rūšims *E.gilvus* ir *E. pallens* remiantis WCPP rezultatais ir kamienų pigmentacija. [Tyrrell ir kt., 2002]

1.2.13. Naujų enterokokų identifikavimas.

Enterokokai – tai oportunistiniai žmogaus patogenai, todėl jų tikslus identifikavimas yra svarbi problema. Šios genties atstovai ne visada atitinka visus charakterizavimo kriterijus, dėl to sunku juos identifikuoti. Buvo išskirti du sunkiai identifikuojami kamienai (SS-1728 ir SS-1729) iš žmogaus kraujo ir vienas (SS-1730) iš smegenų audinio. Fiziologinių testų nepakako juos priskirti kuriai nors iš žinomų enterokokų rūšių. Buvo atlikta visų ląstelės baltymų analizė, kurios rezultatai parodė, kad tirti kamienai negali būti priskirti žinomiems enterokokams:

- SS-1728 kamienas buvo panašiausias į *E. sulfureus* ATCC 49903^T, tačiau tik 66%
- SS-1729 su *E. durans* ATCC 19432^T siejo 70% panašumas
- SS-1730 su *E. raffinosus* ATCC 49427^T – 68% panašumas.

Atlikus 16S rRNR geno dalinės sekos sekvenavimą, buvo nustatyta, kad tiriami kamienai priklauso *Enterococcus* genčiai, tačiau nėra pakankamai artimi žinomoms rūšims. DNR-DNR hibridizacija tarp tirtų kamienų ir žinomų šios genties kamienų buvo mažesnė nei 70%.

Taigi remiantis gautais rezultatais, tirti kamienai priskirti naujoms *Enterococcus* genties rūšims. [Carvalho ir kt., 2004]

1.2.14. *Varibaculum cambriensis* gen. nov., sp. nov.

Iš žmogaus organizmo buvo išskirta penkiolika gram-teigiamų anaerobinių bakterijų kamienų. Buvo atliktas beveik visos 16S rDNR sekvenavimas. Tai parodė, kad kamienai buvo beveik identiški (99.1 – 100% panašumas). Lyginant kamienus su kitais, žinomais organizmais paaiškėjo, kad tai gali būti nauja rūšis, nes 16S rRNR seka nuo artimiausių genčių *Mobiluncus*, *Actinomyces* ir *Arcanobacterium* skyrėsi net 10 – 12%. Tai reiškia, kad rasta ne tik nauja rūšis, bet ir nauja gentis. Atlikus WCPP gauti panašūs rezultatai. Tarp kamienų nustatytas 82% panašumas, tuo tarpu su gentim *Mobiluncus* juos siejo tik 28% panašumas. Taigi rezultatai tik patvirtino naujos rūšies išskyrimą. Bakterijos pavadintos *Varibaculum cambriensis* gen. nov., sp. nov. [Hall ir kt., 2003]

WCPP buvo atlikta 16S rDNR sekvenavimo rezultatams patikslinti. WCPP rezultatai sutapo su 16S rDNR sekvenavimo rezultatais.

1.2.15. Bifidobakterijų, išskirtų iš kiaulių aklosios žarnos, genetinė įvairovė ir giminingumas.

Buvo panaudota įvairių metodų genetiniam giminingumui nustatyti ir Bifidobakterijų rūšims atskirti. RAPD PCR buvo panaudota sugrupuoti bakterijas išskirtas iš žiurkių žarnyno, žmogaus fekalijų ir žmogaus virškinamojo trakto. Bifidobakterijų rūšių identifikavimui buvo panaudoti visų ląstelės baltymų analizė, 16S rDNR sekvenavimas ir DNR-DNR hibridizacija

Pagal PFGE kamienai susiskirstė į septynis tipus: A, B, C, D, E, F ir G. Tolesniam Bifidobakterijų identifikavimui buvo atliktas WCPP. Šis metodas jau buvo žinomas ir patikimas Bifidobakterijų rūšių identifikavimui. Po analizės tipai susiskirstė į keturias grupes:

- I grupė susidarė iš tipų C,D ir G pagal 78% panašumą.
- II grupė – iš B ir E tipų, kurių panašumo rodiklis siekė net 92%.
- O tipai A ir F buvo visiškai nepanašūs į kitus ir tarpusavyje ir todėl sudarė atitinkamai III ir IV grupes.
- Vėliau palyginus I grupės kamienus su žinomomis 33 Bifidobakterijų rūšimis spėta, kad jie priklauso arba *B. pseudolongum* subsp. *pseudolongum* arba *B. pseudolongum* subsp. *globosum*. Kitų Bifidobakterijų grupių nariai nebuvo identifikuoti.

Po 16S rDNR koduojančio geno sekvenavimo buvo gauti tokie rezultatai:

- G tipas 100% sutapo su *B. pseudolongum* subsp. *pseudolongum*.
- C ir D tipai buvo atitinkamai 99.93 ir 100% panašūs į *B. pseudolongum* subsp. *globosum*.
- Tipas A buvo identifiкуotas kaip *B. minimum* pagal 99.57% panašumą.
- Tipas F buvo panašus į tipą A ir *B. minimum* atitinkamai tik 95.08 ir 94.85%. Taigi manoma, kad tai nauja Bifidobakterijų rūšis *B. psychroaerophilum* sp. nov.
- Tipai B ir E tarpusavyje buvo labai panašūs, bet jiems taip pat nebuvo rasta atitiktens, taigi jie priskirti naujai rūšiai *B. aerophilum* sp. nov.

WCPP Bifidobakterijų identifikavimui buvo naudinga, nes atlikus tyrimus buvo galima sugrupuoti bakterijas, tačiau rūšis pavyko nustatyti tik sekvenavus 16S rRNR koduojantį geną. [Simpson ir kt., 2003]

1.2.16. *Campylobacter lari* genetinių grupių identifikavimas pagal amplifikuotų fragmentų ilgio polimorfizmą ir visų ląstelės baltymų analizę.

Campylobacter lari yra viena iš žmogaus patogeninių bakterijų rūšių, plintanti per vandenį ir jūros gėrybes. Išskiriami šie *C. lari* variantai: NARTC – pirminės nalidikso rūgščiai atsparūs kamienai, NASC – nalidikso rūgščiai jautrūs kamienai, UPTC – ureazę sintetinantys kamienai ir ureazę sintetinantys nalidikso rūgščiai jautrūs kamienai. Kol kas nėra nustatytų virulentiškumo skirtumų tarp šių biocheminių grupių. Norint nustatyti taksonominius ir epidemiologinius ryšius tarp skirtingų grupių su 55 *C. lari* kamienais, išskirtais iš įvairių šaltinių, buvo atlikti šie tyrimai: amplifikuotų fragmentų ilgio polimorfizmo (AFLP) ir visų ląstelės baltymų analizė. Pagal AFLP gautos keturios genetinės grupės (I, II, III, IV) ir vienas kamienas nepriskirtas nei vienai iš jų. NARTC variantui priklausantys kamienai pagal AFLP išsiskirstė į I ir IV genetines grupes, II grupei priklausė UPTC ir NASC variantų kamienai, o III grupei – tik NASC varianto kamienai.

Palyginus žemos molekulinės masės (21 – 36 kDa) regionus visų ląstelės baltymų profiliuose, buvo gautos tos pačios keturios grupės atitinkamai pagal 91%, 93%, 89% ir 95% panašumus. Analizei buvo pasirinkti penki atsitiktiniai kamienai iš kiekvienos genetinės grupės.

Taip pat buvo atlikta DNR-DNR hibridizacija tarp genetinių grupių kamienų. Gauti rezultatai rodo, kad I ir III grupės turėtų priklausyti tai pačiai rūšiai, IV grupė atskirai, o II grupės DNR-DNR hibridizacijos rezultatai prieštaringi, todėl, norint tiksliai identifikuoti pastarajai grupei priklausančias bakterijas reikia kartoti DNR-DNR hibridizaciją.

AFLP ir baltymų profiliai neparodė esminių skirtumų tarp kamienų išskirtų iš skirtingų šaltinių. Epidemiologiniams skirtumams tarp kamienų reikalingi tolimesni tyrimai. [Duim ir kt., 2004]

1.2.17. *Stenotrophomonas africana* ir *Stenotrophomonas maltophilia* priskirimas vienai rūšiai.

Stenotrophomonas maltophilia yra svarbus patogenas paplitęs plačiai aplinkoje. Ankstesniuose tyrimuose nustatytas genetinė įvairovė šios rūšies viduje, o vėliau išskirtos ir kelios naujos rūšys. Viena iš jų *Stenotrophomonas africana* buvo atskirta remiantis vienu kamieniu išskirtu iš cerebrospinalinio skysčio. Fenotipiškai šis kamienas buvo beveik identiškas *S. maltophilia*, tačiau DNR-DNR hibridizacija parodė tik 35% panašumą. Vėliau kitai mokslininkų

grupei atlikus DNR-DNR hibridizaciją buvo gautas 65,9% panašumas. Čia apžvelgiami tyrimai buvo atlikti patikslinti *S. africana* identitetą.

Buvo atlikta WCPP ir nustatytas *S. africana* 84% panašumas su trimis *S. maltophilia* kamienais ir didesnę negu 70% su kitais šios rūšies kamienais. Tuo tarpu su kitomis *Stenotrophomonas* genties rūšimis *S. africana* buvo panašus apie 60%. Atlikus DNR-DNR hibridizaciją tarp šių dviejų rūšių tipinių kamienų buvo gautas 70% panašumas, o tai rodo, kad šie du kamieniai priklauso tai pačiai rūšiai. Tokius rezultatus pavertino ir RFLP, riebiųjų rūgščių ir kitos analizės. [Coenye ir kt., 2004]

1.2.18. *Streptococcus marimammalium* sp. nov. išskirtas iš ruonių organizmo.

Du neidentifikuoti gram-teigiami, kokai sudarantys grandinėles buvo charakterizuojami fenotipiniais ir molekulinės taksonomijos metodais. Bakteriniai kamieniai buvo išskirti iš skirtingų ruonių rūšių: *Halichoerus grypus* ir *Phoca vitulina*. Remiantis morfologija ir biocheminiais požymiais tiriami kamieniai preliminariai buvo priskirti streptokokams, tačiau pagal rezultatus nepavyko jų priskirti jokiai žinomai *Streptococcus* genties rūšiai. 16S rRNR geno sekvenavimas patvirtino kamienų priklausomybę šiai genčiai ir parodė, jog tiriami kamieniai yra labai artimi. Su artimiausia žinoma rūšimi *S. entericus* kamienus siejo tik 94% panašumas. WCPP rezultatai parodė, kad tiriami kamieniai yra tarpusavyje labai panašūs, bet skiriasi nuo kitų *Streptococcus* genties rūšių. Taigi šie kamieniai buvo priskirti naujai rūšiai – *Streptococcus marimammalium* sp. nov. [Lawson ir kt., 2005]

1.2.19. *Arcobacter cibarius* sp. nov. išskirta iš broilerių skerdienos.

20 gram-neigiamų lazdelės formos, sporų neformuojančių bakterinių kamienų buvo išskirta iš 13 tarpusavyje nesusijusių broilerių. Atlikus *Arcobacter* genčiai specifinę PGR gauti teigiami rezultatai, tačiau tiriamų kamienų nepavyko priskirti nė vienai žinomai šios genties rūšiai. Atlikus WCPP nustatyta, kad visi tirti kamieniai tarpusavyje buvo panašūs daugiau nei 70% ir aiškiai atsiskyrė nuo kitų *Arcobacter* genties rūšių. Pagal 16S rRNR geno sekvenavimą tiriami kamieniai buvo panašiausi į *A. cryaerophilus* pagal 97,5% panašumą. Pagal DNR-DNR hibridizaciją tirti kamieniai tarpusavyje buvo panašūs 91%, o su kitomis *Arcobacter* genties rūšimis mažiau nei 50%. Apibendrinus gautus rezultatus tirti kamieniai buvo priskirti naujai rūšiai – *Arcobacter cibarius* sp. nov. [Houf ir kt., 2005]

1.2.20. *Staphylococcus equorum* ir *Staphylococcus succinus* izoliuoti iš žmonių organizmo.

11-kai novobiocinui atsparių stafilokokų kamienų, izoliuotų iš žmogaus organizmo, identifikuoti buvo pritaikyta polifazinė taksonomija. Remiantis fenotipinės analizės rezultatais kamienai buvo suskirstyti į dvi grupes. 8 iš jų buvo priskirti *Staphylococcus xylosus*, o likę 3 kamienai dviprasmiškai *S. xylosus*/*S. equorum*. Tuo tarpu atlikus ribotipavimą su EcoRI and HindIII restrikcijos endonukleazėmis ir visų ląstelės baltymų analizę 6 kamienai priskirti *S. equorum*, o 5 *S. succinus*. Identifikacijai patvirtinti buvo nusekvenotas dalinis 16S rRNA genas, o numanomi *S. equorum* kamienai dar patikrinti PGR metodu, amplifikuojant *sodA* geną. Iš gautų rezultatų galima spręsti, kad ribotipavimas ir visų ląstelės baltymų analizė tinka biocheminiais metodais neatskiriamų rūšių *S. xylosus*, *S. equorum* and *S. succinus* identifikavimui. [Nováková ir kt., 2006]

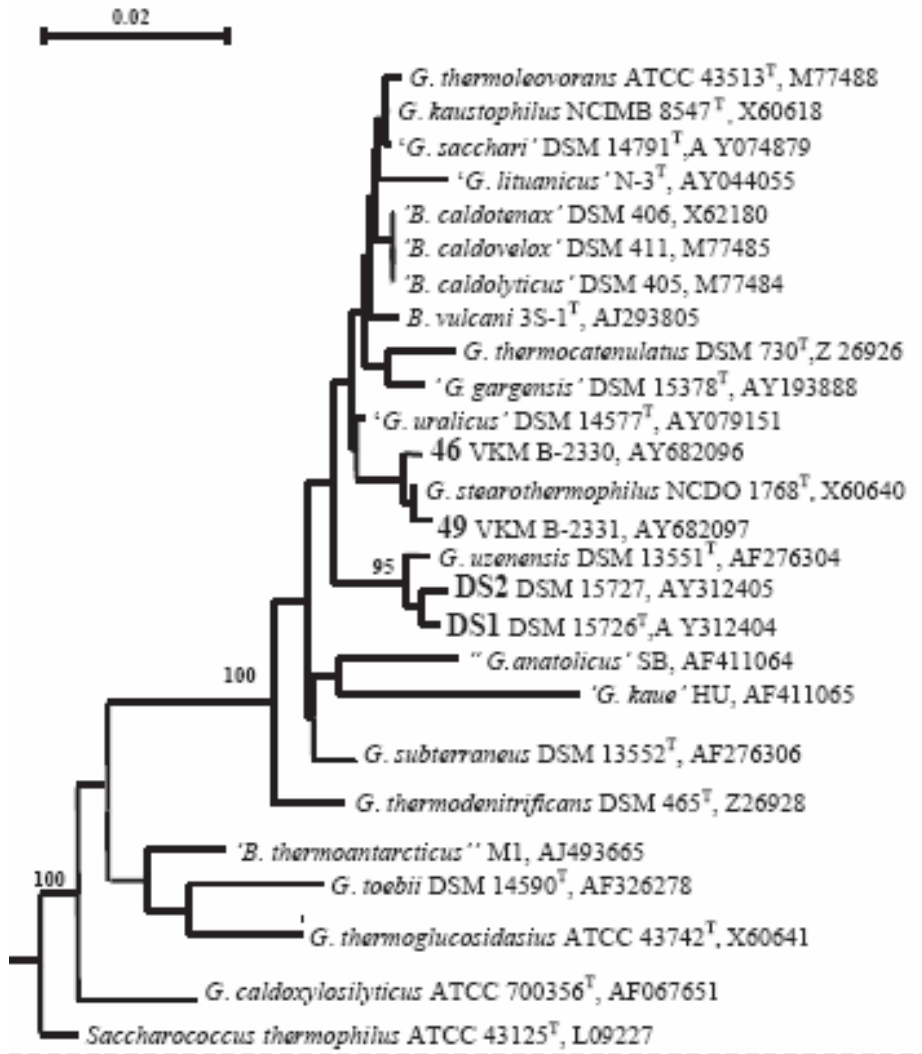
1.3. *Geobacillus* genties bakterinių kamienų identifikacija.

Geobacillus genties bakterijų vegetatyvinės ląstelės - lazdelės formos. Ląstelės pavienės arba sudaro trumpas grandinėles. Gali judėti peritrichiniais žiuželiais, arba ląstelės gali būti nejudrios. Sienelės struktūra Gram-teigiama, tačiau dažant gramo būdu gali dažytis ir kaip Gram-neigiamos. Iš vienos ląstelės gali susidaryti viena endospora. Endosporos – elipsinės arba cilindrinės. Jos – terminalinės arba subterminalinės. Kolonijų morfologija ir dydis varijuoja. Bakterijos aerobinės arba fakultatyviai anaerobinės. Obligatiniai termofilai, optimali temperatūra 55-65° C. Daugelio rūšių augimui augimo faktoriai, vitaminai, NaCl ir KCl nereikalingi. 16S rRNR geno sekos panašumas genties viduje yra 91% ir didesnis. Dauguma rūšių plačiai paplitusios gamtoje. [Nazina ir kt. 2001]

Geobacillus genties bakterijų kamienų panaudojimas labai platus: dėl termostabilumo vertinami iš šios genties bakterijų išskirti įvairūs fermentai: lipazė iš *Geobacillus* genties kamieno T1 [Leow ir kt., 2004], ksilanazė iš *Geobacillus* genties kamieno MT-1 [Wu ir kt., 2006], D-amino rūgščių aminotransferazė iš *G. toebii* [Lee ir kt., 2006] aminopeptidazė iš *G. thermoleovorans* [Deejing ir kt., 2005], α -gliukozidazė iš *Geobacillus* genties kamieno HTA-462 [Hung ir kt., 2005], atvirkštinė transkriptazė iš *G. stearothermophilus* [Vellore ir kt., 2004] ir daugelis kitų. Dauguma šių fermentų savo savybes išlaiko plačiame pH diapazone ir lieka stabilūs iki 90° C temperatūroje.

Geobacillus stearothermophilus sporos naudojamos kaip indikatoriai sterilinimo įrangai tikrinti, o šios rūšies DNR polimerazė buvo viena iš pirmųjų išskirtų termofilinių polimerazių.

Toliau aptariama naujausių rūšių šioje gentyje identifikavimo eksperimentiniai duomenys.



Pav. 1. *Geobacillus* genties filogenetinis medis [Nazina ir kt., 2005].

1.3.1. *Geobacillus jurassicus* sp. nov., naujos termofilinių bakterijų, išskirtų iš aukštos temperatūros naftos gręžinių, rūšies identifikavimas.

Iš Dagang'o naftos gręžinio (Kinija) buvo išskirti keturi bakteriniai kamienai DS1^T, DS2, 46 ir 49. Tai aerobinės, termofilinės, sporas formuojančios bakterijos. Kamienai buvo identifikuojami naudojantis polifazine taksonomija - buvo atlikti šie tyrimai: 16S rDNR sekų

sekvenavimas, riebiųjų rūgščių analizė, DNR-DNR hibridizacija, taip pat buvo tirta bakterijų morfologija ir fiziologija. Pagal augimo sąlygas kamienai buvo atskirti į dvi grupes: 46 ir 49 bei DS1^T ir DS2. Vėliau buvo įvertintas kamienų DNR panašumas pagal DNR-DNR hibridizaciją. Kamienai DS1^T ir DS2 tarpusavyje buvo panašūs 82%, o tuo tarpu su rūšies *G. uzenensis* kamienais atitinkamai 44% ir 45%. Palyginus kamieną DS1^T su kitais žinomais *Geobacillus* genties kamienais buvo nustatytas panašumas svyravo tarp 33% ir 53%. Tai rodo, kad tiriamieji kamienai nepriklauso nė vienai žinomai *Geobacillus* genties rūšiai, tačiau gali priklausyti minėtai genčiai. Taip pat buvo atlikta kamienų 46 ir 49 DNR hibridizacija su vienu iš *G. stearothermophilus* kamieno DNR. Buvo nustatytas atitinkamai 76% ir 78% panašumas.

Pagal riebiųjų rūgščių analizę nustatyta, kad DS1^T kamienas yra artimiausias *Geobacillus* genčiai, tačiau negali būti priskirtas nė vienai šios genties rūšiai ir taip patvirtina DNR-DNR hibridizacijos tyrimų rezultatus. Nustatyta, kad 46 kamienas yra artimiausias *G. stearothermophilus*.

Sekvenavus beveik pilnas 16S rDNR sekas buvo nustatytas 99.2% panašumas tarp kamienų DS1^T ir DS2. Taip pat nustatytas aukštas (~99%) panašumas tarp šių kamienų ir *G. uzenensis*. Tuo tarpu tarp kamienų 46 ir 49 bei *G. stearothermophilus* buvo nustatytas atitinkamai 99.3% ir 99.6% panašumas.

Taigi remiantis tyrimų rezultatais 46 ir 49 kamienai buvo priskirti *G. stearothermophilus*, o kamienai DS1^T ir DS2 – naujai rūšiai, *G. jurassicus* sp. nov. [Nazina ir kt., 2005]

1.3.2. *Geobacillus lituanicus* sp. nov.

Iš Girkailių (Lietuva) naftos gręžinio buvo išskirtas naujas bakterinis kamienas N-3^T. Buvo sekvenuotas 16S rRNR koduojantis genas ir nustatytas 99,4% panašumas su *G. thermoleovorans* DSM 5366^T. Geno seka buvo artima ir kitų *G. thermoleovorans* kamienų sekoms. Mažiau panašus naujasis kamienas buvo į kitas *Geobacillus* genties rūšis. Atlikus DNR-DNR hibridizaciją N-3^T kamieno nepavyko priskirti nė vienai žinomai *Geobacillus* genties rūšiai, nes jas su naujuoju kamieniu siejo iki 50% panašumas. Todėl buvo atlikta amplifikuotos rDNR restrikcijos analizė – ARDRA (angl. **a**mplified **r**DNA **r**estriction **a**nalysis) ir remiantis gautais rezultatais tiriamasis kamienas buvo priskirtas naujai rūšiai – *G. lituanicus* N-3^T. [Kuisienė ir kt., 2004]

Šiuo metu yra identifikuotos šios *Geobacillus* genties rūšys :

G. caldxylosilyticus, *G. debilis*, *G. gargensis*, *G. jurassicus*, *G. kaustophilus*, *G. lituanicus*, *G. pallidus*, *G. stearothermophilus*, *G. subterraneus*, *G. tepidamans*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermodenitrificans*, *G. thermoglucosidasius*, *G. thermoleovorans*, *G. toebii*, *G. uzenensis*, *G. vulcani*. Daugelis iš jų buvo identifikuotos per pastaruosius penkis metus.

APIBENDRINIMAS

Iš literatūroje skelbiamų rezultatų matome, kad WCPP yra naudingas metodas identifikuojant medicinoje svarbias bakterijų rūšis, o taip pat maisto pramonėje naudojamus mikroorganizmus. Nors pagal šio metodo gautus rezultatus ne visada galima nustatyti tiriamų kamienų identitetą, tačiau tai leidžia suskirstyti kamienus pagal panašumą ir palengvinti tolimesnius tyrimus. Taip pat galima sukurti savitą identifikavimo sistemą, kai kamienai identifikuojami lyginant juos su tipiniais kamienais tam tikroje baltymų profilių srityje [Perez ir kt., 2000].

WCPP naudojamas norint sugrupuoti bakterijų kamienus, nustatyti jų pirminę priklausomybę tam tikroms rūšims. Šios analizės rezultatai neretai sutampa su DNR-DNR hibridizacijos rezultatais, ypač jei kamienus sieja didesnis nei 70% DNR panašumas.

Plačiai paplitęs WCPP panaudojimas identifikuojant ankščiau minėtas bakterijų grupes, leidžia manyti, kad ši analizė turėtų būti tinkama ir kitoms bakterijų rūšims identifikuoti.

Mano darbo tikslas yra pritaikyti šį metodą identifikuojant *Geobacillus* genties bakterijų kamienus.

2. Medžiagos ir metodai

2.1. Medžiagos

2.1.1. Reagentai

AB "Vilniaus degtinė", Lietuva	Etanolis
BARTA A CIHLAR, Čekija	HCl
BIOKAR, Prancūzija	Maitinamasis agaras, Maitinamasis buljonas
BIO-RAD, JAV	Kumasi mėlynasis R-250
LACHEMA, Čekija	Glicerolis, NaCl, gliukozė
MERCK, Vokietija	Acto rūgštis, Amonio persulfatas, Formaldehidas, L-prolinas, L-tirozinas
REANAL, Vengrija	Bromofenolio mėlynasis, Na ₂ CO ₃ , Tris, glicinas, L-argininas, L-asparginas, L-asparto rūgštis, L-gliutamatas, L-serinas, L-valinas
REAXIM, Rusija	Biotinas, inozitolis, niacinas, piridoksinas, riboflavinai, tiaminas, L-triptofanas, malachito žaliasis, safraninas, KH ₂ PO ₄ , NH ₄ Cl, CaCl ₂ , MgSO ₄
ROTH, Vokietija	AgNO ₃ , Akrilamidas, Bisakrilamidas, Glicinas, Metanolis, Na ₂ S ₂ O ₃ x 5H ₂ O, SDS, TEMED;
SERVA, Vokietija	β-merkaptioetanolis, L-alaninas, L-cisteinas, L-fenilalaninas, L-izoleucinas, L-leucinas, L-lizinas, L-metioninas, L-treoninas

2.1.2. Darbe naudoti *Geobacillus* genties kamieniai

Tipiniai kamieniai	<i>G. caldxylosilyticus</i> DSM 12041 ^T , <i>G. debilis</i> DSM 16016 ^T , <i>G. gargensis</i> DSM 15378 ^T , <i>G. jurassicus</i> DSM 15726 ^T , <i>G. kaustophilus</i> DSM 7263 ^T , <i>G. lituanicus</i> 15325 ^T , <i>G. pallidus</i> DSM 3670 ^T , <i>G. stearothermophilus</i> DSM 22 ^T , <i>G. subterraneus</i> DSM 13552 ^T , <i>G. tepidamans</i> DSM 16325 ^T , <i>G. thermocatenulatus</i> DSM 730 ^T , <i>G. thermodenitrificans</i> DSM 465 ^T , <i>G. thermoglucosidasius</i> DSM 2542 ^T , <i>G. thermoleovorans</i> DSM 5366 ^T , <i>G. toebii</i> DSM 14590 ^T , <i>G. uzenensis</i> DSM
--------------------	---

	13551 ^T , <i>G. vulcani</i> DSM 13174 ^T .
<i>G. stearothermophilus</i> kamienai	<i>G. stearothermophilus</i> 3, <i>G. stearothermophilus</i> 9, <i>G. stearothermophilus</i> 17, <i>G. stearothermophilus</i> 18, <i>G. stearothermophilus</i> 19, <i>G. stearothermophilus</i> 28, <i>G. stearothermophilus</i> 30, <i>G. stearothermophilus</i> 31, <i>G. stearothermophilus</i> 32A, <i>G. stearothermophilus</i> 35C, <i>G. stearothermophilus</i> 36A, <i>G. stearothermophilus</i> 10 DSM 13240
<i>G. vulcani</i> kamienai	22
neidentifikuoti kamienai	15

2.1.3. Terpės

Maitinamasis agaras (MA)

20g triptono
 5g mėsos ekstrakto
 5 NaCl
 15 g bakteriologinio agaro
 dist. H₂O iki 1000 ml
 Terpė autoklavuojama 1 atm 30 min. ir išpilstoma į Petri lėkšteles.

Maitinamasis buljonas (MB)

20g triptono
 5g mėsos ekstrakto
 5g NaCl
 dist. H₂O iki 1000 ml
 Terpė autoklavuojama 1 atm 30 min.

mM9 terpė

200 ml 5× mM9 druskų tirpalo
 100 ml 10× Amino rūgščių tirpalo
 2 ml 1M MgSO₄
 0,1 ml 1M CaCl₂
 1 ml 1000× Vitaminų tirpalo
 2,5 g Gliukozės
 Tris-HCl (pH 7,8/ 60°C) iki 1000 ml

10× amino rūgščių tirpalas (Leejeerajumnean ir kt., 2000)

Terpė autoklavuojama 0.5 atm 15 min.
 1M MgSO₄ ir 1M CaCl₂ tirpalai autoklavuojami atskirai 1 atm 30 min. ir pilstoma į išautoklavuotą terpę.
 126 mg L-alanino
 522 mg L-arginino
 300 mg L-asparagino

	120 mg L-cisteino
	294 mg L-gliutamato
	294 mg L-gliutamino
	150 mg glicino
	155 mg L-histidino
	263 mg L-izoleucino
	262 mg L-leucino
	363 mg L-lizino
	76 mg L-metionino
	165 mg L-fenilalanino
	230 mg L-prolino
	210 mg L-serino
	238 mg L-treonino
	180 mg L-triptofano
	234 mg L-valino
	266mg L-asparto r.
	dist. H ₂ O iki 1000 ml
<u>5× mM9 druskų tirpalas</u>	15g KH ₂ PO ₄
	2,5g NaCl
	5g NH ₄ Cl
<u>1000×Vitaminų tirpalas</u>	10 mg biotino
	100 mg inozitolio
	100 mg niacino
	100 mg piridoksino
	100 mg riboflavino
	100 mg tiamino
	dist. H ₂ O iki 1000 ml

2.1.4. Tirpalai ir buferiai

<u>10x Tris-glicino elektroforezės buferis (pH 8.3)</u>	250mM Tris-HCl
	1,92M Glicino
	1% NDS
	ištirpinta dist. H ₂ O
<u>12% darbinis elektroforezės gelis (30 ml)</u>	9,9 ml dist. H ₂ O
	12,0 ml 30% akrilamido mišinio
	7,5 ml 1,5 M Tris (pH 8,8)
	0,3 ml 10% SDS
	0,3 ml amonio persulfato
	0,012 ml TEMED
<u>30% akrilamido mišinys</u>	1% bisakrilamido
	29% akrilamido
	ištirpinta dist. H ₂ O
<u>5% koncentruojantis elektroforezės gelis (8ml)</u>	5,5 ml dist. H ₂ O
	1,3 ml 30% akrilamido mišinio
	1,0 ml 1,0 M Tris (pH 6,8)

<u>Bradfordo reagentas</u>	0,08 ml 10% SDS 0,08 ml amonio persulfato 0,008 ml TEMED 0,01 % Kumasi briliantinio mėlio G-250 5 % etanolio 10 % fosforo rūgšties (80 %) 85 % dist. H ₂ O
<u>Buferis ląstelių suardymui (pH 6,8)</u>	10% glicerolio 5% β-merkaptioetanolio 0,062 mM Tris-HCl
<u>Fiksažas</u>	50% metanolio 12% acto rūgšties 38% dist. H ₂ O
<u>Ląstelių plovimo buferis (pH 7,3)</u>	0,01M Natrio fosfatinis buferis 0,8% NaCl
<u>Malachito žaliojo vandeninis tirpalas</u> <u>Ryškalas</u>	0,5% malachito žaliojo ištirpinta dist. H ₂ O 60g/l Na ₂ CO ₃ 0,5 ml/l 37% formaldehido 4 mg/l Na ₂ S ₂ O ₃ x 5H ₂ O ištirpinta dist. H ₂ O
<u>Safranino tirpalas</u>	10 ml 2,5% spiritinio safranino tirpalo 90 ml dist. H ₂ O
<u>Sidabro tirpalas</u>	2g/l AgNO ₃ 0,75ml/l 37% formaldehido ištirpinta dist. H ₂ O

2.2. Metodai

2.2.1. Bakterijų auginimas

2.2.1.1. Bakterijų auginimas ant MA terpės

Ji naudojama mikroorganizmų auginimui agarizuotoje terpėje. Bakterijos auginamos 60°C temperatūroje dviem valandom trumpiau, nei nustatytas šioje terpėje sporuliacijos pradžios laikas. Taip užauginamos gyvybingos, besidalijančios ir nesporuliuojančios ląstelės.

2.2.1.2. Bakterijų auginimas skystoje terpėje

Bakterijos užauginamos agarizuotoje MA terpėje ir daromas inokuliatas. Bakterijos nuplaunamos distiliuotu vandeniu, maišant špateliu. Įvertinamas inokulianto optinis tankis (OD), bangos ilgis 595 nm. OD₅₉₅ turi būti 1,2. 2,5 ml inokulianto užsėjama į 50 ml skystos terpės. Bakterijos auginamos 24 val. Kas dvi valandas įvertinamas OD₅₉₅.

Braižoma bakterijų augimo kreivė.

2.2.2. Sporuliacijos pradžios laiko nustatymas

Bakterijų endosporų dažymas Šeferio-Fultono metodu

Laboratorine kilpele bakterijų kultūra užnešama ant objektinio stiklelio, išdžiovinama ore ir fiksuojama karščiu. Uždedamas gabalėlis filtrinio popieriaus. Užlašinama 0,5 % vandeninio malachito žaliojo tirpalo ir 5 minutes laikoma virš verdančio vandens vonios. Stikliukas gerai nuplaunamas vandentiekio vandeniu ir 30 sekundžių dažoma safranino tirpalu. Po to vėl praplaunama tekančiu vandentiekio vandeniu ir nusausinama filtriniu popieriumi. Endosporos nusidažo ryškiai žalia spalva, o vegetatyvinės ląstelės – raudonai-ruda. [Gerardt ir kt., red., 1983]

2.2.3. Bakterijų biomasės auginimas

- a) Bakterijos auginamos skystoje terpėje iki eksponentinės stadijos pabaigos, kuris nustatomas iš augimo kreivės. Matuojamas bakterijų suspensijos OD₅₉₅. Suspensija centrifuguojama 30 min 5000 aps./min. Po to supernatantas nupilamas ir nusodintos ląstelės suspenduojamos ląstelių plovimo buferyje. Suspensija centrifuguojama 5 min.

15000 aps./min. Procedūra kartojama kelis kartus. Po paskutinio centrifugavimo supernatantas nupilamas, o ląstelės laikomos – 70° C temperatūroje.

- b) Kultūros auginamos ant agarizuotos terpės dviem valandom mažiau nei jų sporuliacijos laikas. Ląstelės nuplaunamos ląstelių plovimo buferiu, suspenduojamos ir centrifuguojamos 10 minučių 15000 aps./min, procedūra kartojama kelis kartus. Po paskutinio centrifugavimo supernatantas nupilamas, o ląstelės laikomos – 70° C temperatūroje. [Pot ir kt., 1994]

2.2.4. Beląstelinio ekstrakto paruošimas

Ląstelės atšildomos. 20 mg ląstelių suspenduojama 360 µl buferio ląstelėms ardyti, pripilama 40 µl 20% NDS tirpalo. Suspensija verdama vandens vonelėje 10 min. Po to centrifuguojama 10 min. 15000 aps./min. Supernatantas laikomas – 20° C temperatūroje. [Pot ir kt., 1994]

2.2.5. Baltymų koncentracijos nustatymas Bradfordo metodu

Į vieną fotoelektrokolorimetro kiuvetę įpilama 0,5ml tiriamo tirpalo, o į kitą kontrolinio tirpalo, į abi kiuvetes įpilama 1 ml Bradfordo reagento. Po 1-3min. matuojamas optinis tankis 590nm bangos srityje. Iš kalibracinės kreivės, kuri sudaroma naudojant skirtingų žinomų koncentracijų albumino tirpalus nustatoma baltymo koncentracija.

2.2.6. NDS - poliakrilamidinio gelio elektroforezė (PAGE)

Ruošiami 5% koncentruojantysis ir darbinis geliai pagal Sambrook ir kt., 1989. Į šulinėlius įnešama skirtingi beląstelinio ekstrakto kiekiai priklausomai nuo baltymų koncentracijos. Kiekvieno mėginio galutinis įnešimo kiekis privedamas iki 15 µl su ląstelių ardymo buferiu turinčiu 0,001% bromfenolio mėlynojo. Naudojamas baltyminis molekulinės masės žymuo 15 – 200 kDa (15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 85, 100, 120, 150, 200). Gelio matmenys – storis: 1 mm, plotis: 16 cm, ilgis: 13 cm.

2.2.7. Gelio dažymas sidabru

Gelis įdedamas į plastmasinį indelį, užpilama fiksažo tirpalo ir fiksuojama 1 val. kambario temperatūroje švelniai purtant. Fiksažas nupilamas. Užpilama 50% etanolio tirpalo ir purtoma 20 min. Tai kartojama 2 kartus. 50% etanolio tirpalas nupilamas. Užpilama 30% etanolio tirpalo ir purtoma 20 min. 30% etanolio tirpalas nupilamas. Užpilama $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g/l tirpalo ir purtoma 1 min. Gelis 3 kartus po 20 s skalaujamas distiliuotu vandeniu. Užpilama sidabro tirpalo ir purtoma 20 min. Gelis 2 kartus po 20 s skalaujamas distiliuotu vandeniu. Užpilama ryškalo. Gelis laikomas tamsioje vietoje. Kas minutę švelniai purtomas. Ryškalas išpilamas kai išryškėja rudai nusidažiusios baltyminės zonos juostelės. Gelis 2 kartus po 2 min. skalaujamas distiliuotu vandeniu. Gelis purtomas fiksaže 10 min. Fiksažas nupilamas. Užpilama 50% metanolio tirpalo ir purtoma 20 min. Gelis laikomas distiliuotame vandenyje.

Visi tirpalai naudojami vieną kartą. [Rosenberg, 2002]

2.2.8. Visų ląstelės baltymų elektroforetinių profilių palyginimas

Nudažytas poliakrilamidinis gelis nufotografuojamas. Nuotrauka analizuojama programa *Gel Pro Analyzer 3.1*. Ši programa nustato baltyminių zonų vietą gelyje, apskaičiuoja jų molekulinės masės, pagal molekulinės masės žymenį. Nustatomas bendras zonų kiekis kiekviename takelyje. Duomenys perkeliama į programą *STATISTICA*. Sudaromas nepanašumo medis nurodantis procentinį neatitikimą tarp kamienų. Medis sudaromas UPGMA (angl. Unweighted Pair-Group Average) metodu – lyginamas panašumas tarp visų įmanomų kamienų porų. Dėl patogumo nepanašumo procentai paverčiami panašumo procentais,.

Išvados

1. Standartizuotos sąlygos (kultivavimo terpė, NDS-PAGE parametrai) *Geobacillus* genties kamienų ir rūšių panašumo nustatymui visų ląstelės baltymų analizės metodu.
2. Tarp *G. stearothermophilus* kamienų visų ląstelės baltymų analizės metodu nustatytas 79% panašumas, šis panašumo lygmuo leidžia teigti, kad metodas patikimas *Geobacillus* genčiai.
3. Nustačius 15 kamieno visų ląstelės baltymų elektroforetinių profilių 95% panašumą 17 ir 30 *G. stearothermophilus* rūšies kamienams, 15 kamienas priskirtas *G. stearothermophilus* rūšiai.
4. Naudojant visų ląstelės baltymų analizės metodą 22 kamienas priskirtas *G. vulcani* rūšiai pagal 84% panašumą tipiniam *G. vulcani* kamienui.
5. Naudojant visų ląstelės baltymų analizės metodą nustatytas *G. stearothermophilus* 10 DSM 13240 97% panašumas tipiniam *G. vulcani* kamienui. Šie rezultatai rodo, kad *G. stearothermophilus* 10 DSM 13240 turėtų priklausyti *G. vulcani* rūšiai ir leidžia abejoti anksčiau nustatyta šio kamieno rūšine priklausomybe. Galutiniam šio kamieno identifikavimui reikia atlikti DNR-DNR hibridizaciją.
6. Naudojant visų ląstelės baltymų analizės metodą nustatytas 90% panašumas tarp *G. uzenensis* DSM 13551^T ir *G. subterraneus* DSM 13552^T. Šie rezultatai rodo, kad tai turėtų būti ta pati rūšis ir leidžia abejoti anksčiau nustatyta šio kamieno rūšine priklausomybe. Galutiniam šio kamieno identifikavimui reikia atlikti pakartotinę DNR-DNR hibridizaciją.
7. Naudojant visų ląstelės baltymų analizės metodą nustatytas 100% panašumas tarp *G. gargensis* DSM 15378^T ir *G. thermocatenulatus* DSM 730^T. Šie rezultatai rodo, kad tai turėtų būti ta pati rūšis ir leidžia abejoti anksčiau nustatyta šio kamieno rūšine priklausomybe. Galutiniam šio kamieno identifikavimui reikia atlikti pakartotinę DNR-DNR hibridizaciją.

Santrauka

Visų ląstelės baltymų analizė – tai metodas teikiantis fenotipinės informacijos. Jis plačiai naudojamas grupuoti bakterijų kamienus, nustatyti jų pirminį identitetą. Rezultatų patikimumas daugeliu atvejų prilygsta DNR-DNR hibridizacijai – pagrindiniam genotipinės informacijos metodui. Tuo pačiu visų ląstelės baltymų analizės metodas yra greitai atliekamas ir pigus. Dėl šių priežasčių metodas plačiai naudojamas medicininės diagnostikos, o taip pat su maisto pramone susijusiose laboratorijose.

Šiuolaikiniame pasaulyje pramonėje labai svarbūs yra termostabilūs fermentai, o *Geobacillus* genties bakterijų kamienai būdami termofilai, yra tokių fermentų producentai. Dėl šios priežasties *Geobacillus* gentis yra aktualus tyrimų objektas. Labai svarbu tiksliai identifikuoti kamienus produkuojančius tiriamus fermentus. Vienu iš pirminio identifikavimo būdų galėtų būti visų ląstelės baltymų analizės metodas.

Šiame darbe buvo parodyta, kad *Geobacillus* genties kamienų tarpusavio panašumas gali būti nustatytas visų ląstelės baltymų analizės metodu. Tarp *G. stearothermophilus* rūšies kamienų visų ląstelės baltymų elektroforetinių profilių panašumas buvo apie 80% ir atitiko DNR-DNR hibridizacijos rezultatus. Taip pat sutapo ir 22 kamieno panašumas su tipiniu *G. vulcani* kamieniu: WCPP parodė 84% panašumą, DNR-DNR hibridizacija – 93,9%. Pagal visų ląstelės baltymų analizės metodą gauti rezultatai paneigė *G. stearothermophilus* 10 DSM 13240 kamieno priklausomybę šiai rūšiai. Pagal panašumo medį kamienas turėtų būti priskirtas *G. vulcani* rūšiai pagal 97% panašumą. Literatūros duomenims prieštaravo ir skirtingų rūšių palyginimo pagal visų ląstelės baltymų analizės metodą rezultatai: tarp *G. uzenensis* DSM 13551^T ir *G. subterraneus* DSM 13552^T pagal WCPP nustatytas 90% panašumas, tuo tarpu DNR panašumas – 49 %, *G. gargensis* DSM 15378^T ir *G. thermocatenulatus* DSM 730^T pagal WCPP galima būti priskirti vienai rūšiai pagal 100% panašumą, o nustatytas DNR panašumas tik – 43%. Šių rūšių identitetą reikėtų tikslinti pakartotinais polifazinės taksonomijos tyrimais.

Taigi, nustatyta, kad WCPP metodas – tinkamas *Geobacillus* genties rūšių, o ypač tos pačios rūšies kamienų giminingumo nustatymui.

Džiuginta Jasinskytė
Relationship determination of the strains of the genus *Geobacillus* by electrophoretic whole-cell protein profile analysis

Summary

Electrophoretic whole-cell protein profile analysis (WCPP) – is a method providing phenotypic information. It is widely used to group bacterial strains and estimate their primal identity. In most cases reliability of this method is equal to DNA-DNA hybridization – that is the main method of genotypic information. WCPP is performed quickly and it is cheap. Therefore this method is widely used in laboratories of medical diagnostic and laboratories related to food industry.

In modern world thermostable enzymes are very important in industry, whereas thermophilic bacterial strains of the genus *Geobacillus* are producers of these enzymes. Consequently genus *Geobacillus* is an actual object of research. It is very important to strictly identify bacterial strains producing needed enzymes. One of the primal ways for identification of this genus could be WCPP.

During this work it was shown that similarity of strains of the genus *Geobacillus* can be determined by WCPP. There was an 80% similarity among strains of *G. stearothermophilus*. These results matched with DNA-DNA hybridization of these strains. Also there were similar results of WCPP and DNA-DNA hybridization between strain 22 and typical strain of *G. vulcani*: 84% and 93,9% respectively. Results of WCCP denied dependence of strain *G. stearothermophilus* 10 DSM 13240 to this species. According to similarity dendrogram this strain should be assigned to *G. vulcani* because of its 97% similarity to this species. There were also WCPP results which disagreed with previous publications: *G. uzenensis* DSM 13551^T and *G. subterraneus* DSM 13552^T showed 90% similarity by WCPP, but only 49% by DNA-DNA hybridization. *G. gargensis* DSM 15378^T and *G. thermocatenulatus* DSM 730^T showed 100% similarity by WCPP, but only 43% by DNA-DNA hybridization. Identity of these strains should be revised by repeated analysis of polyphasic taxonomy.

Thus, it was settled that WCPP is an appropriate method to determine relationships of species and strains of the genus *Geobacillus*.

Literatūros sąrašas

1. *Bacillus* Genetic Stock Center. Catalog of strains. 2001. 7th edition. Volume 3. The Genus *Geobacillus*.
2. Collins M.D., Hoyles L., Kalfas S., Sundquist G., Monsen T., Nikolaitchouk N., Falsen E. Characterization of *Actinomyces* Isolates from Infected Root Canals of Teeth: Description of *Actinomyces radidentis* sp. nov. *Journal of Clinical Microbiology*, 2000, vol 38(9), pp. 3399-3403.
3. Collins M.D., Hoyles L., Lawson P.A., Falsen E., Robson R., Foster G. Phenotypic and Phylogenetic Characterization of a New *Corynebacterium* Species from Dogs: Description of *Corynebacterium auriscanis* sp. nov. *Journal of Clinical Microbiology*, 1999, vol 37(11), pp. 3443-3447.
4. Collins M.D., Hutson R.A., Falsen E., Sjöden B., Facklam R.R. *Gemella bergeriae* sp. nov., Isolated from Human Clinical Specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 1998, vol 36(5), pp. 1290-1293.
5. Collins M.D., Hutson R.A., Falsen E., Sjöden B., Facklam R.R. *Gemella sanguinis* sp. nov., Isolated from Human Clinical Specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 1998, vol 36(10), pp. 3090-3093.
6. Collins M.D., Lawson P.A., Monasterio R., Falsen E., Sjöden B., Facklam R.R. *Facklamia ignava* sp. nov., Isolated from Human Clinical Specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 1998, vol 36(7), pp. 2146-2148.
7. Deejing S., Yoshimune K., Lumyong S., Moriguchi M. Purification and characterization of hyperthermotolerant leucine aminopeptidase from *Geobacillus thermoleovorans* 47b. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2005, vol. 32, pp. 269–276.
8. Duim B., Wagenaar J.A., Dijkstra J.R., Goris, J., Endtz H.P., Vandamme P.A.R. Identification of Distinct *Campylobacter lari* Genogroups by Amplified Fragment Length Polymorphism and Protein Electrophoretic Profiles. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2004, vol. 70(1), pp. 18-24.
9. Gerhardt, P., Murray R.G.E., Costilow R.N., Nester E.W., Wood W.A., Krieg N.R., Phillips G.B. red. 1983. *Metody obščei bakterilogii*. T.1. Maskva, Mir.

10. Hall V., Collins M.D., Lawson P.A., Hutson R.A., Falsen E., Inganas E., Duerden B. Characterization of some *Actinomyces*-Like Isolates from Human Clinical Sources: Description of *Varibaculum cambriensis* gen. nov., sp. nov., *Journal of Clinical Microbiology*, 2003, vol 41(2), pp. 640-644.
11. Hung V.S., Hatada Y, Goda S, Lu J., Hidaka Y., Li Z., Akita M., Ohta Y., Watanabe K., Matsui H., Ito S., Horikoshi K. α -Glucosidase from a strain of deep-sea *Geobacillus*: a potential enzyme for the biosynthesis of complex carbohydrates. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2005, vol. 68, pp. 757–765.
12. Kuisienė N., Raugalas J., Čitavičius D. *Geobacillus lituanicus* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2004, vol 54, pp. 1991-1995
13. Lawson P.A., Collins M.D., Falsen E., Sjöden B., Facklam R.R. *Facklamia languida* sp. nov., Isolated from Human Clinical Specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 1999, vol 37(4), pp. 1161-1164.
14. Lee S.G., Hong S.P., Song J.J., Kim S.J., Kwak M.S., Sung M.H. Functional and Structural Characterization of Thermostable D-Amino Acid Aminotransferases from *Geobacillus* spp. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2006, vol. 72(2), pp. 1588-1594.
15. Leisner J.J., Pot B., Christensen H., Rusul G., Olsen J.E., Wee B.W., Muhamad K., Ghazali H.M. Identification of Lactic Acid Bacteria from Chili Bo, a Malaysian Food Ingredient. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, vol 65(2), pp. 599-605.
16. Leow T.C., Rahman R.N., Basri M., Salleh A.B. High level expression of thermostable lipase from geobacillus sp, strain T1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2004, vol. 68(1), pp. 96-103.
17. Morais P.V., Mesquita C., Andarade J.L., Costa M. Investigation of Persistent Colonization by *Pseudomonas aeruginosa*-Like Strains in a Spring Water Bottling Plant. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, vol 63(3), pp. 851-856.
18. Nazina T.N., Sokolova D.S., Grigoryan A.A., Shestakova N.M., Mikhailova E.M., Poltarau A.B., Tourova T.P., Lysenko A.M., Osipov G.A., Belyaev S.S. *Geobacillus jurassicus* sp.nov., a new thermophilic bacterium isolated from a high-temperature petroleum reservoir, and the validation of the *Geobacillus* species. *Systematic and Appl. Microbiol.* 2004, vol. 2005 (28), pp. 43-53.

19. Nazina T.N., Tourova T.P., Poltarau A.B., Novikova E.V., Grigoryan A.A., Ivanova A.E., Lysenko A.M., Petrunyaka V.V., Osipov G.A., Belyaev S.S., Ivanov M.V. Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleovorans*, *G. kaustophilus*, *G. thermoglucosidasius* and *G. Thermodenitrificans*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2001, vol. 51, pp. 433–446.
20. Nováková D., Sedláček I., Pantůček R., Štětina V., Švec P., Petráš P. *Staphylococcus equorum* and *Staphylococcus succinus* isolated from human clinical specimens. *Journal of Medical Microbiology*, 2006, vol. 55, pp. 523-528.
21. Pot B., Vandamme P., Kersters K. Analysis of Electrophoretic Whole-Organism Protein Fingerprints. In *Modern Microbial Methods: Chemical Methods in Prokaryotic Systematics*, 1994 pp. 493-521. Edited by Goodfellow M., O'Donnell A.G.
22. Rosenberg I.M., *Protein Analysis and purification: Benchtop Techniques*, 2002
23. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, second edition, 1989, Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY.
24. Simpson P.J., Stanton C., Fitzgerald G.F., Ross R.P. Genomic Diversity and Relatedness of Bifidobacteria Isolated from a Porcine Cecum. *Journal of Clinical Microbiology*, 2003, vol. 185(8), pp. 2571-2581.
25. Teixeira L.M., Carvalho M.G.S., Merquior V.L.C., Steigerwalt A.G., Brenner D.J., Facklam R.R. Phenotypic and Genotypic characterization of *Vagococcus fluvialis*, Including Strains Isolated from Human Sources. *Journal of Clinical Microbiology*, 1997, vol. 35(11), pp. 2778-2781.
26. Tyrrell G.J., Turnbull L., Teixeira L.M., Lefebvre J., Carvalho M.G.S., Facklam R.R., Lovgren M. *Enterococcus gilvus* sp. nov. and *Enterococcus pallens* sp. nov. Isolated from Human Clinical Specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 2002, vol. 40(4), pp. 1140-1145.

27. Vandamme P., Harrington C.S., Javala K., On S.L.W. Misidentifying Helicobacters: *Helicobacter cinaedi* Example. *Journal of Clinical Microbiology*, 2000, vol. 38(6), pp. 2261-2266.
28. Vandamme P., Pot B., Gillis M., De Vos P., Kersters K., Swings J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial classification. *Microbiol. Rev.*, 1996, vol. 60, pp. 407-438.
29. Vellore J., Moretz S.E., Lampson B.C. A Group II Intron-Type Open Reading Frame from the Thermophile *Bacillus (Geobacillus) stearothermophilus* Encodes a Heat-Stable Reverse Transcriptase. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2004, vol 70(12), pp. 7140-7147.
30. Vogel B.F., Jørgensen K., Christensen H., Olsen J.E., Gram L. Differentiation of *Shewanella putrefaciens* and *Shewanella alga* on the Basis of Whole-Cell Protein Profiles, Ribotyping, Phenotypic Characterization, and 16S rRNA Gene Sequence Analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, vol. 63(6), pp. 2189-2199.
31. Wu S., Liu B., Zhang X. Characterization of a recombinant thermostable xylanase from deep-sea thermophilic *Geobacillus* sp. MT-1 in East Pacific. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2006, vol. 72, pp. 1210–1216.