

Joanna Brzeszcz, Piotr Kapusta, Anna Turkiewicz

Institut Nafty i Gazu

Zastosowanie metod molekularnych w badaniach bioremediacji substancji ropopochodnych

Zastosowanie nowoczesnych metod molekularnych zrewolucjonizowało dotychczasową wiedzę w zakresie filogenetycznej i funkcjonalnej różnorodności mikroorganizmów uczestniczących w procesach bioremediacji środowisk, w tym gleb, zanieczyszczonych substancjami ropopochodnymi. Ekosystem glebowy jest silnie zróżnicowanym układem ze stosunkowo wysokim poziomem prokaryotycznej różnorodności. Tradycyjne techniki mikrobiologiczne, oparte na izolacji i hodowli w warunkach laboratoryjnych, nie zapewniają pełnego obrazu różnorodności drobnoustrojów występujących w środowiskach skażonych węglowodorami ropopochodnymi. Obecnie szacuje się, że klasyczne metody pozwalają izolować mniej niż 1% populacji mikroorganizmów glebowych. Tym samym zastosowanie metod molekularnych jako narzędzi diagnostycznych przyczyniło się do odkrycia nowych, dotąd niezidentyfikowanych mikroorganizmów. Dodatkowo techniki te oferują możliwość śledzenia zmian w zbiorowości mikroorganizmów w trakcie trwania procesów bioremediacji. W pracy przedstawiono przegląd nowoczesnych molekularnych technik mikrobiologicznych stosowanych w procesach bioremediacji środowisk zanieczyszczonych ksenobiotykami.

Słowa kluczowe: metody molekularne, mikroorganizmy, bioremediacja, substancje ropopochodne.

Application of molecular methods in bioremediation of petroleum substances

Modern molecular techniques have greatly increased our knowledge concerning phylogenetic and functional diversity of microorganisms during bioremediation of oil-polluted environments such as soil. Soil ecosystem is relatively complex with a high level of prokaryotic diversity. The application of traditional culture-based techniques does not provide a full picture into phylogenetic and functional diversity of microbial community inhabiting oil-contaminated niches, since only a small fraction of the mentioned microbes may be cultivated in artificial media. Nowadays, less than 1% of these diverse microorganisms are cultivable by traditional cultivation techniques. Therefore, the use of molecular methods in studying microbial populations of hydrocarbon-polluted soils has led to the discovery of novel and unrecognized microorganisms. Such complex microbial diversity and dynamics in contaminated soil offer a resounding opportunity for bioremediation strategies. The paper presents an overview of modern approaches and applications of molecular microbiological techniques in bioremediation of petroleum-polluted environmental matrices. A general outline of the recent advances in this field is also given.

Key words: molecular methods, microorganisms, bioremediation, petroleum substances.

Wstęp

Mikroorganizmy to wysoce zróżnicowana grupa organizmów żywych, stanowiąca blisko 60% całej ziemskiej biomasy, z czego $4 \div 5 \cdot 10^{30}$ komórek występuje w środowisku glebowym, nieco mniej zaś, tj. ok. $1,2 \cdot 10^{29}$, zasiedla ekosystemy wodne [54]. Liczby te wskazują, jak ogromny, nie do końca poznany, a bardzo zróżnicowany genetycznie

jest świat drobnoustrojów. Mikroorganizmy odgrywają kluczową rolę w prawidłowym przebiegu większości procesów zachodzących w środowisku, m.in. w obiegu podstawowych pierwiastków w przyrodzie, w rozkładzie ksenobiotyków oraz domykaniu cykli biogeochemicznych. Praktycznie każdy żywy organizm uzależniony jest od aktywności mikroorga-

nizmów. Ten potencjał mikroorganizmów znalazł również swoje zastosowanie w różnych gałęziach przemysłu. Coraz większą popularność zyskują technologie wykorzystujące metaboliczne zdolności mikroorganizmów, stosowane w przemyśle farmaceutycznym, spożywczym czy naftowym. Mikrobiologiczne wspomaganie wydobywania ropy naftowej (MEOR – *microbial enhanced oil recovery*), procesy remediacji substancji ropopochodnych z dołów urobkowych [55, 56] oraz biokatalityczne usuwanie złożeń polimerowych to tylko niektóre z licznych przykładów. Biorąc pod

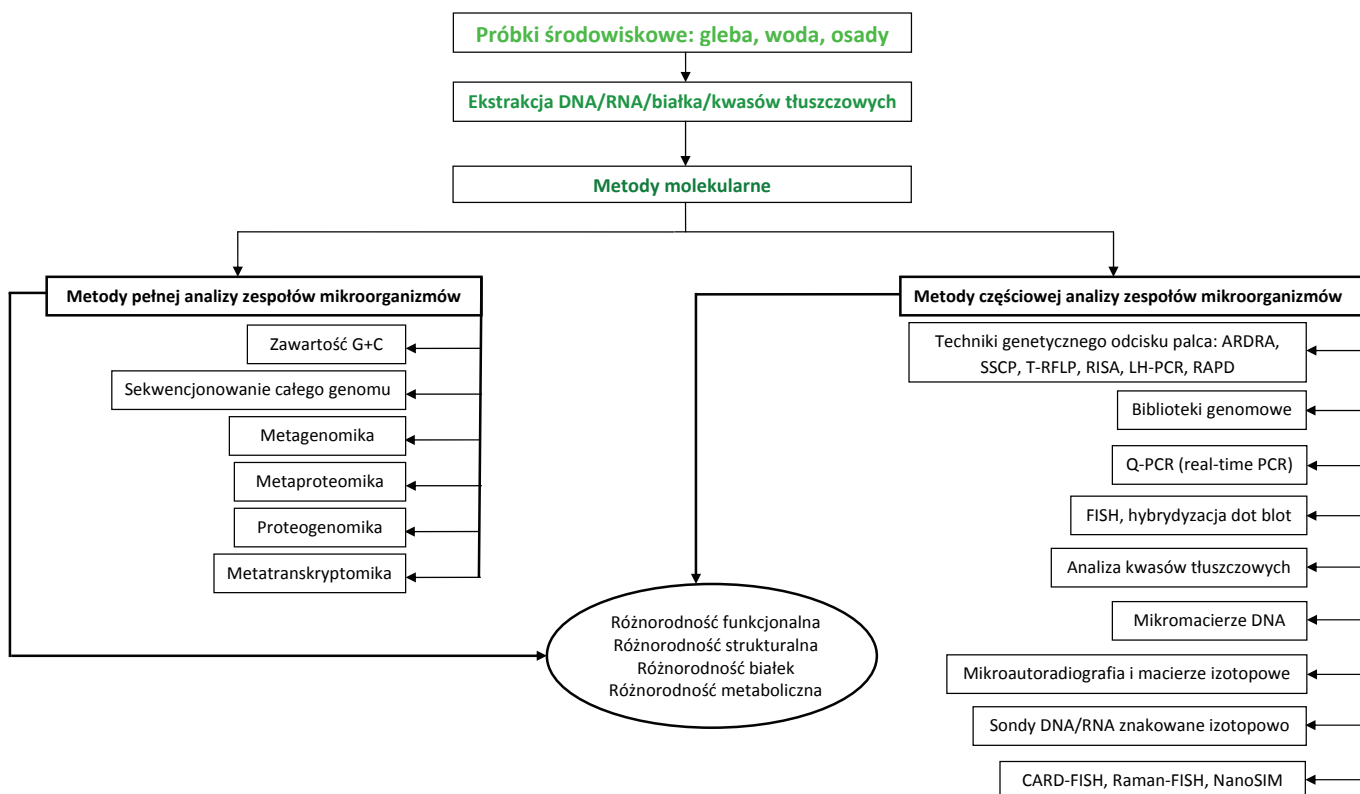
uwagę genetyczne, funkcjonalne i gatunkowe zróżnicowanie mikroorganizmów oraz mnogość procesów przez nie kontrolowanych, prawidłowe zrozumienie zachodzących przemian wymaga zastosowania takich metod diagnostycznych, które umożliwią badanie oddziaływań mikroorganizm–mikroorganizm, jak i mikroorganizm–środowisko. Takie podejście spowodowało gwałtowny rozwój technik molekularnych jako narzędzi diagnostycznych. Uzyskane w ten sposób informacje odsłaniają fragment skomplikowanych relacji występujących między mikroorganizmami.

Metody molekularne

Znaczna większość aktywnych metabolicznie mikroorganizmów zasiedlających środowiska przyrodnicze jest niezdolna do wzrostu w postaci kolonii na pożywkach agarowych. Davis i in. [9] szacują, że mniej niż 1% z 10^9 komórek bakteryjnych występujących w 1 g gleby jest zdolnych do wzrostu na sztucznych podłożach mikrobiologicznych. W latach 90. ubiegłego wieku po raz pierwszy Byrd i in. [6] określili takie mikroorganizmy jako „żywe, lecz niedające się hodować” (VBNC – *viable but nonculturable*). Dziś uważa się, że zastosowanie klasycznych metod mikrobiologicznych, opartych na analizie cech fenotypowych drobnoustrojów (metody fenotypowe), pozwala na symulowanie odpowiednich warunków wzrostu dla mikroorganizmów stanowiących

jedynie 1÷10% składu danej biocenozy. Istnieje zatem potrzeba opracowania szybkich, czułych i specyficznych metod dających możliwość zarówno bezpośredniej oceny pełnego obrazu mikrobiologicznego zróżnicowania analizowanego środowiska, z pominięciem etapu hodowli, jak i identyfikacji wcześniej wyhodowanego drobnoustroju.

U podstaw metod molekularnych leży detekcja makrocząsteczek (kwasów nukleinowych, białek, kwasów tłuszczowych) występujących w żywych organizmach. Co więcej, cząsteczki te można wyekstrahować bezpośrednio z gleby/wody, bez konieczności hodowli mikroorganizmów. Ilościowe, jak i jakościowe zmiany w obrębie tych cząsteczek bezpośrednio świadczą o zmianach w zespołach mikroorga-



Rys. 1. Metody molekularne stosowane w analizie mikrobiologicznej próbek środowiskowych [47]

nizmów, wywołanych pojawieniem się np. zanieczyszczenia w środowisku.

Na przełomie kilku ostatnich dziesięcioleci obserwuje się ogromny postęp w ekologii mikroorganizmów. Jego przyczyną jest intensywny rozwój zaawansowanych metod diagnostycznych (np. metody oparte na analizie kwasów nukleinowych), które umożliwiają charakterystykę drobnoustrojów na poziomie funkcjonalnym i filogenetycznym. Wspomniane powyżej metody molekularne bazują na analizie całego genomu lub wysoce konserwatywnych cząsteczek 16S rRNA (w mniejszym stopniu 23S rRNA) u *Bacteria* i *Archaea* lub 18S rRNA u *Eucarya*, które są swoistymi „zegarami molekularnymi”. Biorąc pod uwagę informacje, które można uzyskać stosując daną metodę wyróżnia się dwa podejścia (rysunek 1):

- umożliwiające pełną analizę zespołu mikroorganizmów,
- umożliwiające częściową analizę zespołu mikroorganizmów.

Większość metod molekularnych powszechnie stosowanych w diagnostyce mikrobiologicznej opiera się na reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR), mimo że równie popularne są metody hybrydyzacyjne, niewymagające amplifikacji badanego materiału. Poniżej opisano metody umożliwiające częściową analizę zespołów mikroorganizmów stosowanych w procesach bioremediacyjnych.

Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR)

W diagnostyce mikrobiologicznej szerokie zastosowanie znalazła technika oparta na reakcji łańcuchowej polimerazy PCR (*DNA polymerase chain reaction*), opracowana w latach 80. XX wieku przez Kary'ego Mullisa. Dziesięć lat później (1993 r.) Mullis za to odkrycie został uhonorowany Nagrodą Nobla. Technika ta jest w pewnym sensie odwzorowaniem (w warunkach laboratoryjnych) zachodzącego *in vivo* procesu replikacji materiału genetycznego. Jest to wydajna i czuła metoda pozwalająca na otrzymanie w komorze termocyklera w ciągu kilku godzin aż 10^6 – 10^9 kopii wyjściowego fragmentu powielanego DNA.

U podstaw omawianej metody leży wielokrotne replikowanie dowolnej sekwencji DNA *in vitro*, z wykorzystaniem jednoniciowych starterów (*primers*) oligonukleotydowych długości kilkudziesięciu (18÷24) par zasad, których sekwencja jest komplementarna do sekwencji syntetyzowanego odcinka DNA. Częściowa znajomość sekwencji obu końców powielanego fragmentu DNA wymagana jest do zaprojektowania i syntezy prawidłowych starterów, co daje możliwość amplifikacji dowolnego fragmentu DNA. Reakcja PCR wymaga ponadto obecności: termostabilnej polimerazy zależnej

od DNA, katalizującej przyłączenie kolejnych trifosforanów deoksynukleotydów (dNTP), wolnych trifosforanów deoksynukleotydów (dNTP), jonów Mg^{2+} oraz buforu zapewniającego pH 8,3. Najczęściej stosowanymi polimerazami są: polimeraza DNA Taq, izolowana z termofilnej bakterii *Thermus aquaticus*, polimeraza Pfu z *Pyrococcus furiosus* czy polimeraza Pwo z *Pyrococcus woesei* lub mieszanina polimerazy Taq z jedną z wymienionych.

Proces powielania matrycowej sekwencji DNA składa się z wielokrotnie powtarzanego cyklu (30÷40 razy) trzech następujących po sobie etapów, przebiegających w różnych temperaturach, precyzyjnie kontrolowanych za pomocą termocyklera:

1. Denaturacji dwuniciowego łańcucha DNA

Warunkiem koniecznym reakcji PCR jest rozplecenie podwójnej helisy matrycowego DNA pod wpływem wysokiej temperatury (ok. 94÷96°C, zależnie od ilości zasad GC (G – guanina, C – cytozyna) w matrycowej nici DNA, czas: 1÷9 minut), wówczas bowiem następuje pękanie wiązań wodorowych zapewniających helikalną strukturę DNA i rozdział na pojedyncze łańcuchy, do których w kolejnym etapie przyłączają się startery oligonukleotydowe.

2. Hybrydyzacji odcinków starterowych (*annealing*)

Obniżenie temperatury reakcji do 45÷60°C umożliwia przyłączenie się odpowiednich starterów do komplementarnej sekwencji matrycowego DNA. Warunki temperaturowe reakcji ściśle zależą od właściwości użytej pary starterów; zarówno skład, jak i długość tych fragmentów DNA są znamienne. Aby uniknąć możliwości tworzenia się hybryd nić matrycy–nić matrycy, zapewnia się nadmiar starterów w stosunku do matrycy w mieszaninie reakcyjnej.

3. Elongacji łańcucha DNA

W końcowym etapie temperatura jest podnoszona do 72°C i rozpoczyna się reakcja polimeryzacji, polegająca na utworzeniu się na matrycy DNA kompleksu polimerazy DNA z przyłączonymi starterami. Polimeraza DNA uczestniczy w wydłużaniu starterów od końca 3' poprzez katalityczne przyłączanie dNTP. Efektem tego jest powstanie fragmentu sekwencji komplementarnej do nici matrycowej.

Następnie cały cykl reakcji, skrótowo opisany powyżej, jest powtarzany aż do momentu uzyskania łańcucha DNA o odpowiedniej długości. Zaletą reakcji PCR jest możliwość otrzymania wielu kopii z niewielkiej ilości materiału wyjściowego oraz obecność zdegenerowanego (w pewnym stopniu) DNA w materiale wyjściowym. Wiąże się to z tym, że każda nowo zsyntetyzowana nić DNA staje się matrycą w następnym cyklu, a tym samym ilość produktu wykładniczo wzrasta. Po zakończeniu reakcji PCR w celu

ustalenia długości nowego łańcucha DNA uzyskany produkt zostaje poddany rozdzielaniu elektroforetycznemu na żelu agarozowym lub poliakrylamidowym, a w kolejnym etapie produkt ten może zostać zsekwencjonowany. Zastosowanie reakcji PCR dla próbek środowiskowych wiąże się bardzo często z ograniczeniami, wynikającymi z obecności w próbce związków nieorganicznych i organicznych (np. kwasy humusowe, polisacharydy itp.), które zaburzają przebieg procesu (osłabienie lub inhibicja reakcji PCR).

Obecnie można wyróżnić wiele odmian omawianej metody, spośród których najbardziej znane to: odwrotna, asymetryczna czy zwielokrotniona reakcja PCR. Co więcej, metoda PCR stała się punktem wyjścia dla technik pochodnych, m.in. analizy polimorfizmu długości łańcuchów restrykcyjnych (PCR-RFLP) czy analizy konformacji pojedynczych nici DNA (PCR-SSCP). Techniki PCR znajdują szerokie zastosowanie w diagnostyce mikrobiologicznej i wykorzystywane są m.in. do:

- wykrywania drobnoustrojów,
- identyfikacji drobnoustrojów na poziomie gatunku i szczepu,
- określenia powiązań filogenetycznych.

Poniżej przedstawiono najpopularniejsze modyfikacje reakcji PCR, które mają swoje zastosowanie w diagnostyce mikroorganizmów środowiskowych:

RT-PCR (reverse transcription PCR, odwrotna transkrypcja połączona z łańcuchową reakcją polimerazy) umożliwia syntezę DNA, która odbywa się na matrycy mRNA z zastosowaniem wirusowej odwrotnej transkryptazy (RT – *reverse transcriptase*). Amplifikacja otrzymanego cDNA (komplementarny DNA) zachodzi według opisanych powyżej reguł, a uzyskany produkt następnie poddany jest rozdzielaniu elektroforetycznemu. Reakcja ta jest dużo czulsza w porównaniu do tradycyjnej reakcji PCR. RT-PCR zastosowano w badaniach środowiskowych oraz m.in. do oceny zdolności degradacyjnych alkanów przez *Dietzia* sp. [1]. Sprzęgnięcie ilościowego PCR (*quantitative PCR*, qPCR) z reakcją odwrotnej transkrypcji (RT-Q-PCR) daje możliwość ilościowej oceny ekspresji genów. Takie podejście zostało wykorzystane w badaniach nad ekspresją genów związanych z degradacją węglowodorów u *Pseudomonas* i *Rhodococcus*, pozyskanych z gleb skażonych węglowodorami z obszaru arktycznego [63].

Real-time PCR (reakcja PCR w czasie rzeczywistym) polega na amplifikacji DNA, którego ilość jest kontrolowana w trakcie przebiegu reakcji dzięki fluorescencyjnemu znakowaniu starterów, sond oligonukleotydowych lub produktów amplifikacji. Sygnał fluorescencyjny jest proporcjonalny do ilości zsyntetyzowanego produktu, zatem każdorazowy pomiar fluorescencji próbki po każdym cyklu daje obraz przebiegu procesu. Real-time PCR z powodzeniem stosuje się

w ocenie zmian zespołów mikroorganizmów degradujących węglowodory podczas przebiegu procesu bioremediacji [46] oraz w identyfikacji i ilościowym określeniu genów kodujących enzymy uczestniczące w metabolizmie węglowodorów [32, 45, 62].

Multipleks PCR (złożony PCR) opiera się na zastosowaniu w tej samej reakcji jednocześnie kilku par starterów, co umożliwia powielenie dwóch lub więcej różnych fragmentów DNA w jednej mieszaninie reakcyjnej. Technika ta pozwala na obniżenie całkowitego czasu badania dużych obszarów DNA przy zachowaniu kontroli nad poprawnością prowadzonego procesu. Baldwin i in. [12] wykorzystali tę metodę w połączeniu z Real-time PCR do badania genów kodujących enzymy uczestniczące w katabolizmie węglowodorów aromatycznych (m.in. monooksygenazę fenolu, dioksygenazy naftalenu i bifenylu).

Nested-PCR (zagnieżdżony PCR) – istotą tej metody jest przeprowadzenie kolejnego etapu amplifikacji, następującego po tradycyjnej reakcji PCR. Modyfikacja opiera się na zastosowaniu drugiej pary starterów, które przyłączają się przyśrodkowo w stosunku do pierwszej pary. W pierwszym etapie stosuje się startery zewnętrzne o niskiej specyficzności gatunkowej celem amplifikacji danego fragmentu DNA, zaś w kolejnym etapie przyłączają się startery wewnętrzne o wysokiej specyficzności gatunkowej. Takie podejście powoduje zwiększenie specyficzności i czułości metody. W klasycznej metodzie PCR konieczna jest matryca DNA w ilości 50 pg, zaś w przypadku nested-PCR już 50 fg matrycowego DNA pozwala uzyskać produkty reakcji.

Monitorowanie ekspresji genów kodujących enzymy odpowiedzialne za degradację węglowodorów [16, 44, 64] czy detekcja mikroorganizmów biorących aktywny udział w procesach bioremediacji substancji ropopochodnych [53] to niektóre przykłady zastosowania tej metody w bioremediacji ksenobiotyków ze środowisk wodnych i glebowych. Wykorzystanie metody zagnieżdżonego PCR pozwoliło wskazać natychmiastową ekspresję genu *alkB* po zaolejeniu próbki gleby [44].

Techniki „genetycznego odcisku palca” (fingerprint)

Do technik „genetycznego odcisku palca” zalicza się: DGGE/TGGE (*denaturing/temperature gradient gel electrophoresis*), SSCP (*single-strand conformation polymorphism*), RAPD (*random amplified polymorphic DNA*), ARDRA (*amplified ribosomal DNA restriction analysis*), RFLP (*restriction fragment length polymorphism*), T-RFLP (*terminal restriction fragment length polymorphism*), LH-PCR (*length heterogeneity PCR*), RISA (*ribosomal intergenic spacer analysis*), ARISA (*automated ribosomal*

intergenic spacer analysis). Wspólną cechą wszystkich odmian techniki *fingerprint* jest amplifikacja polimorficznego regionu DNA przy zastosowaniu tradycyjnej reakcji PCR oraz odpowiednio skonstruowanych starterów. Natomiast omawiane techniki różnią się między sobą sposobem rozdziału otrzymanych amplikonów. Dowolność sekwencji starterów prowadzi do niespecyficznego przyłączania się tych fragmentów do kilku miejsc genomu, w wyniku czego uzyskuje się odpowiedni wzór prążków (od kilku do kilkudziesięciu) zwany odciskiem palca. Analiza takiego profilu pozwala na ocenę występowania różnic genetycznych między np. szczepami tego samego gatunku. W efekcie końcowym otrzymuje się całościowy profil populacji mikroorganizmów występujących w analizowanym obszarze. Niewątpliwymi zaletami tych technik jest szybkość oraz możliwość równoczesnej analizy kilku/kilkunastu próbek. Zastosowanie technik *fingerprint* daje możliwość oceny występowania różnic pomiędzy populacjami mikroorganizmów, nie zapewnia jednak bezpośredniego określenia przynależności taksonomicznej. Poniżej omówiono metody, które są najczęściej wykorzystywane w badaniach mikrobiologicznych skażonych środowisk.

DGGE/TGGE

Elektroforeza w gradiencie denaturującym DGGE została po raz pierwszy zastosowana jako narzędzie diagnostyczne złożonych zespołów mikroorganizmów w 1993 r., natomiast już dekadę wcześniej z powodzeniem pełniła funkcję detektora mutacji w obrębie poszczególnych genów. Metody DGGE, jak i TGGE opierają się na rozdziale amplifikowanych w reakcji PCR fragmentów 16S rRNA, posiadających taką samą długość, ale różną sekwencję nukleotydową. Rozdział amplifikowanych fragmentów DNA (o długości do 500 par zasad) następuje w wyniku zmniejszonej mobilności tych cząsteczek w żelu poliakrylamidowym, w którym uformowany jest liniowo rosnący gradient czynnika denaturującego (formamidu czy mocznika) [39, 40] albo temperatury (w przypadku metody TGGE) [41]. W trakcie elektroforezy w gradiencie czynnika denaturującego niektóre dwuniciowe fragmenty DNA ulegają rozdzieleniu na fragmenty jednoniciowe. Topnienie fragmentów DNA następuje domenowo. Domena o danej temperaturze topnienia osiągnie ją w danym miejscu żelu denaturującego, wówczas następuje utrata helikalnej struktury DNA do fragmentu jednoniciowego i migracja takiej cząsteczki ulega spowolnieniu (retardacja). Zatem jednoniciowe fragmenty DNA charakteryzują się zredukowaną ruchliwością elektroforetyczną po osiągnięciu swojego punktu denaturacji. Dzięki temu możliwy jest rozdział fragmentów cząsteczek DNA, które w formie dwuniciowej mają podobną ruchliwość przy różnych właściwościach topnienia. Zwykle do końca 5' obu starterów doczepiany jest fragment bogaty

w guaninę i cytozynę (GC), tak aby zapobiec całkowitemu topnieniu fragmentów DNA. Dobrze rozdzielone prążki DGGE mogą zostać następnie wycięte, ponownie poddane amplifikacji i zsekwencjonowane lub poddane blottingowi i hybrydyzowane ze specyficzną sondą molekularną. W przypadku mikroorganizmów glebowych analiza wzoru prążków DGGE, uzyskanego z zastosowaniem uniwersalnych starterów, jest niezwykle złożona. Dlatego Mühlhing i in. [38] zastosowali odmienne podejście, używając starterów dedykowanych swoistym grupom filogenetycznym.

Zaletami metod *fingerprint* opartych na właściwościach topnienia amplifikowanych łańcuchów DNA są możliwości:

- monitorowania przestrzennych i czasowych zmian w strukturze zespołów mikroorganizmów,
- obserwacji i monitorowania dominujących szczepów w próbce.

Słabymi stronami metod DGGE/TGGE są:

- podobne temperatury topnienia dla różnych fragmentów DNA,
- liczba różnych fragmentów DNA, która może zostać rozdzielona elektroforetycznie (PAGE),
- heterogeniczność sekwencji pośród licznych operonów rRNA dla danej bakterii, co może zaburzać obraz różnorodności zespołu mikroorganizmów,
- ograniczona informacja filogenetyczna uzyskana na podstawie analizy sekwencyjnej pojedynczego prążka DNA,
- nierzadko brak zależności pomiędzy intensywnością prążka a liczebnością danej populacji mikroorganizmów (intensywny prążek może w większości przypadków oznaczać większą liczbę kopii poszczególnego genu w obrębie analizowanego organizmu), co może powodować niedoszacowanie liczebności danej populacji.

Metody DGGE/TGGE znajdują szerokie zastosowanie w przypadku badań mikroorganizmów środowiskowych, zwłaszcza gdy różnorodność mikroorganizmów jest nieznaną, dając możliwość uzyskania profilu mikrobiologicznego oraz śledzenia zmian w obrębie populacji na poszczególnych etapach biodegradacji ksenobiotyków [18, 22, 36]. Hendrickx i in. [17] zastosowali DGGE do badania genów monooksygenaz związków z grupy BTEX (benzenu, toluenu, etylobenzenu i ksylenów) pozyskanych ze szczepów zasiedlających zanieczyszczone węglowodarami zbiorniki wodne.

Podobne podejście wykorzystali również Cavalca i in. [7], którzy stosując metodę DGGE wykazali obecność zjawiska horyzontalnego transferu pomiędzy filogenetycznie dalekimi szczepami *Pseudomonas*, *Mycobacterium* i *Bradyrhizobium* oraz stwierdzili obecność genu kodującego monooksygenazę toluenu (*tmo*). Równie ciekawe są obserwacje Leys i in. [31], którzy analizowali populacje

Sphingomonas pozyskanych z gleb zanieczyszczonych toksycznymi wielopierścieniowymi węglowodorami aromatycznymi (WWA, np. fenantren, piren, naftalen itp.) o różnym stężeniu. Wykazali, że próbki gleby bogate w fenantren charakteryzowały się najmniejszą różnorodnością w obrębie wymienionego rodzaju *Sphingomonas*. Badania dotyczące zmian populacji mikroorganizmów zdolnych do degradacji benzo[a]pirenu, z wykorzystaniem DGGE jako metody pozwalającej na śledzenie zmian struktury populacji aktywnie uczestniczących w procesach usuwania ksenobiotyku, pozwoliły na selekcję najefektywniejszych populacji mikroorganizmów. Celem tych badań było opracowanie aktywnych zawiesin drobnoustrojów przeznaczonych do bioremediacji obszarów skażonych WWA [35]. Ji i in. [21] badali zmiany w obrębie populacji mikroorganizmów w glebach sztucznie zanieczyszczonych związkami z grupy BTEX, wskazując wzrost liczby bakterii z grupy *Acinetobacter* i *Bacillus*.

PCR-RFLP i T-RFLP

Metoda PCR-RFLP analizy polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych stanowi swoiste połączenie reakcji PCR z analizą restrykcyjną. Produkty amplifikacji poddaje się działaniu enzymów restrykcyjnych, które rozpoznają i tną DNA w punktach o określonej sekwencji. Uzyskane fragmenty poddaje się rozdziałowi elektroforetycznemu, na podstawie którego ocenia się liczbę i wielkość powstałych produktów (tzw. wzór restrykcyjny). Następnie porównuje się je z wzorcami charakterystycznymi dla danych gatunków. Po dokonaniu wyboru odpowiedniego genu, który zostanie poddany amplifikacji, metoda ta może być wykorzystywana zarówno do identyfikacji mikroorganizmów na poziomie gatunków, jak i typowania wewnątrzgatunkowego. Niezwykle ważnym elementem determinującym skuteczność metody jest uzasadniony wybór restryktaz, gdyż poszczególne enzymy tną sekwencje w różnych miejscach restrykcyjnych, prowadząc w ten sposób do powstania odmiennych wzorów restrykcyjnych. Metoda ta jest powszechnie stosowana w badaniach zmian struktury w populacjach mikroorganizmów z zanieczyszczonych środowisk [33, 45].

Kolejną metodą stosowaną powszechnie w monitorowaniu zmian w zbiorowiskach mikroorganizmów jest metoda T-RFLP, czyli polimorfizm długości terminalnych fragmentów restrykcyjnych. Pozwala ona na wykazanie powiązań międzygatunkowych pomiędzy poszczególnymi mikroorganizmami poprzez porównywanie wzorów polimorficznych. Pierwotnie technika ta opierała się na trawieniu cząsteczki DNA poprzez enzymy restrykcyjne (endonukleazy), które precyzyjnie rozpoznają określoną sekwencję i rozcinają ją na odpowiednie fragmenty. Powstałe w ten sposób produkty

poddawano rozdziałowi na żelu agarozowym. Modyfikacje tej techniki opierają się na zastosowaniu hybrydyzacji typu *Southern blot*, polegającej na przeniesieniu z żelu agarozowego na filtr nitrocelulozowy danego fragmentu restrykcyjnego oraz jego denaturacji. Powstałe w ten sposób zdenaturowane fragmenty DNA hybrydują z sondą (ok. 300÷350 par zasad), wyznakowaną radioaktywnym izotopem (^{32}P lub ^{35}S), biotyną lub fluorochromem. Po odpłukaniu nadmiaru sondy miejsca, do których dołączyła się sonda, można zaobserwować, wykorzystując autoradiografię. Metoda ta cechuje się wysoką czułością podczas wykrywania różnic w długości fragmentów restrykcyjnych DNA, przy założeniu użycia dużej ilości wyjściowego DNA, niezbędnego do trawienia. Przyczyną tych różnic może być punktowa mutacja sekwencji (delecje, insercje) bądź utrata lub pojawienie się miejsca restrykcyjnego w obrębie sekwencji, które hybryduje z sondą.

Ewidentnym ograniczeniem metody T-RFLP jest ekstrakcja DNA, reakcja PCR oraz dobór uniwersalnych zestawów starterów. Powszechnie używane startery nie są w stanie amplifikować wszystkich sekwencji bakteryjnych, gdyż sekwencje tych starterów opierają się na istniejących, zdeponowanych sekwencjach 16S rRNA hodowalnych mikroorganizmów. Takie podejście z pewnością zaburza pełny obraz złożoności próbek środowiskowych poprzez wykluczenie mikroorganizmów niehodowalnych. Prawidłowe oszacowanie rzeczywistej różnorodności drobnoustrojów przy wykorzystaniu metody T-RFLP jest trudne ze względu na: (a) specyfikę techniki PCR, która pozwala określić tylko gatunki dominujące, gdyż ich DNA przeważa, oraz (b) różną liczbę kopii genu w obrębie różnych gatunków.

Ze względu na szybkość, powtarzalność i standaryzację metody – T-RFLP jest z powodzeniem stosowane w badaniach zmian populacji mikroorganizmów [24, 25, 51]. Przykładem jest praca Mirallesa i in. [37], która opisuje zmiany w zbiorowiskach bakterii z grupy SRB w odpowiedzi na skażenie ropą naftową. Również Grace Liu i in. [15] wykorzystali tę technikę jako narzędzie diagnostyczne do detekcji powiązań i oddziaływań (m.in. dominacji) między mikroorganizmami oraz w badaniach zmienności w obrębie zbiorowisk mikroorganizmów w trakcie procesu bioremediacji. T-RFLP cechuje się wysoką rozdzielczością i czułością, z drugiej strony zaś metoda ta jest silnie uzależniona od: etapu amplifikacji 16S rRNA w reakcji PCR, wyboru metody ekstrakcji DNA, a także wyboru starterów. Porównując tę metodę z DGGE/TGGE, można zauważyć jej słabą stronę, związaną z brakiem możliwości uzyskania pełnej informacji filogenetycznej, gdyż prążki odpowiadające poszczególnym sekwencjom są zbyt krótkie, aby móc dokonać ich sekwencjonowania.

RISA (analiza rybosomalnych sekwencji międzygenowych) i ARISA (automatyczna analiza rybosomalnych sekwencji międzygenowych)

Metody te opierają się na analizie rybosomalnych sekwencji międzygenowych, a dokładniej na analizie polimorfizmu długości sekwencji fragmentu łącznikowego DNA występującego między genami 16S i 23S rRNA w genomie bakteryjnym (ITS – *intergenic spacer*). Pierwszym etapem badań jest wykonanie PCR regionu łącznikowego, następnie przeprowadza się denaturację uzyskanych amplikonów, które poddawane są rozdzielaniu elektroforetycznemu na żelach poliakrylamidowych czy agarozowych. W przypadku metody RISA sekwencje polimorfizmu wykrywane są w barwieniach srebrem, zaś w ARISA końcowy starter jest znakowany fluorochromem i wykrywany automatycznie. Region ITS jest odpowiedzialny za kodowanie tRNA; tym samym metody te są wykorzystywane do różnicowania gatunków mikroorganizmów. Ze względu na wysoki polimorfizm długości sekwencji ITS różnice występują w obrębie bardzo blisko spokrewnionych mikroorganizmów, a nawet w tej samej komórce, wówczas gdy operon występuje w kilku kopiach. Dzięki temu metoda ta jest stosowana do określania struktury populacji mikroorganizmów występujących w analizowanym ekosystemie. Przykładem zastosowań RISA są badania Erikssona i in. [14], którzy wykorzystali tę metodę do określenia zmian populacji mikroorganizmów uczestniczących w biodegradacji WWA w niskich temperaturach. Również Rosano-Hernández i in. [50] zastosowali RISA do przedstawienia różnic w ilości, różnorodności i rozmieszczeniu zbiorowisk mikroorganizmów pochodzących z osadów o różnym stopniu skażenia substancjami ropopochodnymi. Metoda ARISA została zaś zastosowana do określenia różnorodności i zmian w składzie zbiorowisk mikroorganizmów degradujących węglowodory w ekosystemach glebowych skażonych ropą naftową w wyniku katastrofy platformy Deepwater Horizon [27]. W pracy wykazano, że mikroorganizmy należące do klas γ -Proteobacteria (*Alcanivorax*) i α -Proteobacteria (*Rhodobacteraceae*) są kluczowe w procesach mineralizacji substancji ropopochodnych.

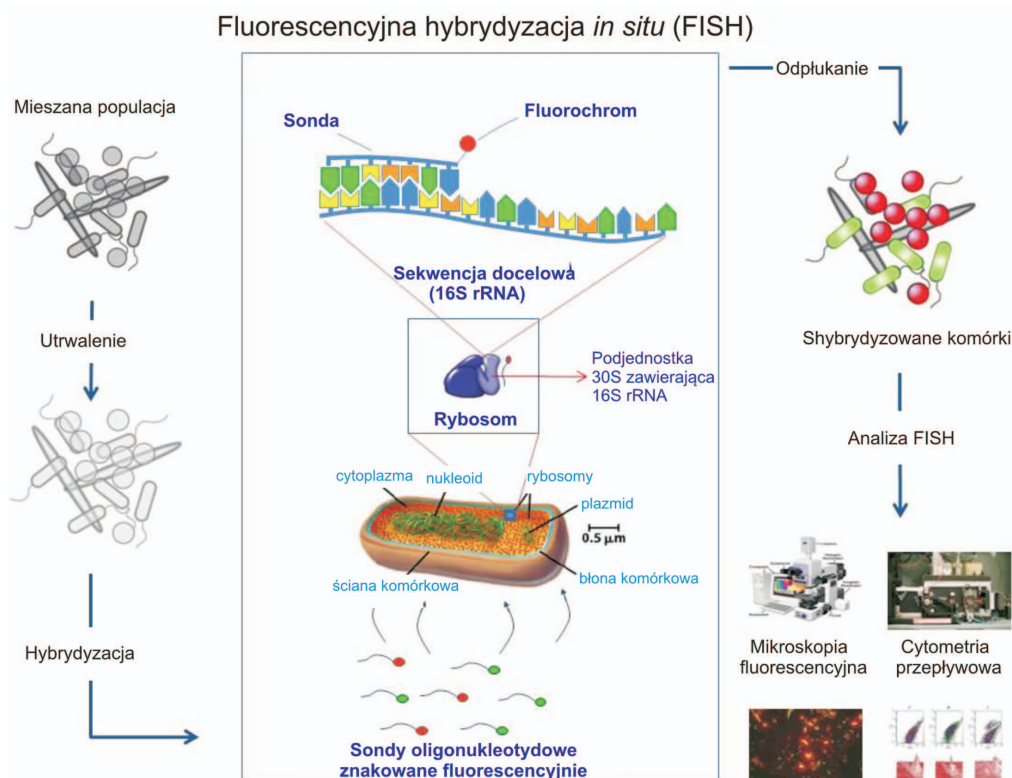
Analiza kwasów nukleinowych w oparciu o hybrydyzację

Kolejną grupę stanowią metody działające na podstawie zjawiska hybrydyzacji, które występuje pomiędzy dwoma dowolnymi jednoniciowymi łańcuchami kwasów nukleinowych (DNA:DNA, DNA:RNA, RNA:RNA). O sukcesie hybrydyzacji decyduje komplementarne oddziaływanie par zasad, w efekcie czego powstają stabilne struktury dwuniciowe.

Hybrydyzacja *in situ*

Hybrydyzacja *in situ* (ISH – *in situ hybridization*) polega na komplementarnym oddziaływaniu wyznakowanego fragmentu RNA lub DNA o znanej sekwencji (sonda oligonukleotydomowa) z nieznanym materiałem genetycznym w badanej próbce.

Metoda fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ*, FISH (*fluorescence in situ hybridization*), polega na identyfikacji określonej sekwencji oligonukleotydomowej w badanym materiale przy użyciu swoistej sondy oligonukleotydomowej znakowanej fluorescencyjnie. Sonda oligonukleotydomowa stosowana w technice FISH to na ogół fragment o maksymalnej długości do 30 nukleotydów, który na końcu 5' zawiera znacznik fluorescencyjny. Dzięki temu możliwa jest detekcja kompleksu sonda–szukana sekwencja kwasu nukleinowego pod mikroskopem fluorescencyjnym. Najczęściej sondy projektowane są na bazie sekwencji genów 16S rRNA lub rzadziej 23S rRNA. Na tej podstawie możliwe jest ustalenie



Rys. 2. Ogólna zasada metody FISH (źródło: www.biovisible.com/indexRD.php?page=fish)

przynależności filogenetycznej danego mikroorganizmu. Obecny postęp wiedzy w zakresie bioinformatyki daje możliwość samodzielnego zaprojektowania sond dla określonego mikroorganizmu na podstawie wcześniej poznanej sekwencji danego genu. W tym celu stosuje się m.in. oprogramowanie ARB [29, 34]. Niewątpliwą zaletą techniki FISH jest brak konieczności wcześniejszego izolowania DNA lub RNA. Co więcej, intensywność sygnału fluorescencyjnego jest skorelowana z zawartością komórkowego RNA oraz etapem wzrostu danego mikroorganizmu. Tym samym możliwa jest ocena poziomu metabolizmu komórkowego, wynikającego z liczby aktywnych rybosomów w komórce.

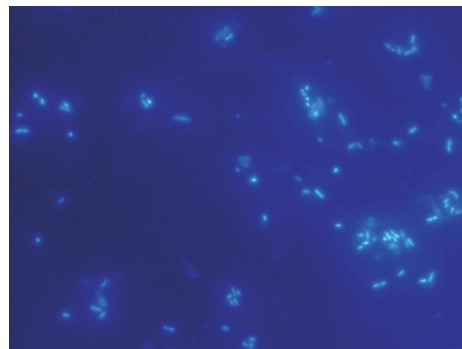
FISH, poza analizą jakościową, umożliwia ocenę liczebności populacji mikroorganizmów w analizowanej próbce poprzez komputerową obróbkę (np. program DAIME – *digital image analysis in microbial environment*) zdjęć wykonanych przy zastosowaniu mikroskopu fluorescencyjnego (patrz: przykłady na rysunkach 3a i 3b). Poniżej wymieniono główne zalety i wady omawianej metody.

Zalety:

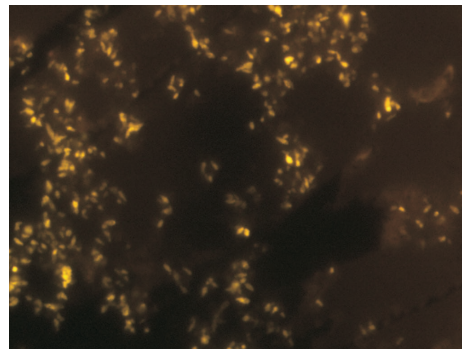
- metoda szybka i łatwa, przy założeniu, że wymagane sondy są dostępne,
- pozwala na bezpośrednią analizę mikroorganizmów, których izolacja jest utrudniona bądź niemożliwa,
- w większości przypadków umożliwia pełną analizę jakościową mikroorganizmów występujących w danej próbce,
- umożliwia analizę ilościową poszczególnych grup mikroorganizmów, przeważając tym samym nad klasycznymi czy innymi metodami molekularnymi,
- pozwala na detekcję aktywnych mikroorganizmów.

Wady:

- projektowanie, a następnie optymalizacja warunków hybrydyzacji dla nowej sondy wymagają doświadczenia i są niezwykle trudne, a otrzymane rezultaty nie zawsze mogą być satysfakcjonujące,
- analizy strukturalne agregatów, m.in. biofilmów, wymagają mikroskopu konfokalnego,
- projektowanie swoistych sond oligonukleotydowych dedykowanych konkretnym grupom mikroorganizmów jest skomplikowane i nie we wszystkich przypadkach możliwe,
- w przypadku detekcji i analizy ilościowej określonego drobnoustroju wymagana jest znajomość sekwencji rRNA (16S rRNA lub 23S rRNA), w celu zaprojektowania, a następnie syntezy sondy dedykowanej temu mikroorganizmowi,
- wymagana jest wcześniejsza wiedza na temat analizowanego ekosystemu, jak również ogólna znajomość do-



Rys. 3a. *Agrobacterium* sp. znakowane barwnikiem DAPI



Rys. 3b. *Mycobacterium frederiksbergense* IN53 (GenBank: JN572675)

tycząca grup mikroorganizmów występujących w tym środowisku.

Poważnymi ograniczeniami stosowania metody FISH są: niska intensywność sygnału, autofluorescencja tła czy niedostępność bądź ograniczony dostęp do sekwencji wiążącej się z sondą, co powoduje utrudnienia związane z prawidłową interpretacją obrazu mikroskopowego. Chcąc przezwyciężyć te problemy, rozwinięto pochodne techniki FISH, w których proponuje się rozwiązania mające na celu wzmocnienie sygnału m.in. poprzez zastosowanie fluorochromu o intensywniejszej emisji, drugiego fluorochromu na końcu 3' sekwencji (metoda DOPE-FISH) czy chloramfenikolu, aby zwiększyć zawartość rRNA w aktywnej komórce bakteryjnej. W tabelicy 1 przedstawiono najważniejsze metody będące pochodnymi standardowej metody FISH. Jedną z ważniejszych metod alternatywnych jest CARD-FISH (*catalyzed reporter deposition FISH*), która znajduje szczególne zastosowanie w analizach złożonych układów o wyraźnej autofluorescencji [13].

Metody FISH i CARD-FISH powszechnie wykorzystywane są w badaniach dotyczących bioróżnorodności mikroorganizmów glebowych [12, 13, 52]. Tischer i in. [59] zastosowali metodę CARD-FISH w badaniach dotyczących oceny składu populacji mikroorganizmów w osadach pobranych z zanieczyszczonych węglowodorami zbiorników wodnych. Celem tej pracy była między innymi ocena zmian w liczebności bakterii należących do grup *α-Proteobacteria*, *γ-Proteobacteria*, *Bacteroidetes* pozyskanych z gleb zawierających WWA [59].

Tablica 1. Modyfikacje metody FISH [2, 30, 57, 61, 65]

CARD-FISH (<i>catalyzed reporter deposition FISH</i>)	Niska zawartość rRNA w komórkach docelowych wymaga zastosowania metody CARD-FISH, w której sygnał zostaje wzmocniony poprzez zastosowanie układu HRP (peroksydazy chrzanowej) i tyramidu (TSA – <i>tyramide signal amplification</i>).
PNA-FISH (<i>peptide nucleic acid FISH</i>)	W PNA-FISH wykorzystuje się fluorescencyjnie znakowane sondy PNA, które różnią się pod względem chemicznym od sond wykorzystywanych w standardowej metodzie FISH, CARD-FISH, DOPE-FISH. Sondy PNA to cząsteczki kwasu peptydonukleinowego, które naśladują cząsteczkę DNA, jedyna różnica polega na zastąpieniu ujemnie naładowanego szkieletu fosforanowo-cukrowego obojętnym elektrycznie fragmentem poliamidowym lub peptydowym. Niestety, sekwencje powszechnie używanych sond oligonukleotydowych nie mogą być prosto przeniesione na sekwencje sond PNA; ponadto wymaga się, aby były one nieco krótsze (14÷15 monomerów). Powyższe czynniki oraz koszt tej metody znacząco ograniczają jej wykorzystanie.
RING-FISH (<i>recognition of individual genes FISH</i>)	RING-FISH jest kolejnym wariantem metody FISH, w którym identyfikuje się pojedyncze geny. Wielokrotnie znakowana sonda oligonukleotydowa służy do identyfikacji pojedynczego genu na chromosomie bakteryjnym.
DOPE-FISH (<i>double labelling of oligonucleotide probes FISH</i>)	Przyczyny stosowania modyfikacji DOPE-FISH są analogiczne jak w przypadku CARD-FISH, z tym że metoda ta jest znacznie prostsza i tańsza w porównaniu z CARD-FISH. Opiera się na zastosowaniu podwójnie znakowanej sondy oligonukleotydowej (znaczniki fluorescencyjne zostają przyłączone do końców 3' i 5' sekwencji oligonukleotydowej), co powoduje blisko 3-krotny wzrost intensywności sygnału sondy bez dodatkowego wpływu na kinetykę reakcji hybrydyzacji i swoistość sondy.
MAR-FISH (<i>FISH-microautoradiography</i>)	Metoda stanowi połączenie dwóch metod <i>in situ</i> : mikroautoradiografii i FISH. Podejście MAR-FISH opiera się na wykorzystaniu podłoża zawierającego w swoim składzie znakowane radioizotopowo substraty organiczne i nieorganiczne (¹⁴ C, ³ H, ³⁵ S itp.), których umiejscowienie określa się na podstawie obserwacji mikroskopowych. W połączeniu z metodą FISH można uzyskać obraz poboru określonych substratów zawartych w próbce.

Ilościowe zmiany populacji mikroorganizmów występujących w środowiskach zanieczyszczonych węglowodorami, zwłaszcza WWA, mogą być monitorowane za pomocą techniki FISH [5, 8, 49]. W większości przypadków jednak techniki FISH są stosowane w połączeniu z technikami *fingerprint*, takimi jak DGGE [11, 43, 58] czy T-RFLP [20, 28].

Mikromacierze DNA (chipy DNA)

Mikromacierze DNA (inaczej chipy genowe lub czujniki DNA) zyskały ogromną popularność wraz z zastosowaniem ich w badaniach profilu ekspresji genów, ze względu na możliwość śledzenia tysięcy reakcji zachodzących na poziomie molekularnym na plastikowym nośniku o wymiarach nie większych niż szkiełko przykrywkowe. Mikromacierze DNA stanowią dwuwymiarowy układ sond molekularnych umieszczonych na stałym podłożu w ściśle określonym porządku. Zasada ich działania jest stosunkowo prosta i opiera się, podobnie jak w technice FISH, na zasadzie hybrydyzacji komplementarnych fragmentów kwasów nukleinowych. Sondy DNA o znanej sekwencji nukleotydowej umieszczone są na stałym podłożu, na które następnie nakłada się wyznakowaną fluorescencyjnie próbkę, pochodzącą z badanego materiału biologicznego. Na podłożu można nanieść jednorazowo kilka tysięcy sond, dzięki czemu w jednym eksperymencie można zbadać ekspresję kilkuset, a nawet i tysięcy genów.

Ze względu na budowę, sposób otrzymywania oraz zasadę działania wyróżnia się dwa rodzaje mikromacierzy: (1) mikromacierze cDNA i (2) mikromacierze oligonukleotydowe. Zasadnicza różnica pomiędzy tymi dwoma systemami dotyczy długości zastosowanych sond.

Mikromacierze oligonukleotydowe nazywane są macierzami oligonukleotydowymi o wysokiej gęstości bądź chipami DNA, co nawiązuje do systemu Genechip, stosowanego do ich syntezy. Charakteryzują się one wysoką specyficznością, umożliwiając odróżnienie nici sensownych od antysensownych czy wykazanie różnych wariantów składania genu (*splicing*). Z drugiej strony, opracowanie tego typu mikromacierzy wymaga znajomości sekwencji i organizacji genomu, co powoduje wzrost kosztów produkcji. Długość sond w przypadku tej technologii wynosi 10÷80 par zasad, przy czym dłuższe sondy są bardziej swoiste dla poszczególnych genów docelowych. Wśród sond zaznacza się podział na dwie kategorie: długie (około 70 merów) i krótkie (20÷25-merowe).

Te pierwsze uzyskuje się w reakcjach zachodzących w syntetyzerach, a następnie nadrukowuje się je na płytkę. Technologia produkcji krótkich sond opiera się na sterowanej światłem syntezie chemicznej *in situ* (synteza fotolitograficzna), połączonej z jednoczesną immobilizacją produktu na podłożu stałym. W konsekwencji uzyskuje się płytki o bardzo dużej gęstości zadruku. Dodatkową zaletą stosowania tych macierzy jest ominięcie etapu PCR. Macierze oligonukle-

otyldowe są powszechnie stosowane w detekcji mutacji, monitorowaniu ekspresji czy mapowaniu genu.

W przypadku mikromacierzy cDNA stosunkowo długie cząsteczki DNA (500÷5000 par zasad) automatycznie nadrukowywane są na powierzchni szkła czy silikonu. Sondy takie uzyskuje się w wyniku klonowania produktów reakcji odwrotnego PCR (RT-PCR), stosując chromosomalny DNA jako matrycę, a następnie sondy poddaje się oczyszczeniu (np. metodą filtracji żelowej) [4]. W obecnych warunkach rozwoju techniki na powierzchnię odpowiednio przygotowanego szkiełka mikroskopowego nanosi się do około 25 tys. sond cDNA. Niewątpliwie zaletą tej metody jest możliwość badania ekspresji genów bez znajomości ich pełnej sekwencji, choć konieczne jest zastosowanie odpowiednich klonów DNA. Omawiany typ mikromacierzy jest bardziej powszechny i znacznie tańszy w porównaniu z chipami DNA. Dodatkowo istnieje możliwość modyfikowania składu tych mikromacierzy poprzez nadrukowywanie nowych sond cDNA w miarę poznawania mechanizmów ekspresji genów w analizowanym mikroorganizmie.

Poza przedstawionymi powyżej systemami istnieją inne, mniej spopularyzowane, jak np. system Luminex, wykorzystujący powierzchnię mikrokuleczek jako miejsce immobilizacji oligonukleotydów, które poddaje się hybrydyzacji ze znakowanym fluorescencyjnie RNA.

Zastosowanie mikromacierzy zakłada następujące etapy [23]:

- 1) syntezę sond DNA i ich immobilizację na powierzchni stałego podłoża,
- 2) izolację i fluorescencyjne wyznaczenie próbki z analizowanego preparatu (materiału),
- 3) hybrydyzację,
- 4) zebranie i ocenę uzyskanych wyników.

Intensywność sygnału pochodzącego od poszczególnych sond jest wprost proporcjonalna do ilości komplementarnej sekwencji kwasu nukleinowego występującej w analizowanej próbce.

Najczęstszym zastosowaniem mikromacierzy jest badanie różnic w ekspresji genów jako funkcji dowolnych zmiennych. W literaturze można znaleźć przykłady wykorzystania tego narzędzia w wykrywaniu bakterii, w badaniach bioróżnorodności mikroorganizmów czy ekspresji genów w obrębie czystych kultur [10], jak i próbek środowiskowych. Jednak w przypadku tych ostatnich uzyskiwany obraz jest niezwykle skomplikowany i jego prawidłowa interpretacja wymaga dużego doświadczenia. Mikromacierze DNA są również wykorzystywane do poszukiwania genów uczestniczących w różnych procesach metabolicznych, dostarczając w ten sposób informacji o różnorodności funkcjonalnej. Opracowanie takiej platformy wymaga jednak zastosowania specyficznych sond tarczy. Ten rodzaj mikromacierzy został zastosowany

m.in. w badaniach procesów biodegradacji węglowodorów. Celem tych badań była detekcja genów kodujących mono- i dioksygenazę benzenu [19] czy genów kodujących enzymy związane z metabolizmem naftalenu [48]. Opierając się na dotychczasowych aplikacjach opisywanej metody i biorąc jako kryterium podziału typ użytych sond, wyróżnia się trzy dominujące typy mikromacierzy DNA stosowane w badaniach środowiskowych: (1) macierze dedykowane grupie genów funkcjonalnych (FGA – *functional gene array*), (2) macierze zawierające cały genomowy DNA (CGA – *community genome array*), (3) macierze oligonukleotydowe filogenetyczne (PGA – *phylogenetic oligonucleotide array*). FGA projektowane są w taki sposób, aby zawierać sondy komplementarne do genów kodujących kluczowe enzymy biorące udział w różnorodnych procesach zachodzących w środowisku, np. degradacji ksenobiotyków, redukcji siarczanów czy denitryfikacji. Taki rodzaj platform wykorzystywany jest w określeniu funkcjonalnej aktywności populacji mikroorganizmów w środowisku. Przykładowo Nyssönen i in. [42] w badaniach dotyczących drobnoustrojów wykazujących zdolności rozkładu WWA zaproponowali zastosowanie niewielkiej mikromacierzy DNA, zawierającej 15 sond. Mikroorganizmy zostały wyizolowane ze środowiska wodnego, silnie skażonego tym typem ksenobiotyków. Sekwencje zastosowanych sond były komplementarne do sekwencji genów pośrednio związanych z biodegradacją węglowodorów. Na podstawie analizy PCR-DGGE określono filogenetyczną przynależność uzyskanych izolatów, wśród których dominowali przedstawiciele klas β -, γ -*Proteobacteria*, rodziny *Bacteroidaceae* oraz rodzaju *Clostridium*. Ponadto potwierdzono obecność genów uczestniczących w różnych etapach biodegradacji WWA, wskazując na istnienie wewnętrznego potencjału biodegradacyjnego. Podobnie Yergeau i in. [63], wykorzystując mikromacierz zbudowaną ze 140 produktów amplifikacji PCR genów związanych z degradacją m.in. alkanów, związków aromatycznych czy redukcją metali, stwierdzili obecność aż 132 tego typu genów w analizowanych próbkach gleby pochodzących z kanadyjskiej stacji arktycznej Alert. Dodatkowo badacze zaobserwowali zależność pomiędzy występowaniem genów degradacji alkanów, fenolu, izopropylbenzenu w próbkach zanieczyszczonych z Alert, podczas gdy geny związane z degradacją katecholu czy toluenu ujawniły się w przypadku próbek gleby nieskażonej. PGA należą do klasy macierzy oligonukleotydowych i z powodzeniem wykorzystywane są do analizy składu i struktury zespołów drobnoustrojów występujących w środowisku. Mikromacierze CGA są doskonałym narzędziem do charakterystyki zespołów mikroorganizmów i opisywania poszczególnych drobnoustrojów na tle grup, w których one naturalnie występują. Tutaj wymagane jest posiadanie całego genomowego DNA, który

został wyizolowany z czystych kultur mikroorganizmów. Niestety, takie podejście obarczone jest wadami, wynikają-

cymi z posiadania dających się hodować mikroorganizmów na etapie przygotowania macierzy.

Tablica 2. Zalety i ograniczenia niektórych metod molekularnych stosowanych w badaniach ekspresji genetycznej drobnoustrojów glebowych [26]

Metoda	Typ informacji, zalety i wady metody	Zastosowanie
Fluorescencyjna hybrydyzacja <i>in situ</i> (FISH)	Identyfikacja i ilościowe oznaczenie aktywnych metabolicznie mikroorganizmów <i>in situ</i> . Ograniczenia: (1) fluorescencja tła, zwłaszcza w przypadku próbek gleby, zaburza uzyskanie prawidłowego obrazu aktualnego stanu mikrobiologicznego badanego ekosystemu, (2) w przypadku standardowej metody FISH jedynie ograniczona liczba sond może zostać jednorazowo użyta w pojedynczym eksperymencie.	(1) Detekcja, identyfikacja oraz ilościowa ocena aktywnych metabolicznie mikroorganizmów (posiadających aktywne rRNA). (2) Analiza porównawcza zmian struktury zespołu mikroorganizmów w wyniku skażenia gleby ksenobiotykami.
PCR-T-RFLP	Skład zespołu mikroorganizmów oraz oznaczenie względnej liczby dominujących drobnoustrojów. Ograniczenie: wymagane jest użycie wielu enzymów restrykcyjnych, aby zobrażać populację mikroorganizmów.	Porównawcza analiza rozmieszczenia populacji, monitoring zmian w składzie zespołu wszystkich mikroorganizmów.
Techniki <i>fingerprint</i> PCR-DGGE/TGGE	Genetyczny „odcisk palca”, uzyskanie profilu zespołów mikroorganizmów, określenie przynależności dominujących mikroorganizmów poprzez sekwencjonowanie wybranych prążków. Ograniczenia: (1) informacja dotycząca sekwencji populacji mikroorganizmów jest ograniczona do fragmentu 500 par zasad 16S rRNA, (2) występowanie wielu prążków na wzorach związane z heterogenicznością w obrębie 16S rRNA.	Porównawcza analiza rozmieszczenia populacji, określenie przestrzennych i czasowych zmian w składzie zespołów mikroorganizmów. Obecnie DGGE uznaje się jako rutynową metodę <i>fingerprint</i> .
Mikromacierze DNA	Zapewnia równoległe uzyskanie informacji dotyczącej różnorodności na poziomie filogenetycznym i funkcjonalnym. Ograniczenia: (1) występowanie hybrydyzacji krzyżowych (<i>cross-hybridization</i>) pomiędzy sekwencjami o niskiej homologii, (2) brak specyficzności i niska czułość metody.	Umożliwia uzyskanie obrazu analizowanej gleby <i>in situ</i> .

Podsumowanie

Gleba to układ wysoce złożony i bogaty pod względem mikrobiologicznym. Powszechnie stosowane metody molekularne pozwalają śledzić zmiany bioróżnorodności mikrobiologicznej tego środowiska oraz dostarczają informacji dotyczącej drobnoustrojów niedających się hodować. Jednak ograniczenia stosowania tych metod, wymienione w tablicy 2, umożliwiają jedynie częściowy opis danego aspektu tej złożoności.

Skażenie gleby substancjami ropopochodnymi powoduje zmianę populacji mikroorganizmów. Tym samym zrozumienie procesów bioremediacji zachodzących w skażonym środowisku wymaga zastosowania wyrafinowanych technik diagnostycznych, m.in. molekularnych metod mikrobiologicznych. Ich dynamiczny rozwój umożliwił poszerzenie dotychczasowego stanu wiedzy w zakresie złożoności oddziaływań między mikroorganizmami oraz ich różnorodności funkcjonalnej w procesach bioremediacji środowisk skażonych substancjami ropopochodnymi. Metody te są z powodzeniem stosowane

w badaniach monitoringowych postępu usuwania ksenobiotyków, co dodatkowo przyczynia się do zwiększenia świadomości i wzrostu społecznej akceptacji dla procesów sterowanych biologicznie. Tym samym zrozumienie ekologicznych zależności między autochtonicznymi i allochtonicznymi szczepami uczestniczącymi w procesach degradacji jest konieczne, aby w sposób przemyślany kontrolować zabiegi biooczyszczania. Przy obecnym stanie wiedzy oraz uwzględniając ograniczenia techniczne, niemożliwe jest uzyskanie pełnej, jednoznacznej informacji dotyczącej oddziaływań między tymi drobnoustrojami. Aby rozwiązać ten problem, proponuje się wybór szczepu docelowego (*target strain*), który następnie zostanie wyznakowany przed zmieszaniem z innymi mikroorganizmami. Omawiany zabieg umożliwi śledzenie zmian aktywności fizjologicznej i biochemicznej (adaptacja do określonych warunków środowiskowych lub jej brak), co pozwoli ocenić potencjalną rolę, jaką odgrywa ten mikroorganizm.

Skróty:

ARDRA (*amplified ribosomal DNA restriction analysis*) – analiza amplifikowanych fragmentów rybosomalnego DNA
BTEX (*benzene, toluene, ethylbenzene, xylene*) – benzen, toluen, etylobenzen, ksylen
cDNA – komplementarny DNA
DAPI – 4',6-diamidyno-2-fenylindol
DGGE/TGGE (*denaturing/temperature gradient gel electrophoresis*) – elektroforeza w gradiencie czynnika denaturującego (DGGE), elektroforeza w gradiencie temperatury (TGGE)
DNA – kwas deoksyrybonukleinowy
dNTP – trifosforany deoksynukleotydów
MEOR (*microbial enhanced oil recovery*) – mikrobiologiczne wspomaganie wydobycia ropy naftowej
nested PCR – zagnieżdżony PCR

PCR (*polymerase chain reaction*) – reakcja łańcuchowa polimerazy

RAPD (*random amplified polymorphic DNA*) – losowo amplifikowany polimorficzny DNA

Real-time PCR – reakcja PCR w czasie rzeczywistym

RISA (*ribosomal intergenic spacer analysis*) – analiza rybosomalnych sekwencji międzygenowych

RT-PCR (*reverse transcription PCR*) – odwrotna transkrypcja połączona z łańcuchową reakcją polimerazy

SSCP (*single-strand conformation polymorphism*) – polimorfizm konformacji pojedynczej nici DNA

T-RFLP (*terminal restriction fragment length polymorphism*) – polimorfizm długości terminalnych fragmentów restrykcyjnych

WWA – wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne

VBNC (*viable but nonculturable*) – żywe, lecz niedające się hodować (drobnoustroje)

Prosimy cytować jako: Nafta-Gaz 2013, nr 11, s. 829–842

Artykuł powstał w ramach realizacji pracy statutowej INIG (DK-4100-55/12), finansowanej przez MNiSW.

Literatura

- [1] Alonso-Gutierrez J., Teramoto M., Yamazoe A., Harayama S., Figueras A., Novoa B.: *Alkane-degrading properties of Dietzia sp. HOB, a key player in the Prestige oil spill biodegradation*. Journal of Applied Microbiology 2011, vol. 111, pp. 800–810.
- [2] Amann R., Fuchs B. M.: *Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence in situ hybridization techniques*. Nature Reviews Microbiology 2008, vol. 6, pp. 339–348.
- [3] Baldwin B., Nakatsu C., Nies L.: *Detection and enumeration of aromatic oxygenase genes by multiplex and real-time PCR*. Applied and Environmental Microbiology 2003, vol. 69, pp. 3350–3358.
- [4] Bodrossy L.: *Diagnostic oligonucleotide microarrays for microbiology*. [W:] Blalock E. (ed.): *A Beginner's Guide to Microarrays*. New York, Kluwer Academic Publishers, 2003, pp. 43–92.
- [5] Brakstad O. G., Bonaunet K.: *Biodegradation of petroleum hydrocarbons in seawater at low temperatures (0-5 degrees C) and bacterial communities associated with degradation*. Biodegradation 2006, vol. 17, pp. 71–82.
- [6] Byrd J. J., Xu H. S., Colwell R. R.: *Viable but nonculturable bacteria in drinking water*. Applied and Environmental Microbiology 1991, vol. 57, pp. 875–878.
- [7] Cavalca L., Dell'Amico E., Andreoni V.: *Intrinsic bioremediability of an aromatic hydrocarbon-polluted groundwater: diversity of bacterial population and toluene monooxygenase genes*. Applied Microbiology and Biotechnology 2004, vol. 64, pp. 576–587.
- [8] Christensen N., Batstone D. J., He Z., Angelidaki I., Schmidt J. E.: *Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from sewage sludge by anaerobic degradation*. „Water Science and Technology” 2004, vol. 50, pp. 237–244.
- [9] Davis K. E. R., Joseph S. J., Janssen P. H.: *Effects of growth medium, inoculum size, and incubation time on culturability and isolation of soil bacteria*. Applied and Environmental Microbiology 2005, vol. 71, pp. 826–834.
- [10] de los Reyes F., Ritter W., Raskin L.: *Group-specific small-subunit rRNA hybridization probes to characterize filamentous foaming in activated sludge systems*. Applied and Environmental Microbiology 1997, vol. 63, pp. 1107–1117.
- [11] Ebie Y., Matsumura M., Noda N., Tsuneda S., Hirata A., Inamori Y.: *Community analysis of nitrifying bacteria in an advanced and compact Gappei-Johkasou by FISH and PCR-DGGE*. Water Science and Technology 2002, vol. 46, pp. 105–111.
- [12] Eickhorst T., Tippkoetter R.: *Detection of microorganisms in undisturbed soil by combining fluorescence in situ hybridization (FISH) and micropedological methods*. Soil Biology and Biochemistry 2008, vol. 40, pp. 1284–1294.
- [13] Eickhorst T., Tippkoetter R.: *Improved detection of soil microorganisms using fluorescence in situ hybridization (FISH) and catalyzed reporter deposition (CARD-FISH)*. Soil Biology and Biochemistry 2008, vol. 40, pp. 1883–1891.
- [14] Eriksson M., Sodersten E., Yu Z., Dalhammar G., Mohn W. W.: *Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons at low temperature under aerobic and nitrate-reducing conditions in enrichment cultures from northern soils*. Applied and Environmental Microbiology 2003, vol. 69, pp. 275–84.
- [15] Grace Liu P. W., Chang T. C., Whang L. M., Kao C. H., Pan P. T., Cheng S. S.: *Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil: Effects of strategies and microbial community shift*. International Biodeterioration & Biodegradation 2011, vol. 65, pp. 1119–1127.
- [16] Guo C., Dang Z., Wong Y., Tam F. T.: *Biodegradation ability and dioxygenase genes of PAH-degrading Sphingomonas and Mycobacterium strains isolated from mangrove sediments*. International Biodeterioration & Biodegradation 2010, vol. 64, pp. 419–426.

- [17] Hendrickx B., Dejonghe W., Faber F., Boenne W., Bastiaens L., Verstraete W.: *PCR-DGGE method to assess the diversity of BTEX mono-oxygenase genes at contaminated sites*. FEMS Microbiology Ecology 2006, vol. 55, pp. 262–273.
- [18] Hilyard E. J., Jones-Meehan J. M., Spargo B. J., Hill R. T.: *Enrichment, isolation, and phylogenetic identification of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria from Elizabeth River sediments*. Applied and Environmental Microbiology 2008, vol. 74, pp. 1176–1182.
- [19] Iwai S., Kurisu F., Urakawa H., Yagi O., Kasuga I., Furimai H.: *Development of an oligonucleotide microarray to detect di-and monoxygenase genes for benzene degradation in soil*. FEMS Microbiology Letters 2008, vol. 285, pp. 111–121.
- [20] Jardillier L., Boucher D., Personnic S., Jacquet S., Thenot A., Sargos D.: *Relative importance of nutrients and mortality factors on prokaryotic community composition in two lakes of different trophic status: microcosm experiments*. FEMS Microbiological Ecology 2005, vol. 53, pp. 429–443.
- [21] Ji S. C., Kim D., Yoon J. H., Lee C. H.: *Metagenomic Analysis of BTEX-Contaminated Forest Soil Microcosm*. Journal of Microbiology and Biotechnology 2007, vol. 17, pp. 668–672.
- [22] Kao C. M., Chen C. S., Tsa F. Y., Yang K. H., Chien C. C., Liang S. H., Yang C. A., Chen S. C.: *Application of real-time PCR, DGGE fingerprinting and culture-based method to evaluate the effectiveness of intrinsic bioremediation on the control of petroleum-hydrocarbon plume*. Journal of Hazardous Materials 2010, vol. 178, pp. 409–416.
- [23] Karczmarczyk M., Bartoszcze M.: *Mikromacierze DNA – nowe narzędzie w wykrywaniu czynników biologicznych*. Przegląd Epidemiologiczny 2006, vol. 60, s. 803–811.
- [24] Katsivela E., Moore E. R., Kalogerakis N.: *Biodegradation of aliphatic and aromatic hydrocarbons: specificity among bacteria isolated from refinery waste sludge*. Water, Air and Soil Pollution 2003, vol. 3, pp. 103–115.
- [25] Katsivela E., Moore E. R., Maroukli D., Stroempl C., Pieper D., Kalogerakis N.: *Bacterial community dynamics during in-situ bioremediation of petroleum waste sludge in landfarming sites*. Biodegradation 2005, vol. 16, pp. 169–180.
- [26] Kirk J., Beaudette L., Hart M., Moutoglis P., Klironomos J., Lee H., Trevors J.: *Methods of studying soil microbial diversity*. Journal of Microbiological Methods 2004, vol. 58, pp. 169–188.
- [27] Kostka J. E., Prakash O., Overholt W. A., Green S. J., Freyer G., Canion A., Delgado J., Norton N., Hazen T. C., Huettel M.: *Hydrocarbon-degrading bacteria and the bacterial community response in Gulf of Mexico beach sands impacted by the deep horizon oil spill*. Applied and Environmental Microbiology 2011, vol. 77, pp. 7962–7974.
- [28] Kotsyurbenko O. R., Chin K. J., Glagolev M. V., Stubner S., Simankova M. V., Nozhevnikova A. N.: *Acetoclastic and hydrogenotrophic methane production and methanogenic populations in an acidic West-Siberian peat bog*. Environmental Microbiology 2004, vol. 6, pp. 1159–1173.
- [29] Kumar Y., Westram R., Kipfer P., Meier H., Ludwig W.: *Evaluation of sequence alignments and oligonucleotide probes with respect to the three-dimensional structure of ribosomal RNA using ARB software package*. BMC Bioinformatics 2006, vol. 7, p. 240, doi:10.1186/1471-2105-7-240.
- [30] Lee N., Nielsen P., Andreasen K., Juretschko S., Nielsen J., Schleifer K. H., Wagner M.: *Combination of fluorescent in situ hybridization and microautoradiography – a new tool for structure-function analyses in microbial ecology*. Applied and Environmental Microbiology 1999, vol. 65, pp. 1289–1297.
- [31] Leys N. M. E., Ryngaert A., Bastiaens L., Verstraete W., Top E. M., Springael D.: *Occurrence and phylogenetic diversity of Sphingomonas strains in soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons*. Applied and Environmental Microbiology 2004, vol. 70, pp. 1944–1955.
- [32] Liu C., Wang W., Wu Y., Zhou Z., Lai Q., Shao Z.: *Multiple alkane hydroxylase systems in a marine alkane degrader, Alcanivorax dieselolei B-5*. Environmental Microbiology 2011, vol. 13, pp. 1168–1178.
- [33] Liu H. J., Yang C. Y., Tian Y., Lin G. H., Zheng T. L.: *Screening of PAH-degrading bacteria in a mangrove swamp using PCR-RFLP*. Marine Pollution Bulletin 2010, vol. 60, pp. 2056–2061.
- [34] Ludwig W., Strunk O., Westram R., Richter L., Meier H., Yadhu Kumar, Buchner A., Lai T., Steppi S., Jobb G., Forster W., Brettske I., Gerber S., Ginhart A. W., Gross O., Grumann S., Hermann S., Jost R., Koenig A., Liss T., Luessmann R., May M., Nonhoff B., Reichel B., Strehlow R., Stamatakis A., Stuckmann N., Vilbig A., Lenke M., Ludwig T., Bode A., Schleifer K. H.: *ARB: a software environment for sequence data*. Nucleic Acids Research 2004, vol. 25, pp. 1363–1371.
- [35] Luo Y. R., Tian Y., Huang X., Yan C. L., Hong H. S., Lin G. H., Zheng T. L.: *Analysis of community structure of a microbial consortium capable of degrading benzo(a)pyrene by DGGE*. Marine Pollution Bulletin 2009, vol. 58, pp. 1159–1163.
- [36] Mao J., Luo Y., Teng Y., Li Z.: *Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil by a bacterial consortium and associated microbial community changes*. International Biodeterioration & Biodegradation 2012, vol. 70, pp. 141–147.
- [37] Miralles G., Grossi V., Acquaviva M., Duran R., Bertrand J. C., Cuny P.: *Alkane biodegradation and dynamics of phylogenetic subgroups of sulfate-reducing bacteria in an anoxic coastal marine sediment artificially contaminated with oil*. Chemosphere 2007, vol. 68, pp. 1327–1334.
- [38] Muehling M., Woolven-Allen J., Murrell J. C., Joint I.: *Improved group-specific PCR primers for denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the genetic diversity of complex microbial communities*. The ISME Journal 2008, vol. 2, pp. 379–392.
- [39] Muyzer G., de Waal E. C., Uitterlinden A. G.: *Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16S rRNA*. Applied and Environmental Microbiology 1993, vol. 59, pp. 695–700.
- [40] Muyzer G., Smalla K.: *Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology*. Antonie van Leeuwenhoek 1998, vol. 73, pp. 127–141.
- [41] Muyzer G.: *DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems*. Current Opinion in Microbiology 1999, vol. 2, pp. 317–322.
- [42] Nyyssönen M., Kapanen A., Piskonen R., Lukkari T., Itävaara M.: *Functional genes reveal in the intrinsic PAH biodegradation potential in creosote-contaminated groundwater following in situ biostimulation*. Applied Microbiology and Biotechnology 2009, vol. 84, pp. 169–182.
- [43] Onda S., Hiraishi A., Matsuo Y., Takii S.: *Polyphasic approaches to the identification of predominant polyphosphate-accumulating organisms in a laboratory-scale anaerobic/aerobic activated sludge system*. Journal of General and Applied Microbiology 2002, vol. 48, pp. 43–54.

- [44] Paisse S., Goni-Urriza M., Coulon F., Duran R.: *Are alkane hydroxylase genes (alkB) relevant to assess petroleum bioremediation processes in chronically polluted coastal sediments?* Applied Microbiology and Biotechnology 2011, vol. 92, pp. 835–844.
- [45] Perez-de-Mora A., Engel M., Schloter M.: *Abundance and diversity of n-alkane-degrading bacteria in a forest soil co-contaminated with hydrocarbons and metals: a molecular study on alkB homologous genes.* Microbial Ecology 2011, vol. 62, pp. 959–972.
- [46] Powell S. M., Ferguson S. H., Bowman J. P., Snape I.: *Using real-time PCR to assess changes in the hydrocarbon-degrading microbial community in Antarctic soil during bioremediation.* Microbial Ecology 2006, vol. 52, pp. 523–532.
- [47] Rastogi G., Sani R. K.: *Molecular Techniques to Assess Microbial Community Structure, Function, and Dynamics in the Environment.* Microbes and Microbial Technology 2011, vol. 2, pp. 29–57.
- [48] Rhee S. K., Liu X., Wu L., Chong S. C., Wan X., Zhou J.: *Detection of genes involved in biodegradation and biotransformation in microbial communities by using 50-mer oligonucleotide microarrays.* Applied and Environmental Microbiology 2004, vol. 70, pp. 4303–4317.
- [49] Rogers S. W., Ong S. K., Moorman T. B.: *Mineralization of PAHs in coal-tar impacted aquifer sediments and associated microbial community structure investigated with FISH.* Chemosphere 2007, vol. 69, pp. 1563–1573.
- [50] Rosano-Hernandez M. C., Ramirez-Saad H., Fernandez-Linares L.: *Petroleum-influenced beach sediments of the Campeche Bank, Mexico: diversity and bacterial community structure assessment.* Journal of Environmental Management 2012, vol. 95, pp. S325–S331.
- [51] Said O. B., Goni-Urriza M., Bour M. E., Aissa P., Duran R.: *Bacterial community structure of sediments of the Bizerte lagoon (Tunisia), a southern Mediterranean coastal anthropized lagoon.* Microbial Ecology 2010, vol. 59, pp. 445–456.
- [52] Schmidt H., Eickhorst T., Tippkoetter R.: *Evaluation of tyramide solutions for an improved detection and enumeration of single microbial cells in soil by CARD-FISH.* Journal of Microbiological Methods 2012, vol. 91, pp. 399–405.
- [53] Shen F. T., Ho M. J., Huang H. R., Arun A. B., Rekha P. D., Young C.: *Molecular detection and phylogenetic characterization of Gordonia species in heavy-oil contaminated soils.* Research in Microbiology 2008, vol. 159, pp. 522–529.
- [54] Singh B. K., Campbell C. D., Sorenson S. J., Zhou J.: *Soil genomics.* Nature Reviews Microbiology 2009, vol. 7, p. 756.
- [55] Steliga T., Jakubowicz P., Kapusta P.: *Optimisation research of petroleum hydrocarbon biodegradation in weathered drilling wastes from waste pits.* Waste Management and Research 2010, vol. 28, s. 1065–1075.
- [56] Steliga T., Kapusta P., Jakubowicz P.: *Effectiveness of bioremediation processes of hydrocarbon pollutants in weathered drill wastes.* Water, Air, and Soil Pollution 2009, vol. 202, s. 211–228.
- [57] Stoecker K., Dorninger C., Daims H., Wagner M.: *Double labeling of oligonucleotide probes of fluorescence in situ hybridization (DOPE-FISH) improves signal intensity and increases rRNA accessibility.* Applied and Environmental Microbiology 2010, vol. 76, pp. 922–926.
- [58] Straub K. L., Buchholz-Cleven B. E.: *Enumeration and detection of anaerobic ferrous iron-oxidizing, nitrate-reducing bacteria from diverse European sediments.* Applied and Environmental Microbiology 1998, vol. 64, pp. 4846–4856.
- [59] Teira E., Lekunberri I., Gasol J. M., Nieto-Cid M., Alvarez-Salgado X. A., Figueiras F. G.: *Dynamics of the hydrocarbon-degrading Cycloclasticus bacteria during mesocosm-simulated oil spills.* Environmental Microbiology 2007, vol. 9, pp. 2551–2562.
- [60] Tischer K., Zeder M., Klug R., Pernthaler J., Schattenhofer M., Harms H., Wendeberg A.: *Fluorescence in situ hybridization (CARD-FISH) of microorganisms in hydrocarbon contaminated aquifer sediment samples.* Systematic and Applied Microbiology 2012, vol. 35, pp. 526–532.
- [61] Wagner M., Horn M., Daims H.: *Fluorescence in situ hybridization for the identification and characterisation of prokaryotes.* Current Opinion in Microbiology 2003, vol. 6, pp. 302–309.
- [62] Wasmund K., Burns K. A., Kurtboeke D. I., Bourne D. G.: *Novel alkane hydroxylase gene (alkB) diversity in sediments associated with hydrocarbon seeps in the Timor Sea, Australia.* Applied and Environmental Microbiology 2009, vol. 75, pp. 7391–7398.
- [63] Yergeau E., Arbour M., Brousseau R., Juck D., Lawrence J. R., Masson L., Whyte L. G., Greer C. W.: *Microarray and real-time PCR analyses of the responses of high-arctic soil bacteria to hydrocarbon pollution and bioremediation treatments.* Applied and Environmental Microbiology 2012, vol. 75, pp. 6258–6267.
- [64] Yuliani H., Sahlan M., Hermansyah H., Wijanarko A.: *Selection and identification of polyaromatic hydrocarbon degrading bacteria.* World Applied Sciences Journal 2012, vol. 20, pp. 1133–1138.
- [65] Zwirgmaier K., Ludwig W., Schleifer K. H.: *Recognition of individual genes in a single bacterial cell by fluorescence in situ hybridization – RING-FISH.* Molecular Microbiology 2004, vol. 51, pp. 89–96.



Dr Piotr KAPUSTA
 Adiunkt; kierownik Zakładu Mikrobiologii.
 Instytut Nafty i Gazu
 ul. Lubicz 25A
 31-503 Kraków
 E-mail: piotr.kapusta@inig.pl



Mgr Joanna BRZESZCZ
 Asystent w Zakładzie Mikrobiologii.
 Instytut Nafty i Gazu
 ul. Lubicz 25A
 31-503 Kraków
 E-mail: joanna.brzeszcz@inig.pl



Dr Anna TURKIEWICZ
 Adiunkt w Zakładzie Mikrobiologii.
 Instytut Nafty i Gazu
 ul. Lubicz 25A
 31-503 Kraków
 E-mail: turkiewicz@inig.pl