

## VYUŽITÍ ZNAČENÍ STABILNÍMI ISOTOPY PRO DETEKCI MIKROORGANISMŮ AKTIVNÍCH PŘI DEGRADACI XENOBIOTIK

ONDŘEJ UHLÍK<sup>a,b</sup>, KATEŘINA JEČNÁ<sup>a</sup>,  
MARTINA MACKOVÁ<sup>a</sup>, MARY BETH LEIGH<sup>c</sup>,  
KATEŘINA DEMNEROVÁ<sup>a</sup> a TOMÁŠ MACEK<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 3, 166 28 Praha 6, <sup>b</sup> Ústav organické chemie a biochemie, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6, <sup>c</sup> Institute of Arctic Biology, University of Alaska Fairbanks, 902 Koyukuk Dr., Fairbanks, AK 99775-7000  
ondrej.uhlik@seznam.cz

Došlo 24.9.07, přijato 3.12.07.

Klíčová slova: bioremediace, životní prostředí, xenobiotika, stabilní isotopy

### Obsah

1. Úvod
2. Metody identifikace mikroorganismů založené na kultivaci
3. Metody identifikace mikroorganismů nezávislé na kultivaci
4. Značení stabilními isotopy
  - 4.1. Značení stabilními isotopy s následnou analýzou nukleových kyselin
  - 4.2. Studium diversity mikrobiálních populací aktivních při degradaci xenobiotik
  - 4.3. Analýza funkčních genů
5. Závěr

### 1. Úvod

Mikroorganismy a jejich aktivity získávají stále větší pozornost v různých oblastech lidské činnosti. Jsou středem zájmu jak z hlediska jejich pozitivního působení, které lze využít v řadě odvětví, tak i z hlediska negativních aktivit způsobujících nemoci, kažení a rozklad potravin, korozi atd. Velmi důležitá je aktivita mikroorganismů v souvislosti s jejich úlohou v životním prostředí, kdy se účastní rozkladu organické hmoty, koloběhu základních prvků, a tím udržování rovnováhy prostředí. Jejich metabolické aktivity jsou rozsáhlé a mohou být i do jisté míry a relativně velmi rychle přizpůsobovány podmínkám daného prostředí. V této souvislosti lze připomenout i schopnost řady mikroorganismů přežít v prostředí kontaminovaném toxickými látkami (xenobiotiky) a schopnost tyto látky využít<sup>1</sup>. Existuje mnoho mikroorganismů schop-

ných v různé míře degradovat perzistentní organické polutanty. Na remediaci životního prostředí se často podílí i rostliny (tzv. fytofarmacie); velmi významná je jejich vzájemná spolupráce s mikroorganismy v rhizosférní oblasti (tzv. rhizoremediace)<sup>1–4</sup>.

Studium mikrobiální diversity daného prostředí a vlastností mikroorganismů, jejich izolace, charakterizace a správná identifikace byly vždy problémem, v němž se odrážela především nedokonalost technik dostupných a používaných při mikrobiální analýze. S nástupem molekulárně biologických metod se situace zlepšila. Charakterizaci mikrobiálních populací a identifikaci mikroorganismů je možné provádět po přímé izolaci DNA mikroorganismů obsažených ve zkoumaném vzorku. Metabolické aktivity jsou však zjišťovány zvlášť, a to po izolaci a kultivaci daných druhů, kdy lze získat obrázek o vlastnostech daného druhu. V současné době jsou stále ještě používány pro charakterizaci mikroorganismů biochemické testy ověřující schopnost mikroorganismu využít běžně dostupné substráty nebo přítomnost určitého enzymu. Výsledky těchto testů však poskytují informace s nízkou vypovídací hodnotou o skutečném chování organismu v životním prostředí, kde je mikroorganismus vystaven celé řadě vlivů, mimo jiné i přítomnosti xenobiotik, existenci konkurenčních mikroorganismů soutěžících o zdroje živin, energie atd.

Použitím klasických kultivačních metod lze v laboratoři izolovat a identifikovat pouze zlomek mikroorganismů skutečně přítomných v životním prostředí. Bylo zjištěno, že kultivačně může být izolováno pouze 1–10 % populace půdních bakterií<sup>5</sup>. S cílem překonat problémy spojené s kultivací byla vyvinuta řada postupů pro identifikaci a studium mikroorganismů na základě analýzy mastných kyselin, DNA a RNA. Možnost taxonomického zařazení poskytují metody založené na izolaci mikrobiální DNA přímo z přírodního materiálu, následné amplifikaci úseku kódujícího 16S rRNA pomocí polymerasové řetězové reakce (PCR – polymerase chain reaction), sekvenaci tohoto úseku a srovnání primární struktury s údaji dostupnými v databázích. Rozdíly v sekvencích molekul 16S rRNA (v případě eukaryot pak molekul 18S rRNA) jsou považovány za ukazatele mikrobiální diversity, neboť jejich struktura je vysoce konzervovaná a typická pro každý mikrobiální druh<sup>6</sup>. Nedostatkem informace o sekvenci genů kódujících 16S rRNA je nízká vypovídací hodnota o metabolických schopnostech příslušného bakteriálního kmene.

Výhody obou předchozích přístupů spojuje metoda značení stabilními isotopy (SIP – stable isotope probing). Jedná se o metodu, která nevyžaduje kultivaci mikroorganismů a navíc umožňuje detegovat organismy aktivně se účastnící určitého biochemického procesu.

## 2. Metody identifikace mikroorganismů založené na kultivaci

Prvním krokem při identifikaci mikroorganismů kultivačními technikami je jejich izolace z přírodního materiálu. Tím může být vzorek kontaminované půdy, vody, sedimenty, kaly apod. V literatuře se uvádí celá řada postupů, jak izolovat mikroorganismy z přírodních matric<sup>7–9</sup>. Protože ne všechny mikroorganismy, které jsou v matrici přítomny, dokáží degradovat polutant, je třeba oddělit pouze ty organismy, které tuto vlastnost mají. Nejjednodušším způsobem takové selekce je kultivace izolovaných mikroorganismů na minimálním médiu (obsahujícím pouze základní anorganické ionty) s látkou, jejíž struktura je podobná nebo analogická struktuře polutantu, jako jediným zdrojem uhlíku. Např. při izolaci mikroorganismů ze vzorků kontaminovaných polychlorovanými bifenylly lze použít bifenyl nebo dibenzofuran<sup>10</sup>. Zda je daný mikroorganismus schopen xenobiotikum degradovat, lze potvrdit dále pomocí tzv. testu vytvoření čirých zón (clearing-zone test)<sup>11</sup>. Ten spočívá v převrstvení povrchu agarů 5–10 % (w/v) roztokem dané sloučeniny (bifenyl, chlorobifenyl, pyren, naftalen, anthracen atd.) v acetonu nebo etheru, následněm odpaření rozpouštědla, kdy dojde k vytvoření matného filmu na povrchu agarů, a další inkubaci. Dojde-li okolo kolonie k vytvoření čirých zón, je zřejmé, že mikroorganismus je schopen testovanou sloučeninu využít. Schopnost daného mikroorganismu využít xenobiotikum může být potvrzena i amplifikací genů z degrační dráhy xenobiotika metodou PCR za použití specificky navržených primerů<sup>12</sup> – např. se jedná o geny kódující oxygenasy aromatických sloučenin podílející se na degradaci bifenylu, naftalenu a toluenu nebo geny kódující monooxygenasy, které jsou součástí degračních drah toluenu, xylynu a fenolu. Alternativní možností potvrzení degračních schopností je kultivace daného mikroorganismu v tekutém médiu spolu s daným xenobiotikem a analytické měření úbytku výchozí látky.

Pokud se chceme soustředit na studium jednotlivých kmenů s degračními schopnostmi, jsou vhodnou volbou tzv. nabohacovací kultivace<sup>11</sup>. Tyto metody jsou založené na přidání studovaného vzorku mikrobiální suspenze do tekutého minimálního média obohaceného o sloučeninu, jejíž degradaci studujeme, a následně kultivaci až do vzniku zákalu tvořeného rostoucí biomasou buněk. Ten indikuje selektivní pomnožení mikroflóry s degračními schopnostmi. Nevýhodou metod založených na selektivním nabohacení určitého typu mikroflóry je fakt, že nereflktují kvantitativní zastoupení jednotlivých kmenů ve vzorku.

Nevýhodou metod založených na kultivaci je především fakt, že v laboratorních podmínkách je možné z přírodních vzorků izolovat a kultivovat jen velmi malé procento mikroorganismů. Kromě toho, podaří-li se kultivace daného mikroorganismu a prokáží-li se jeho degrační schopnosti, stále není jisté, zda a za jakých podmínek uplatňuje tyto schopnosti v přirozeném prostředí.

## 3. Metody identifikace mikroorganismů nezávislé na kultivaci

Tyto metody zahrnují studium DNA nebo RNA, ale i mastných kyselin nebo specifických proteinů. Nejčastěji používané jsou techniky založené na studiu mikrobiální DNA izolované přímo z přírodního materiálu<sup>13</sup>. Z přírodních matric je možné DNA izolovat po oddělení buněk od zbytku matrice a následně provést buněčnou lyzi pro uvolnění DNA nebo s využitím komerčně dostupných souprav přímo lyzovat celý vzorek. Tato metoda je časově méně náročná a při extrakci se získá DNA až z 99 % buněk. Po izolaci a purifikaci následuje amplifikace vysoce konzervativních úseků, tedy především úseků DNA kódujících 16S rRNA (resp. 18S rRNA), a jejich elektroforetické rozdělení na základě stejné délky, ale různého zastoupení jednotlivých purinových a pyrimidinových bází v tomto úseku použitím denaturační nebo teplotní gradientové gelové elektroforézy (DGGE – denaturing gradient gel electrophoresis, TGGE – temperature gradient gel electrophoresis)<sup>14</sup>. Po eluci úseků DNA z gelu lze provést jejich sekvencování. Alternativně lze studovat různorodost délek restričních fragmentů (RFLP – restriction fragment length polymorphism). V tomto případě je po amplifikaci úseků DNA kódujících 16S rRNA (resp. 18S rRNA) působením restričních endonukleas DNA štěpena v místech se specifickou cílovou sekvencí pro danou endonukleasu. Určitá variabilita nukleotidové sekvence genů kódujících 16S rRNA u jednotlivých bakteriálních druhů předurčuje různorodost (v délce, sekvenci) úseků DNA po štěpení restričními endonukleasami. Jednotlivé fragmenty vzniklé specifickým štěpením jsou tedy u jednotlivých druhů různě dlouhé a jsou zdrojem polymorfismu délek restričních fragmentů.

Izolace RNA je náročnější vzhledem k podstatně nižší stabilitě RNA oproti DNA. Při její extrakci je nutné zvolit takové podmínky, aby byla zcela inhibována aktivita ribonukleas. V současné době se rovněž objevily na trhu soupravy umožňující extrakci RNA.

Velkou nevýhodou použití metod založených na izolaci nukleových kyselin, především DNA, z půdy je, že neposkytují téměř žádnou souvislost mezi identitou daného mikroorganismu a jeho metabolickými schopnostmi a funkcí v životním prostředí.

## 4. Značení stabilními isotopy

Na rozdíl od výše zmíněných metod je velkou předností techniky založené na značení stabilními isotopy možnost detegovat ty mikroorganismy, které se v životním prostředí přímo účastní daného biochemického procesu<sup>15</sup>. Jedná se o metodu umožňující zaměřit se pouze na aktivní část mikrobiální populace v daném prostředí, která je schopná asimilovat příslušný značený substrát. Následně studium a analýza tzv. biomarkerů – DNA, RNA<sup>16</sup> nebo mastných kyselin, které tvoří součást fosfolipidů<sup>17</sup> (PLFA

– phospholipid-derived fatty acids) – mikroorganismů, které využívaly značený substrát, poskytne výsledky vedoucí k identifikaci příslušných organismů a genů za daný proces zodpovědných. Nejčastěji se pro tyto účely používají substráty značené stabilním isotopem uhlíku  $^{13}\text{C}$  (cit.<sup>18</sup>), méně často pak isotopem dusíku  $^{15}\text{N}$  (cit.<sup>19</sup>). „Těžké“ isotopy mohou být následně detegovány v biomarkerech těchto organismů. Jako první bylo použito značení stabilními isotopy s následnou analýzou mastných kyselin, které tvoří součást fosfolipidů<sup>20</sup>, a teprve později byly jako biomarkery použity nukleové kyseliny. Značení stabilními isotopy s následnou analýzou DNA na rozdíl od RNA nebo mastných kyselin tvořících součást fosfolipidů vyžaduje pro zabudování „těžkého“ isotopu do DNA replikaci. To samozřejmě předpokládá dělení buněk v přítomnosti značeného substrátu. Značení stabilními isotopy s následnou analýzou DNA je považováno za univerzální, neboť umožňuje prokázání souvislosti mezi určitou metabolickou aktivitou v životním prostředí a identifikací organismů za tuto aktivitu zodpovědných<sup>21</sup>. Rychlost syntézy RNA je podstatně vyšší než rychlost syntézy DNA a je odrazem buněčné aktivity, která je nezávislá na replikaci, což je výhodou při analýze RNA značené stabilními isotopy<sup>22</sup>.

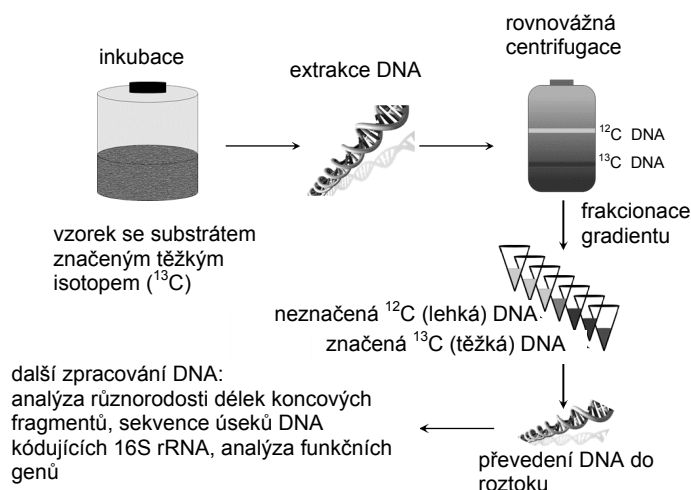
V současné době bylo popsáno již několik příkladů využití značení stabilními isotopy v environmentální mikrobiologii. Např. Singleton<sup>23</sup> využil tuto metodu při sledování bakterií degradujících salicylát, naftalen a fenantren v bioreaktoru obsahujícím kontaminovanou půdu. Leigh<sup>24</sup> ve své studii uvádí, že použitím značení stabilními isotopy s následnou analýzou DNA bylo v reálné půdě kontaminované polychlorovanými bifenoly odhaleno 75 různých rodů schopných získávat uhlík z bifenylu značeného isotopem uhlíku  $^{13}\text{C}$ , přičemž kultivační metody odhalily pouze jeden z těchto organismů. Naproti tomu Madsen<sup>25</sup> uvádí, že značení stabilními isotopy může mít i svá úskalí a ne-

musí vést k předpokládaným výsledkům v případě, že nebudou vhodně zvoleny podmínky provedení.

#### 4.1. Značení stabilními isotopy s následnou analýzou nukleových kyselin

Prvním krokem při experimentu založeném na značení stabilními isotopy (obr. 1) je inkubace matrice obsahující mikroorganismy se substrátem, u kterého je nahrazeno více než 99,5 % atomů daného prvku, nejčastěji uhlíku  $^{12}\text{C}$ , jeho stabilním isotopem. V případě uhlíku se jedná o isotope  $^{13}\text{C}$ . Tento „těžký“ isotope se pak stává součástí nukleových kyselin mikroorganismů, které využívají značený substrát. Takovýmto substrátem může být glukosa<sup>26</sup>, ethanol<sup>27</sup>, methan<sup>28,29</sup>, polutanty (bifenyl<sup>24</sup>, naftalen<sup>30</sup> apod.) nebo jiná látka, kterou jsou mikroorganismy schopny využívat jako zdroj uhlíku. Vedle čistých substrátů existují i substráty směsné, např. kořenové exudáty rostlin vylučované poté, co rostlina asimilovala značený oxid uhličitý  $^{13}\text{CO}_2$ . Vedle substrátů založených na isotopu uhlíku  $^{13}\text{C}$  lze použít i substráty založené na stabilním isotopu dusíku  $^{15}\text{N}$ , např. nitrát nebo TNT. Uhlíku je ale v nukleových kyselinách mnohem více než dusíku, a proto je použití isotopu  $^{13}\text{C}$  vhodnější. Jako matrice může být použit vzorek půdy, kal, sediment apod. Značení stabilními isotopy lze provádět buď v reálných podmínkách – tzv. *in situ* SIP (cit.<sup>31</sup>) – nebo v laboratorních podmínkách, kdy se vzorek inkubuje se značeným substrátem ve sterilních nádobách opatřených septem, které zamezuje výměně plynů s okolím a zajišťuje stabilní atmosféru.

Během inkubace je vhodné sledovat, zda dochází k utilizaci značeného substrátu monitorováním úbytku substrátu nebo přírůstku metabolitu např. plynovou chromatografií nebo vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií. Příslušnou metodu je nutné volit dle povahy substrátu



Obr. 1. Základní schéma experimentu, při kterém je využíváno značení stabilními isotopy

nebo metabolického produktu. Při použití  $^{13}\text{C}$ -značených substrátů lze jako univerzální metodu využívat hmotnostní spektrometrii isotopových poměrů a pomocí ní měřit uvolňování „těžkého“ oxidu uhličitého. Např. bakterie využívající bifenyl jako zdroj uhlíku mineralizují 60–80 % bifenylu v  $\text{CO}_2$  (cit.<sup>32</sup>).

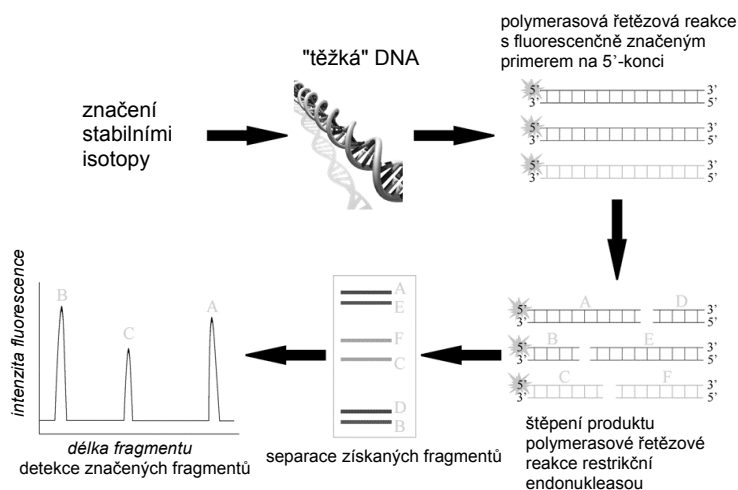
Dalším krokem následujícím po inkubaci je extrakce nukleových kyselin. V literatuře je popsáno několik postupů pro současnou extrakci DNA a RNA<sup>33,34</sup> nebo pro extrakci samotné RNA a DNA<sup>35</sup> nebo lze rovněž využít komerčně dostupné soupravy pro izolaci celkové DNA. Při extrakci nukleových kyselin dojde k uvolnění jak značených nukleových kyselin (syntetizovaných mikroorganismy, které využívaly značený substrát), tak nezačených nukleových kyselin (syntetizovaných mikroorganismy, které značený substrát nevyužívaly). Z tohoto důvodu je nutné od sebe tyto nukleové kyseliny oddělit. Pro jejich separaci se používá rovnovážná centrifugace v hustotním gradientu cesné soli – buď v gradientu chloridu cesného, který lze použít pouze pro separaci DNA, nebo v gradientu trifluoracetátu cesného, který je sice dražší než chlorid, ale lze ho použít jak pro separaci DNA, tak RNA. Jeho výhodou je i to, že na rozdíl od chloridu cesného denaturuje proteiny, a tak inhibuje aktivitu nukleas. Pohyblivost DNA v gradientu cesné soli závisí na procentuálním zastoupení jednotlivých nukleotidů a na množství inkorporovaného těžkého isotopu – při gradientové centrifugaci bude DNA s vyšším procentuálním zastoupením G-C párů migrovat do míst s vyšší hustotou cesné soli než DNA s nižším zastoupením G-C párů a  $^{13}\text{C}$ -značená DNA bude migrovat do míst s vyšší hustotou než DNA nezačená. Gradient se po rozdělení „těžké“ (se značeným  $^{13}\text{C}$ ) a „lehké“ DNA nechá frakcionovat po určitých objemech. Nukleové kyseliny jsou v těchto frakcích sráženy přidávkem ethanolu nebo isopropanolu. Protože množství nukleové kyseliny je v každé frakci poměrně malé, není peleta po srážení vidět, což poněkud

komplikuje experimentální práci. Peletu je možné vizualizovat přidáním glykogenu, který slouží jako matrice pro precipitaci nukleových kyselin.

Protože zastoupení purinových a pyrimidinových bází se v jednotlivých molekulách nukleových kyselin liší, bude „těžká“ DNA (příp. RNA) přítomna v několika frakcích získaných po frakcionaci gradientu. Lokalizovat ji lze kvantitativní polymerasovou řetězovou reakcí cílenou na určité sekvence DNA (nebo v případě RNA kvantitativní polymerasovou řetězovou reakcí s použitím reversní transkriptasy), UV-spektrofotometrií nebo amplifikací určitých sekvencí DNA polymerasovou řetězovou reakcí s následnou elektroforézou v agarosovém gelu. Z hlediska citlivosti je nevhodnější metodou kvantitativní polymerasová řetězová reakce. Citlivost dalších zmíněných metod je mnohem nižší. Frakce obsahující „těžkou“ DNA jsou poté spojeny a dále analyzovány. Účelem následné analýzy je identifikace genů kódujících 16S rRNA a funkčních genů (geny pro degradaci určitých xenobiotik) a bližší identifikace a charakterizace struktury aktivní mikrobiální populace. Pro tyto účely lze použít jednu z dále zmíněných metod.

#### 4.2. Studium diversity mikrobiálních populací aktivních při degradaci xenobiotik

Jednou z metod pro studium diversity mikrobiální populace, která umožňuje i přímo identifikovat přítomné druhy, je analýza různorodosti délek koncových restričních fragmentů<sup>36</sup> (T-RFLP – terminal-restriction fragment length polymorphism) (obr. 2). Je odvozená od analýzy různorodosti délek restričních fragmentů, jejíž princip již byl v textu popsán. Analýza různorodosti délek koncových restričních fragmentů se liší použitím fluorescenčně značených primerů při amplifikaci cílové sekvence DNA



Obr. 2. Schéma analýzy různorodosti délek koncových restričních fragmentů<sup>36</sup> DNA značené „těžkým“ isotopem

a v závěru i detekci pouze fluoreskujících terminálních fragmentů.

V případě použití analýzy různorodosti délek koncových restričních fragmentů v souvislosti se značením stabilními isotopy je výchozím materiálem soubor frakcí po gradientové centrifugaci, které obsahují „těžkou“ DNA. Za použití fluorescenčně značeného primeru na 5'-konci (používá se 6-karboxyfluorescein, hexachlorfluorescein nebo tetrachlorfluorescein) je amplifikována určitá cílová sekvence, většinou opět úsek kódující 16S rRNA, která je po namnožení a purifikaci (za použití komerčně dostupných souprav pro purifikaci produktů polymerasové řetězové reakce) štěpena určitou restriční endonukleasou. Fragmenty vzniklé restričním štěpením (typické pro daný mikrobiální druh) jsou poté elektroforeticky separovány. Ve výsledném elektroforeogramu je na ose *x* vynesena délka fragmentů a na ose *y* intenzita fluorescence. Detegovány jsou tedy pouze koncové (terminální), fluorescenčně značené fragmenty, které mají odlišné délky. Délky těchto fragmentů se porovnávají s údaji v databázi (např. T-RFLP Phylogenetic Assignment Tool dostupný na <http://trflp.limnology.wisc.edu/index.jsp> nebo APLAUS+ dostupný na <http://mica.ibest.uidaho.edu>). V obou případech pro správný výsledek analýzy je nutné uvést sekvenci fluorescenčně značeného primeru a použitou restriční endonukleasu. Program APLAUS+ navíc vyžaduje i použití fluorescenčně značeného druhého primeru v paralelním pokusu – je totiž mnoho bakterií, které mají jeden terminální úsek stejně dlouhý a provedení další PCR reakce s fluorescenčně značeným druhým primerem snižuje pravděpodobnost, že po srovnání s databází nebude identifikace mikroorganismu spolehlivá. Tomu se lze vyhnout i použitím více restričních endonukleas v několika paralelních pokusech.

Spolehlivým způsobem identifikace původu příslušné „těžké“ DNA je amplifikace úseků DNA kódujících 16S rRNA, následné klonování těchto úseků DNA ve vhodném vektoru a vytvoření genové knihovny. Tato knihovna představuje soubor sekvencí genů kódujících 16S rRNA získaných z jedinců přítomných v daném konsorciu. Po sekvenciaci genů lze bakterie daného konsorcia identifikovat.

Alternativně lze analyzovat „těžkou“ DNA denaturační nebo teplotní gradientovou gelovou elektroforézou zmíněných výše.

#### 4.3. Analýza funkčních genů

Zajímáme-li se o přítomnost vybraných genů v populaci mikroorganismů aktivně se podílejících na degradaci xenobiotika v životním prostředí, je možné využít speciálně navržených genových čipů (oligonucleotide-based functional gene arrays)<sup>37,38</sup>. Jedná se o soubor značených imobilizovaných oligomerů DNA nebo RNA (průb, značek), které jsou navrženy tak, aby za určitých podmínek specificky hybridizovaly s příslušnými cílovými sekvencemi – částmi genů kódujících enzymy degradačních (nebo jiných metabolických) drah. K vlastní hybridizaci dochází při více než 86–90% homologii značené sekvence

a cílové sekvence. Analýzou funkčních genů lze detegovat funkční geny kultivovatelných i nekultivovatelných organismů přirozeně se vyskytujících v přírodní matrici. Některé z přítomných značek jsou skupinově specifické, jiné zcela unikátní, specifické pouze pro jeden organismus.

#### 5. Závěr

Studium mikrobiálních populací, objasnění podstaty mikrobiální diversity a charakterizace jednotlivých druhů vyskytujících se v určitém prostředí má velký význam pro pochopení vztahu mezi strukturou mikrobiálních komunit, jejich funkcí a jejich biochemickými a fyziologickými projevy v daném prostředí. V nedávné minulosti použití molekulárně biologických technik sice umožnilo mikrobiologům studovat diversitu přírodních komunit, avšak dosud bylo poměrně těžké popsat vztahy mezi identitou a funkcí jednotlivých mikroorganismů v rámci těchto komunit. První metodou, která popis těchto vztahů umožňuje, je značení stabilními isotopy. Touto technikou lze identifikovat mikroorganismy zodpovědné za katalýzu biogeochemických reakcí v půdě, vodě i sedimentech. Z počátku byla metoda značení stabilními isotopy používána ve studiích zabývajících se koloběhem jednoduchých sloučenin jako např. CO<sub>2</sub> (cit.<sup>39</sup>), methan<sup>40</sup>, glukosa<sup>41</sup>, methanol<sup>42</sup> atd., v dnešní době se stává účinným prostředkem, který umožňuje daleko detailnější analýzu a charakterizaci mikrobiálních populací.

*Tato studie byla podpořena granty GA ČR 203/05/0563 a MŠMT – NSF IP05ME745, MŠMT NPVII 2B06156 a výzkumnými záměry MŠM6046137305 a Z40550506.*

#### LITERATURA

1. Macková M., Dowling D., Macek T. (ed.): *Phytoremediation and Rhizoremediation. Theoretical Background*. Springer, Dordrecht 2006.
2. Uhlík O., Šanda M., Frančová K., Macková M., Macek T.: Chem. listy 101, 461 (2007).
3. Chrástilová Z., Nováková M., Macková M., Macek T., Szekeres M.: Chem. listy 101, 440 (2007).
4. Najmanová J., Macková M., Macek T., Kochánková L.: Chem. listy 101, 449 (2007).
5. Torsvik V., Daae F. L., Sandaa R. A., Ovreas L.: J. Biotechnol. 64, 53 (1998).
6. Baker G. C., Smith J. J., Cowan D. A.: J. Microbiol. Methods 55, 541 (2003).
7. Clark R. R., Chian E. S. K., Griffin R. A.: Appl. Environ. Microbiol. 37, 680 (1979).
8. Hurst C. J., Crawford R. L. (ed.): *Manual of Environmental Microbiology*. AMS Press, Washington 2002.
9. Khomutova T. E., Demkina T. S., Demkin V. A.: Microbiology 73, 196 (2004).
10. Demnerová K., Macková M., Spěváková V., Beranová K., Kochánková L., Lovecká P., Ryšlavá E., Macek

- T.: *Int. Microbiol.* 8, 205 (2005).
11. Leigh M. B., v knize: *Phytoremediation and Rhizoremediation. Theoretical Background* (Mackova M., Dowling D. N., Macek T., ed.), Springer, Dordrecht 2006.
  12. Baldwin B. R., Nakatsu C. H., Nies L.: *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 3350 (2003).
  13. Ranjard L., Poly F., Nazaret S.: *Res. Microbiol.* 151, 167 (2000).
  14. Muyzer G.: *Curr. Opin. Microbiol.* 2, 317 (1999).
  15. Radajewski S., Ineson P., Parekh N. R., Murrell J. C.: *Nature* 403, 646 (2000).
  16. Lueders T., Manefield M., Friedrich M. W.: *Environ. Microbiol.* 6, 73 (2004).
  17. Boschker H. T., deGraaf W., Koster M., Meyer-Reil L., Cappenberg T. E.: *FEMS Microbiol. Ecol.* 35, 97 (2001).
  18. Radajewski S., McDonald I. R., Murrell J. C.: *Curr. Opin. Biotechnol.* 14, 296 (2003).
  19. Cadisch G., Espana M., Causey R., Ritcher M., Shaw E., Morgan J. A. W., Rahn C., Bending G. D.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19, 1424 (2005).
  20. Boschker J. T., Nold S. C., Wellsbury P., Bos D., de Graaf W., Pel R., Parkes R. J., Cappenberg T. E.: *Nature* 392, 801 (1998).
  21. Neufeld J. D., Dumont M. G., Vohra J., Murrell J. C.: *Microb. Ecol.* 53, 435 (2007).
  22. Manefield M., Whiteley A. S., Griffiths R. I., Bailey M. J.: *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5367 (2002).
  23. Singleton D. R., Powell S. N., Sangaiah R., Gold A., Ball L. M., Aitken M. D.: *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 1202 (2005).
  24. Leigh M. B., Pellizari V., Uhlík O., Sutka R., Ostrom N. E., Zhou J., Tiedje J. M.: *ISME J.* 1, 134 (2007).
  25. Madsen E. L.: *Curr. Opin. Biotechnol.* 17, 92 (2006).
  26. Webster G., Watt L. C., Rinna J., Fry J. C., Evershed R. P., Parkes R. J., Weightman A. J.: *Environ. Microbiol.* 8, 1575 (2006).
  27. Leigh M. B., Cardenas E., Wu W.-M., Uhlík O., Carley J., Carroll S., Gentry T., Marsh T. L., Zhou J., Jardine P., Criddle C. S., Tiedje J. M.: Nepublikované výsledky.
  28. Hutchens E., Radajewski S., Dumont M. G., McDonald I. R., Murrell J. C.: *Environ. Microbiol.* 6, 111 (2004).
  29. Cébron A., Bodrossy L., Stralis-Pavese N., Singer A. C., Thompson I. P., Prosser J. I., Murrell J. C.: *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 798 (2007).
  30. Jeon C. O., Park W., Padmanabhan P., DeRito C., Snape J. R., Madsen E. L.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 11, 13591 (2003).
  31. Padmanabhan P., Padmanabhan S., DeRito C., Gray A., Gannon D., Snape J. R., Tsai C. S., Park W., Jeon C., Madsen E. L.: *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 1614 (2003).
  32. Bailey R. E., Gonsoir S. J., Rhinehart W. L.: *Environ. Sci. Technol.* 17, 617 (1983).
  33. Griffiths R. I., Whiteley A. S., O'Donnell A. G., Bailey M. J.: *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 5488 (2000).
  34. Hurt R. A., Qiu X., Wu L., Roh Y., Palumbo A. V., Tiedje J. M., Zhou J.: *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4495 (2001).
  35. Zhou J., Bruns M. A., Tiedje J. M.: *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 316 (1996).
  36. Grüntzig V., Stres B., Ayala del Río H. L., Tiedje J. M.: *Improved Protocol for T-RFLP by Capillary Electrophoresis*. [http://rdp8.cme.msu.edu/html/t-rflp\\_jul02.html](http://rdp8.cme.msu.edu/html/t-rflp_jul02.html), staženo 5. března 2007.
  37. Rhee S. K., Liu X., Wu L., Chong S. C., Wan X., Zhou J.: *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 4303 (2004).
  38. Zhou J.: *Curr. Opin. Biotechnol.* 6, 288 (2003).
  39. Whitby C. B., Hall G., Pickup R., Saunders J. R., Ineson P., Parekh N. R., McCarthy A.: *Lett. Appl. Microbiol.* 32, 398 (2001).
  40. Morris S. A., Radajewski S., Willison T. W., Murrell J. C.: *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 1446 (2002).
  41. Padmanabhan P., Padmanabhan S., DeRito C., Gray A., Gannon D., Snape J. R.: *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 1614 (2003).
  42. Radajewski S., Webster G., Reay D. S., Morris S. A.: *Microbiology* 148, 2331 (2002).

**O. Uhlík<sup>a,b</sup>, K. Ječná<sup>a</sup>, M. Macková<sup>a</sup>, M. B. Leigh<sup>c</sup>, K. Demnerová<sup>a</sup>, and T. Macek<sup>b</sup>** (<sup>a</sup>*Institute of Chemical Technology, Prague, Department of Biochemistry and Microbiology, Prague*, <sup>b</sup>*Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague*, <sup>c</sup>*Institute of Arctic Biology, University of Alaska, Fairbanks, U.S.A.*): **Stable Isotope Probing as a Tool for the Detection of Active Microorganisms in Xenobiotics Degradation**

One of the challenges the microbial ecologists are facing is the identification of microorganisms that are responsible for particular biochemical processes in the environment. Although small-subunit rRNA gene sequencing is a robust technique whereby the phylogenetic diversity of microbial communities can be described, it provides few direct links between the identity of microorganisms and their metabolic capabilities and function in the environment. In contrast, when a microorganism is cultivable, it can be identified, after isolation, and characterized at the physiological, biochemical and genetic level. However, only a small fraction of microorganisms present in the environment have been successfully cultivated. Stable isotope probing (SIP) techniques are based on analyzing biomarkers (nucleic acids or phospholipid-derived fatty acids) after microbial consumption of <sup>13</sup>C- or <sup>15</sup>N-labelled substrate added to an environmental sample. The use of SIP allows the direct detection of microorganisms that are truly active in the degradation and assimilation of a particular substrate within a complex microbial community. The main advantages of this method are its cultivation independence and the fact that it links the identity of microorganisms with their function in the environment.