

IDENTIFIKACE A CHARAKTERIZACE BAKTERIÍ S BIOREMEDIÁČNÍM POTENCIÁLEM – OD KULTIVACE K METAGENOMICE

ONDŘEJ UHLÍK^a, MICHAL STREJČEK^a,
MILUŠE HROUDOVÁ^b, KATEŘINA
DEMNEROVÁ^a a TOMÁŠ MACEK^a

^a Vysoká škola chemicko-technologická, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Ústav biochemie a mikrobiologie, Technická 3, Praha 6, ^b Ústav molekulární genetiky, v.v.i., Oddělení genomiky a bioinformatiky, Vídeňská 1083, Praha 4
ondrej.uhlik@vscht.cz

Došlo 2.3.13, přijato 4.4.13.

Klíčová slova: identifikace bakterií, bioremediace, kultivace, metagenomika

Obsah

1. Úvod
2. Identifikace a charakterizace bakterií s bioremedičním potenciálem – od kultivace k metagenomice
 - 2.1. Kultivace
 - 2.1.1. Strategie kultivace bakterií s bioremedičním potenciálem
 - 2.1.2. Identifikace izolátů
 - 2.2. Metagenomika
 - 2.3. Identifikace původců biogeochemických dějů: isotopové značení
 - 2.4. Případová studie: Identifikace a charakterizace bakterií v zemině kontaminované polychlorovanými bifenyly z lokality Lhenice, jižní Čechy
3. Závěr

1. Úvod

Během druhé poloviny minulého století bylo do životního prostředí uvolněno velké množství látek toxických pro vyšší organismy. Tyto látky byly do prostředí zaneseny buď záměrně, např. pesticidy, nebo neúmyslně, např. polychlorované bifenyly nebo ropné látky uniklé z průmyslových zařízení a při různých haváriích. Nejstarší pokusy o remediaci kontaminovaných lokalit byly založeny na fyzikálně-chemických principech. Ačkoli se v průběhu času velmi zdokonalily, jsou stále ekonomicky náročné a jejich aplikace většinou způsobuje další devastaci prostředí. Alternativou je využití biologických systémů, tzv. bioremediace. Hlavními aktéry v procesu bioremediace jsou rostliny a mikroorganismy¹.

Mikroorganismy jsou zapojeny do koloběhu všech základních prvků nezbytných pro existenci vyšších forem

života a fungování ekosystémů. Mikrobiální bioremediace je založena na metabolické aktivitě určitých populací v kontaminovaném materiálu. Vedle běžně známých nepatogenních i patogenních mikroorganismů existují totiž i druhy s unikátními vlastnostmi, které spočívají ve schopnosti přežít v extrémních podmínkách nebo asimilaci neobvyklých substrátů včetně toxických látek. Obrovská metabolická (funkční) rozmanitost především bakterií činí tuto skupinu organismů z hlediska odbourávání kontaminantů zcela unikátní².

Rostliny jsou sice schopné absorbovat a transformovat mnohá xenobiotika a poté je ukládat ve vakuolách nebo složkách buněčné stěny, na rozdíl od mikroorganismů mají ale jen limitované schopnosti kontaminanty mineralizovat³. Přítomnost rostlin má však své opodstatnění ve spolupráci s mikroorganismy. Rhizosféra, tedy oblast v bezprostřední blízkosti kořenů, je hlavním místem, kde dochází k interakcím rostlina-mikroorganismus. Z hlediska remediací je podstatná především schopnost rostlin uvolňovat kořenovým systémem látky, které mohou mikroorganismy využívat jako zdroj uhlíku a/nebo energie, případně jako induktory enzymů degradačních drah⁴.

Identifikace a bližší charakterizace mikroorganismů v kontaminovaném prostředí je tedy zásadní pro (i) stanovení bioremedičního potenciálu přirozené mikroflóry, (ii) navrhování bioremedičních strategií s cílem podpořit přirozenou atenuaci, (iii) monitorování řízené bioremediace. Tento text je věnován otázkám identifikace a charakterizace bakterií s důrazem na bakterie disponující bioremedičním potenciálem. Součástí práce je případová studie, kde je vývoj příslušných technik demonstrován na příkladu populací v zemině dlouhodobě kontaminované polychlorovanými bifenyly.

2. Identifikace a charakterizace bakterií s bioremedičním potenciálem – od kultivace k metagenomice

Identifikace určité bakterie nebo jiného mikroorganismu je klíčovým úkolem všech disciplín mikrobiologie. Taxonomické zařazení s sebou přináší určité předpoklady a očekávané vlastnosti daného organismu. Typickým příkladem je mikrobiologie klinická, kde identifikace mikroorganismu izolovaného z pacienta implikuje jeho patogenitu⁵. Obdobně v jakékoli biotechnologické oblasti, včetně bioremedičního výzkumu a praxe, je velice důležitou otázkou, zda je daný kmen patogenní či ne, protože z této vlastnosti vyplývá celá řada povinností či restrikcí při práci s takovýmto kmenem.

Kämpfer a Glaeser⁶ uvádějí, že mikrobiální taxonomie zahrnuje klasifikaci, nomenklaturu a identifikaci. V tomto smyslu klasifikace řeší otázku, jak jsou dvě bakte-

rie vzájemně příbuzné a na základě míry příbuznosti jsou jednotlivé jednotky, tedy organismy, uspořádány do určitých kategorií neboli taxonů. Nomenklatura pak tyto taxony pojmenovává a identifikace představuje spojení konkrétní bakterie s konkrétním taxonem^{5,6}.

Počátky bakteriální klasifikace a identifikace na konci 19. století se výhradně opíraly o fenotypové vlastnosti – první bakteriální izoláty byly klasifikovány na základě morfologických znaků, růstových požadavků a potenciálu patogenity. Později, od počátku 20. století, se k morfologickým znakům postupně přidávaly charakteristiky fyziologické, biochemické či chemotaxonomické. Od 60. let se fenotypová klasifikace bakteriálních izolátů rozšířila o druhý přístup – klasifikaci genotypovou. Tento přístup je založený na studiu fylogenetické příbuznosti bakterií⁸.

V 80. letech minulého století ale vědci objevili velký rozpor ve výsledcích počtu bakterií zjištěných při přímém počítání buněk pozorovatelných pod mikroskopem a počtu kolonií vyrostlých na médiu⁹. Tento jev, dnes známý jako tzv. „great plate count anomaly“, byl první indicií toho, že kultivovat za rutinních podmínek lze jen některé bakterie. Tato zjištění přispěla k rozvoji molekulárně biologických metod pro studium bakteriálních populací bez potřeby kultivace a s tím spojených nových poznatků o bakteriální diversitě.

Nejpodstatnější molekulou pro genotypickou klasifikaci se stala 16S rRNA – tedy RNA malé ribosomální podjednotky¹⁰. Některé vlastnosti této molekuly předurčují její použití jako tzv. fylogenetického markeru^{11–13}. Konkrétně se jedná o následující vlastnosti: (i) přítomnost napříč říší prokaryot, (ii) konstantní, pro buňku esenciální, funkce, (iii) pomalá evoluční rychlost, kde počet mutací odpovídá evoluční vzdálenosti mezi kmeny a (iv) kombinace vysoce konzervovaných úseků napříč bakteriální říší a variabilních úseků specifických pro daný taxon. Jak uvádějí Cole a spol.¹⁴, RNA malé ribosomální podjednotky se stala základním kamenem mikrobiální taxonomie a díky ní byla odhalena drtivá většina diversity mikrobiálního světa. Analýzou primární sekvence 16S rRNA, resp. jejího genu, lze klasifikovat bakterie na úrovni čeledi při přečtení 200 bází a na úrovni rodové při přečtení 400 bází¹⁵. Díky vysoce konzervativní povaze 16S rRNA ale v mnoha případech nelze její analýzou klasifikovat bakterie na úrovni druhové¹⁴.

Otázkou v tomto případě zůstává, co je vlastně bakteriální druh. Koncept Ernsta Mayra, definující druh jako soubor populací navzájem si podobných jedinců, kteří se mezi sebou mohou plodně křížit a jsou reprodukčně izolováni od jiných podobných skupin¹⁶, je poměrně těžko aplikovatelný pro prokaryotní organismy z důvodů, jakými jsou absence sexuální reprodukce a naproti tomu horizontální výměna genů. Podstatně vhodnější koncepty pro bakteriální klasifikaci jsou založené na fenotypizaci a především genotypizaci. V současné době uznávaný koncept se opírá o definici bakteriálního druhu založenou na DNA-DNA hybridizačních experimentech – dva bakteriální kmeny jsou označeny jako tentýž druh tehdy, když jejich genomické DNA za standardních podmínek vzájemně

hybridizují minimálně ze 70 % a rozdíl v teplotě tání obou genomických DNA není vyšší než 5 °C (cit.^{17,18}). I když je DNA-DNA hybridizace (DDH) pro zjištění příbuznosti dvou bakteriálních kmenů používána od 60. let, je poměrně obtížně proveditelná a standardizovatelná napříč laboratořemi a mnohdy bývá zatížena vysokou experimentální chybou¹⁹. Protože míra hybridizace dvou vláken DNA je nepochybně dána podobností sekvencí, bylo tedy třeba najít odpovídající parametr dobře čitelný z primární sekvence. Tím se stala průměrná nukleotidová identita (v angl. average nucleotide identity, ANI) všech orthologických genů. Experimentálně bylo zjištěno, že 70% DDH odpovídá 95% ANI (cit.²⁰). Pro rutinní klasifikace bakterií, kde úkolem je rychlá analýza diversity jednotlivých ekologických nik, je ale i přístup založený na stanovení ANI zcela nevhodný. Při obrovské diversitě bakteriálních populací v životním prostředí je nemyšlitelné (z hlediska ekonomického i technologického) sekvenovat DNA všech populací a následně je tímto způsobem analyzovat. Proto si v takovýchto studiích dominanci udržela analýza genů kódujících 16S rRNA – nebyly totiž dosud popsány bakteriální kmeny, jejichž ANI by bylo větší než 95 % a identita 16S rRNA nižší než 98,5 % (cit.²¹). Lze tedy shrnout, že DNA bakteriálních kmenů v rámci jednoho druhu bude vykazovat následující: (i) DDH > 70 %, (ii) ANI > 95 % a (iii) identita 16S rRNA genů > 98,5 %. Jak už ale bylo zmíněno výše, pouhou analýzou 16S rRNA či jejich genů v mnoha případech nelze klasifikovat bakterie na úrovni druhové – existují totiž různé bakteriální druhy vykazující < 95 % ANI a přesto vyšší než 98,5 % identitu 16S rRNA (cit.¹⁴). Ze známých příkladů mikrobiologie životního prostředí se jedná např. o různé pseudomonády či bakterie rodu *Arthrobacter* nebo *Achromobacter*²². Proto je mnohdy v environmentálních studiích termín bakteriální druh nahrazen termínem operační taxonomická jednotka (v angl. operational taxonomic unit, OTU), která je definovaná jako shluk sekvencí 16S rRNA genů identických na určité prahové hodnotě, např. 98,5 % či dříve používaná hodnota 97 %.

Následující text shrnuje vhodné postupy identifikace a charakterizace bakterií s bioremediačním potenciálem v závislosti na tom, zda jim předchází izolace bakteriálních buněk a kultivace, či jako klíčová molekula poslouží DNA izolovaná přímo ze životního prostředí.

2.1. Kultivace

Původně byly všechny bakterie identifikovány na základě fenotypových charakteristik poté, co byly izolovány v čisté kultuře. I přesto, že izolovat v čisté kultuře lze pouze zlomek bakterií přítomných v životním prostředí, kultivace stále zůstává nejsnazším a nejefektivnějším způsobem určení metabolických schopností bakteriálních kmenů. Proto je stále jednou z klíčových technik mikrobiologie. Otázkou zůstává, o jaké procento bakterií, resp. mikroorganismů, se jedná. Amann a spol.²³ udávají, že tzv. kultivovatelných je méně než 0,1 % mořských bakterií, 0,1–3 % sladkovodních, 1–15 % bakterií v aktivovaném

kalu, 0,25 % v sedimentech a 0,3 % v zemině. Pozdější odhady hovoří o kultivovatelnosti 0,1–10 % (cit.²⁴), případně pouze 0,1–1 % (cit.²⁵) bakterií z životního prostředí obecně a méně než 1 % ze zeminy²⁶.

2.1.1. Strategie kultivace bakterií s bioremediačním potenciálem

Z hlediska bioremediačního výzkumu i praxe lze rozdělit kultivační strategie na dva základní přístupy.

První z přístupů je založen na extrakci buněk z kontaminovaného materiálu, následném desetkovém ředění a inokulaci suspenzí na agarové plotny. V oblasti bioremediací je snahou získat bakterie schopné biotransformovat, degradovat a v ideálním případě mineralizovat sledovaný polutant. Zatímco pro kvantitativní analýzu kultivovatelných populací jsou vhodná nutričně bohatá média, pro izolaci bakterií degradujících či mineralizujících danou látku jsou vhodná média minerální s přídatkem polutantu jako jediného zdroje uhlíku/energie.

Druhý přístup pro získání kultury schopné efektivní biodegradace je nabohacovací kultivace. Tato kultura je vytvořena inokulací vzorku kontaminovaného materiálu do tekutého minerálního média s přídatkem kontaminantu jako zdroje uhlíku a/nebo energie. Po několika pasážích je dosaženo stabilního konsorcia, kde převažují populace s nejvyšší specifickou růstovou rychlostí²⁴.

Oba přístupy byly porovnány při izolaci bakterií rostoucích na bifenylu jako jediném zdroji uhlíku²⁷. Zatímco přímou extrakcí bylo získáno 38 izolátů, nabohacovací kultivací bylo selektováno 18 izolátů, nicméně potřebná doba pro tvorbu kolonie na minerálním médiu s přídatkem bifenylu byla přibližně týden pro izoláty získané přímou extrakcí, zatímco pro izoláty získané nabohacovací kultivací to bylo méně než 48 hodin.

2.1.2. Identifikace izolátů

Nutnost rychlé a přesné identifikace izolátů byla v minulosti řízena především potřebami klinické a potravinářské mikrobiologie, protože tyto obory úzce souvisí se zdravím člověka. Zatímco pro identifikaci patogenů hrají stále důležitou roli sérologické metody a biochemické testy²⁸, v případě izolátů z životního prostředí jsou tyto testy obvykle nevhodné vzhledem k obrovské diversitě bakterií v různých ekologických nikách²⁹. I přesto, že pro environmentální izoláty byly vytvořeny sofistikované testy založené na sadách biochemických reakcí, např. systémy API 20NE či Biolog GN, bylo zjištěno, že než pro samotnou identifikaci jsou tyto techniky vhodné spíše pro rozlišení jednotlivých izolátů³⁰. Proto jsou v současnosti environmentální izoláty identifikovány především na základě primární struktury genů pro 16S rRNA¹⁵. Celý proces identifikace zahrnující izolaci DNA, amplifikaci cílových genů a jejich sekvenaci je velmi časově náročný. Z tohoto důvodu bylo zásadním milníkem zavedení hmotnostní spektrometrie pro potřeby bakteriální identifikace^{31,32}. Od té doby byla pro identifikaci bakterií použita celá řada metod hmotnostní spektrometrie³³. Obzvláště rychlou metodou je tzv. „celobuněčná“ MALDI-TOF technologie³⁴.

Proces identifikace je založen na analýze ribosomálních proteinů nebo dalších hojně zastoupených proteinů v buňce, jedná se tedy o příklad metody chemotaxonomické. Ribosomální proteiny představují asi 20 % veškerých buněčných bílkovin a asi 3 % celkové hmoty buňky. Tyto molekuly jsou specifické pro jednotlivé bakteriální druhy, a proto jsou to vhodné biomarkery³⁵. Na základě zvýšené poptávky po tomto typu technik uvedla na trh firma Bruker Daltonics (Bremen, Německo) MALDI Biotyper, jeden ze softwarů umožňující rychlou identifikaci bakterií spočívající v porovnání proteinového spektra izolátu se spektry v databázi³⁶. Kombinace „celobuněčné“ MALDI-TOF technologie s databází MALDI Biotyper se tak stává efektivní, velmi rychlou a vysoce reprodukovatelnou metodou identifikace bakterií.

V naší laboratoři bylo testováno použití MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie jak pro screening, tak pro identifikaci bakterií degradujících bifenyl a potenciálně polychlorované bifenyl^{37,38}. První ze studií porovnávala použití sady biochemických testů NEFERMtest 24 a MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie s analýzou 16S rRNA genů³⁷. Tato studie zcela jasně poukázala na nevýhody biochemických testů – především nízkou reprodukovatelnost a použití jen na určitou skupinu bakterií, v tomto případě konkrétně Gram-negativní nefermentující tyčinky. MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie zde naopak byla vyzdvížena jako velice vhodná screeningová metoda, s jejímž použitím je možné výrazně snížit počet izolátů pro další analýzy, např. identifikaci na základě určení primární sekvence 16S rRNA genů. Výhody a nevýhody všech srovnávaných metod shrnuje tabulka I. Účelem druhé studie³⁸ bylo ověření použitelnosti metodologie MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie v kombinaci s databází MALDI Biotyper pro izoláty z kontaminované zeminy. Bylo izolováno celkem 54 bakterií, přičemž dominantní mezi izoláty byly bakterie rodů *Arthrobacter*, *Serratia*, *Rhodococcus* a *Rhizobium*. Identifikace pomocí MALDI Biotyper

Tabulka I

Výhody a nevýhody jednotlivých metod používaných pro charakterizaci bakteriálních izolátů s bioremediačním potenciálem

Metoda	Výhody	Nevýhody
Biochemické testy	jednoduché na provedení; nepřilíši drahé	nízká reprodukovatelnost; lze použít jen pro některé bakterie
MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie	jednoduché na provedení; nejrychlejší metoda	vysoké pořizovací náklady přístrojového vybavení; ne zcela vhodná pro všechny izoláty
Sekvenace 16S rRNA genů	vysoká reprodukovatelnost; vysoká přesnost	pracnější; nákladnější

v mnoha případech předčila identifikaci na základě 16S rRNA genů – použití hmotnostní spektrometrie totiž umožnilo identifikaci izolátů na druhové úrovni. Jednalo se o izoláty *Aeromonas hydrophila*, *Arthrobacter aureoscens*, *Arthrobacter ilicis*, *Arthrobacter oxydans*, *Rhizobium radiobacter*, *Rhodococcus erythropolis* a *Serratia fonticola*. Tímto způsobem lze tedy odlišit bakteriální druhy některých rodů hojně zastoupených v zemině, u nichž je 16S rRNA nepoužitelná pro identifikaci na druhovou úroveň. Jako příklad lze uvést druhy *Pseudomonas alcaliphila* a *P. oleovorans*, jejichž 16S rRNA geny jsou identické, ale pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie jsou tyto druhy rozlišitelné (Uhlík a spol., dosud nepublikovaná data). Jedinou nevýhodou hmotnostní spektrometrie pro účely bakteriální identifikace zůstává její závislost na databázi referenčních spekter, která obsahuje jen omezené množství záznamů dobře popsanych druhů. Sekvenace 16S rRNA genů tak zůstává přední metodou pro klasifikaci a identifikaci nově izolovaných bakterií.

2.2. Metagenomika

Metagenomika představuje soubor molekulárně biologických metod, které pracují s veškerou genetickou informací dostupnou ve vzorku a poskytují tak daleko větší množství informací o biodiverzitě než postupy založené na kultivaci^{39,40}. Koncept metagenomiky stejně tak jako pojem metagenom byl prvně zaveden koncem 90. let, ačkoliv idea jako taková existovala už mnohem dříve⁴¹. Veškeré environmentální studie založené na analýze 16S rRNA genů amplifikovaných z DNA, která byla izolována přímo ze vzorku, lze chápat jako prvotní formy metagenomiky a lze je datovat až do 80. let (cit.¹²). Gen 16S rRNA je standardně využíván pro bakteriální identifikaci, fylogenetické a ekologické analýzy a v praxi představuje odpověď na otázku „kdo“ je v komunitě přítomen (které bakteriální taxony).

16S rRNA geny byly ještě před deseti lety rutinně analyzovány pomocí tzv. fingerprintingových technik, jakými jsou elektroforézy v teplotním či chemickém gradientu^{42,43} nebo studium polymorfismu délek terminálních fragmentů⁴⁴. Tyto metody jsou vhodné pro porovnání změn diversity v čase, případně po vnějším zásahu (kontaminace nebo naopak sanační zákrok); toto srovnání je však velice hrubé⁴⁵. Pokud bylo třeba identifikovat populace ve zkoumaném vzorku, 16S rRNA geny byly amplifikovány z izolovaného metagenomu a jejich sekvence byla zjišťována po konstrukci a screeningu genových knihoven. Zcela obdobně se postupovalo i pro geny funkční. Hlavním problémem tohoto přístupu bylo především nízké pokrytí získaných sekvencí vedoucí pouze k detekci těch nejhojněji zastoupených taxonů⁴⁶.

Handelsman a spol.⁴¹ představili půdní metagenom jako zcela neprobádaný potenciální zdroj molekul s biotechnologickým využitím. Jejich přístup spočíval v izolaci půdního metagenomu, jeho fragmentaci, klonování a tím získku tzv. metagenomické knihovny, jejíž fenotypové projevy jsou následně zkoumány. Dnes tento přístup nazývá-

me funkční screening. Tzv. sekvenční screening je přístup založený na anotaci získaných sekvencí a následné analýze s primárním cílem odhalit diversitu organismů a jejich genů v dané oblasti. Byl představen při sekvenaci metagenomu Sargasového moře⁴⁷. V této studii se autoři záměrně zaměřili na oblast otevřeného oceánu, která není příliš bohatá na živiny. I přesto jejich odhady mluví o přibližně 1800 různých druhů organismů, z nichž získané sekvence pocházely.

Příchod druhé generace sekvenačních technik DNA umožnil další rozvoj metagenomiky. Tyto techniky jsou označovány za vysokokapacitní, tj. schopné čtení několika set tisíc až milionů sekvencí najednou, a s jejich využitím je možno sekvenovat metagenom bez potřeby konstrukce knihoven^{48,49} (tzv. „shotgun“ sekvenování). Některé environmentální vzorky, které jsou nutričně bohaté, jako např. zemina či sedimenty, jsou ale z hlediska diversity příliš komplexní a dosažení dostatečného pokrytí sekvencí je ekonomicky a technicky náročné i s využitím druhé generace sekvenačních technik. Ke studiu diversity genetických a ekologických markerů v takovýchto vzorcích se proto jako vhodnější metoda ujala metagenomika cílená na geny⁵⁰ (z angl. gene-targeted metagenomics). Pomocí polymerasové řetězové reakce (PCR) se amplifikují specifické úseky DNA (tzv. markery), které se pak sekvenují⁵⁰. Komplexita vzorku je tak značně redukována omezením analýzy metagenomu pouze na určitou skupinu genů. Pro tento typ analýzy je především používána tzv. 454 pyrosekvenace, protože umožňuje číst delší úseky DNA než ostatní sekvenační technologie. Zatím nejpropracovanější metoda metagenomiky cílené na geny je pyrosekvenace variabilních úseků genů kódujících 16S rRNA (cit.³⁹).

Metagenomická analýza může být spojena kromě technologií vysokokapacitního sekvenování i s vysokokapacitními mikročipy. Jejich využití se v současné době stává jednou z předních technologií analýzy mikrobiálních komunit a monitorování procesů probíhajících v životním prostředí. Mikročipy GeoChip^{51,52} obsahují téměř 84 000 oligomerních sekvencí pokrývajících více než 152 000 různých genů, které kódují enzymy zodpovědné za reakce cyklů základních prvků (C, N, P, S), reakce procesů získávání energie, rezistenci vůči kovům, odbourávání organických kontaminantů, rezistenci vůči antibiotikům atd. Součástí je i gen *gyrB*, který je zde použit jako fylogenetický marker, protože na úrovni druhové má tento biomarker vyšší rozlišovací schopnost než 16S rRNA.

2.3. Identifikace původců biogeochemických dějů: isotopové značení

Jednou ze základních otázek mikrobiální ekologie je, které mikroorganismy jsou zodpovědné za určité biogeochemické děje probíhající v životním prostředí. U čistých kultur získaných kultivací je určení metabolických schopností poměrně jednoduché. Jednou ze základních idejí metagenomiky byla rekonstrukce mikrobiálních genomů, která by bez kultivace umožnila identifikovat metabolické schopnosti individuálních populací⁵³. Už první studie ale

ukázaly, že diversity mnohých ekologických nik je tak velká, že rekonstrukce genomů nekultivovaných bakterií bude velice obtížná, pokud vůbec dosažitelná⁵⁴. Mezi metodami funkční environmentální mikrobiologie zůstávají tak v popředí ty, které umožňují stanovit funkci mikrobiálních populací bez potřeby kultivace. Jedním z přístupů tohoto typu je isotopové značení DNA (*v angl.* stable isotope probing, SIP). Jeho podstatou je inkubace environmentálního vzorku s ¹³C (případně ¹⁵N)-značeným substrátem, jehož metabolismus je studován. Metabolicky aktivní populace využívající daný substrát jako zdroj uhlíku inkorporují stabilní isotopy do buněčných komponent. Tyto komponenty je možné následně separovat od komponent neznačených (pocházejících od populací, které nevyužívaly značený substrát) a analyzovat je. První používané molekuly pro analýzu byly mastné kyseliny⁵⁵, DNA⁵⁶ a rRNA⁵⁷. Později byly analyzovány isotopově značené proteiny⁵⁸ a mRNA^{59,60}. Gutierrez-Zamora a Manefield⁶¹ porovnávali četnost použití těchto biomarkerů ve vědeckých studiích. Analýza isotopově značené DNA byla mezi roky 2007 a 2010 použita přibližně v 60 studiích, zatímco na RNA připadalo asi o třetinu méně, mastné kyseliny byly analyzovány ve 25 případech a u proteinů to nebyla ani desítka. Toto rozvržení je zcela logické a odpovídá výhodám a nevýhodám biomarkerů⁶². Izolace DNA z přírodních matric není obtížná a dosahuje poměrně dobrých výtěžků požadované čistoty na rozdíl od RNA nebo proteinů. Rovněž metagenomika je ve srovnání s metatranskriptomikou (obor zabývající se studiem RNA environmentálních komunit) či metaproteomikou (obor zabývající se studiem proteinů environmentálních komunit) v současné době podstatně propracovanější. Navíc DNA v sobě skýtá celou řadu informací jak z pohledu fylogenetické identifikace, tak z pohledu metabolických drah. Z těchto důvodů je v současnosti isotopové značení DNA preferovaným způsobem identifikace funkcí mikrobiálních populací, zatímco isotopové značení RNA a proteinů zůstává velkou výzvou do budoucna.

Integrace metagenomiky a isotopového značení výrazně eliminuje zásadní nevýhody metagenomiky celých komunit. Mezi ty patří především problematická detekce málo zastoupených populací, které ale mohou plnit velmi důležité role pro fungování ekosystému. To samé lze říci o detekci jednotlivých genů. Isotopové značení redukuje komplexnost metagenomu pouze na populace aktivně se podílející na daném procesu a pravděpodobnost detekce méně zastoupených, ale z hlediska funkce klíčových populací a jejich genů je tak značně zvýšená. Experimentálně to dokázali Schwarz a spol.⁶³ při izolaci genů kódujících glyceroldehydratasy. Frekvence detekce těchto genů se zvýšila 4krát, pokud konstrukci metagenomické knihovny předcházelo isotopové značení. Metagenomická analýza isotopově značené DNA byla použita pro detekci celých operonů či genových shluků zodpovědných za určitou funkci^{64–66} nebo pro úspěšnou rekonstrukci genomu nekultivované bakterie *Methylothera mobilis*⁶⁷. Vedle toho byla isotopově značená DNA studována i pomocí vysokokapacitních mikročipů⁶⁸. V ¹³C-metagenomu izolovaném po inkubaci

kontaminované zeminy s ¹³C-bifenylem byla nalezena celá řada genů katabolických drah bifenylu, benzoátu, katecholu, protokatechuátu, naftalenu, fenolu, dibenzofuranu a fenypropionátu, což ukazuje, že půdní bakterie podílející se na degradaci aromatických kontaminantů mají větší komplexní metabolismus a dokáží odbourávat mnohé z těchto látek zároveň. Detekce genů β-ketoadipátové dráhy v ¹³C-metagenomu poukazuje na schopnost komunity aromáty nejen transformovat ale i mineralizovat.

2.4. Případová studie: Identifikace a charakterizace bakterií v zemině kontaminované polychlorovanými bifenylem z lokality Lhenice, jižní Čechy

Polychlorované bifenyle (PCB) jsou organické sloučeniny obecného vzorce C₁₂H_{10-n}Cl_n. Do 80. let minulého století byly vyráběny ve velkém množství pro své průmyslové využití. Vzhledem k tomu, že jsou nehořlavé, byly používány jako aditivum do chladicích směsí a maziv v transformátorech, kondenzátorech a dalších elektrických zařízeních. Celosvětová produkce PCB do roku 1988 je odhadována přibližně na 1,5 milionů tun (cit.⁶⁹). Přestože jejich výroba byla zastavena vzhledem k jejich negativnímu vlivu na lidské zdraví a celkově na fungování ekosystémů, jsou dnes stále odhalovány na mnoha lokalitách⁷⁰. Je to dáno především tím, že jsou tyto látky těžké a atmosférickými proudy mohou být transportovány na obrovské vzdálenosti od místa výroby či použití⁷¹. Z tohoto důvodu je bioremediace ideálním způsobem odstraňování PCB z životního prostředí a je jí proto dlouhodobě věnována pozornost.

První studie o bakteriální degradaci chlorobifenylů pocházejí ze 70. let (cit.^{72–74}). Od té doby byla izolována celá řada bakteriálních kmenů schopných růstu na bifenylu a kometabolizace celé řady chlorovaných derivátů^{75–78}. Vedle mikroorganismů se na bioremediaci lokalit kontaminovaných PCB podílejí i rostliny – buď přímo absorpcí a transformací PCB, nebo nepřímo produkcí celé řady látek v rhizosféře, které slouží jako zdroj uhlíku nebo induktor degradačních enzymů rhizosférických mikroorganismů^{1,79}.

V České republice je dle materiálů Ministerstva životního prostředí k lednu 2013 evidováno celkem 340 lokalit kontaminovaných PCB. Výzkum v naší laboratoři se dlouhodobě soustředil na kontaminovanou zeminu, která je uložena v blízkosti obce Lhenice v jižních Čechách. Souhrn výsledků 10 let výzkumu prezentovaný ve studii autorů Macková a spol.⁸⁰ ukazuje, jak během času dochází přirozenou atenuací k úbytku PCB ze zeminy činností autochtonní mikroflóry a přirozené náletové vegetace, která dnes zcela skládku kontaminované zeminy pokrývá. Proto byla kontaminovaná zemina z této lokality předmětem celé řady experimentů prováděných v laboratorních mikrokosmech. Jejich cílem bylo nejprve izolovat a identifikovat bakterie schopné růstu na bifenylu jako jediným zdroji uhlíku (kmeny potenciálně zodpovědné za přirozenou atenuaci PCB), později byla pomocí molekulárně biologických nástrojů studována bakteriální diversity a její změny v závislosti na rostlinném druhu či přítomnosti

sekundárních metabolitů rostlin i potenciální důsledky těchto změn pro odbourávání PCB.

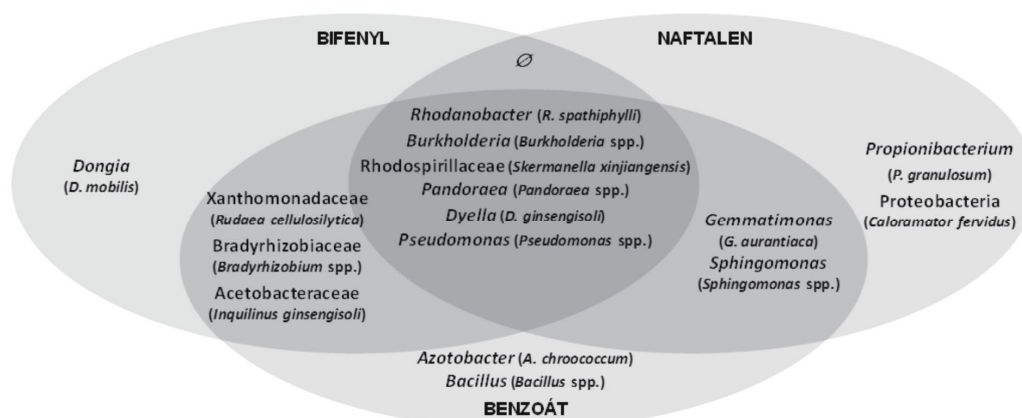
Hlavními testovanými rostlinnými druhy byl křen selský, tabák viržinský a lilek černý. Z hlediska efektivity degradace PCB se jako vhodný kandidát k zrychlení bioremediačního procesu dle našich výsledků jeví především křen selský. V jeho kořenech se akumulovalo největší množství PCB (Uhlík a spol., dosud nepublikovaná data) a z jeho rhizosféry se podařilo izolovat největší množství různých bakteriálních izolátů rostoucích na bifenyly. Z rhizosféry tabáku byly izolovány především zástupci rodů *Pseudomonas* a *Achromobacter*, z rhizosféry lilku pak rovněž několik různých pseudomonád a jeden izolát rodu *Ochrobactrum*²⁷. Jak bylo uvedeno výše, izoláty z rhizosféry křenu byly podstatně rozmanitější. Mezi 54 izoláty byly identifikovány bakterie rodů izolovaných běžně mezi bakteriemi degradujícími PCB, konkrétně *Achromobacter*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Arthrobacter*, *Aeromonas*, *Gordonia* nebo *Microbacterium*. Vedle nich se podařilo na parách bifenyly nově izolovat bakterie *Rhizobium radiobacter* nebo *Serratia fonticola*³⁸.

Otázkou bylo, zda tyto bakterie, dle kultivačních studií disponující schopností metabolizovat bifenyly, rostou na bifenyly přímo v zemině. Pro tyto účely byla použita metoda isotopového značení s finální detekcí bakterií metabolizujících bifenyly pomocí genových knihoven 16S rRNA genů. Knihovny byly sestaveny po amplifikaci genů z ¹³C-značené DNA, která byla izolována po 3, 7 a 14denní inkubaci vzorků zeminy s ¹³C-bifenyly⁸¹. Mezi metabolicky aktivními kmeny byl nalezen z výše zmíněných bakterií pouze *Achromobacter* sp., a sice v genových knihovnách získaných po 7 a 14denní inkubaci. V těchto knihovnách to byl dokonce druhý dominantní taxon, početně převládá už pouze rod *Hydrogenophaga*. Na výsledcích této studie je patrná i zvyšující se diversita populací, jejichž DNA je značena nuklidem ¹³C, v závislosti na době inkubace zeminy se substrátem. Tento jev může být důsledkem toku uhlíku komunitou, kdy populace primárně asimilující uhlík ze značeného substrátu produkují metabo-

lity, které se stávají zdrojem uhlíku pro jiné populace.

S příchodem vysokokapacitního sekvenování bylo možné mnohem podrobněji popsat diversitu celkových populací v dané zemině, ale i populací potenciálně zodpovědných za přirozenou atenuaci kontaminantů. Jako modelové sloučeniny byly použity (i) bifenyly, strukturní analog PCB, (ii) benzoát, meziprodukt odbourávání bifenyly, a (iii) naftalen, základní zástupce polyaromatických uhlovodíků, které se v lhenické zemině rovněž vyskytují. Z analýzy 16S rRNA genů celkových populací je patrné, že dominantními skupinami bakterií jsou proteobakterie a acidobakterie. Mezi proteobakteriemi pak početně převládají bakterie rodu *Rhodanobacter*. Při analýze isotopově značených metagenomů izolovaných po inkubaci vzorků zeminy s ¹³C-značeným bifenyly, benzoátem a naftaleny se ukázalo, že tento taxon byl rovněž velmi hojně zastoupen mezi metabolicky aktivními populacemi spolu s bakteriemi rodů *Burkholderia*, *Pandoraea*, *Dyella*, *Pseudomonas* nebo populací čeledi Rhodospirillaceae (obr. 1). Je patrné, že většina populací, které získávají uhlík z bifenyly a/nebo benzoátu, využívají uhlík i z naftalenu, což poukazuje na širší biodegradaci schopnosti mnohých půdních bakterií⁸².

V mnoha předchozích studiích bylo popsáno, že remediace probíhající v rhizosféře je efektivnější než remediace v nevegetované zemině⁸³. Za normálních podmínek totiž rostliny uvolňují do zeminy sacharidy, aminokyseliny a další látky podporující bakteriální růst a aktivitu. Z hlediska bioremediace jsou podstatně především produkty sekundárního metabolismu jako potenciální zdroj uhlíku pro řadu mikrobiálních populací schopných degradovat aromatické látky nebo jako induktory enzymů biodegradčních drah⁸⁴. V naší nejnovější studii⁸⁵ jsme se věnovali vlivu vybraných sekundárních metabolitů naringinu (flavonoid), limonenu (terpen) a kyseliny kávové (fenolická látka) na mikrobiální diversitu v kontaminované zemině a s tím spojenou degradaci PCB. Tyto sekundární metabolity byly vybrány na základě předchozích výsledků, kdy se ukázalo, že mají u vybraných bakteriálních izolátů



Obr. 1. Vennův diagram zobrazující populace, které se podílejí na metabolismu bifenyly, benzoátu a naftalenu. V závorkách je uveden typový kmen fylogeneticky nejbližší příbuzný nalezené sekvenci⁸²

srovnatelnou schopnost indukovat degradaci PCB obdobně jako běžně užívaný, ale toxický laboratorní induktor bifenyly. Diversita celkových populací se po 8týdenním pravidelném přidávání sekundárních metabolitů výrazně změnila. Na základě indexů alfa-diversity je patrný její pokles v pořadí kontrolní zemina > zemina obohacovaná limonem > zemina obohacovaná naringinem > zemina obohacovaná kyselinou kávovou. Zjevně se tak projevuje antimikrobiální účinek těchto látek, které potlačují růst celé řady bakteriálních populací. Byly ale patrné i změny v diversitě populací metabolizujících 4-chlorbifenyly. Naringin selektivně podporoval především bakterie rodů *Hydrogenophaga* a *Terrimonas*, kyselina kávová bakterie rodu *Burkholderia* a *Pseudoxanthomonas*, limonen pak *Hydrogenophaga* a *Azoarcus*. S výjimkou *Azoarcus* spp. nebyly žádné z těchto populací identifikovány v ¹³C-DNA izolované z kontrolní zeminy. Se změnami diversity byla spojená i rozdílná degradace PCB v zemině. Aplikace naringinu vedla k nejvyššímu úbytku PCB jako celku, aplikace kyseliny kávové pak především ke zvýšenému odbourávání výše chlorovaných kongenerů. Toto zjištění skýtá potenciál použití celé řady přírodních produktů bohatých na příslušné sekundární metabolity (např. velké množství naringinu v grepové kůře nebo limonenu v citronové kůře) pro zvýšení efektivity bioremediace.

3. Závěr

Techniky identifikace a charakterizace bakterií se v posledních letech velice intenzivně rozvíjejí a umožňují tak obrovský pokrok na poli mikrobiální ekologie. Ještě před dvaceti lety nebylo možné nalézt bakterie degradující kontaminanty životního prostředí jinak než kultivačně. O dekádu později se do rukou mikrobiálních ekologů dostal mocný nástroj umožňující spojit bez potřeby kultivace metabolickou aktivitu s jejím původcem – isotopové značení. I přesto, že se nejedná o jedinou techniku integrující metabolickou aktivitu s identitou jejího původce, je jednoznačně nejpoužívanější⁶¹. Výsledky mnohých výše zmíněných studií jasně ukazují rozpor ve výsledcích kultivačních experimentů a těch, které využívají isotopového značení. Právě tento fakt může být důvodem toho, proč mnohé bioremediační zákroky navržené na základě kultivačních metod nevedou ke kýženému cíli.

Nedávné zapojení metagenomiky při analýze isotopově značené DNA opět posunula možnosti molekulárně ekologických analýz o krok dále. Metagenomická analýza isotopově značené DNA se tak stala účinným nástrojem bioremediačního výzkumu. S jejím využitím lze identifikovat mikroorganismy podílející se na degradaci kontaminantů i jejich příslušné funkční geny, tedy stanovit bioremediační potenciál indigenní mikrobioty, ale i sledovat průběh bioremediačních zákroků, jakými jsou biostimulace či bioaugmentace.

V budoucnu s nástupem technik metatranskriptomiky a metaproteomiky lze očekávat další rozvoj mikrobiální ekologie. Oproti metagenomice se metatranskriptomika a metaproteomika zabývají pouze realizovanou genetickou

informací. V případě metatranskriptomiky nedávné studie ukazují, že se již podařilo překonat zásadní problémy, které bránily rozkvětu tohoto oboru – nízké výtěžky environmentálních transkriptů, nestabilitu mRNA nebo obtížnou separovatelnost mRNA od ostatních druhů RNA⁸⁶. Je tedy jen otázkou času, kdy budou tyto techniky promítnuty do bioremediačního výzkumu.

I když molekulárně ekologické metody umožňují odhalit a studovat skutečnou mikrobiální diversitu, charakterizace mikroorganismů po kultivaci zůstává stále zdrojem největšího množství informací. Proto je nutné se v rámci výzkumu v oblasti mikrobiální diversity zaměřovat i na kultivaci obtížně nebo dosud nekultivovaných mikroorganismů. Získ nových izolátů v čisté kultuře umožní jejich následnou důkladnou charakterizaci. Nově získané informace budou využity pro doplnění databází, což umožní další rozvoj metagenomiky, metatranskriptomiky i metaproteomiky.

Práce vznikla za finanční podpory projektu GA ČR 13-20414P

LITERATURA

- Macek T., Macková M., Káš J.: *Biotechnol. Adv.* 18, 23 (2000).
- Vondráček J., Lovecká P., Uhlík O., Musilová L., Macková M.: *Chem. Listy* 106, 246 (2012).
- Rezek J., Macek T., Macková M., Tříska J., Růžičková K.: *Environ. Sci. Technol.* 42, 5746 (2008).
- Musilová L., Uhlík O., Macková M., Macek T.: *Chem. Listy* 106, 1029 (2012).
- Moore E. R. B., Mihaylova S. A., Vandamme P., Krichesky M. I., Dijkshoorn L.: *Res. Microbiol.* 161, 430 (2010).
- Kämpfer P., Glaeser S. P.: *Environ. Microbiol.* 14, 291 (2012).
- Brenner D. J., Staley J. T., Krieg N. R., v knize: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Boone D. R., Castenholz R. W., ed.), sv. 1. Springer Verlag, New York 2001.
- Schleifer K. H.: *Syst. Appl. Microbiol.* 32, 533 (2009).
- Staley J. T., Konopka A.: *Annu. Rev. Microbiol.* 39, 321 (1985).
- Fox G. E., Stackebrandt E., Hespell R. B., Gibson J., Maniloff J., Dyer T. A., Wolfe R. S., Balch W. E., Tanner R. S., Magrum L. J., Zablen L. B., Blakemore R., Gupta R., Bonen L., Lewis B. J., Stahl D. A., Luehrschen K. R., Chen K. N., Woese C. R.: *Science* 209, 457 (1980).
- Lane D. J., v knize: *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics* (Stackebrandt E., Goodfellow M., ed.). J. Wiley, New York 1991.
- Pace N. R., Stahl D. A., Lane D. J., Olsen G. J.: *ASM News* 51, 4 (1985).
- Lane D. J., Pace B., Olsen G. J., Stahl D. A., Sogin M. L., Pace N. R.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 6955

- (1985).
14. Cole J. R., Konstantinidis K., Farris R. J., Tiedje J. M., v knize: *Environmental Molecular Microbiology* (Liu W. T., Jansson J. K., ed.). Caister Academic Press, Norfolk 2010.
 15. Cardenas E., Tiedje J. M.: *Curr. Opin. Biotechnol.* 19, 544 (2008).
 16. Mayr E.: *Systematics and the Origin of Species*. Columbia University Press, New York 1942.
 17. Gevers D., Cohan F. M., Lawrence J. G., Spratt B. G., Coenye T., Feil E. J., Stackebrandt E., Y. V. d. P., Vandamme P., Thompson F. L., Swings J.: *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 733 (2005).
 18. Achtman M., Wagner M.: *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 431 (2008).
 19. Stackebrandt E., Frederiksen W., Garrity G. M., Grimont P. A. D., Kampf P., Maiden M. C. J., Nesme X., Rossello-Mora R., Swings J., Truper H. G., Vaute-erin L., Ward A. C., Whitman W. B.: *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 1043 (2002).
 20. Goris J., Konstantinidis K. T., Klappenbach J. A., Coenye T., Vandamme P., Tiedje J. M.: *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57, 81 (2007).
 21. Konstantinidis K. T., Tiedje J. M.: *Curr. Opin. Microbiol.* 10, 504 (2007).
 22. Cole J. R., Wang Q., Cardenas E., Fish J., Chai B., Farris R. J., Kulam-Syed-Mohideen A. S., McGarrell D. M., Marsh T., Garrity G. M., Tiedje J. M.: *Nucleic Acids Res.* 37, D141 (2009).
 23. Amann R. I., Ludwig W., Schleifer K. H.: *Microbiol. Rev.* 59, 143 (1995).
 24. Leigh M. B., v knize: *Phytoremediation and Rhizoremediation. Theoretical Background* (Macková M., Dowling D., Macek T., ed.). Springer, Dordrecht 2006.
 25. Xu J.: *Mol. Ecol.* 15, 1713 (2006).
 26. Torsvik V., Øvreås L.: *Curr. Opin. Microbiol.* 5, 240 (2002).
 27. Kurzawová V., Štursa P., Uhlík O., Norková K., Strohalm M., Lipov J., Kochánková L., Macková M.: *New Biotechnol.* 30, 15 (2012).
 28. Sutherland J. B., Rafii F., v knize: *Identification of Microorganisms by Mass Spectrometry* (Wilkins C. L., Lay J. O., Jr., ed.). J. Wiley, Hoboken 2006.
 29. Torsvik V., Øvreås L., Thingstad T. F.: *Science* 296, 1064 (2002).
 30. Truu J., Talpsep E., Heinaru E., Stottmeister U., Wand H., Heinaru A.: *J. Microbiol. Methods* 36, 193 (1999).
 31. Claydon M. A., Davey S. N., Edwards-Jones V., Gordon D. B.: *Nat. Biotechnol.* 14, 1584 (1996).
 32. Holland R. D., Wilkes J. G., Rafii F., Sutherland J. B., Persons C. C., Voorhees K. J., Lay J. O., Jr.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 10, 1227 (1996).
 33. Sauer S., Kliem M.: *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 74 (2010).
 34. Jurinke C., Oeth P., van den Boom D.: *Mol. Biotechnol.* 26, 147 (2004).
 35. Liyanage R., Lay J. O., Jr., v knize: *Identification of Microorganisms by Mass Spectrometry* (Wilkins C. L., Lay J. O., Jr., ed.). J. Wiley, Hoboken 2006.
 36. Maier T., Klepel S., Renner U., Kostrzewa M.: *Nat. Methods* 3, i (Application Note) (2006).
 37. Koubek J., Uhlík O., Ječná K., Junková P., Vrkoslavová J., Lipov J., Kurzawová V., Macek T., Macková M.: *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 69, 82 (2012).
 38. Uhlík O., Strejček M., Junková P., Šanda M., Hroudová M., Vlček C., Macková M., Macek T.: *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 6858 (2011).
 39. Riesenfeld C. S., Schloss P. D., Handelsman J.: *Annu. Rev. Genet.* 38, 525 (2004).
 40. Daniel R.: *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 470 (2005).
 41. Handelsman J., Rondon M. R., Brady S. F., Clardy J., Goodman R. M.: *Chem. Biol.* 5, R245 (1998).
 42. Muyzer G., de Waal E. C., Uitterlinden A. G.: *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 695 (1993).
 43. Vasquez A., Ahne S., Pettersson B., Molin G.: *Lett. Appl. Microbiol.* 32, 215 (2001).
 44. Liu W. T., Marsh T. L., Cheng H., Forney L. J.: *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 4516 (1997).
 45. Torsvik V., Daae F. L., Sandaa R. A., Øvreås L.: *J. Biotechnol.* 64, 53 (1998).
 46. Bent S. J., Forney L. J.: *ISME J.* 2, 689 (2008).
 47. Venter J. C., Remington K., Heidelberg J. F., Halpern A. L., Rusch D., Eisen J. A., Wu D., Paulsen I., Nelson K. E., Nelson W., Fouts D. E., Levy S., Knap A. H., Lomas M. W., Nealson K., White O., Peterson J., Hoffman J., Parsons R., Baden-Tillson H., Pfannkoch C., Rogers Y. H., Smith H. O.: *Science* 304, 66 (2004).
 48. Goldberg S. M. D., Johnson J., Busam D., Feldblyum T., Ferriera S., Friedman R., Halpern A., Khouri H., Kravitz S. A., Lauro F. M., Li K., Rogers Y. H., Strausberg R., Sutton G., Tallon L., Thomas T., Venter E., Frazier M., Venter J. C.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 11240 (2006).
 49. Margulies M., Egholm M., Altman W. E., Attiya S., Bader J. S., Bemben L. A., Berka J., Braverman M. S., Chen Y. J., Chen Z. T., Dewell S. B., Du L., Fierro J. M., Gomes X. V., Godwin B. C., He W., Helgesen S., Ho C. H., Irzyk G. P., Jando S. C., Alenquer M. L. I., Jarvie T. P., Jirage K. B., Kim J. B., Knight J. R., Lanza J. R., Leamon J. H., Lefkowitz S. M., Lei M., Li J., Lohman K. L., Lu H., Makhijani V. B., McDade K. E., McKenna M. P., Myers E. W., Nickerson E., Nobile J. R., Plant R., Puc B. P., Ronan M. T., Roth G. T., Sarkis G. J., Simons J. F., Simpson J. W., Srinivasan M., Tartaro K. R., Tomasz A., Vogt K. A., Volkmer G. A., Wang S. H., Wang Y., Weiner M. P., Yu P. G., Begley R. F., Rothberg J. M.: *Nature* 437, 376 (2005).
 50. Iwai S., Chai B., Jesus E. d. C., Penton C. R., Lee T. K., Cole J. R., Tiedje J. M., v knize: *Handbook of Molecular Microbial Ecology I*. J. Wiley, Hoboken 2011.
 51. He Z., Deng Y., Van Nostrand J. D., Tu Q., Xu M., Hemme C. L., Li X., Wu L., Gentry T. J., Yin Y., Liebich J., Hazen T. C., Zhou J.: *ISME J.* 4, 1167

- (2010).
52. He Z., Gentry T. J., Schadt C. W., Wu L., Liebich J., Chong S. C., Huang Z., Wu W., Gu B., Jardine P., Criddle C., Zhou J.: *ISME J.* 1, 67 (2007).
 53. Schmeisser C., Steele H., Streit W. R.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75, 955 (2007).
 54. Vieites J. M., Guazzaroni M. E., Beloqui A., Golyshin P. N., Ferrer M.: *FEMS Microbiol. Rev.* 33, 236 (2009).
 55. Boschker H. T. S., Nold S. C., Wellsbury P., Bos D., de Graaf W., Pel R., Parkes R. J., Cappenberg T. E.: *Nature* 392, 801 (1998).
 56. Radajewski S., Ineson P., Parekh N. R., Murrell J. C.: *Nature* 403, 646 (2000).
 57. Manefield M., Whiteley A. S., Griffiths R. I., Bailey M. J.: *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5367 (2002).
 58. Jehmlich N., Schmidt F., von Bergen M., Richnow H. H., Vogt C.: *ISME J.* 2, 1122 (2008).
 59. Huang W. E., Ferguson A., Singer A. C., Lawson K., Thompson I. P., Kalin R. M., Larkin M. J., Bailey M. J., Whiteley A. S.: *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 234 (2009).
 60. Dumont M. G., Pommerenke B., Casper P., Conrad R.: *Environ. Microbiol.* 13, 1153 (2011).
 61. Gutierrez-Zamora M. L., Manefield M.: *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 9, 153 (2010).
 62. Neufeld J. D., Dumont M. G., Vohra J., Murrell J. C.: *Microb. Ecol.* 53, 435 (2007).
 63. Schwarz S., Waschkowitz T., Daniel R.: *World J. Microbiol. Biotechnol.* 22, 363 (2006).
 64. Dumont M. G., Radajewski S. M., Miguez C. B., McDonald I. R., Murrell J. C.: *Environ. Microbiol.* 8, 1240 (2006).
 65. Chen Y., Dumont M. G., Neufeld J. D., Bodrossy L., Stralis-Pavese N., McNamara N. P., Ostle N., Briones M. J., Murrell J. C.: *Environ. Microbiol.* 10, 2609 (2008).
 66. Neufeld J. D., Chen Y., Dumont M. G., Murrell J. C.: *Environ. Microbiol.* 10, 1526 (2008).
 67. Kalyuzhnaya M. G., Lapidus A., Ivanova N., Copeland A. C., McHardy A. C., Szeto E., Salamov A., Grigoriev I. V., Suciú D., Levine S. R., Markowitz V. M., Rigoutsos I., Tringe S. G., Bruce D. C., Richardson P. M., Lidstrom M. E., Chistoserdova L.: *Nat. Biotechnol.* 26, 1029 (2008).
 68. Leigh M. B., Pellizari V. H., Uhlík O., Sutka R., Rodrigues J., Ostrom N. E., Zhou J., Tiedje J. M.: *ISME J.* 1, 134 (2007).
 69. Holoubek I., v knize: *PCBs: Recent Advances in Environmental Toxicology and Health Effects* (Robertson L. W., Hansen L. G., ed.). University Press of Kentucky, Lexington 2001.
 70. Breivik K., Sweetman A., Pacyna J. M., Jones K. C.: *Sci. Total Environ.* 290, 181 (2002).
 71. Oehme M.: *Ambio* 20, 293 (1991).
 72. Ahmed M., Focht D. D.: *Can. J. Microbiol.* 19, 47 (1973).
 73. Baxter R. A., Gilbert P. E., Lidgett R. A., Mainprize J. H., Vodden H. A.: *Sci. Total Environ.* 4, 53 (1975).
 74. Furukawa K., Tonomura K., Kamibayashi A.: *Appl. Environ. Microbiol.* 35, 223 (1978).
 75. Bopp L. H.: *J. Ind. Microbiol.* 1, 23 (1986).
 76. Furukawa K., Miyazaki T.: *J. Bacteriol.* 166, 392 (1986).
 77. Masai E., Yamada A., Healy J. M., Hatta T., Kimbara K., Fukuda M., Yano K.: *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 2079 (1995).
 78. Hurtubise Y., Barriault D., Powlowski J., Sylvestre M.: *J. Bacteriol.* 177, 6610 (1995).
 79. Van Aken B., Correa P. A., Schnoor J. L.: *Environ. Sci. Technol.* 44, 2767 (2010).
 80. Macková M., Prouzová P., Štursa P., Ryšlavá E., Uhlík O., Beranová K., Rezek J., Kurzawová V., Demnerová K., Macek T.: *Environ. Sci. Pollut. Res.* 16, 817 (2009).
 81. Uhlík O., Ječná K., Macková M., Vlček C., Hroudová M., Demnerová K., Pačes V., Macek T.: *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 6471 (2009).
 82. Uhlík O., Wald J., Strejček M., Musilová L., Řídl J., Hroudová M., Vlček Č., Cardenas E., Macková M., Macek T.: *PLoS ONE* 7, e40653 (2012).
 83. Siciliano S. D., Germida J. J.: *Environ. Rev.* 6, 65 (1998).
 84. Singer A. C., Crowley D. E., Thompson I. P.: *Trends Biotechnol.* 21, 123 (2003).
 85. Uhlík O., Musilová L., Řídl J., Hroudová M., Vlček C., Koubek J., Holečková M., Macková M., Macek T.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *V tisku*, DOI: 10.1007/s00253-012-4627-6, (2012).
 86. Simon C., Daniel R.: *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 1153 (2011).

O. Uhlík^a, M. Strejček^a, M. Hroudová^b, K. Demnerová^a, and T. Macek^a (^a*Department of Biochemistry and Microbiology, Institute of Chemical Technology, Prague*, ^b*Institute of Molecular Genetics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague*): **Identification and Characterization of Bacteria with Bioremediation Potential: from Cultivation to Metagenomics**

Microbial bioremediation is based on the metabolic activity of certain populations capable of transforming or assimilating unusual substrates, including xenobiotics. Plants, on the other hand, have only limited ability to mineralize such substrates; they rather transform and store them in vacuoles or cell wall structures. Yet plants are often important for microbial activities. The rhizosphere is a hotspot of plant-microbe interactions. Identification and characterization of microorganisms in contaminated environments is essential for (i) assessing the bioremediation potential of intrinsic microflora, (ii) designing bioremediation strategies; and (iii) monitoring engineering bioremediation. The development of associated techniques – from cultivation to metagenomics – is illustrated by a case study.