

# WSPÓLCZESNE METODY IDENTYFIKACJI BAKTERII STOSOWANE W EKOLOGII MIKROORGANIZMÓW WODNYCH – FLUORESCENCYJNA HYBRYDYZACJA *IN SITU* (FISH)

Agnieszka Skowrońska, Izabella Zmysłowska

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski, Katedra Mikrobiologii Środowiskowej  
ul. Romana Prawocheńskiego 1, 10-957 Olsztyn-Kortowo, e-mail: agnieszka.skowronska@uwm.edu.pl

Wpłynęło w sierpniu 2005 r.

1. Wstęp. 2. Badania zespołów mikroorganizmów z zastosowaniem metody PCR i sekwencjonowaniem genów rRNA. 3. Fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (FISH). 4. Enzymatyczne wzmocnienie sygnału (CARD)-FISH. 5. Ograniczenia związane ze stosowaniem metody FISH. 6. Podsumowanie

## Current methods for identification of bacteria in aquatic microbial ecology – fluorescence *in situ* hybridization (FISH)

**Abstract:** Nowadays using molecular techniques prokaryotic cells can be quickly and directly identified in environmental samples. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) with rRNA-targeted oligonucleotide probes has become one of the major techniques in environmental microbiology allows rapid and reliable quantification of population sizes, as well as distinction of bacterial morphotypes. The major question in microbial ecology of who is out there can be answered using this method. With the increased sensitivity of FISH and methodological improvements, as well as combination of FISH with various other techniques, more detailed account of the activity of a single microbial cell can be also gained. Another approach in microbial ecology is based on comparative sequence analysis of rRNA genes for the study of diversity and community composition of microbial assemblages. It has been termed the “full-cycle rRNA analysis” and offers a cultivation-independent alternative technique for the identification of new microorganisms. In this procedure the 16S rRNA gene fragments can be selectively amplified from mixed DNA then cloned and sequenced. The rapidly growing amount of new retrieved sequence allows comparative sequence analysis with the available databases and design of specific rRNA-targeted DNA probes.

1. Introduction. 2. Bacterial community analysis using PCR and sequencing of rRNA genes. 3. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH). 4. Enzymatic signal amplification (CARD)-FISH. 5. Current obstacles to general application of FISH method. 6. Summary

---

**Słowa kluczowe:** FISH, hybrydyzacja *in situ*, 16S rRNA, sondy oligonukleotydowe

**Key words:** FISH, *in situ* hybridization, 16S rRNA, oligonucleotide probes

---

## 1. Wstęp

Do niedawna identyfikacja bakterii w mieszaninie mikroorganizmów wymagała wielu żmudnych i długotrwałych analiz. Wprowadzenie metody bezpośredniego liczenia bakterii z użyciem filtrów membranowych i odpowiednich barwników interkalujących z DNA, jak np. DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindol) oraz zastosowanie mikroskopu epifluorescencyjnego, umożliwiło precyzyjną analizę i rozpoznawanie bardzo małych form drobnoustrojów [35, 60]. Dzięki zaadoptowaniu techniki komputerowej analizy obrazu przez Björnsena [12] i Pennera [61], możliwa stała się szybka ilościowa ocena morfologiczna bakterii, umożliwiająca wgląd w strukturę bakteriocenozy. Powyższe metody pozwoliły na wykazanie, że nie wszystkie bakterie widoczne pod mikroskopem są zdolne do formowania kolonii na pożywkach. Identyfikacja bakterii z mieszaniny mikroorganizmów jest bardzo trudna, ponieważ po wyhodowaniu na specjalnie dobranych podłożach laboratoryjnych następuje całkowita zmiana składu po-

pulacji i procesy te trudno jest kontrolować [37, 38]. Okazało się, że zaledwie 0,001–0,1% ogólnej liczby bakterii jest zdolna do wzrostu *in vitro* [2]. Obecnie ocenia się, że mniej niż 1% wszystkich mikroorganizmów występujących w naturze zostało wyhodowanych i zbadanych, a zaledwie kilka tysięcy gatunków bakterii sklasyfikowano taksonomicznie. Potwierdziły się przypuszczenia wielu badaczy, że większość mikroorganizmów jest niezdolna do wzrostu w czystych kulturach.

Wizualna identyfikacja większości mikroorganizmów jest niemożliwa ze względu na ograniczenia wynikające z podobieństwa morfologicznego bakterii. Klasyczne metody diagnostyczne są często niewystarczające do właściwego rozróżniania bakterii. Tylko w przypadku dobrze poznanych drobnoustrojów, do ich identyfikacji wystarczy wykonanie testów opartych o oznaczanie cech fenotypowych: biochemicznych, morfologicznych i serologicznych. Jednakże diagnostyka oparta tylko na oznaczeniach cech fenotypowych, ze względu na dużą zmienność bakterii, może prowadzić do nieprawidłowej identyfikacji. Nawet te