



Gen *gfp* jako fluorescencyjne narzędzie w analizie ekspresji genów i konstrukcji biosensorów

Marzena Matejczyk¹, Stanisław, Józef Rosochacki^{1,2}

¹Katedra Biologii Sanitarnej i Biotechnologii, Politechnika Białostocka, Białystok

²Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt, Polska Akademia Nauk, Jastrzębiec

Gfp gene as a fluorescence tool in gene expression analysis and biosensors construction

Summary

When autofluorescent protein such as green fluorescent protein (GFP) is excited with light of a specific wavelength, it emits light of a longer wavelength without further addition of substrates. *Gfp* belongs to a family of reporter genes which provide easily detectable phenotypes to microbial cells and are, therefore, a valuable tool for the study of microorganisms in the environment, especially for analysis of processes such as microbe-plant interactions, biofilm formation, horizontal gene transfer (HGT) and gene expression analysis in different conditions (under influence of biological, physical and chemical factors), and bacterial biosensors construction. In this paper, the main possibilities of *gfp* gene as a marker application in microbial ecology, gene expression analysis and biosensors development are presented.

Adres do korespondencji

Marzena Matejczyk,
Katedra Biologii Sanitarnej
i Biotechnologii,
Politechnika Białostocka,
ul. Wiejska 45 E,
15-351 Białystok;
e-mail:
matejczyk@interia.pl

Key words:

gfp gene, GFP protein, reporter gene technology, gene expression analysis, biosensors.

1. Wstęp

Technologia genów reporterowych jest obecnie szeroko wykorzystywana nie tylko do monitorowania procesów zachodzących w komórce związanych z transdukcją sygnałów komórkowych

i ekspresją określonych genów, lecz również geny te stały się podstawowym narzędziem używanym w wielu laboratoriach do monitorowania *in situ* horyzontalnego transferu genów między mikroorganizmami, ich aktywności w glebie, tkankach roślinnych i zwierzęcych, podczas formowania biofilmu oraz w konstruowaniu biosensorów (1-3).

W kreowaniu genetycznie zmodyfikowanych mikroorganizmów wyróżniono dwie główne strategie, pierwsza z nich dotyczy użycia metabolicznych markerów wymagających do wykrycia ich ekspresji dodatkowych substratów. Do tej kategorii genów należą: gen *lacZ* kodujący enzym β -galaktozydazę, gen *xylE* kodujący dioksygenazę 2,3-katecholu, gen *gusA* kodujący β -glukuronidazę, gen *phoA* kodujący fosfatazę, geny prokariotycznej i eukariotycznej lucyferazy oraz geny oporności na antybiotyki i metale ciężkie. Drugą grupę genów reporterowych stanowią geny odpowiedzialne za syntezę autofluorescencyjnych białek (AFPs, ang. *autofluorescent proteins*). Jednym z najbardziej popularnych genetycznych markerów należących do tej grupy okazał się pochodzący z meduzy *Aequorea victoria* gen *gfp* (ang. *green fluorescent protein*), którego produktem ekspresji jest świecące na zielono białko GFP. Białko GFP świeci w świetle UV (ryc. 1 i 2) bez potrzeby stosowania dodatkowych substratów. Jedynym ograniczeniem w aplikacji genu *gfp* jest dostępność tlenu, ponieważ w warunkach beztlenowych nie dochodzi do prawidłowego formowania się odpowiedzialnego za świecenie fluoroforu i pojawienia się sygnału świetlnego (4-6). Dzięki analizie mutacyjnej regionu fluoroforowego i w konsekwencji zmiany długości fali maksymalnego wzbudzenia i emisji otrzymano szereg komercyjnie dostępnych wariantów GFP; ważniejsze z nich przedstawiono w tabeli 1. Mutanty białka charakteryzują się m.in. szybszym czasem dojrzewania fluoroforu, większą stabilnością oraz emisją znacznie silniejszego sygnału świetlnego niż ich formy dzikie. Pozy-skano również warianty o krótszym okresie półtrwania, które okazały się szczególnie przydatne w testowaniu aktywności oraz funkcjonalności promotorów, jak również warianty nie wykazujące fluorescencji (7-9).

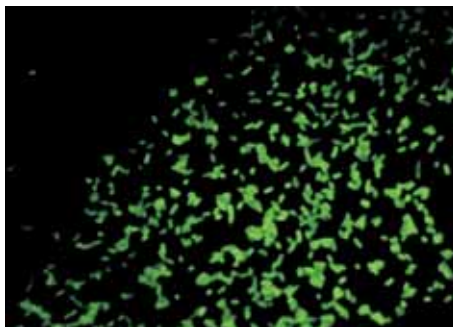
Tabela 1

Główne mutanty białka GFP (4)

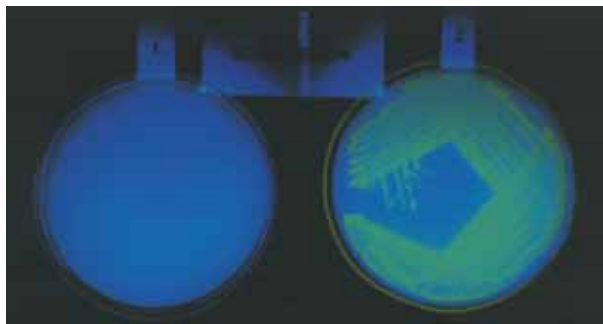
Nazwa białka	Długość fali maksymalnego wzbudzenia (nm)	Długość fali maksymalnej emisji (nm)
1	2	3
GFP	395	509
S657	489	511
S65C	479	507
GFPmut1*	488	507
GFPmut2	481	507
GFPmut3	501	511
P11	471	502
GFP(ASV)	501	511
Y66H	380	440

1	2	3
P4	382	448
P4-3	381	445
BFPsg50	387	450
W2	432	480
W7	434	474
ECFP	433	475/501
EYFP	514	527
10C	514	527
OGFP	385	510

* jedna z najczęściej wykorzystywanych form białka GFP charakteryzująca się emisją 35-krotnie silniejszego sygnału świetlnego (w przeliczeniu na jednostkę białka) przy wzbudzeniu światłem o długości fali 488 nm w stosunku do dzikiego typu GFP.



Ryc. 1. Ekspresja genu *gfp* w dwudziestogodzinnej płynnej hodowli – pożywka LB z ampicyliną w stężeniu 100 g/ml hodowli *E. coli* MM 294 (kolekcja własna). Dokumentację fotograficzną wykonano w mikroskopie fluorescencyjnym BX41 firmy OLYMPUS z filtrem do *gfp* sprzężonym z kamerą cyfrową DP-12, pow. 1000 ×.



Ryc. 2. Ekspresja genu *gfp* w 20-godzinnej hodowli *E. coli* MM 294 (kolekcja własna) na agarze/LB bez ampicyliny. Dokumentację fotograficzną wykonano aparatem cyfrowym OLYMPUS C-350.

Ze względu na fakt, że właściwości GFP są szeroko eksponowane w literaturze specjalistycznej szczególnie w ostatniej dekadzie, autorzy tej pracy postanowili ograniczyć się do dokonania przeglądu doniesień dotyczących możliwości aplikacji genu *gfp* jakie ukazały się w ostatnich latach, szczególnie od 2000 r.

2. Autofluorescencyjne białko GFP jako marker w ekologii mikroorganizmów

Wykorzystanie transkrypcyjnych fuzji promotorów wrażliwych na określone związki chemiczne jest chyba najbardziej popularne w konstrukcji bakteryjnych bioczuJNIków i monitorowaniu poziomu tego rodzaju zanieczyszczeń w różnych próbach. Jednakże bardzo interesujące, jak się wydaje, jest zwrócenie uwagi na ciekawe eksperymenty opisane w literaturze, począwszy od 2002 r., w których użyte sekwencje promotorowe wykazywały aktywność w reakcji na zmianę poziomu wody w środowisku, wahania wartości pH, czy jako wskaźnik ekspresji genów zaangażowanych w biodegradację niektórych węglowodorów w glebie, np. genu *pra* kodującego białko wykazujące właściwości bioemulsyfikujące – biorące czynny udział w procesie degradacji, np. heksadekanu (10). Gen *gfp* znalazł zastosowanie jako reporter w konstrukcji bioczuJNIka zawierającego wrażliwy na zmiany dostępności wody promotor operonu *ProU* w *E. coli*. Układ ten wykazywał wyraźną ilościową zależność pomiędzy fluorescencyjną odpowiedzią biosensora na zmiany w komórkach bakteryjnych związane z ich dostępnością do wody. Ponadto z użyciem epifluorescencyjnego mikroskopu oraz przepływowego cytometrii stało się możliwe zademonstrowanie dostępności wody bakteryjnym komórkom na liściach fasoli (11). W innej pracy poprzez substytucję aminokwasu w chromoforze uzyskano białko GFP, które wykazywało zmienność spektrum wzbudzenia w zależności od wartości pH. Taki wariant białka okazał się bardzo przydatny jako molekularna sonda w określaniu wewnętrznego pH w pojedynczych komórkach bakteryjnych w zakresie pH 5,5-8,5 (12).

Markery autofluorescencyjne, jak się okazuje, znajdują również coraz szersze zastosowanie w zjawisku wzajemnego porozumiewania się drobnoustrojów (ang. *quorum sensing*) za pomocą syntezy określonych związków chemicznych. Dotychczas zidentyfikowano, że mediatorem, który bierze udział we wzajemnej komunikacji drobnoustrojów jest lakton N-acyl-L-homoseryny (AHL). W eksperymencie przeprowadzonym przez Steidle i wsp. (13) transformowano sensorową kasetę zawierającą wrażliwy na obecność długołańcuchowych cząsteczek AHL promotor oraz gen *gfp* jako reporter do szczepu *Pseudomonas putida*, który kolonizował ryzosferę sadzonek pomidora wzrastających w niesterylnej glebie. Indukcja ekspresji genu *gfp* w tych warunkach potwierdziła pogląd, że AHL jest sygnałowym związkiem chemicznym biorącym udział we wzajemnym porozumiewaniu się populacji bakterii w ryzosferze pomidora. Tego rodzaju bioczuJNIki okazały się również przydatne w monitorowa-

niu indukowanej przez wydzieliny roślinne ekspresji bakteryjnych genów. Potwierdzono użyteczność genu *gfp* jako reportera po indukcji jego ekspresji przez arabinozę w wydzielinach sadzonek jęczmienia, przez lizynę z wydzielin korzenia kukurydzy oraz pod wpływem wydzielin z sadzonek pomidora. W tym ostatnim przypadku stwierdzono, że w bakteriach *Bacillus cereus* regulacja aktywności promotora *trap* połączonego z genem *gfp* odbywa się przy udziale wydzielin sadzonek pomidora, co mogłoby wskazywać na istnienie systemu chemicznej komunikacji pomiędzy *Bacillus cereus* i rośliną (14-16).

Moller i wsp. (17) uzyskali, na drodze transkrypcyjnej fuzji promotorów operonu degradacji toluenu (P_u i P_m) z genem *gfp* konstrukt genowy, którym transformowano szczepy *Pseudomonas putida* oraz *Acinetobacter* sp., biorące udział w tworzeniu biofilmu. Zaobserwowano indukcję obu promotorów, przy czym promotor P_u w *Pseudomonas putida* wykazywał cechy indukowalności pod wpływem alkoholu benzyłowego, który został dodany do komór z rozwijającym się biofilmem zawierającym w swoim składzie komórki *Pseudomonas putida* i *Acinetobacter* sp., oraz gdy w biofilmie był tylko szczep *Pseudomonas putida*. Odmienne reagował promotor P_m , którego aktywność wzrastała tylko wtedy gdy biofilm był jednocześnie tworzony przez oba szczepy bakteryjne, co wskazywałoby na pobudzenie tego promotora w konsekwencji wzajemnych metabolicznych interakcji pomiędzy *Pseudomonas putida* i *Acinetobacter* sp. Dzięki zastosowaniu genu *gfp* i wykorzystaniu konfokalnego, laserowego mikroskopu skaningowego możliwe było jednoczesne monitorowanie aktywności obu promotorów P_u i P_m , jak również śledzenie przestrzennego układu pojedynczych komórek bakterii w rozwijającym się biofilmie (18).

DeAngelis i wsp. (19) wprowadzili do szczepu *Enterobacter cloacae* plazmidowy konstrukt genowy zawierający fuzję aktywowanego azotanami promotora z genem *gfp*. Wykazali oni wyższy poziom fluorescencji białka GFP w ryzosferze żyta (*Avena fatua*), gdy roślina ta rosła w naturalnej glebie z dodatkiem azotanów w stosunku do gleby do której nie dodano tych związków. W eksperymencie wykazano przydatność tego bakteryjnego biosensora nie tylko w analizie aktywności promotora, lecz również w określaniu dostępności azotanów w niszach mikrobiologicznych. Do podobnych wniosków doszli również autorzy eksperymentu, w którym analizowano biodostępność jonów żelaza w bakteriach *Pseudomonas syringae*, zawierających wrazliwy na jony żelaza promotor połączony z genem *gfp* (20).

W 2000 r. Bloemberg i wsp. (21) przedstawił swoje pionierskie badania dotyczące jednoczesnego użycia trzech różnych zmutowanych form GFP oraz pochodzącego z koralowca *Discosoma striata* białka świecącego na czerwono DsRed, do monitorowania z wykorzystaniem konfokalnego laserowego mikroskopu skaningowego, różnych populacji *Pseudomonas* w ryzosferze pomidora. Od tej pory ze względu na fakt ciągłego opracowywania bardziej zróżnicowanych mutantów zarówno białka GFP jak i DsRed, ukazało się szereg prac, w których do analiz ekspresji genów, jak również wizualizacji mikroorganizmów w biofilmie i ryzosferze wykorzystuje się jednocześnie kilka autofluorescencyjnych białek emitujących światło o róż-

nej barwie. Zagadnienie to zostało szeroko omówione oraz poparte dokumentacją fotograficzną w pracy Larrainzar i wsp. (4,22).

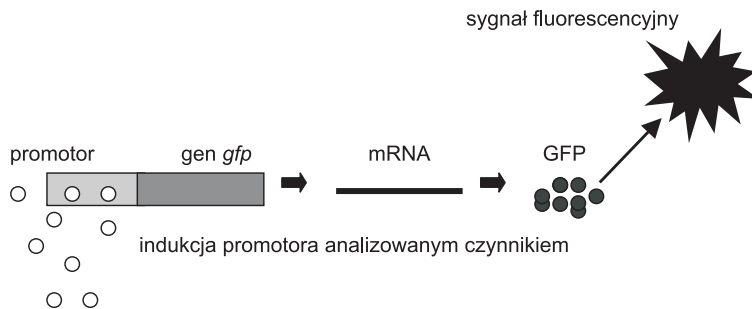
Grupa szwedzkich badaczy prowadziła prace (10), w których z sukcesem wykorzystano gen *gfp* do badań nad interakcjami różnorodnych patogenów roślinnych z biorącymi udział w biokontroli szczepami bądź roślinami. Patogen roślinny *Ralstonia solanacearum* wyznakowano genem *gfp* w celu wizualizacji infekcji tkanek pomidora. Innym przykładem jest monitorowanie z użyciem systemu GFP *Trichoderma atroviride*, używanego w biokontroli chorób wywoływanych przez grzyby (10).

Kolejnym zagadnieniem analizowanym z użyciem fluorescencyjnego białka GFP jest wizualizacja horyzontalnego transferu genów – HGT (ang. *Horizontal Genes Transfer*) u bakterii. Horyzontalny transfer genów odgrywa ogromną rolę zarówno w ewolucji mikroorganizmów, jak również w rozprzestrzenianiu się genów oporności na antybiotyki stosowane w leczeniu ludzi i zwierząt. Tradycyjne molekularne metody analizy DNA ograniczają się jedynie do kontrolowanych warunków laboratoryjnych, natomiast techniki z wykorzystaniem AFP pozwalają na bezpośredni fluorescencyjny screening materiału genetycznego transferowanego pomiędzy szczepami bakterii, co umożliwi przede wszystkim określenie częstości transferu genowego w różnych środowiskach (4). Spośród prac dotyczących aplikacji genu *gfp* w badaniach nad HGT interesujące jest, jak się wydaje, zwrócenie uwagi na prezentowane przez Nancharai i wsp. (23) pionierskie badania dotyczące zastosowania techniki podwójnego znakowania białkami GFP i DsRed szczepu *Pseudomonas putida*. Szczep *Pseudomonas putida* transformowany transpozonom z genem kodującym DsRed poddano ponownej transformacji plazmidem TOL z genem *gfp*. Ekspresja białek pozwoliła na monitorowanie komórek bakterii w mikrokosmkach osadu.

3. Gen *gfp* jako marker w konstrukcji biosensorów

Technologie fuzji genów reporterowych z sekwencjami promotorowymi wrażliwymi na określone związki chemiczne, jak również układy konstytutywnej ekspresji z autofluorescencyjnymi markerami znalazły zastosowanie w konstrukcji bakteryjnych biocujników, które są używane w wykrywaniu szkodliwych substancji chemicznych oraz stwierdzaniu biodostępności i potencjalnej toksyczności związków występujących w niebezpiecznych odpadach, ściekach, wodzie, glebie i powietrzu. Spośród tego rodzaju bakteryjnych biosensorów dominują systemy w których gen markerowy (np. *gfp*) znajduje się pod kontrolą indukowalnego promotora, specyficznie reagującego na określone czynniki fizyczne, chemiczne bądź biologiczne (ryc. 3).

Biotesty te nie mogą zastąpić chemicznych metod monitorowania skażenia środowiska, umożliwiając wskazanie czynnika powodującego toksyczność, jednak z powodzeniem mogą być używane jako szybkie i tanie wskaźniki pojawienia się niebezpiecznych zanieczyszczeń w wodach, ściekach, osadach i wyciągach gło-



Ryc. 3. Ogólny schemat indukowalnego bioczuJNIKA oraz mechanizm jego reakcji będący konsekwencją wpływu analizowanego czynnika – analitu: fizycznego (np. zmiany wartości pH, temperatury), chemicznego (związki chemiczne, np. benzen) bądź biologicznego (np. wzajemne oddziaływanie różnych gatunków drobnoustrojów) (5); objaśnienia: mRNA – matrycowy RNA, GFP – białko, produkt ekspresji genu *gfp*.

wych. Pozwala to na zminimalizowanie kosztów często drogich i czasochłonnych, oraz wymagających kosztownej aparatury analiz chromatograficznych. Technologie bakteryjnych bioczuJNIKÓW są rekomendowane przez EPA na terenie Stanów Zjednoczonych jak również w Kanadzie, Francji, Niemczech, Szwecji, Włoszech, Holandii, Hiszpanii, Meksyku, jako szybkie metody monitorowania jakości wód i ścieków. Najbardziej znanymi, komercyjnie dostępnymi zestawami wykorzystującymi m.in. świecące bakterie są np. zestawy Microtox®, Toxalert® (24-28). Tematyka biosensorów została szeroko omówiona w nowej, obszernej pracy Gu i wsp. (28) oraz we wcześniejszych własnych publikacjach przeglądowych (6,25).

Spośród licznych eksperymentalnych artykułów prezentujących efektywność reakcji bioczuJNIKÓW z genem *gfp* interesujące są, jak się wydaje, dwie oryginalne prace: Shitashiro i wsp. (29) oraz Rabbow i wsp. (30). Ich oryginalność polega na odmienności konstrukcji transkrypcyjnej fuzji sekwencji promotorowej z genem *gfp*. Z reguły w monitorowaniu reakcji bioczuJNIKA stosowano wrażliwy na analizowany czynnik promotor, natomiast w omówionych dwóch przykładach autorzy odeszli od tego schematu. Shitashiro i wsp. (29) podjęli próbę oszacowania przydatności zjawiska aerotaksji (poruszania się komórek bakterii w kierunku tlenu) jako indykatora toksyczności trichloroetyleny (TCE), tetrachloroetyleny (PCE) oraz 1,1,1-trichloroetanu (TCA) względem *Pseudomonas aeruginosa* zawierających gen *gfp* znajdujący się pod kontrolą *lac* promotora. Za toksyczną przyjęto substancję, która wywoływała 50% inhibicję aerotaksji komórek *P. aeruginosa* po ich 40-minutowej ekspozycji na badany czynnik. Do innych inhibitorów tego zjawiska zaliczono analizowane również metale ciężkie: Hg^{2+} , Cu^{2+} , Ag^+ , Pb^{2+} i Sn^{2+} , a także takie związki jak: $BrCN$ i NaN_3 . W konkluzji pracy autorzy stwierdzili przydatność analizy aerotaksji jako wskaźnika toksyczności. Natomiast przeprowadzony przez Rabbow i wsp. (30) eksperyment dotyczył użyteczności bioczuJNIKA LAC-FLUORO w procesie analizy ko-

mórkowej odpowiedzi na cytotoksyny, na które narażeni są przebywający w przestrzeni kosmicznej astronauty. W tym bakteryjnym teście gen *gfp* wykazywał konstytutywną ekspresję pod kontrolą promotora *lac* i reagował zależną od stężenia cytotoksyny redukcją fluorescencji GFP. W tabeli 2 przedstawiono niektóre bakteryjne bioczuJNIKI z genem *gfp* indukowalne określonymi czynnikami.

Tabela 2

Indukowalne bakteryjne bioczuJNIKI z genem *gfp*

Testowany związek	Geny bakteryjne	Szczep bakteryjny	Literatura
BTEX (benzen, toluen, etylobenzen, ksylene)	<i>tbuT</i>	<i>P. fluorescens</i>	(31)
fenol	<i>DnaK</i> ,	<i>E. coli</i>	(32)
genotoksyny: mitomycyna C, N-metyl-N-nitro-N-nitrozoguanidyna, kwas nalidyksowy, formaldehyd	<i>recA</i> , <i>umuDC</i> , <i>sulA</i>	<i>E. coli</i>	(26,33,34,40)
metale: Ag, As, Cu, Cd, Fe, Hg, Pb, Sb, Zn	<i>ars</i> , <i>arsR</i> , <i>CadC</i>	<i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>P. syringae</i>	(37,38,39,41)
salicylany	<i>salA</i>	<i>Acinetobacter</i> sp.	(35)
tetracykliny	<i>tetA</i>	<i>E. coli</i>	(36)

4. Podsumowanie

Możliwość przyżyciowego monitorowania *in situ* horyzontalnego transferu genów między mikroorganizmami, ich aktywności w różnorodnych środowiskach, a także monitorowania poziomu ekspresji genów z użyciem genu *gfp* w czasie rzeczywistym i w pojedynczych komórkach, stanowią główne czynniki, które zadecydowały o tym, że obecnie gen *gfp* jest jednym z najbardziej popularnych genów reporterowych w biologii molekularnej (42,43). Jego ekspresję wykazano z użyciem wektorów zarówno plazmidowych jak i transpozonów i z udziałem promotorów pochodzących z odległych ewolucyjnie organizmów – począwszy od bakteryjnych, a skończywszy na ssakach (44). Okazuje się, że *gfp* stał się również podstawowym genem reporterowym lokalizacji i funkcjonalności białek komórkowych. Fuzje białek komórkowych z białkiem GFP (zwane chimerami białkowymi) umożliwiają monitorowanie w czasie rzeczywistym migracji białek fuzyjnych w różnych układach, także kompleksach wielobiałkowych jakie tworzą. Emitowane i łatwe do wykrycia światło GFP pozwala na „podglądanie” dynamiki różnorodnych procesów zachodzących w żywej komórce, np. replikacji i segregacji chromosomów bakteryjnych do komórek potomnych, podziału komórek bakteryjnych oraz sporulacji (4,25,45). Wydaje się jednak, że jedną z najbardziej dynamicznie rozwijających się dziedzin aplikacji genu *gfp* jest technologia wykorzystania biologicznych biosensorów, która

znajduje szerokie zastosowanie w monitorowaniu poziomu określonych zanieczyszczeń w środowisku.

Składamy serdeczne podziękowania dr Imrich Barak (Słowacka Akademia Nauk) za umożliwienie wykorzystania w badaniach własnych szczepu *E. coli* MM294.

Praca wykonana w ramach projektu badawczego nr S/IIŚ/22/06 i W/IIŚ/33/06.

Literatura

1. Errampalli D., Leung K., Cassidy M. B., Kostrzyńska M., Blears M., Lee H., Trevors J. T., (1999), *J. Microbiol. Meth.*, 35, 187-199.
2. Jansson J. K., (1995), *Curr. Opin. Biotechnol.*, 6, 275-283.
3. Jansson J. K., Bruijn J., (2000), *Environm. Biotechnol.*, 54, 65-665.
4. Larrainzar E., O'Gara F., Morrissey J. P., (2005), *Annu. Rev. Microbiol.*, 59, 257-277.
5. Rosochacki S. J., Matejczyk M., (2002), *Acta Microbiol. Polon.*, 3, 205-216.
6. Rosochacki S. J., Matejczyk M., (2003), *Biotechnologia*, 1, 200-207.
7. Chalfie M., Euskirchen G., Ward W., Prasher C. D., (1994), *Science*, 263, 802-805.
8. Cowley C. S., Av-Gay Y., (1999), *Gene*, 264, 225-231.
9. Rosochacki S. J., Strzelecka M., Kozikova L., Matejczyk M., Obłap R., Połozynowicz J., (2002), 50, 61-67.
10. Jansson J. K., (2003), *Cur. Opin. Microbiol.*, 6, 310-316.
11. Axtell C., Beattie G. A., (2002), *Appl. Environ. Microbiol.*, 9, 4604-4612.
12. Olsen K. N., Budde B. B., Siegumfeldt H., Ger K. B., (2002), 68, 6343-6352.
13. Steidle A., Allesen-Holm M., Riedel K., Berg G., Givskov M., Molin S., Eberl L., (2002), *Appl. Environ. Microbiol.*, 12, 6371-6382.
14. Casavant N. C., Beattie G. A., Phillips G. J., Halverson L. J., (2002), *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 3588-3597, 3588-3597.
15. Espinosa-Urgel M., Ramos J. L., (2001), *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, 5219-5224.
16. Koch B., Nielsen T. H., Sorensen J., Nybroe O., (2002), *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 1197-1205.
17. Moller S., Sternberg C., Andersen J. B., Christensen B. B., Ramos J. L., (1998), *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 721-732.
18. Kuchma S. L., O'Toole A. G., (2000), *Cur. Opin. Biotechnol.*, 11, 429-433.
19. DeAngelis K. M., Ji P., Firestone M. K., Lindow S. E., (2005), *Appl. Environ. Microbiol.*, 12, 8537-8547.
20. Joyner D. C., Lindow S. E., (2000), *Micrbiol.*, 146, 2435-2445.
21. Bloemberg G. V., Wijffes A. H., Lamers G. E., Stuurman N., Lugtenberg B. J., (2000), *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 1170-1176.
22. Jansson J. K., Bjorklof K., Elvang A. M., Jorgensen K. S., (2000), *Environm. Pollut.*, 107, 217-223.
23. Nancharaiah Y. V., Wattiau P., Wuertz S., Bathe S., Mohan S. V., (2003), *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 4846-4852.
24. Ruban-Ośmiałowska B., Zakrzewska-Czerwińska J., (2003), *Post. Mikrobiol.*, 4, 359-368.
25. Matejczyk M., (2004), *Post. Mikrobiol.*, 43, 155-165.
26. Mitchell R. J., Gu M. B., (2003), *Biosens. Bioelectr.*, 19, 977-985.
27. Steinberg S. M., Poziomek E. J., Engelmann W. H., Rogers K. R., (1995), *Chemosphere*, 30, 2155-2197.
28. Gu M. B., Mitchell R. J., Kim B. C., (2004), *Adv. Biochem. Engin. Biotechnol.*, 87, 269-305.
29. Shitashiro M., Kato J., Fukumura T., Kuroda A., Ikeda T., Takiguchi N., Ohtake H., (2003), *J. Biotechnol.*, 101, 11-18.
30. Rabbow E., Rettberg P., Baumstark-Khan C., Horneck G., (2003), *Adv. Space. Res.*, 6, 1513-1524.
31. Stiner L., Halverson L. J., (2002), *Appl. Environm. Microbiol.*, 4, 1962-1971.
32. Cha H. J., Srivastava R., Vakharia V., Rao G., Bentley W., (1998), *Appl. Environm. Microbiol.*, 65, 409-414.

33. Mitchell R. J., Gu M. B., (2004), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 64, 46-52.
34. Norman A., Hansen L. H., Sorensen S. J., (2005), *Appl. Environm. Microbiol.*, 5, 2338-2346.
35. Huang W. E., Wang H., Zheng H., Huang L., Singer A. C., Thompson I., Whiteley A. S., (2005), *Environ. Microbiol.*, 1339-1348.
36. Bahl M. I., Hansen L. H., Licht T. R., Sorensen S. J., (2003), *Antimicrob. Chemoter.*, 4, 1112-1117.
37. Shetty R. S., Deo S. K., Liu Y., Daunert S., (2004), *Biotechnol. Bioeng.*, 88 (5), 664-670.
38. Shetty R. S., Deo S. K., Shah P., Barry Y. S., Daunert S., (2003), 376, 11-17.
39. Liao V. H., Chien M. T., Tseng Y. Y., Ou K. L., (2005), *Environ. Pollut.*, 16, 325-333.
40. Kuang Y., Biran I., Walt D. R., (2004), *Anal. Chem.*, 76, 2902-2909.
41. Liao V. H., Ou K. L., (2005), *Environm. Toxicol. Chem.*, 7, 1624-1631.
42. Rosochacki S. J., Kozikova L., Korwin-Kossakowski M., Matejczyk M., Połoszynowicz J., (2003), *Folia Biol.*, 51, 97-104.
43. Prosser J. I., (1994), *Microbiol.*, 140, 5-17.
44. Cases I., Lorenzo V., (1998), *Curr. Opin. Microbiol.*, 1, 303-310.
45. Kostrzyńska M., Leung K. T., Lee H., Trevors J. T., (2000), *J. Microbiol. Meth.*, 48, 43-51.