

**MASARYKOVA UNIVERZITA  
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA  
ÚSTAV EXPERIMENTÁLNÍ BIOLOGIE  
ODDĚLENÍ MIKROBIOLOGIE**

# **Habilitační práce**

**Brno 2013**

**Martin Krsek**



**MASARYKOVA UNIVERZITA**  
**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**  
**ÚSTAV EXPERIMENTÁLNÍ BIOLOGIE**

---



**SOUČASNÉ TRENDY STUDIA DIVERZITY  
PŮDNÍCH MIKROBIÁLNÍCH  
SPOLEČENSTEV**

Habilitační práce

**Martin Krsek**

**Brno 2013**

# Obsah

1.	Úvod – význam půdních mikroorganismů	7
2.	Analýza diverzity mikrobiálních komunit	15
2.1.	Biochemické metody studia diverzity	
2.1.1.	Komerční systémy pro identifikaci bakterií	
2.1.2.	Využití biomarkerů ke studiu biodiverzity	16
2.1.3.	Stabilní izotopy a diverzita	18
2.2.	Metody studia mikrobiální diverzity založené na extrakci nukleových kyselin	20
2.2.1.	Extrakce půdní mikrobiální frakce	20
2.2.2.	Extrakce R/DNA z půdy a půdní mikrobiální frakce	25
	2.2.2.1. Volba vhodného pufru	25
	2.2.2.2. Lyze mikrobiálních buněk	26
	2.2.2.3. Čištění - srážení izolované R/DNA	29
2.2.3.	Metody studia mikrobiální diverzity založené na analýze R/DNA bez použití PCR	33
	2.2.3.1. Metody založené na hybridizaci DNA izolované z mikrobiální komunity	33
	2.2.3.2. Metagenomové knihovny	35
2.2.4.	Metody studia mikrobiální diverzity založené na analýze R/DNA s použitím PCR	38
	2.2.4.1. Polymerázová řetězcová reakce	38
	2.2.4.2. Polymorfismus délky restrikčních fragmentů (RFLP, T-RFLP, ARDRA)	44
	2.2.4.3. Gelová elektroforéza v tepelném/denaturačním gradientu (T/DGGE)	46
	2.2.4.4. Polymorfismus jednořetězcových nukleových kyselin (SSCP)	52
	2.2.4.5. Analýza polymorfismu délky intergenového spaceru mezi geny malé a velké ribozomální podjednotky - Ribosomal Intergenic Spacer analysis - RISA	53
	2.2.4.6. Délková heterogenita PCR (LH PCR)	54
	2.2.4.7. Náhodná amplifikace polymorfní DNA (RAPD, AP-PCR)	55
	2.2.4.8. Kvantitativní PCR	56
	2.2.4.9. DNA microarray	57
	2.2.4.10. Klonování, sekvenování a fylogenetická analýza	58
3.	Komentáře k článkům	60
	<b>3.1. Analysis of Actinomycete Communities by Specific Amplification of Genes Encoding 16S rRNA and Gel-Electrophoretic Separation in Denaturing Gradients</b>	61
	Heuer H, Krsek M, Baker P, Smalla K, Wellington EM. (1997) Appl Environ Microbiol. 63(8):3233-41.	
	<b>3.2. Comparison of different methods for the isolation and purification of total community DNA from soil</b>	63

	Krsek M, Wellington EMH (2001) <i>Antonie Van Leeuwenhoek</i> . 79(3-4):261-7.	
	<b>3.3. Assessment of Chitin Decomposer Diversity within an Upland Grassland.</b>	74
	Krsek, M., and Wellington, E.M.H. (2001) <i>Antonie van Leeuwenhoek</i> 79: 261-267.	
	<b>3.4. Molecular Analysis of a Bacterial Chitinolytic Community in an Upland Pasture.</b>	78
	Metcalf, A.C., Krsek, M., Gooday, G.W., Prosser, J.I., Wellington, E.M.H. (2002a) <i>Appl. Envir. Microbiol.</i> 68: 5042-5050.	
	<b>3.5. Molecular diversity within chitinolytic actinomycetes determined by <i>In situ</i> analysis.</b>	80
	Metcalf, A.C., Williamson, N., Krsek, M., and Wellington, E.M.H. (2002b) <i>Actinomycetol.</i> 17: 18-22.	
	<b>3.6. Resolving functional diversity in relation to microbial community structure in soil: exploiting genomics and stable isotope probing.</b>	81
	Wellington, E.M.H., Berry, A., and Krsek, M. (2003) <i>Curr. Opin. Microbiol.</i> 6: 295-301.	
	<b>3.7. Soil Invertebrates Disrupt Carbon Flow Through Fungal Networks.</b>	85
	Johnson, D., Krsek, M., Wellington, E.M.H., Stott, A.W., Cole, L., Bardgett, R.D., Read, D.J., and Leake, J.R. (2005) <i>Science</i> : 1047.	
	<b>3.8. Nucleic acid extraction and metagenomic library construction from soil</b>	87
	Krsek, M., Wellington, E.M.H. (2006b) In: Abstracts SGM 158th Meeting 3-6 April 2006, University of Warwick, p.14,	
	<b>3.9. Studies of microbial community structure and function below ground in a managed upland grassland site at Sourhope Research Station.</b>	92
	Krsek, M., Wellington, E.M.H. (2006a) <i>Appl Soil Ecol.</i> 33:127-136.	
	<b>3.10. Metagenomic analysis of a southern maritime antarctic soil.</b>	95
	Pearce, D.A., Newsham, K.K., Thorne, M.A., Calvo-Bado, L., Krsek, M., Laskaris, P., Hodson, A., Wellington, E.M. (2012) <i>Front Microbiol.</i> 2012;3:403, 1-13.	
4.	Přínos vlastní vědecké práce	98
5.	Závěr	100
6.	Seznam použité literatury	101

## ABSTRAKT

### Současné trendy studia diverzity půdních mikrobiálních společenstev

Mikroorganismy jsou základní a nepostradatelnou součástí všech ekosystémů. Jsou odpovědné za koloběh prvků v přírodě a podílejí se na mnoha významných procesech v terestriálních i akvatických ekosystémech. Jsou zdrojem živin v základně všech potravinových řetězců a jejich rozsáhlé metabolické schopnosti jsou využívány v mnoha oblastech lidské činnosti. Rozšiřování spektra jejich využití je podmíněno hlubším poznáním jejich diverzity v nejrůznějších ekosystémech. K tradičním metodám studia mikroorganismů a jejich identifikace patří komerční systémy jako BIOLOG, často jsou také využívány nejrůznější biomolekuly (analýza fosfolipidových mastných kyselin - PLFA, analýza metylesterů mastných kyselin – FAME, analýzy quinonového profilu, kyselina muramová a teichoová, ergosterol a podobně). Dlouholetou tradici mají i metody stabilních izotopů, které jsou v poslední době využívány především k detekci skupin organismů schopných degradovat specifické substráty (detekce různých metabolických drah a podobně). Většina metod je však založena na extrakci a analýze nukleových kyselin. Po jejich izolaci ze studovaného ekosystému mohou být nukleové kyseliny přímo využity ke studiu diverzity daného ekosystému (metody hybridizace DNA – například metoda reasociace denaturované environmentální DNA; metagenomové knihovny), nebo častěji je s použitím metody PCR využita některá z tzv. fingerprintových metod, jako je polymorfismus délky restričních fragmentů (RFLP), elektroforéza v teplotním/denaturačním gradientu (T/DGGE), polymorfismus konformace jednořetězcových nukleových kyselin (SSCP), polymorfismu délky intergenového spaceru (RISA), délková heterogenita PCR produktů (LH PCR), náhodná amplifikace polymorfní DNA (RAPD), DNA microarray. Významnou součástí moderní analýzy je real-time PCR umožňující kvantifikaci nejrůznějších cílových molekul DNA, klonování vybraných genů, sekvenování DNA a fylogenetická analýza získaných dat. Předložená práce podává přehled metod studia diverzity mikrobiálních společenstev a využití vybraných metod ilustruje na vlastních vědeckých publikacích.

## **ABSTRACT**

### Current trends in diversity studies of microbial communities

Microorganisms are fundamental and irreplaceable part of all ecosystems. They are responsible for nutrient cycling in nature and involved in many important processes in terrestrial and aquatic ecosystems. They generate nutrients in bases of all nutrient chains and their extensive metabolic potential is utilized in many areas of human activities. Further expansion of their usage depends on increasing knowledge of their diversity in various ecosystems. Basic methods for such studies are commercial identification systems like BIOLOG, or the use of various biomolecules (phospholipids fatty acid analysis – PFLA, fatty acids methyl ester analysis - FAME, quinone profile analysis, muramic and teichoic acids, ergosterol etc.). Traditional are also methods using stable isotopes which have been recently applied for detection of different groups of microorganisms capable of degrading specific substrates (detection of various metabolic pathways etc.). But majority of methods are based on nucleic acids extraction and analysis. After their isolation, nucleic acids can be used for diversity studies directly (hybridization of DNA – e.g. the method of reassociation of denatured DNA, metagenomic libraries). Also, after PCR amplification, some of the so called finger printing methods are applied (Restriction Fragment Length Polymorphism - RFLP, Temperature/Denaturing Gradient Gel Electrophoresis - T/DGGE, Single-Strand Conformation Polymorphism - SSCP, Ribosomal Intergenic Spacer analysis - RISA, Length Heterogeneity PCR - LH PCR, Random Amplified Polymorphic DNA – RAPD, DNA microarray). An important role in diversity analysis is played by real-time PCR capable of quantifying various DNA molecules, cloning particular genes, DNA sequencing and phylogenetic analysis of data acquired. Presented thesis provides an overview of methods used for microbial diversity studies and illustrates specific methods on our own scientific publications.

## PŘEDMLUVA

Mikrobiální ekologie, jako jedna ze základních mikrobiálních disciplín, zkoumá vztahy mezi mikroorganismy a jejich prostředím a to jak živým (zahrnujícím jak mikroorganismy, tak i vyšší organismy), tak i neživým prostředím. Jedná se o vztahy a vazby, na jejichž fungování závisí veškerý život na Zemi. Proto zvláště v posledních desetiletích jejich výzkum nabývá na významu a věnuje se mu stále více výzkumných skupin, včetně skupiny Environmental Microbiology profesorky Elizabeth Wellington na Biological Sciences, University of Warwick, Coventry ve Velké Británii, již jsem byl v letech 1996-2006 členem. Tato skupina se soustřeďuje především na studium bakterií *in situ* s cílem rozkrýt a pochopit mechanismy kontrolující odezvu mikrobiálních společenstev na klíčové environmentální signály. Dlouhodobě se úsilí skupiny zaměřuje na půdní habitaty, na detekci klíčových aktivních skupin v tomto prostředí, na jejich mechanismy adaptace a přežívání za využití molekulárních technik, především práce s R/DNA. S rozvojem proteomiky se spektrum aktivit skupiny rozšířilo i na studium relevantních proteinů s cílem získání maxima informací o tzv. nekultivovatelných mikroorganismech, o složení jejich společenstev a jejich aktivitě. Spolu se studiem produkce antibiotik (především půdními aktinobakteriemi) se skupina zabývá i otázkami šíření genů rezistence k antibiotikům (spojené s nadměrným užíváním antibiotik i vlivem dalších polutantů v životním prostředí) a přežívání patogenních mikroorganismů v půdním prostředí.

Během mého více jak desetiletého působení ve skupině prof. Wellington jsem postupně pracoval na pěti výzkumných grantech (Microbial genetic diversity as an indicator of climatic and pollution impacts on soil; Assessment of chitin decomposer diversity: the role of actinomycetes and other bacteria in C and N cycling in limed and unlimed grasslands; Provision of a molecular archive for microbial diversity within treatment plots at Sourhope; Carbon flow through mycorrhizal mycelial systems to soil microbial populations- their impact of microarthropod diversity; ACTAPHARM – Novel sources of actinomycete diversity for detection of antimicrobial agents with pharmaceutical applications) a několika menších pilotních studiích/projektech (studium mikroflóry zažívacího traktu novorozenců a vliv aplikace antibiotik matkám před porodem a novorozencům po porodu na diverzitu této mikroflóry; studiu interakcí mezi *Salmonella typhimurium* a *Acanthamoeba polyphaga* a jejich významu pro přežívání salmonel v životním prostředí).

Jak je i z tohoto stručného výčtu patrné, většina projektů, jichž jsem byl řešitelem/spoluřešitelem, se zabývala nejrůznějšími aspekty diverzity půdních mikrobiálních společenstev. Ve většině případů šlo o hledání nejvhodnějších, často novátorských nebo inovativních přístupů, postupů a metod k řešení zkoumané problematiky se všemi jejími zvláštnostmi a problémy (nekultivovatelnost většiny mikroorganismů, obtížnost izolace biomolekul z tohoto prostředí, kontaminace huminovými a jinými inhibičními látkami) a proto i předkládaná práce pojednává především o metodách a technikách využívaných ke studiu diverzity půdních mikrobiálních společenstev.



## 1. Úvod

Mikroorganismy hrají nezastupitelnou roli v životě lidské společnosti. Jsou využívány v potravinářství, humánní i veterinární medicíně i v nejrůznějších průmyslových aplikacích a také většina moderních biotechnologií je založena na mikrobiologických základech. Kromě této pozitivní role způsobují mikrobi lidstvu i mnoho komplikací, ať už ve formě patogenů živočichů i rostlin, či původců nejrůznějších ztrát (kažení potravin, koroze materiálů a podobně). V první řadě jsou ale mikrobi nepostradatelnou součástí všech ekosystémů. Jsou zodpovědní za koloběh prvků v přírodě a podílejí se na mnoha významných procesech v terestriálních i akvatických ekosystémech. Jsou zdroji živin v základně všech potravinových řetězců. Rozsáhlé degradační schopnosti mikrobů jsou ve stále větší míře využívány při bioremediacích pro odstraňování nejrůznějších polutantů. I pouhá biomasa mikroorganismů na Zemi je - i přes jejich mikroskopické rozměry - úctyhodná. Podle některých odhadů tvoří víc jak třetinu celkové biomasy na Zemi (Whitman *et al.*, 1998). Značná část této biomasy se nachází v terestriálních ekosystémech, především v půdě (Tabulka 1), která představuje základní prostředí zabezpečující produkci naprosté většiny suchozemské organické hmoty a nepřímo také akvatické organické hmoty.

Půda představuje heterogenní médium sestávající z pevné, tekuté a plynné fáze. Na tvorbě půdy se podílí pět vzájemně reagujících faktorů: klima, topografie, matečný materiál (hornina), čas a v neposlední řadě půdní organismy, kde klíčovou roli plní půdní mikroorganismy. Rozpad matečné horniny na jemné částice doprovázený uvolňováním živin zahajuje tvorbu půdy. Vzhledem k nedostatku využitelného C a N v raných stádiích tvorby půdy připadá klíčová role mikrobům schopným vázat tyto elementy, tedy fotosyntetizujícím a dusík-poutajícím mikroorganismům, ke kterým se postupně přidávají další skupiny mikrobů, jejichž funkcí je využití a především degradace vytvořené organické hmoty a návrat všech prvků do přirozeného koloběhu látek.

Odhady, kolik je na Zemi půdy, se liší. Vyjděme z předpokladu, že z celkového povrchu Země zhruba 25% připadá na pevninu a jen polovina z této výměry je vhodná pro nějakou rostlinnou produkci (zbytek je tvořen pouštěmi, polárními oblastmi, nebo prostředím, kde je příliš teplo nebo chladno či jinak nehostinně). Zhruba 40% z těchto 12,5% je příliš limitováno terénními podmínkami, úrodností oblastí, či příliš vysokými srážkami, aby podporovaly jakoukoliv produkci potravin. To znamená, že k produkci

potravin zbývá zhruba pouhých 7,5% plochy zeměkoule, o které ještě soutěží s ostatními potřebami lidské společnosti, jako je budování měst, komunikací, průmyslových podniků a podobně. I přesto – nebo právě proto – představuje těch několik procent povrchu Země významné prostředí, jehož studiu se věnuje mnoho oborů lidské činnosti a to nejen z důvodů produkce potravin a dalších surovin. Půda také představuje prostředí filtrující vodu (včetně odpadních vod), produkuje i absorbuje významná množství plynů, je materiálem pro mnohá další odvětví lidské činnosti (produkce stavebnin, využití v lékařství, umělecké činnosti), je domovem pro mnoho živočichů a dalších organismů a v neposlední řadě místem dekompozice většiny organických i anorganických „odpadních“ produktů. Ve většině zmíněných procesů hrají klíčovou roli mikroorganismy přítomné v půdě. Jejich hlavní funkcí je již zmíněná dekompozice organické hmoty (včetně těl mikrobů). Během tohoto procesu dochází zároveň k tvorbě nových mikrobiálních buněk i vytváření nových organických látek (včetně humusu). Přesto však představa o půdě kypící mikrobiálním životem je pro většinu půdního prostředí (s výjimkou rhizosferní půdy) s největší pravděpodobností mylná. Většina mikroorganismů je v půdě v klidovém stádiu čekající na svou příležitost, která nastane s přísunem nové organické hmoty.

**Tabulka 1 Relativní počty a biomasa mikrobiální a živočišné populace v povrchových vrstvách půdy (do 15 cm hloubky). (Převzato z: Scow, 2000)**

Organisms	Number		Biomass <sup>c</sup>	
	per m <sup>2</sup>	per gram	kg/ha	g/m <sup>2</sup>
Microflora				
Bacteria	10 <sup>13</sup> –10 <sup>14</sup>	10 <sup>8</sup> –10 <sup>9</sup>	400–5000	40–500
Actinomycetes	10 <sup>12</sup> –10 <sup>13</sup>	10 <sup>7</sup> –10 <sup>8</sup>	400–5000	40–500
Fungi	10 <sup>10</sup> –10 <sup>11</sup>	10 <sup>5</sup> –10 <sup>6</sup>	1000–20,000	100–2,000
Algae	10 <sup>9</sup> –10 <sup>10</sup>	10 <sup>4</sup> –10 <sup>5</sup>	10–500	1–50
Fauna				
Protozoa	10 <sup>9</sup> –10 <sup>10</sup>	10 <sup>4</sup> –10 <sup>5</sup>	20–200	2–20
Nematodes	10 <sup>6</sup> –10 <sup>7</sup>	10–10 <sup>2</sup>	10–150	1–15
Mites	10 <sup>3</sup> –10 <sup>6</sup>	1–10	5–150	0.5–1.5
Collembola	10 <sup>3</sup> –10 <sup>6</sup>	1–10	5–150	0.5–1.5
Earthworms	10–10 <sup>3</sup>		100–1700	10–170
Other fauna	10 <sup>2</sup> –10 <sup>4</sup>		10–100	1–10

Biomasa – čerstvá hmotnost biomasy

## Stručná charakteristika skupin půdních mikroorganismů

Půdní mikroorganismy zahrnují širokou řadu funkčních a taxonomických skupin a najdeme zde zástupce všech tří fylogenetických domén *Bacteria*, *Archaea* a *Eukarya* (Tab.1.). Nejvýznamnější skupinu co do jejich počtu i biomasy představují bakterie a houby, přesto ale i ostatní skupiny půdních (mikro)organismů nelze přehlížet. Plní v půdním prostředí své nezastupitelné funkce a společně se podílí na správném fungování půdního prostředí, což nás téměř opravňuje odhlédnout od jednotlivých půdních organismů a uvažovat o půdě jako o velkém mnohobuněčném organismu.

Nejmenšími „organismy“ v půdě jsou **viry**. Jedná se o obligátní parazity všech organismů nacházejících se v půdě. Tato skupina na pomezí živé a neživé hmoty nemá svůj vlastní metabolismus (a proto často viry ani nejsou zařazovány mezi organismy) a naše znalosti o jejím zastoupení a funkci v půdě jsou více než kusé. Až do nedávné doby se studium virů v půdě omezovalo na bakteriofágy významných skupin půdních bakterií, například fixátorů vzdušného dusíku a podobně. Zvýšený zájem o půdní viry byl podnícen výsledky studií virů ve vodním, především mořském prostředí, které odhalily skutečnost, že množství virů zde převyšuje množství prokaryotických mikroorganismů se všemi z toho vyplývajícími důsledky (lytické působení virů, transdukcce a podobně). Například Ashelford *et al.* (2003) uvádí hustotu populace virů v akvatickém prostředí  $2,5 \times 10^8 \text{ ml}^{-1}$  převyšující tak 10x hustotu populace jejich bakteriálních hostitelů. Průměrný počet fágů z půdy získaný transmisní elektronovou mikroskopií stanovili Ashelford *et al.* (2003) na  $1,5 \times 10^7 \text{ g}^{-1}$ . Weinbauer a Rassoulzadegan (2004) shrnují poznatky a úvahy o úloze virů v akvatických systémech a zdůrazňují jejich význam v následujících oblastech: vliv na genetickou diverzitu mikrobiálních komunit, především jejich možnou roli v regulaci četností bakteriálních populací (teorie „killing the winner“, podle které by viry svým lytickým působením zabraňovaly „přemnožení“ kompetitivních druhů) a přenos genů mezi druhy. Podle těchto autorů geny a aktivita virů vytváří genetickou variabilitu prokaryot a je hnací silou ekologického fungování těchto komunit a jejich evolučních změn. Situace v půdním prostředí má svá specifika (mikroskopická struktura půdy s množstvím povrchů schopných poutat mnohé „složky“ půdního prostředí), přesto však funkce a význam virů v tomto prostředí budou velmi podobné prostředí akvatickému.

Nejzávažnější překážkou studia virů je nemožnost jejich kultivace bez jejich hostitele. Přidáme-li k tomu i známý a všeobecně uznávaný fakt, že například ze všech

bakterií přítomných v životním prostředí je méně než 1% kultivovatelných (Torsvik *et al.*, 1990a), je jasné, že studium bakteriofágů v půdním prostředí je odkázané především na molekulárně biologické metody (a podobně tomu bude i u ostatních mikroorganismů v půdě – archeí i mikromycet). I zde však narážíme na další komplikace – malá velikost studovaných částic a silné vazby na pevnou složku půdy znesnadňující jejich extrakci z tohoto prostředí a především pak absence jakéhokoliv molekulárního markeru (obdoba genů 16S rDNA u prokaryotických organismů) umožňujícího detekci virů a studium jejich diverzity.

Významným přínosem k metodologii studia virů v půdním prostředí byla práce Williamsona *et al.* (2003), ve které autoři srovnávali různé pufrы k extrakci fágů z půdy a v návaznosti na to techniky použité ke kvantifikaci fágů (počítání plak, epifluorescenční mikroskopii a transmisní elektronovou mikroskopii). Publikované údaje o četnosti virů v půdě se pohybují v závislosti na použité technice v rozmezí od  $10^7$  do  $10^9$  a tedy i v tomto prostředí jejich četnost pravděpodobně přesahuje (zhruba 10x) četnost jejich hostitelů, bakterií. První údaje získané studiem metagenomových knihoven naznačují, že většina genů dvouřetězcových DNA virů je neznámá. Pro srovnání zhruba 85% mikrobiálních metagenomových sekvencí má významnou homologii s geny v GenBank, ale v případě fágových sekvencí je to pouze 35% (Srinivasiah *et al.*, 2008). Kromě volných virů nesmíme také zapomenout na temperované fágy. Výsledky různých studií naznačují, že zhruba 30% kultivovatelných půdních bakterií je lyzogenních a podobná čísla zřejmě platí i pro nekultivovatelnou složku půdní mikroflóry (Williamson *et al.*, 2007, 2008).

Podobně informace o roli zástupců *Archaea* v půdě, s výjimkou zaplavených půd a jiných extrémních habitatů, jsou značně omezené. Až do nedávné doby se předpokládalo, že *Archaea* se nacházejí především v extrémních prostředích, nicméně ke konci 90. let minulého století se začaly objevovat studie potvrzující přítomnost zástupců domény *Archaea* v půdě i rhizosféře rostlin (Bintrim *et al.*, 1997; Buckley *et al.*, 1998; Simon *et al.*, 2005; Nicol *et al.*, 2003). Jedná se především o ne-exteremofilní zástupce skupiny *Crenarcheota*. Podíl archeí na celkovém počtu prokaryotických organismů v půdě byl pomocí analýzy 16S rRNA určen na 1,42 % +/- 0,42 % (Buckley *et al.*, 1998). Úloha archeí v půdním ekosystému není ještě jednoznačně určená, ale například studie Leiningera *et al.* (2006) odhalila významný podíl archeí na procesech nitrifikace. Studiem genů kódujících podjednotku klíčového enzymu amonia

monooxygenaze (*amoA*) byli tito autoři schopni stanovit, že počet kopií genu *amoA* archeálního původu je 3000x vyšší než počet *amoA* bakteriálního původu.

Nejvíce studovaným objektem půdní mikrobiologie jsou bezesporu **bakterie**. V 1g půdy se v závislosti na její úrodnosti i způsobu stanovení nachází  $10^8 - 10^{10}$  bakteriálních buněk. Odhady počtů bakteriálních druhů nacházejících se v půdě se velmi liší. Encyclopedia of Microbiology (Scow, 2000) uvádí 13 tisíc bakteriálních druhů, Reid a Wong (2005) mluví o 60 tisících různých bakteriálních druhů přítomných v půdě. Podle výsledků renaturační kinetiky DNA bakteriální frakce extrahované z půdy může jeden gram půdy obsahovat 4000 zcela rozdílných genomů standardních půdních bakterií (Torsvik *et al.*, 1990a). S množstvím bakteriálních druhů zastoupených v půdě koresponduje i jejich metabolická variabilita nebo funkce, které v půdě plní. Základní funkcí je bezesporu degradace organických substrátů vstupujících do půdního prostředí, kde bakterie hrají - především v počátečních fázích rozkladu charakterizovaných dostatečnou vlhkostí substrátu - vedoucí roli (v pozdějších fázích rozkladu mohou dominovat houby). Významné místo zaujímají také symbiotičtí i volně žijící fixátoři vzdušného dusíku schopní doplnit tento základní makrobiogenní element v půdním prostředí, kde jeho nedostatek je často limitujícím faktorem všech fyziologických procesů v půdě, degradace nevyjímaje a také ostatní bakterie koloběhu dusíku (nitrifikační a denitrifikační). Na tomto místě by bylo možné zmínit i mnoho dalších skupin bakterií, jejichž role je pro správnou funkci půdního prostředí nezastupitelná, jako například aktinobakterie, síru oxidující bakterie a podobně.

Přehled nejčastějších zástupců půdních bakterií uvádí například všeobecně uznávaná Soil Microbiology and Biochemistry autorů Paula a Clarka (1989). Podle této publikace jsou numericky převládajícími půdními bakteriemi zástupci rodu *Arthrobacter*, který by podle některých odhadů měl představovat až 40% bakterií detekovaných kultivačními metodami. Jedná se o pleomorfní grampozitivní až gramvariabilní pomalu rostoucí buňky, někdy pohyblivé. V množství mezi 5 až 20% jsou v půdě často detekovány další tři rody: *Streptomyces*, *Pseudomonas* a *Bacillus*,

Rod *Streptomyces* představuje až 90% zástupců řádu *Actinomycetales*. Jedná se o myceliární grampozitivní organismus množící se pomocí vzdušných spor nebo rozpadem mycelia. Najdeme ho na sušších stanovištích s neutrální až alkalickou reakcí. Tento rod (a i celý zmíněný řád) je znám produkcí četných antibiotik i dalších komerčně zajímavých látek (sekundárních metabolitů) a v neposlední řadě také geosminu zodpovědného za typickou vůni půdy.

Rod *Pseudomonas* patří k gramnegativním tyčinkovitým bakteriím, je opatřen polárním bičíkem a většina zástupců je aerobní (s výjimkou denitrifikačních bakterií využívajících nitráty jako konečný akceptor elektronů). Mnoho představitelů tohoto rodu žije v těsné asociaci s rostlinami, některé z nich mohou způsobit i choroby rostlin. Častá je u tohoto rodu produkce fluorescentních pigmentů. Siderofory produkované zástupci tohoto rodu mají silnou afinitu k  $\text{Fe}^{3+}$  a díky tomu mohou být použity k biologické kontrole půdních rostlinných patogenů.

Představitelé rodu *Bacillus* jsou grampozitivní sporulující většinou pohyblivé aerobní tyčinky. *B. polymyxa* je někdy uváděn jako fixátor atmosférického dusíku. Rod dále zahrnuje druhy používané pro biologickou ochranu rostlin (*B. thuringensis*), máčení lnu (*B. macerans*), ale i živočišné patogeny, jako *B. anthracis*.

Další častou půdní bakterií je rod *Clostridium*, opět sporulující avšak ve většině případů striktně anaerobní grampozitivní tyčinkovité bakterie. Také zde se vyskytují fixátoři dusíku, ale také druhy produkující silné toxiny (botulotoxin a tetanotoxin) a druhy patogenní pro živočichy včetně lidí. Jiné druhy mohou být použity pro produkci alkoholů a rozpouštědel.

Jak již bylo zmíněno výše, významnou skupinu půdních bakterií (ne tak svým početním zastoupením, jako svou funkcí v půdních mikrobiálních společenstvech) tvoří bakterie koloběhu esenciálního makrobiogenního prvku – dusíku. Patří sem v první řadě bakterie schopné poutat vzdušný dusík, tedy jednak volně žijící fixátoři, představovaní například rody *Azotobacter*, *Azomonas*, *Beijerinckia*, *Derrxia*, *Azospirillum* a především pak symbiotičtí fixátoři rodů *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* (některé kmeny tohoto rodu jsou schopné fixovat dusík i mimo rostliny) a *Sinorhizobium*. Na pomezí mezi volně žijícími a symbiotickými fixátory dusíku se nachází kmen *Cyanobacteria*, grampozitivní fototrofní bakterie, které se uplatňují zejména v prvotních stádiích tvorby půdy (najdeme je však i na povrchu již vytvořených půd), kdy jako primární kolonizátoři matečného materiálu uplatní svou schopnost fotosyntézy i fixace atmosférického dusíku ať už samostatně, nebo v symbióze s houbami v lišejnících. Z ostatních bakterií koloběhu dusíku je třeba zmínit nitrifikační bakterie oxidující ionty  $\text{NH}_4^+$  za aerobních podmínek přes  $\text{NO}_2^-$  na  $\text{NO}_3^-$  (a tím převádějící relativně imobilní formu dusíku  $\text{NH}_4^+$  na velmi pohyblivou a tedy lehce vymyvateľnou formu  $\text{NO}_3^-$ ) reprezentované například rody *Nitrosomonas*, *Nitrosolobus*, *Nitrospira*, *Nitrosovibrio* a *Nitrobacter* a bakterie denitrifikační, které naopak za anaerobních podmínek mohou využívat oxidy dusíku ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}$  a  $\text{N}_2\text{O}$ ) jako akceptory elektronů a převádět je

zpět až na vzdušný dusík N<sub>2</sub>. Schopnost denitrifikace má celá řada bakterií, například i zástupci výše zmíněných rodů *Pseudomonas*, *Bradyrhizobium* a další. Procesy koloběhu dusíku jsou významné nejen z hlediska „hospodaření“ s tímto esenciálním makrobiogenním prvkem, ale například uvolnění N<sub>2</sub>O během procesů přeměny dusíku představuje významný zdroj skleníkových plynů.

Je však třeba mít na paměti, že většina zvláště dříve publikovaných studií půdních mikroorganismů je založena především na tradičních kultivačních postupech, které však mají schopnost detekovat pouze zhruba 1% všech přítomných mikroorganismů. Zbývajících 99% lze do určité míry studovat pouze za pomoci molekulárních metod. Například Hugenholtz *et al.* (1998) udávají, že tradičními kultivačními postupy izolujeme nejčastěji zástupce kmene *Proteobacteria*, *Cytophagales*, *Actinobacteria* a *Firmicutes*, které tvoří 90% všech bakterií kultivovaných z půdy. Na druhé straně při klonování půdní bakteriální DNA více jak 75% všech klonů tvoří zástupci třídy  $\alpha$ -*proteobacteria*, kmene *Actinobacteria*, *Acidobacteria* a *Verrucomicrobia*. Další třídy kmene *Proteobacteria* a kmeny *Firmicutes* a *Planctomycetes* jsou detekovány v 25-75% studií.

**Houby** představují velice různorodou skupinu jak z hlediska morfologického, tak i co se týká životního cyklu. V lesních půdních ekosystémech (a i dalších fyzicky nenarušovaných půdách) předčí jejich biomasa všechny ostatní skupiny mikroorganismů a najdeme zde i zřejmě největší známý organismus zaujímající plochu 2,5 čtverečních mil, *Armillaria ostoyae* rostoucí v Malheur National Forest v Blue Mountains východního Oregonu. I přesto však jejich studiu v půdě je věnována podstatně menší pozornost než bakteriím a proto i naše znalosti o nich jsou značně omezené. Dosud bylo identifikováno zhruba 70 tisíc druhů hub patřících do skupin Oomycota, Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota a Basidiomycota. Zástupci oomycet, chytridií a zygomycet rychle kolonizují organické substráty přidané do půdy. Chytridie se často vyskytují v zamokřených půdách a zahrnují také parazity rostlin a živočichů. Mezi zygomycety patří i zástupci významných endomykorhizních hub. Pomalu rostoucí bazidiomycety zahrnují ektomykorrhizní houby a degradátory ligninu (Scow, 2000).

Houby v půdě rostou většinou ve formě mycelia, což jim umožňuje kolonizovat velké objemy půdy s velice heterogenně uloženými zdroji potravy. Tato jejich vlastnost má i významné důsledky pro tvorbu a udržení struktury půdy, základního předpokladu její úrodnosti. Najdeme mezi nimi mnoho patogenů rostlin, ale

na druhé straně také symbiotické druhy – mykorhizní houby, jejichž význam pro výživu většiny rostlin dosud není často docenovaný.

Také **zelené řasy** a výše zmíněné **sinice** se nachází ve většině půd, ale s výjimkou zamokřených půd zaujímají významnou roli především v prvotních fázích tvorby půdy, kde – podobně jako třeba i v pouštních habitatech - představují hlavní zdroj uhlíku a dusíku. Jak již bylo řečeno a uvádí i Tabulka 1, najdeme v půdě i mnoho zástupců vyšších eukaryotických organismů (ale stále často mikroskopických), kteří mají v půdě svou nezastupitelnou funkci, nicméně tyto organismy už nespádají do tématu naší práce.

Až do celkem nedávné doby byly naše znalosti o složení půdních mikrobiálních společenstev založené především na tradičních kultivačních technikách, kdy byli mikrobi (především bakterie a v menší míře mikromycety) nejprve izolováni z půdy a následně kultivováni na pevných médiích. Zde však narážíme na dva fundamentální problémy: obtížnost extrakce všech mikrobů z půdního prostředí a především pak nemožnost následné kultivace většiny z nich. Podle některých odhadů lze extrahovat 33-34% všech bakterií přítomných v půdě (Holben *et al.*, 1988), jiné - silně optimistické - odhady hovoří sice až o 80% účinnosti extrakce (Torsvik *et al.*, 1990a), ale i v tomto případě však kterákoliv studie používající takovou půdní bakteriální frakci nechává bez povšimnutí významnou část půdní bakteriální diverzity (v 1g půdy může být až  $10^{10}$  mikrobiálních buněk reprezentujících možná desítky tisíc různých druhů; Torsvik a Ovreas, 2002). Ještě významnější problém je již výše zmiňovaná nekultivovatelnost většiny mikroorganismů přítomných v přirozených prostředích, tedy i v půdě (Torsvik *et al.*, 1990a; Torsvik a Ovreas 2002). Celá situace je ještě komplikovanější, vezmeme-li v úvahu také již výše zmíněnou a dosud ve většině případů zcela přehlíženou skupinu virů, k jejichž kultivaci potřebujeme hostitelskou buňku, kde – v případě bakteriofágů – opět narážíme na problém nekultivovatelnosti většiny bakteriálních hostitelů.

Z výše uvedeného je jasné patrné, že metody klasické mikrobiologie založené na izolaci a kultivaci mikroorganismů jsou nedostatečné a studium a využití obrovského potenciálu mikrobiální diverzity se neobejde bez molekulárně biologických metod využívajících nejrůznější biomarkery, tj. komponenty mikrobiálních buněk. Přehledu těchto metod využívaných ke studiu diverzity mikrobiálních společenstev se budeme věnovat v následujících kapitolách.



## 2. Analýza diverzity mikrobiálních komunit

### 2.1. Biochemické metody studia diverzity

#### 2.1.1. Komerční systémy pro identifikaci bakterií

Jedním ze základních biochemických přístupů k identifikaci mikroorganismů a z toho se odvíjejícího studia biodiverzity je zjišťování přítomnosti různých metabolických drah nebo vybraných enzymů u testovaných mikroorganismů, případně celých mikrobiálních komunit. Mikroorganismy jsou v tomto případě kultivovány za přítomnosti různých zdrojů uhlíku (sacharidy, bílkoviny či další látky). V případě, že je předložená látka metabolizována, její degradace je spojena s barevnou změnou přítomného indikátoru. Tyto testy byly většinou původně vyvinuty pro určování lékařsky významných bakterií. Jejich jednodušší variantou je například ENTEROtest 16 nebo 24 (Pliva Lachema) určený pro rutinní identifikaci významných druhů střevních bakterií z čeledi *Enterobacteriaceae*.

Komplexní systém pro identifikaci mikroorganismů představuje systém Biolog (Biolog, Inc., USA) na mikrotitračních destičkách. Podle firemních údajů je schopný identifikovat více jak 2500 druhů aerobních a anaerobních bakterií, kvasinek a hub. Na mikrotitračních destičkách jsou v 95 jamkách testovány různé zdroje uhlíku, dusíku, fosforu a síry (případně i schopnosti využívat/vyžadovat i komplikovanější peptidové zdroje dusíku), dále vhodnost různých osmotických podmínek i vlivy pH a identifikace je založena na výměně elektronů uvolněných během respirace, což vede k změně barvy přítomného tetrazolia. Původně šlo o identifikaci kultivovatelných bakterií, protože testovanou bakterii je nutné nejprve nakultivovat a poté inokulovat do všech 96 jamek destičky. Nicméně již počátkem 90. let se objevila snaha o využití této techniky pro získání informací (ve formě fingerprintů) o složení celých mikrobiálních společenstev (nebo přesněji o jejich metabolickém potenciálu), kdy byly destičky místo čistou kulturou jednoho mikroorganismu inokulovány mikrobiální frakcí izolovanou z environmentálního vzorku (Garland a Mills, 1991). Dnes je vedle destiček pro Gram-pozitivní bakterie, Gram-negativní bakterie, houby a kvasinky možné využít i tzv. EcoPlate, určené speciálně pro analýzu mikrobiálních komunit (Microbial Community Analysis). V tomto případě místo 95 různých substrátů obsahuje destička pouze 31 substrátů ve třech opakováních, což umožňuje i statistickou analýzu výsledků. Výsledkem je pak tzv. fyziologický nebo metabolický fingerprint-profil daného mikrobiálního společenstva. (např. Kirk *et al.*, 2004).

Podobný systému BIOLOG je API systém (Merieux, France) nabízející řadu API proužků s různými zdroji uhlíku, které mohou být použity k měření funkční diverzity mikrobů i mikrobiálních společenstev (Torsvik *et al.*, 1990b)

Využitím techniky BIOLOG a podobných systémů je generováno velké množství dat o fyziologických schopnostech daného společenstva s relativně jednoduchým technickým zázemím. Pomocí těchto výsledků můžeme odlišit různá mikrobiální společenstva, případně můžeme sledovat vývoj uvnitř jednoho společenstva. Nicméně i tento systém má svá omezení – získané údaje charakterizují pouze tu část mikrobiální komunity, která je schopná za daných podmínek růst (zároveň však lze spekulovat o tom, že pomocí tohoto systému lze do jisté míry získat údaje i o tzv. nekultivovatelných organismech - jejich podíl na fyziologickém profilu společenstva nelze alespoň zcela vyloučit), preferuje rychle rostoucí mikroorganismy, je citlivý k hustotě použitého inokula a odráží spíše potenciální než skutečnou metabolickou aktivitu daného společenstva (Kirk *et al.*, 2004).

Systém BIOLOG jsme využili v počátcích mé práce ve výzkumné skupině prof. Wellington na Univerzity of Warwick pro charakterizaci půdních izolátů v laboratořích společnosti Novo Nordisk, Dánsko (získané výsledky však nebyly přímo zahrnuty do žádné naší publikace). V té době (1995) ještě nebyly k dispozici výše zmíněné EcoPlate a systém byl opravdu využíván téměř výlučně jen pro identifikaci izolátů kultivovatelných bakterií. Toto (pochopitelné) zaměření na kultivovatelné organismy je také hlavní slabinou systému a odhlédneme-li od zmiňovaných EcoPlate, do značné míry omezuje využití systému pro studia diverzity mikroorganismů.

### 2.1.2. Využití biomarkerů ke studiu biodiverzity

Další možností studia diverzity mikrobiálních komunit je analýza vhodného biomarkeru, například **lipidového profilu** organismu nebo společenstva. Lipidy se v buňce vyskytují jako zásobní látky, specifické mediátory a aktivátory signálních procesů a především jako strukturní komponenty buňky - v cytoplasmatické membráně všech živých buněk (a vnější membráně buněčné stěny Gram negativních buněk), jejich složení se však liší od organismu k organismu, takže například druhy rodu *Micrococcus* lze rozlišit na základě profilů rozvětvených mononenasycených mastných kyselin. Stejně tak lze lipidový profil využít i k charakteristice struktury mikrobiálních komunit.

Jednou z často využívaných metod je analýza metylesterů mastných kyselin, tedy tzv. **FAME analýza** - fatty acid methyl ester analysis (Ibekwe a Kennedy, 1999). Principem metody je esterifikace mikrobiálních lipidů s následným nástřikem, separací a identifikací metylových esterů mastných kyselin na plynovém chromatografu. Jde o rychlou a ne příliš drahou metodu, avšak interpretace získaných dat není jednoduchá (mnoho mastných kyselin je společných pro více mikroorganismů). Tato metoda je používána jak pro identifikaci mikroorganismů (Sherlock Microbial Identification Systém zavedený v roce 1991 pro identifikaci více než 1500 mikrobiálních druhů), tak pro charakterizaci diverzity mikrobiálních společenstev.

Podobnou metodou je **PLFA analýza** (Ibekwe a Kennedy, 1998), tedy „phospholipid fatty-acids analysis“, která využívá mastné kyseliny specificky vázané k polární lipidové frakci a tím značně zvyšuje citlivost a specifitu detekce mikrobiálních populací. Metoda začíná extrakcí všech lipidů ze vzorku, které jsou pak frakcionovány na neutrální lipidy, glykolipidy a fosfolipidy. Oddělené fosfolipidy jsou pak dále metylovány a analyzovány na plynovém chromatografu. Analýza PLFA je zdouhavější než výše uvedená metoda FAME, protože ale fosfolipidy jsou po smrti buněk rychle degradovány (v řádu minut, maximálně hodiny), předpokládá se, že extrahované lipidy reprezentují pouze živé buňky ve vzorku. Výše uvedená FAME metoda pracuje s lipidy i z mrtvé organické hmoty včetně zásobních lipidů, které jsou citlivější na růstové podmínky. Fosfolipidové větvené mastné kyseliny jsou specifické pro bakterie, eukaryotické organismy jsou charakterizovány poly-nenasycenými mastnými kyselinami. Kromě toho PLFA profil poskytuje informaci nejen o složení a relativní četnosti populací komunity, ale i o fyziologickém stavu těchto populací. Například hladovění či stres se projeví vyšším poměrem trans/cis izomerů mononenasycených PLFA, ve zvýšeném poměru nasycených k nenasyceným mastným kyselinám i zvýšeném poměru cyklopropyl mastných kyselin k jejich mononenasyceným prekurzorům. Celkovou citlivost metody je možné zvýšit spojením separace na plynovém chromatografu s hmotnostním spektrometrem (GC-MS). Metoda FAME ve srovnání s PLFA vyžaduje menší vzorek, na druhé straně však reprodukovatelnost výsledků je lepší u metody PLFA. Po taxonomické stránce metoda PLFA nezahrnuje *Archea*, protože ty mají mastné kyseliny vázané etherovou vazbou na rozdíl od esterové u bakterií (Palojarvi 2006).

Další metodou využívající buněčných lipidů je **analýzy quinonového profilu** společenstva. Quinony tvoří součást respiračního a fotosyntetického elektronového

transportního systému mikroorganismů. Jako jedni z prvních je využili k taxonomickým účelům u koryneformních bakterií Collins *et al.* (1979). Jedná se o jednoduchou, rychlou a levnou metodu, kdy jsou quinony pomocí organických rozpouštědel extrahovány ze vzorku (např. Irvan 2006) a podrobeny analýze za využití nejrůznějších chromatografických metod (HPLC, tenkovrstevná či sloupcová chromatografie, hmotnostní spektrometrie). Výsledkem je opět určitý fingerprint zkoumaného společenstva. Ke studiu změn půdních mikrobiálních společenstev pod vlivem aplikace pesticidů je použili například Katayama *et al.* (2001), změny mikrobiálních populací během degradace lignocelulózového komplexu pomocí nich sledovali Huang *et al.* (2010).

Kromě FAME, PLFA a quinonové analýzy jsou k charakteristice mikrobiálních společenstev používány i mastné kyseliny lipopolysacharidů vnější membrány gram-negativních buněk. Tyto mastné kyseliny mohou být využity pro určení biomasy gram-negativních bakterií, nebo i struktury jejich společenstva (Parker *et al.*, 1982). Podobně teichoové kyseliny gram-pozitivních bakterií byly použity k taxonomické klasifikaci (např. Tonn a Gander, 1979) i k určení biomasy těchto bakterií (Gehron *et al.*, 1984). Muramová kyselina byla použita k určení biomasy bakterií a sinic (Balkwill *et al.*, 1988), ergosterol k stanovení biomasy i růstu hub v půdě (např. Rousk a Bååth, 2011).

Z velké skupiny metod využívajících ke studiu diverzity biomarkery jsme v naší práci použili metodu PFLA, která nám v kombinaci s metodou stabilních izotopů (SIP) poskytla velice zajímavé výsledky při studiu toku rostlinných asimilátů z nadzemních částí rostlin do půdního prostředí a roli, kterou v tomto procesu hrají mykorrhizní houby a jejich konzumenti z řad půdní mikrofauny (Johnson *et al.*, 2005 – viz. kapitola 3.7. na straně 85).

### **2.1.3. Stabilní izotopy a diverzita**

Další zajímavé možnosti studia mikrobiální diverzity na pomezí mezi „biochemickými“ metodami a metodami využívajícími nukleové kyseliny poskytuje využití stabilních izotopů. Metody využívající přirozené frakcionace stabilních izotopů prvků mají již dlouholetou tradici. Možnosti jejich využití pro nejrůznější ekologické studie včetně archeologických aplikací shrnuli Peterson a Fry (1987). Kromě toho je možné využít stabilní izotopy i pro tzv. obohacovací studie. V tomto případě jde o aplikaci vhodného substrátu značeného stabilním izotopem některého prvku

a následnou detekci tohoto izotopu ve fylogeneticky významných biomolekulách (PLFA, R/DNA) zkoumaného společenstva. V závislosti na druhu substrátu můžeme pak selektivně detekovat skupiny mikroorganismů schopné tento substrát využívat. Mluvíme zde o tzv. SIP metodách, tedy „stable isotope probing“. Jednou z prvních prací využívajících tuto metodu byla práce Boschker et al (1987), kteří aplikovali značený  $^{13}\text{C}$  acetát a  $^{13}\text{C}$  metan ke studiu redukce sulfátů spřažené s oxidací acetátů v sedimentech ústí řek a oxidace metanu ve sladkovodních sedimentech. Mikroorganismy zodpovědné za tyto procesy detekovali pomocí značených PLFA. O dva roky později použili značený  $^{13}\text{CH}_3\text{OH}$  nebo  $^{13}\text{CH}_4$  Radajewski *et al.* (2000) opět ke studiu metylotrofních organismů, tentokrát však za využití DNA. Po inkubaci mikrokosmů s lesní půdou se značeným substrátem byla extrahována DNA a pomocí gradientové centrifugace rozdělena na normální lehkou frakci a značenou těžkou frakci. Ve frakci těžké DNA byly potom pomocí PCR, klonování a sekvenování stanoveni hlavní představitelé metylotrofních organismů podílející se na fixaci předloženého substrátu. Tato metoda umožňuje detekci aktivní části mikrobiálních společenstev, má však i četná úskalí. Její využití v první řadě předpokládá dostupnost vhodného značeného substrátu, který i v případě, že je komerčně vyráběn, bývá velmi drahý a k dosažení detekovatelného značení je třeba použít významná množství tohoto substrátu. Dále je třeba brát v úvahu fakt, že po využití značeného substrátu cílovou skupinou mikroorganismů a (případně) zabudování značeného prvku do biomasy primárních konzumentů využívaného substrátu, může v potravním řetězci dojít k přenesení tohoto značení i do jiných mikroorganismů. Této vlastnosti se na druhé straně dá využít právě ke studium zmíněných potravních řetězců.

Jak jsme již zmínili, metodu SIP v kombinaci s metodou PLFA jsme využili při studiu toků asimilátů z rostlin do půdního prostředí. Kombinace těchto metod nám umožnila jednoznačně prokázat roli mykorhizních hub v transferu těchto látek i jeho narušení půdními bezobratlými konzumací mycelia této skupiny mikromycet (Johnson et al., 2005 – 3.7. str 85).

## 2.2. Metody studia diverzity založené na extrakci nukleových kyselin

I přes nesporný význam metod stručně zmíněných v předcházející kapitole, nejrozšířenějšími metodami studia diverzity nejrůznějších ekosystémů jsou bezesporu metody založené na studiu genetické informace uložené v R/DNA. K jejich využití je nukleové kyseliny nutné z biologického materiálu nejprve izolovat, separovat a koncentrovat. Poté následuje jejich zpracování a využití v navazujících aplikacích. Podívejme se proto nejprve na metody extrakce nukleových kyselin.

Pro izolaci půdní mikrobiální R/DNA existují dva základní postupy, označované jako přímá (*in situ*) a nepřímá (*ex situ*) izolace R/DNA. V případě přímé izolace jsou mikrobiální buňky lyzovány přímo v půdní matrici a uvolněná R/DNA je pak následně extrahována a čištěna. Při nepřímé izolaci jsou nejprve mikrobiální buňky extrahovány z půdy, odděleny od půdní matrice a teprve takto získaná mikrobiální frakce je podrobena lyzi. Protože způsoby lyze mikrobiálních buněk v případě přímé i nepřímé izolace jsou téměř identické, všimněme si nejprve nepřímé izolace, tj. způsobů extrakce půdní mikrobiální frakce.

### 2.2.1. Extrakce půdní mikrobiální frakce

Půda je komplexní prostředí sestávající z fáze pevné, tekuté a plynné. Částice pevné fáze se shlukují do mikro- a makroagregátů a vytvářejí tak půdní strukturu. Jen dobré strukturní půdy zajistí rostlinám vhodné prostředí pro jejich zdárný vývoj. Významný podíl na vytváření půdní struktury mají mikrobiální buňky, které spolu s kořeny rostlin nejrůznějšími mechanismy poutají drobné minerální částice dohromady (sekrece polysacharidů, glykoproteinů a podobných látek, mechanický účinek bakteriálních fimbrií, myceliárních mikroorganismů – hub a některých aktinobakterií spolu s kořeny rostlin, elektrostatické síly a další) a vytvářejí tak půdní agregáty. Mikrobiální buňky nejsou v rámci struktury půdy univerzálně rozšířené a najdeme je především na vnější straně agregátů a v mikroskopických pórech mezi nimi (jedná se ale o nepatrné procento všech půdních pórů), kde mají zajištěny vhodné podmínky pro svou existenci, především dostatek vody a určité množství živin. Důsledkem jejich soustředění v mikropórech i jejich schopnosti poutat dohromady minerální částice půdy (a tímto způsobem být samy k minerálním částicím poutány) je však také snížená dostupnost mikrobiálních buněk pro většinu lytických postupů a jejich uvolnění z půdní

matrice není snadné. Proto většina metod izolace půdní mikrobiální frakce kombinuje mechanické metody rozrušení struktury půdy s chemickým působením pufrů různého složení.

Metody izolace mikrobiální frakce se liší způsoby mechanického ošetření půdy (u publikovaných metod však často chybí technická data použitých zařízení), složením pufru použitým pro homogenizaci vzorku i způsobem extrakce mikrobiální frakce samotné po homogenizaci půdních vzorků. Uvedme si několik příkladů izolace půdní mikrobiální frakce.

Jedněmi z prvních, kdo využili metodu nepřímé izolace půdní mikrobiální DNA, byli v roce 1977 Faegri *et al.*, kteří homogenizovali půdu ve vhodném pufru a kombinací nízkootáčkové a vysokootáčkové centrifugace (diferenciální centrifugace) oddělili od sebe frakci obsahující většinu půdních částic spolu s houbovým myceliem a částí bakterií (sediment po první nízkootáčkové centrifugaci) a frakci obsahující 50-80% všech přítomných bakterií (sediment po vysokootáčkové centrifugaci supernatantu z první nízkootáčkové centrifugace).

Bakken (1985) testoval tři druhy homogenizátorů: Waring blender (obdoba kuchyňského mixéru), „Braun melsungen cell homogenizer“ (třepání půdy se skleněnými kuličkami) a Ilado X 10/20homogenizer (intenzivní mixování vzorku), kde jako homogenizační medium použil vodu, detergenty nebo pufrů: 0,22% hexametafosfát sodný pH 8,5 s Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; 0,3% pyrofosfát sodný; roztok Winogradského; 0,2% bromhexin chlorid; 0,5% Tween 80. Kromě toho testoval možnost flokulace jílových minerálů s použitím okyselení půdního homogenátu na pH 3 (přidáním kyseliny octové a sírové) a přísadkou CaCl<sub>2</sub>. Půdní homogenát centrifugoval 15 minut ve výkyvném rotoru při 630-1060xg a vzniklý sediment podrobil následně opakované extrakci. Výsledný kombinovaný supernatant centrifugoval 20 minut při 10.000xg. Mikrobiální frakci ze vzniklého sedimentu pak získal pomocí centrifugace v hustotním gradientu za použití Ludoxu HS 40 (Du Pont Co., Wilmington, Del.), případně Percollu (Pharmacia) – 1,16 g/ml.

Macdonald (1986a,b,c) publikoval v roce 1986 sérii tří článků zabývajících se izolací půdní mikrobiální frakce. Půda byla 2 hodiny třepána se skleněnými kuličkami v přítomnosti sodné formy iontoměniče Dowex A1 (Sigma) v 0,1% roztoku cholátu sodného a poté následovalo vyplavování bakteriální frakce. Pro disperzi polymerů poutajících mikrobiální buňky k půdní matici byly testovány různá média: voda, Tween 80 (1% v/v), Triton X-100 (0,1% v/v), N-lauroyl sarcosinát sodný (0,1% w/v) a

cholát sodný (0,1% w/v), kde nejúčinnější se jevil cholát sodný (Tabulka 2). Dalším testovaným ošetřením byla centrifugace při 1xg, 20xg a 1600xg. Získaná bakteriální frakce byla podrobena centrifugaci v Percollovém gradientu (1,139-1,101 g cm<sup>-3</sup>).

**Tabulka 2 Výnos mikroorganismů z půdy dispergované pomocí Dowex A1 v různých detergentech** (Převzato z: Macdonald, 1986a)

Treatment	Yield % <sup>a</sup>
Water	26
Tween 80 (1% v/v)	76
Triton X-100 (0.1% v/v)	57
Na-N-lauroyl sarcosinate (0.1% w/v)	37
Na-cholate (0.1% w/v)	84

Výnos vypočten procenty váhy biomasy určené fumigací

Steffan *et al.* (1988) získal bakteriální frakci homogenizací půdy v 0,1M fosfátovém pufru pH4,5 s přidavkem polyvinylpolypyrrolidonu (PVPP) za použití Waring blendru (mixéru). Po třech jednodominutových intervalech mixování přidal do suspenze SDS a následovalo krátké (5 sec) mixování. Poté byly vzorky po dobu jedné minuty třepány v ruce a centrifugovány 10 minut při 1000xg. Vzniklý sediment byl podroben dalším dvěma cyklům popsané extrakce a kombinovaný supernatant centrifugován 30 minut při 10.000xg. Pro snížení obsahu organického materiálu nebakteriálního původu byl sediment 2x resuspendován v 0,1% roztoku hexametafosfátu a pyrofosfátu sodného a poté centrifugován (10.000xg). Finální promytí k odstranění huminových nečistot bylo provedeno v pufru podle Crombacha (0,33 M Tris, 0,001M EDTA).

Hopkins *et al.* (1991a) testoval devět různých metod půdní disperze, většinu z nichž nakonec zahrnul do následující metody: půda byla mixována v 0,1% roztoku cholátu sodného, poté byl přidán další cholát sodný spolu se sodným chelatačním činidlem (sodium chelating resin) a skleněnými kuličkami a suspenze byla 2 hodiny třepána. Následovala dvouminutová centrifugace při 500xg, poté byl sediment resuspendován v Tris pufru a opět po dobu 1 hodiny třepán, znovu centrifugován (500xg), resuspendován v cholátu sodném, lehce sonikován ve vodní lázni a s přidavkem dalšího cholátu sodného třepán po dobu jedné hodiny. Následovala centrifugace (500xg), resuspendování v Tris pufru, centrifugace (500xg), resuspendování



v destilované vodě s následným třepáním (1 hod), centrifugace (500xg), resuspendování v destilované vodě, třepání (1 hod) a poslední centrifugace (500xg).

V následující publikaci použili Hopkins *et al.* (1991b) první krok výše uvedené metody: půda byla mixována v 0,1% roztoku cholátu sodného, poté byl přidán další cholát sodný spolu se sodným chelatačním činidlem (sodium chelating resin) a skleněnými kuličkami a suspenze byla 2 hodiny třepána. Bakteriální frakce byla poté vyplavována proudem fyziologického roztoku.

Holben (1994) použil k homogenizaci roztok Winogradského s přidavkem askorbátu sodného a okyseleného PVPP. Vzorek mixoval 3x1 minutu (Waring blender), poté jej podrobil centrifugaci (640xg) a následně proces homogenizace sedimentu opakoval dvakrát. Bakteriální frakci ze všech tří získaných supernatantů oddělil centrifugací při 14.740xg.

Lindal a Bakken (1995) testovali několik metod fyzikální a chemické disperze půdy. Z fyzikálních metod to byla ultrasonikace za použití sondy o průměru 13 mm a dvou hladinách energie (40W a 55W), mixování (Waring blender), použití gumového rotujícího pístu ve zkumavce o průměru o 0,5-1 mm větším než píst a dvouhodinové třepání. Pro chemickou disperzi byl testován roztok deoxycholátu sodného s polyetylen glykolem 6000 a iontoměničem Chelex 100. Účinnost disperze byla hodnocena nízkorychlostní centrifugací (1000xg) nebo centrifugací v Nycodenzovém gradientu.

Courtois *at al.* (2001) homogenizoval půdu mixováním v 0,9% roztoku NaCl (Waring blender) a z takto získané suspenze oddělil mikrobiální frakci vysokorychlostní centrifugací na Nycodenzovém gradientu (1,3 g ml<sup>-1</sup>).

Bylo by možné dál pokračovat ve výčtu publikovaných metod izolace půdní mikrobiální frakce, nicméně jak je zřejmé z již uvedeného přehledu vybraných publikací, největší variabilitu vykazuje složení pufru použitého k homogenizaci půdy. Odhlédneme-li od jeho složení, je možné metody rozdělit do dvou skupin podle způsobu vlastní extrakce mikrobiálních buněk na metody používající diferenciální centrifugaci (Faegri *et al.*, 1977, Steffan *et al.*, 1988, Hopkins *et al.*, 1991a,b, Holben 1994) a metody využívající centrifugaci v hustotním gradientu (Bakken 1985, Macdonald 1986a,b, Lindal a Bakken 1995, Cortois *et al.*, 2001).

Účinnější separace mikrobiální frakce od půdních koloidů a především huminových látek je možné dosáhnout centrifugací v hustotním gradientu. Princip této metody je založen na skutečnosti, že bakterie mají menší vznášivou hustotu než většina půdních částic. Jedním z prvních, kdo tuto metodu v kombinaci s nízkootáčkovou

centrifugací použil, byl Bakken (1985), který připravil hustotní gradient za použití Ludoxu HS 40 (Du Pont Co., Wilmington, Del) a později velmi často používaného Percollu (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden). Percoll tvoří suspenze koloidního křemíku, která má v požadovaném rozsahu hustoty nízkou viskozitu a osmolaritu. Problémem mohou ale být právě částice křemíku zvláště při následném použití fluorescenční mikroskopie díky silné fluorescenci těchto částic. V poslední době získal na popularitě Nycodenz, neionický iodovaný derivát benzoové kyseliny se třemi bočními alifatickými hydrofilními řetězci. Jeho systemický název je 5-(N-2,3-dihydroxypropylacetamido)-2,4,6-tri-iodo-N,N'-bis(2,3 dihydroxypropyl) isophthalamid, molekulová hmotnost 821, hustota 2,1 g ml<sup>-1</sup>. Není toxický a je velmi dobře rozpustný ve vodě. Jeho vlastnosti poprvé popsali Rickwood *et al.* (1982) a pro účely izolace půdní mikrobiální frakce ho jako jedni z prvních použili Lindahl a Bakken (1995). Z poslední doby můžeme uvést například práci Liu *et al.* (2010), kteří Nycodenzový gradient použili pro izolaci bakterií z půdy při přípravě metagenomové BAC knihovny. Práci s Nycodenzovým gradientem popíšeme podrobněji v následujících kapitolách práce.

Konečně bychom také měli zmínit metodu využívající zachycení cílové skupiny mikroorganismů na magnetických nosičích a jejich následné oddělení od půdní suspenze. V tomto případě jsou magnetické mikroskopické kuličky obalené monoklonálními či polyklonálními protilátkami smíchány s půdním homogenátem, kde se na ně nacytují cílové mikroorganismy, které jsou potom pomocí magnetu odděleny od zbytku půdního homogenátu. Metoda detekce určitých skupin mikroorganismů pomocí protilátek se většinou využívala především pro detekci lékařsky významných mikroorganismů ve vodě a potravinách, ale její aplikovatelnost pro půdní podmínky potvrdila již v roce 1968 studie Schmidta *et al.*, kteří využili techniku fluorescenčních protilátek ke studiu volně žijících bakterií jako jsou rhizobia. Přímou metodu imunomagnetické detekce pro spory bakterií *Streptomyces lividans* v půdním prostředí využili například Wipat *et al.* (1994).

## 2.2.2. Extrakce R/DNA z půdy a půdní mikrobiální frakce

Extrakci půdní mikrobiální R/DNA se věnuje celá řada článků, což je zřejmě způsobeno především velkou variabilitou půdních podmínek znemožňujících vytvoření jedné univerzální metody extrakce R/DNA. Složitost extrakce se také odráží i v množství komerčních kitů k izolaci nukleových kyselin z půdy a sedimentů, o kterých se zmíníme v závěru této kapitoly. Na tomto místě se budeme věnovat „klasickým“ postupům izolace/extrakce nukleových kyselin, které i z hlediska výuky a přípravy absolventů vysokých škol považujeme za mnohem vhodnější (ve srovnání s používáním komerčních kitů). Celý proces extrakce je možné rozdělit do několika fází, kde se každá podílí na kvalitě konečného produktu: volba vhodného pufru, lyze buněk a konečně čištění uvolněné R/DNA.

### 2.2.2.1. Volba vhodného pufru

Prvním krokem je volba vhodného pufru, ve kterém se uskuteční vlastní lyze mikrobiálních buněk. Jde o krok zdánlivě méně důležitý, který však významnou měrou rozhoduje o výsledku celé extrakce. Úlohou pufru je zajistit vhodné prostředí pro lyzi buněk (například často využívaný lysozym je inhibován vysokou koncentrací solí v roztoku), zabránit degradaci R/DNA uvolněné lyzí (především působením restrikčních enzymů) a v případě přímé extrakce R/DNA také zabránit vazbě uvolněných nukleových kyselin na půdní koloidy. A právě zde dochází ke „střetu zájmů“, protože z hlediska izolace a ochrany R/DNA po jejím uvolnění je žádoucí mírně alkalické pH (většinou pH 8) a vysoká chelatační schopnost pufru (restrikční enzymy potřebují bivalentní ionty), tedy podmínky vhodné i k uvolnění kontaminujících huminových látek. Jakmile však dojde k uvolnění těchto látek, jsou při většině extrakčních procesů vysráženy spolu s R/DNA a jen velmi obtížně se z roztoku odstraňují.

Za tradiční pufr bychom mohli označit fosfátový pufr (například 0,12 M fosfátový pufr pH 8), který umožňuje izolaci značného množství R/DNA, bohužel však současně uvolňuje mnoho huminových látek. Tento pufr byl použit v mnoha pracích, namátkou jmenujme alespoň některé z nich: Ogram *et al.* 1987, Leff *et al.* (1995), Stefan *et al.* (1988). Další velkou skupinu tvoří pufrы s různým obsahem EDTA a TrisHCl; EDTA vázáním bivalentních iontů zabraňuje činnosti restrikčních enzymů a TrisHCl zajišťuje vhodné pH roztoku: jmenujme například pufr použitý Crombachem

*et al.* (1972) a dále využívaný Torsvik *et al.* (1990a) obsahující 33mM Tris-HCl a 1 mM EDTA, pH 8,0. Picard *et al.* (1992) použil TNPE pufr: 50mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8,0, 100 mM NaCl, 1% (w/w) polyvinylpolypyrrolidone (PVPP); tento pufr později použili také například Frostegard *et al.* (1999), Courtois *et al.* (2001) a další; EDTA najdeme ve většině dalších pufrů použitých k izolaci půdní mikrobiální DNA (např. Torsvik *et al.*, 1980; Liles *et al.*, 2008).

#### 2.2.2.2. Lyze mikrobiálních buněk

Metody používané k lyzi mikrobiálních buněk je možné rozdělit na dvě skupiny, na metody mechanické a chemicko-enzymatické. Většina postupů extrakce R/DNA používá kombinaci obou přístupů, kdy především při přímé lyzi buněk v půdní matrici mechanické ošetření v počáteční fázi extrakce zajišťuje kromě přímého lytického účinku i přístup použitých enzymů a chemikálií k mikrobiálním buňkám pevně vázaným v matrici půdy.

Nejběžnějším **mechanickým ošetřením** je intenzivní třepání půdní suspenze často s přidáním různě velkých skleněných kuliček. Například Hopkins *et al.* (1991a,b) nebo Macdonald (1986a) použili třepání půdní suspenze se skleněnými kuličkami především k dokonalému resuspendování či homogenizaci vzorku za účelem zpřístupnění mikrobiálních buněk lytickému účinku použitých enzymů a ostatních sloučenin. Velmi účinnou variantou tohoto ošetření je tzv. beat beating, tj. velice intenzivní třepání půdy (4-6,5 m/s) s pufrem a skleněnými kuličkami o velikosti kolem 0,1 mm, kde už kromě homogenizace vzorku dochází i k mechanické lyzi části mikrobiálních buněk. Původně šlo o velmi hmotné a hlučné zařízení (Braun Beat – beater), kdy vzorek půdy (několik gramů dle velikosti použitých zkumavek) s příslušným pufrem a skleněnými kuličkami (0,11 mm) 5 minut rotoval ve skleněné zkumavce ve speciální kapsli přístroje chlazené stlačeným CO<sub>2</sub> (Smalla *et al.*, 1993, van Elsas *et al.*, 1997). Toto zařízení bylo v posledních letech nahrazeno menšími přístroji (nazývanými např. FastPrep, Ribolyzer, MagnaLyser a podobně), kde je rotační pohyb jedné zkumavky nahrazen vertikálním třepáním 12, případně 24 dvoumilitrových plastových zkumavek se vzorkem (např. 0,5 g půdy) a příslušnou lytickou matricí obsahující kromě jiného i různě velké kuličky. Nejznámější je systém FastPrep, což je označení jak pro samotný homogenizátor, tak i pro komerčně dodávané

a velmi úspěšné kity pro izolaci R/DNA z půdy, bakterií, mikromycet a podobně (Griffiths *et al.*, 2000; Dineen *et al.*, 2010a, 2010b; Mettel *et al.*, 2010).

Další možností je sonikace vzorku buď ve vodní lázni, nebo podstatně účinnější způsob za použití kovové sonikační sondy vibrující v nádobce s půdní suspenzí nebo mikrobiální frakcí. Zvláště při použití sondy se dosáhne velmi účinné lyze buněk, bohužel však spojené s intenzivním nastříháním extrahované DNA a proto se tento způsob příliš neuplatňuje (Frostegard *et al.*, 1999; Courtois *et al.*, 2001).

Z dalších možností musíme jmenovat tradiční „freezing-thawing“, tedy prudké zmrazování a rozmrazování půdní suspenze za použití tekutého dusíku a teplé vodní lázně. Avšak vzhledem k malé velikosti především bakteriálních buněk a velké rychlosti jejich zmrazení se dá předpokládat, že toto ošetření nebude na značnou část půdních bakteriálních buněk příliš účinné. Smalla *et al.* (1993) porovnávala účinek tohoto ošetření s tradičním beat-beatingem, který prokázal podstatně vyšší účinnost lyze a Kauffmann *et al.* (2004) a Zhou *et al.* (1996) došli k závěru, že toto ošetření je účinné pouze na Gram-negativní buňky.

Byly také testovány nejrůznější způsoby tření či mletí půdy, a to půdy suché (Frostegard *et al.*, 1999), nebo zmražené tekutým dusíkem (Hurt *et al.*, 2001). Frostegard *et al.* (1999) a Courtois *et al.* (2001) využili strojové mletí v achátové třecí misce s achátovými kuličkami o průměru 20 mm po dobu až 60 minut nebo drcení wolframovými kroužky po dobu 30 vteřin, avšak i po tomto ošetření zůstalo podle mikroskopického pozorování více než 50% buněk intaktních. Tření půdy s kapalným dusíkem ručně v třecí misce použili k extrakci DNA z půdy Volossiuk *et al.* (1995). Zhou *et al.* (1996) testoval účinek tohoto ošetření na kultury Gram-pozitivních buněk smíchaných se sterilním pískem, kde toto ošetření zvýšilo výnos DNA 2-6x ve srovnání s pouhým freezing-thawing.

Nejčastěji používaným **enzymatickým ošetřením** je působení lysozymu. Tento enzym přítomný ve slinách, slzách a jiných tělních exkretech, ale také ve vaječném bílku, hydrolyzuje 1-4 beta glykosidickou vazbu mezi N-acetylmuramovou kyselinou a N-acetyl-D-glukozaminem v peptidoglykanu bakteriální buněčné stěny především Gram-pozitivních bakterií a mezi N-acetyl-D-glukózaminovými zbytky v chitodextrinu mikromycet (zřejmě proto se někdy lysozym používá pro izolaci R/DNA z mikromycet). Gram-negativní bakterie vzhledem k odlišnému složení buněčné stěny jsou chráněny proti ataku lysozymu, avšak tato ochrana není úplná (Masschalck *et al.*, 2001). Lysozym je inhibován vysokou koncentrací solí, což je nutné respektovat při

výběru pufru použitého k lyzi. K pufru bývá někdy přidávána sacharóza, která stabilizuje sféroplasty vznikající účinkem lysozymu do přidání detergentu lyzujícího cytoplazmatickou membránu. Kromě lysozymu (a často společně s ním) bývá také užívána proteináza K, širokospektrá serin-proteáza používaná k trávení proteinů a odstraňování kontaminací při extrakci nukleových kyselin. Její lytickou činností jsou také rychle rozštěpeny endonukleázy a tímto způsobem jsou uvolněné nukleové kyseliny chráněny proti jejich degradaci. Svou proteolytickou schopnost si proteináza K uchovává i za přítomnosti SDS a EDTA, což je nesmírně důležité právě při procesech izolace a čištění R/DNA. Z dalších enzymů můžeme zmínit achromopeptidazu, kterou Ezaki a Suzuki (1982) použili k lyzi Gram-pozitivních anaerobních koků rezistentních účinku lysozymu. Tento enzym atakuje peptidové můstky mezi řetězci peptidoglykanu.

K lyzi mikromycet lze použít kombinaci lytických enzymů z *Rhizoctonia solani*, vykazujících glukanázovou, proteázovou, pektinázovou a amylázovou aktivitu a lytických enzymů z *Trichoderma harzianum* s glukanázovou, cellulázovou, proteázovou a chitinázovou aktivitou (Sigma-Aldrich). Novo Nordisk produkoval Novozym 234 (směs chitinolytických enzymů), který se používal k přípravě houbových protoplastů, extrakci DNA z houbových kultur i k extrakci DNA mikromycet z půdy (Porteous a Armstrong, 1991).

K **chemické lyzi** bakteriálních buněk je nejčastěji využíván laurylsulfát sodný (SDS), tenzid využívaný i v mnoha přípravcích osobní hygieny, jako například zubní pasty a podobně. Pro účely lyze se často používá tzv. horká lyze (hot SDS lysis), kdy je k půdní suspenzi přidán SDS do konečné koncentrace 1% a výsledná suspenze je inkubována při 65-70°C. Lyze buňky proběhne narušením cytoplazmatické membrány. Dalším často využívaným kationtovým detergentem je cetyltrimethylammonium bromide (nebo také hexadecyltrimethylammonium bromid; CTAB). Tento detergent by neměl být použit spolu s SDS nebo fenolem, protože s nimi tvoří nerozpustné sraženiny. Pro zachování rozpustnosti DNA je potřebná vysoká koncentrace monovalentních kationů jako  $\text{Na}^+$  nebo  $\text{NH}_4^+$ , která také zajistí vysrážení polysacharidových (obecně uhlovodíkových) a proteinových komplexů s CTAB, které budou za těchto podmínek naopak nerozpustné. Podobný účinek mají i další detergenty, lze dokonce použít i kterýkoliv běžný prací prostředek (Bahl a Pfenninger, 1996). Metoda izolace DNA pomocí pracích prostředků byla publikována pro nejrůznější typy tkání (lidské tkáň, tkáň plazů, slimáků, tabáku), v naší laboratoři jsem ji aplikovali i na půdní vzorky a i zde byla izolace úspěšná, což není překvapivé, vezmeme-li v úvahu, že většina pracích

prostředků obsahuje detergenty, enzymy a chelatační činidla. Problémem zůstává skutečnost, že podobně jako při využití SDS a EDTA je spolu s DNA uvolněno i mnoho huminových substancí, což se projeví tmavým zbarvením vzorku a je samozřejmě spojeno se značnými komplikacemi při dalším čištění a užití extrahované DNA (inhibice enzymatických reakcí).

### 2.2.2.3. Čištění - srážení izolované R/DNA

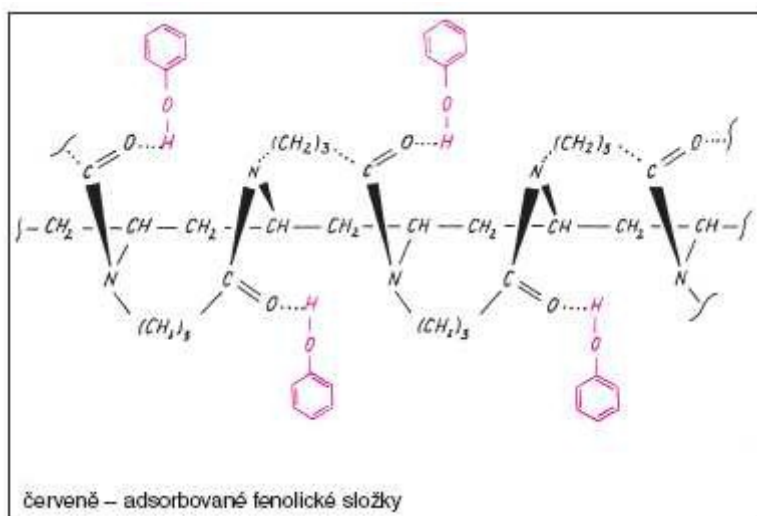
Po uvolnění z buněk je potřeba R/DNA zbavit kontaminací nukleoidových proteinů i dalších zbytků buněčných struktur a – především v případě přímé lyze - i příměsí z půdního prostředí, hlavně huminových substancí, které vykazují výrazný inhibiční vliv na enzymatické reakce a znesnadňují tak další práci s R/DNA. Úroveň kontaminace je posuzována skanováním na UV spektrofotometru, kde fenolické látky (huminové substance) mají maximum absorpance při vlnové délce 230 nm, DNA při 260 nm a proteiny při 280 nm. K výpočtu kontaminace pak slouží poměry absorpance 260/230 pro huminové látky a 260/280 pro proteiny, které by se oba u čisté DNA měly pohybovat v rozmezí 1,8-2,0.

**Problémem huminových substancí** je fakt, že jsou běžnými srážecími technikami používajícími etanol nebo isopropanol vysráženy z roztoku spolu s R/DNA a dají se proto jen velmi obtížně odstranit. Proto je lépe soustředit veškeré úsilí na minimalizaci těchto kontaminací již v průběhu procesu extrakce R/DNA, tedy volbou vhodného pufru i lytických ošetření, jak bylo diskutováno výše. Kromě toho byly publikovány postupy omezující kontaminaci přidávkem nejrůznějších chemikálií, z nichž asi nejčastěji diskutovaným je již výše zmíněný polyvinylpolypyrrolidone (PVPP), běžně používaný jako plnidlo (tablety – např. náhražky cukru) a čefící látka (nápoje).

**PVPP** je makromolekulární ve vodě nerozpustná sloučenina, která je schopna na sebe selektivně vázat fenolické látky (používá se např. pro vazbu tříslovin při výrobě piva). Reakce probíhá jenom v určité oblasti pH. V alkalickém prostředí se vazba uvolňuje a adsorbované látky přecházejí zpět do roztoku. Právě tento fakt může působit komplikace při extrakci R/DNA, kde se využívají pufrů s alkalickým pH. To je zřejmě také důvod, proč některé metody využívající PVPP při extrakci nukleových kyselin hovoří o tzv. „acid washed PVPP“, tedy okyseleném PVPP. PVPP je součástí například již výše zmíněného TNPE pufru, který byl publikován Picardem *et al.* (1992) a dále

používán Frostegardem *et al.* (1999), nebo součástí protokolu izolace půdní bakteriální DNA publikované Holbenem (1994). Jiné metody využívají PVPP jako filtrační kolonu (Lakay *et al.*, 2006; Arbeli a Fuentes, 2007).

Podobný účinek jako PVPP má mít již dříve zmíněný **CTAB**, který by tedy kromě úlohy při narušení cytoplazmatické membrány měl být schopen tvořit nerozpustné komplexy s huminovými látkami a již výše zmíněnými polysacharidy a proteiny (Obr.1).



**Obr. 1 Vazba fenolických sloučenin na CTAB**

Kromě PVPP byl testován i vliv polyvinylpyrolidonu (PVP) na čistotu DNA. V tomto případě byl rozpustný PVP přidán do agarózového gelu, kde zpomalil elektroforetickou mobilitu fenolických látek (huminové substance) a umožnil tak jejich oddělení od nukleových kyselin (Young *et al.*, 1993).

Další možností odstranění kontaminace huminovými látkami jsou nejrůznější **filtrační kolony**. Kromě již zmíněného PVPP se používají kolony Sepharozové (Torsvik 1980), Sephadexové (Howeler *et al.*, 2003, Miller *et al.*, 1999), Chelexové (Straub *et al.*, 1994) častěji využívané v prvních fázích izolace k usnadnění lyze buněk a existuje i celá řada komerčně produkovaných filtračních kolon, jako například Wizardové kolony (Henne *et al.*, 1999) nebo Elutip-d kolony (Degrange a Bardin 1995; Frostegard *et al.*, 1999), nebo kolony, které jsou součástí komerčních kitů pro izolaci půdní DNA (např. FastDNA<sup>®</sup> SPIN Kit for Soil, FastRNA<sup>®</sup> Pro Soil-Direct Kit, FastRNA<sup>®</sup> Pro Soil-Indirect Kit). Při použití filtračních kolon dochází buď k vazbě huminových látek na tyto kolony (např. Sepharozové kolony), DNA v tomto případě



kolonami volně prochází, nebo zvláště u kolon, které jsou součástí izolačních kitů, se naopak nukleové kyseliny selektivně váží na matrici kolon, zatímco huminové látky jsou vymyty. Po změně pH nebo osmotické síly roztoku jsou čisté nukleové kyseliny uvolněny z kolon.

K získání a čištění R/DNA po lyzi se používají také nejrůznější **srážení**. Nejčastější je srážení etanolem nebo isopropanol za vysoké koncentrace solí v roztoku (obvykle 0,3 M acetát sodný), kde základním rozdílem je množství alkoholu použitého ke srážení (2-2,5 objemů v případě etanolu, nebo 0,6-1 objem u isopropanolu). V obou případech jsou ale spolu s nukleovými kyselinami vysráženy také huminové látky. Existují však postupy srážení, které jsou selektivnější a při jejich použití dojde ke značnému snížení kontaminace nukleových kyselin těmito látkami. Jedním z nich je srážení R/DNA pomocí polyetylén glykolu (PEG). V tomto případě se většinou používá PEG 6000 nebo PEG 8000 v konečné koncentraci 10% za přítomnosti 1M NaCl (např. Howeler *et al.*, 2003; Towe *et al.*, 2011). Je možné také využít srážení pomocí 5mM spermine tetrahydrochloride (spermine-HCl), zde je naopak nutná nízká koncentrace solí, tedy nejlépe v TE pufru (Hopwood *et al.*, 1985).

Používají se i další způsoby **čištění DNA**, jako je centrifugace v gradientu chloridu cesného nebo čištění na hydroxyapatitových kolonách (Ogram *et al.*, 1987, Stefan *et al.*, 1988). V obou případech však jde o procesy jak časově tak finančně náročné, během kterých dochází také ke ztrátám na výnosu DNA. Kromě toho centrifugace v gradientu chloridu cesného je vhodná spíše pro odstranění proteinových a dalších buněčných nečistot, huminové látky budou dispergovány v tomto gradientu (Stefan *et al.*, 1988).

Odstranění dalších kontaminantů, především proteinů, již nepředstavuje takový problém. Část proteinů může být rozložena přidávkem proteinázy K a běžným ošetřením je fenol-chloroformová extrakce. Proteiny mohou být také sráženy acetátem draselným (Smalla *et al.*, 1993) nebo cesium chloridem (Smalla *et al.*, 1993, Van Elsas *et al.*, 1997).

Již v úvodu této kapitoly jsme se zmínili o **komerčních soupravách/kitech** k extrakci DNA z půdy, kterých se zvláště v posledních letech objevila celá řada. Zmíňme například UltraClean Soil DNA kit a PowerSoil™ DNA Isolation Kit (MoBio Laboratoriem Inc., Solana Beach, CA, USA), FastDNA® SPIN Kit for Soil (Q-BIOgene), Mag-Bind® Soil DNA Kit (Omega Bio-Tek, Inc.), nebo ZR Soil Microbe DNA Kit (Zymo Research). S většinou těchto souprav je možné získat velmi kvalitní

DNA z většiny půd, avšak podobně jako stále neexistuje univerzální metoda extrakce R/DNA z půdních mikroorganismů aplikovatelná na všechny půdní podmínky (pro úplnost/správnost je zde třeba zmínit metodu izolace DNA z půdy - ISO standard 11063 – Soil quality – Method to directly extract DNA from soil samples), neexistuje také jeden univerzální kit účinný ve všech půdních podmínkách. Kromě toho se v případě komerčních kitů pracuje s „černou skříňkou“, kde se míchají blíže nespecifikované roztoky a používají nejrůznější centrifugační kolony bez podrobnějších informací, s čím se vlastně pracuje, což prakticky znemožňuje jakoukoliv optimalizaci extrakčního procesu. Je také třeba zdůraznit, že i při použití stejných komerčních extrakčních kitů (případně stejných extrakčních protokolů) a stejných půdních vzorků se výsledky izolace budou lišit laboratoř od laboratoře (vlastní nepublikované výsledky; Pan *et al.*, 2010). A konečně z hlediska výuky na vysokých školách nepovažujeme použití kitů za přínosné pro již zmíněnou absenci znalosti procesu samotné extrakce. I přesto je nutné zdůraznit, že pro některé aplikace může být použití kitů vhodné a bylo by chybou se mu a priori vyhýbat.

Problematice izolace půdní mikrobiální R/DNA jsme se věnovali během celého mého působení na Univerzity of Warwick, výsledky testování nejvhodnějších metod extrakce mikrobiální frakce, lyze mikrobiálních buněk i vlivu jednotlivých kroků izolace a čištění R/DNA na množství a kvalitu získaných nukleových kyselin jsme publikovali v našem článku v roce 1999 (Krsek a Wellington) - viz. kapitola 3.2. (str. 63). I po publikaci tohoto článku jsme i nadále zkoumali možnosti optimalizace tohoto klíčového kroku všech molekulárních metod a bylo-li to možné, testovali nové metody a postupy publikované nejrůznějšími výzkumnými skupinami.

### 2.2.3. Metody studia mikrobiální diverzity založené na analýze R/DNA bez použití PCR

#### 2.2.3.1. Metody založené na hybridizaci DNA izolované z mikrobiální komunity

Jedinou metodou, která je teoreticky schopná určit absolutní diverzitu mikrobiálního společenstva, je **metoda reasociace denaturované DNA** extrahované z mikrobiálních společenstev. Tuto metodu k analýze diverzity mikrobiálních společenstev poprvé použila v roce 1990a Torsvik *et al.*, ale vzhledem ke své obtížnosti nedoznala velkého rozšíření. Metoda spočívá v extrakci DNA z environmentálního vzorku, jejího naštípání a tepelné denaturaci a následné renaturaci po ochlazení vzorku, jejíž rychlost je nepřímo úměrná diverzitě analyzovaného vzorku. Čas potřebný k dosažení poloviční reasociace může pak být využit jako index diverzity příslušného vzorku. Jedná se tedy o jednoduchý princip dříve používaný k určení velikosti genomů nejrůznějších organismů (Baldari a Amaldi, 1976; Dhillon *et al.*, 1980). Jeho aplikace na podmínky mikrobiálních komunit, zvláště půdních, však spolu přináší značné komplikace. Kromě již dříve zmíněného problému zajištění extrakce DNA ze všech mikrobiálních buněk studované mikrobiální komunity společného pro všechny ostatní metody založené na extrakci DNA, bude prvním závažným problémem zajištění DNA v dostatečné kvantitě i kvalitě. Metoda vyžaduje v porovnání s jinými molekulárními metodami značné množství DNA, která musí kromě toho být dostatečně čistá, protože jakékoliv nečistoty (především huminové látky) mají značný vliv na průběh reasociace denaturované DNA. Proto byla extrahovaná DNA v původní metodě (Torsvik *et al.*, 1990a) čištěna na hydroxyapatitových kolonách. Poté byla nastříhána na menší kousky (reasociace intaktní DNA by trvala neúměrně dlouho) a opět čištěna na hydroxyapatitových kolonách z důvodu odstranění malých úseků DNA. Teprve potom mohlo být přistoupeno k tepelné denaturaci DNA a následné reasociaci za nižší teploty. Právě pomalý průběh reasociace (i po nastříhání DNA je k dosažení poloviny reasociace potřeba inkubace v řádu dní až několika týdnů) spolu s dalšími nároky této metody na přístrojové vybavení a podobně zřejmě způsobil, že se tato metoda nerozšířila a naprostá většina publikovaných prací využívající tuto metodu pochází z laboratoře autorky (Torsvik *et al.*, 1990a; Ovreas *et al.*, 2003; Ovreas a Torsvik, 1998; Sandaa *et al.*, 1999; Ritz *et al.*, 1997).

Kromě metody reasociace princip hybridizace DNA používají i další metody, často však již za přispění PCR, či jiných molekulárních metod. Například Griffiths *et al.*

(1996) použili **hybridizaci DNA** izolované z různých půdních vzorků ke srovnání struktury mikrobiálních společenstev těchto půd. V tomto případě je DNA z jednoho vzorku naštípána restrikčními endonukleázami a označena buď pomocí tzv. „nick translation“, metody, při které je DNA naštípána pomocí DNázy a následně označena s využitím DNA polymerázy I, která zaměňuje některé nukleotidy za značené (Rigby *et al.*, 1977), nebo „random primer labeling“ (Thomas-Cavallin M. a Aït-Ahmed O, 1988), kdy jsou k denaturované DNA přidány náhodné oligonukleotidy, které jsou za pomoci Klenowa fragmentu polymerázy a směsi 4 nukleotidů, z nichž jeden je značený, prodlouženy za produkce značené dvouřetězcové DNA. Takto značená DNA jednoho společenstva je poté hybridizována s DNA druhého vzorku imobilizovaného na membráně. Touto metodou je tedy možné pouze srovnat dva vzorky DNA, ale protože je srovnání prováděno oboustranně (vzorek A je srovnáván se sondami vytvořenými ze vzorku B a naopak), porovnáním získáme informace jak co do druhové bohatosti, tak i vyrovnanosti obou vzorků.

Konečně jsou na hybridizaci založeny nejrůznější molekulární metody využívající různě specifické DNA sondy a pracující jak s DNA, tak i s RNA, nebo dokonce *in situ*. Tímto způsobem je možné získat důležité kvantitativní i kvalitativní údaje o studované komunitě. Nutno podotknout, že část těchto metod je opět založená na využití PCR. Sondy mohou mít nejrůznější specificitu od domén až po jednotlivé mikrobiální druhy a mohou být i různě značeny (Theron a Cloete, 2000). Tradičně se používaly radioaktivně značené sondy, v poslední době však nabyly na významu fluorescenční sondy, které vedly k aplikaci techniky FISH (fluorescent *in situ* hybridization) i v analýze půdních mikrobiálních společenstev (Margesin *et al.*, 2009; Henneberger *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2012).

Metodou reasociace denaturované environmentální DNA jsem se během své praxe zabýval opakovaně. Poprvé to bylo v počátcích mé práce na Univerzity of Warwick, kdy jsem nejprve navštívil laboratoř dr. K. Ritze na Scottish Crop Research Institute v Dundee ve Skotsku, který získal zkušenosti s touto metodou v laboratořích průkopnice metody, dr. V. Torsvik. Poté jsem se snažil metodu aplikovat při práci na svém prvním grantu na Univerzity of Warwick, kde hlavním problémem byla absence odpovídajícího spektrofotometru vybaveného peltiérem temperovaným držákem kyvet k přesné regulaci teploty. Se stejným problémem jsme se potýkali i na mém současném pracovišti na MU, kde jsem toto téma zadal jako Diplomovou práci (L. Kozáková:

Nový pohled na určení diverzity bakteriálních společenstev metodou reasociace denaturované bakteriální DNA). Teprve v nedávné době se nám podařilo na pracoviště mikrobiologie zakoupit odpovídající spektrofotometr s patřičným vybavením a v nejbližší době plánujeme opět testovat možnosti této metody.

### 2.2.3.2. Metagenomové knihovny

Konečně je na tomto místě nutné zmínit metodu tvorby metagenomových knihoven, někdy také v literatuře nazývané „shotgun cloning“. Metagenomem rozumíme všechny geny přítomné ve zkoumaném environmentálním vzorku. Metagenomová knihovna tedy vznikne přímým klonováním DNA extrahované z environmentálního vzorku. Genetická informace vytvořených klonů je pak nejrozličnějšími způsoby analyzována. Jednu z prvních studií používajících tento přístup publikovali již v roce 1991 Schmidt *et al.*, kteří klonovali DNA izolovanou z mořského bakterioplanktonu do bakteriofága lambda a mezi klony identifikovali a sekvenovali 38 klonů s geny pro 16S rRNA. Dalším mezníkem byla práce Rondona *et al.* (2000), kteří publikovali jednu z prvních prací zabývajících se tvorbou metagenomových knihoven s použitím bakteriálního umělého chromozómu (bacterial artificial chromosome - BAC) a DNA izolované ze dvou půdních vzorků.

Metagenomové knihovny představují nevyčerpatelný a dosud téměř nedotčený zdroj informací o genetické variabilitě a potenciálu nejrozličnějších mikrobiálních společenstev. Praktické provedení tohoto úkolu však není snadné. Základním předpokladem úspěšné tvorby knihovny je totiž klonování velkých úseků DNA, často o velikosti několika stovek kb. Jen takovéto klony vytváří předpoklad k získání opravdu užitečných genetických informací například ve formě nových ucelených metabolických drah a usnadňují následnou analýzu knihoven. Běžnými postupy extrakce mikrobiální DNA jsou však izolovány fragmenty DNA jen o velikosti 10 – 20 kb. K získání větších úseků je většinou potřeba přistoupit k izolaci DNA z mikrobiálních buněk v terčících z nízkotuhnoucí agarózy. Mikrobiální buňky jsou potom v těchto terčících lyzovány a uvolněná DNA nastříhána restrikcími enzymy na fragmenty o vhodné délce. Kontrola účinnosti štěpení DNA spolu se separací DNA podle molekulové hmotnosti fragmentů se provede na pulzní gelové elektroforéze. Z výsledného gelu je pak vyříznuta oblast odpovídající požadované molekulové hmotnosti DNA, která je z gelu získána buď enzymatickým rozpuštěním agarózy, nebo vyplavením pomocí elektroforézy.

Získáním DNA fragmentů o vysoké molekulární hmotnosti však úskalí metody nekončí. Fragmenty je nutné vložit do vhodného vektoru a následně pak analyzovat. Avšak už jen samotná manipulace s takovými fragmenty DNA je velice obtížná – například při pipetování může dojít velice snadno k našťipání těchto fragmentů. Dalším úskalím je výběr vhodného vektoru, který by měl v ideálním případě zajistit neselekční vložení všech získaných DNA fragmentů a případně i jejich expresi ve vhodném organismu. Jako vektor je možné použít plazmidy, častěji jsou ale využívány vektory odvozené od různých fágů, jako například cosmidy, odvozené z fágu lambda. Tento vektor obsahuje cos sekvenci z původního fága (nutnou pro zabalení DNA) a vhodný počátek replikace dle požadavků klonované DNA. V porovnání s normálními plazmidy schopnými pojmout fragmenty 1-20 kb, se cosmidy používají ke klonování fragmentů v rozmezí 37-52 kb. Fosmidy jsou podobné cosmidům, jsou ale odvozené z bakteriálního F-plazmidu. Velikost klonovaných fragmentů zde dosahuje 40 kb. Vzhledem k nízkému počtu kopií jsou stabilnější než cosmidy s vysokým počtem kopií. Dalším typem klonovacího vektoru jsou tzv. phasmidy (phagemidy), které byly vyvinuty jako hybridy fága M13 a plazmidů. Mohou růst podobně jako plazmidy, zároveň však mohou obsahovat i jednořetězcovou DNA jako virové částice. Významným přínosem ve tvorbě metagenomových knihoven bylo vytvoření výše zmíněného BAC vektoru založeného na F-plazmidu. Na rozdíl od fosmidů jsou schopné pojmout až 150-350 kb genetické informace. Z bakteriálního P1-plazmidu byl vyvinut podobný vektor nazývaný PAC. Jen pro úplnost zde zmiňme vektory vyvinuté pro klonování DNA z jiných než bakteriálních zdrojů, jako například vektor YAC (yeast artificial chromosome) nebo HAC (human artificial chromosome).

Po úspěšném klonování a zavedení vektoru do vhodné hostitelské buňky je možné ke studiu získaných knihoven aplikovat dva přístupy – screening může být založený na sekvenování, nebo na funkční detekci klonovaných genů. Oba přístupy mají své výhody, ale také úskalí. Sekvenční screening je založen na detekci sekvencí podobných známým (funkčním) genům a může tedy detekovat (za použití primerů nebo sond) jen varianty již známých metabolických drah a podobně. Jejich detekce však nezajišťuje přítomnost celých takovýchto genů/drah. Výhodou tohoto přístupu je nezávislost na expresi a produkci cizích genů v hostitelské buňce. Případně je – díky nesmírnému pokroku v technikách sekvenování - teoreticky možné sekvenovat celé knihovny, kde pak největším problémem bude zpracování a především interpretace získaných výsledků. V případě funkčního screeningu není potřebná znalost jakékoliv

sekvence a proto tímto přístupem mohou být objeveny zcela nové geny/funkce. Základním a limitujícím faktorem zde však bude exprese klonovaných genů a tvorba funkčních produktů v hostitelské buňce. Situace je dále komplikována faktem, že i v případě, že k této expresi a tvorbě produktů dojde, mohou tyto být pro buňku letální a v důsledku toho tedy nedetekovatelné. Tvorbě metagenomových knihoven a jejich analýze se budeme ještě podrobněji věnovat v následujících kapitolách práce.

Jako pro jiné aplikace v molekulární biologii i pro tvorbu metagenomových knihoven existují dnes i komerční kity. Například firma Epicentre vyvinula kit k izolaci DNA z vodného prostředí za účelem tvorby metagenomových knihoven (Metagenomic DNA Isolation Kit for Water, Epicentre, dnes součást Illumina, Inc., Madison, Wisconsin, USA). Uváděná velikost izolovaných fragmentů je však jen 40 kb, což může být podle našeho názoru nedostatečné. Firma Lucigen nabízí dokonce ucelený servis ve formě tvorby celých metagenomových knihoven: Metagenomic BAC and Fosmid Libraries. Podle informací na jejich webovských stránkách (<http://lucigen.com/store/Metagenomic-BAC-and-Fosmid-Libraries.html>) jsou schopni izolovat DNA o vysoké molekulové hmotnosti z minimálního množství nejrozličnějšího materiálu (mikrobiální vzorky z rostlin a živočichů; půdní vzorky; mořské vzorky – plankton, řasy, houby; extremofilové; a jiné environmentální vzorky) a tuto pak použít k přípravě náhodně nastříhaných (Random Shear) BAC a fosmidových knihoven, které jsou zákazníkovi doručeny zmrazené v 384 nebo 96 jamkových destičkách. V době, kdy jsme se v našich laboratořích zabývali tvorbou metagenomových knihoven, žádný z těchto servisů neexistoval a proto jejich vhodnost nebo účinnost nemůžeme posoudit.

I přes všechny zmíněné problémy a omezení představují metagenomové knihovny významný a nepostradatelný prostředek k identifikaci nových biomolekul využitelných v medicíně (nová antibiotika a jiná léčiva), potravinářství i mnoha průmyslových aplikacích a v neposlední řadě i ke studiu diverzity a metabolického potenciálu mikrobiálních společenstev včetně dosud do značné míry opomíjených virových společenstev, pro které knihovny představují téměř jediný možný způsob jejich soustavného studia. Svědčí o tom i řada prací z poslední doby zabývajících se tvorbou a využitím metagenomových knihoven z půdního prostředí, jako například Nacke *et al.*, 2011; Sang *et al.*, 2011; Khan a Jithesh, 2012; Ko *et al.*, 2012; McGarvey *et al.*, 2012.

Tvorba metagenomové knihovny byla úkolem našeho druhého grantu (Provision of a molecular archive for microbial diversity within treatment plots at Sourhope) v rámci programu Soil Biodiversity anglické grantové agentury NERC. O metodách tvorby metagenomových knihoven i jejich úskalích jsme podrobně informovali na konferenci anglické mikrobiologické společnosti (SGM) pořádané v roce 2006 na Univerzity of Warwick. Tato prezentace je součástí předkládané práce ( kapitola 3.8. na straně 87). Metagenomové knihovny z antarktických půd a metody jejich analýzy jsou také tématem naší publikace z roku 2012 (Pearce *et al.*, 2012 – viz. kapitola 3.10. na straně 95).

## **2.2.4. Metody studia mikrobiální diverzity založené na analýze R/DNA s použitím PCR**

### **2.2.4.1. Polymerázová řetězová reakce**

Až do počátku 80. let minulého století byla identifikace mikroorganismů i všechny navazující mikrobiologické metody založeny převážně na metodách kultivačních. Pak přišly dva významné objevy. V roce 1985 Kay Mullis pracující v laboratořích Henry Ericha (Cetus Corp. in Emeryville, Kalifornie) objevil polymerázovou řetězovou reakci. Druhým důležitým milníkem bylo zjištění, že fylogenetické vztahy mezi organismy mohou být odvozeny z molekulárních sekvencí. Zcela ideální se pro tento účel ukázal gen pro 16s rRNA, který splňuje všechny požadavky kladené na ideální molekulární marker: je přítomen ve všech živých organismech, je dostatečně dlouhý (první pokusy byly prováděny s kratší 5s rRNA), aby poskytl potřebné informace (dokumentace evoluce a podobně), jeho horizontální transfer je omezený, stejně tak jako jeho primární a sekundární struktura a konečně jeho sekvence obsahuje domény konzervativní (umožňující např. tvorbu primerů) i variabilní (umožňující rozlišení jednotlivých genů/organismů). Spojení těchto dvou objevů znamenalo doslova revoluci v mikrobiální ekologii i v celé mikrobiologii i ostatních biologických vědách. Vzhledem k významu PCR pro všechny biologické vědy se budeme touto metodou zabývat poněkud podrobněji.

Princip PCR spočívá v namnožení úseku nukleové kyseliny ohraničeného na začátku a na konci tzv. primery (krátkými oligonukleotidy DNA) v zařízení zvaném termocycler, které je schopné rychle měnit teplotu vzorků. Celý proces PCR pak sestává



z mnohonásobného opakování kroků denaturace DNA (94°C), nasednutí primerů na oddělené jednovláknové řetězce denaturované templátové molekuly DNA (50-65°C) a prodlužování primerů – tedy syntéza komplementárního řetězce DNA (72°C). Teoreticky lze takto během 30 cyklů z jedné molekuly DNA získat přes miliardu identických molekul DNA .

Základním předpokladem pro úspěšnou aplikaci všech molekulárně biologických metod využívajících PCR je kvalitní pár primerů zabezpečující vysokou specifitu a účinnost PCR reakce. Proto všechny PCR metody začínají buď vyhledáváním vhodných již existujících primerů, nebo tvorbou nových primerů. Pro vytvoření nových primerů je nutné nejprve shromáždit maximum informací o DNA sekvenci zkoumané oblasti, tyto pak seřadit podle podobnosti sekvencí a na základě sekvencí konzervativních úseků DNA navrhnout vhodné primery.

V případě primerů pro 16S rDNA bude zdrojem potřebných informací nejpravděpodobněji databáze RDP – Ribosomal Database Project. Tato databáze vznikla na popud Carl R. Woese a Gary J. Olsena z University of Illinois, kteří si uvědomili, že rRNA, díky svým konzervativním sekvencím, může být využita ke zkoumání fylogenetických vztahů mezi organismy. Databáze obsahuje sekvence prokaryotické, eukaryotické a mitochondriální malé podjednotky rRNA a nabízí i řadu služeb, jako seřazení dat dle sekvencí, tvorba dendrogramů, vyhledávání sekvencí dle podobností a podobně.

Kromě primerů pro 16s rRNA s různou specificitou (od univerzálních bakteriálních primerů až k druhově specifickým primerům) jsou také často využívány primery pro funkční geny. Princip jejich tvorby je podobný jako u 16s rRNA primerů, ale vzhledem k tomu, že se jedná o primery pro funkční geny, jejichž produktem jsou většinou enzymy či bílkoviny všeobecně, má jejich tvorba určitá specifika. Jde především o prvotní seřazení sekvencí zkoumané oblasti, které je možné udělat podobně jako u 16s rRNA primerů na úrovni bází, ale v případě funkčních genů asi častěji na úrovni aminokyselin, které může odhalit některé skryté podobnosti mezi příbuznými sekvencemi.

Existuje celá řada programů pro tvorbu/designe primerů, na tomto místě zmíníme jen námi často úspěšně využívaný program CODEHOP (Consensus-DEgenerate Hybrid Oligonucleotide Primers), který je možné v původní formě nalézt na webové adrese <http://blocks.fhrc.org/blocks/help/CODEHOP/tips.html>. Tento program už není v současné době dále udržován a je možné jej využít jen pro jednodušší

úkoly/primery a byl nahrazen podobným programem iCODEHOP na Univerzity of Washington (<http://dbmi-icode-01.dbmi.pitt.edu/i-codehop-context/Welcome>). Do programu jsou nejprve vloženy původní aminokyselinové sekvence zkoumaného úseku DNA, případně přímo hotový soubor vzniklý seřazením sekvencí například pomocí programu ClustalW a tato data jsou předána na server. V případě větší podobnosti sekvencí program přímo navrhne soubor degenerovaných primerů (degenerovaný primer představuje směs primerů skládajících se z konzervované části společné pro všechny primery a části variabilní zabezpečující perfektní dosednutí primeru na maximální množství templátů v environmentálním vzorku), ze kterých je možné si vybrat nejvhodnější pár primerů. Pokud však jsou sekvence příliš různorodé a program není schopen navrhnout žádný primer, je nutné buď změnit podmínky tvorby primerů (v programu je například možné upřednostnit některé sekvence zvýšením jejich váhy/významu a podobně), případně zúžit výběr sekvencí (a tím i specifitu vytvořených primerů). Může dojít i k tomu, že i po změně podmínek pro dané sekvence není program schopen vytvořit žádné primery.

V případě, že jsou primery nalezeny, je vhodné (nutné) jejich specifitu ověřit nejprve *in silico*, tedy porovnáním jejich sekvence se známými sekvencemi v databázích, což se většinou děje za pomoci programu BLAST (The Basic Local Alignment Search Tool), <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Pokud se prokáže dostatečná specifita, je možné přistoupit k optimalizaci podmínek PCR reakce a ke kontrole specifity primerů s využitím co možná největšího souboru DNA z cílových a příbuzných mikroorganismů (kde je očekáván PCR produkt), ale i „cizích“ organismů (kde naopak by nemělo k tvorbě PCR produktů dojít). Příklad optimalizace PCR reakce prováděný v naší laboratoři pro nové primery (podobná optimalizace by měla být prováděna vždy při jakékoliv změně v PCR reakci – například i při změně dodavatele DNA polymerázy) uvádí Tabulka 3. Údaje v tabulce vychází z následujících předpokladů: všechny reakce jsou prováděny v konečném objemu 25  $\mu$ l; konečná koncentrace dNTPs je 200  $\mu$ M; koncentrace  $MgCl_2$  vychází z předpokladu, že je k taq polymeráze dodáván pufr bez  $MgCl_2$ ; v případě, že je  $MgCl_2$  součástí dodávaného PCR pufru, bude první koncentrace  $MgCl_2$  nulová a další dvě mohou být vhodně upravené; zásobní roztok BSA – bovinní sérový albumin – je připraven v koncentraci 10 mg/ml a do reakce je přidáván za účelem odstranění inhibicí z environmentální templátové DNA (především huminové látky); DMSO - dimethyl sulfoxide – do reakce je přidáván pro zvýšení její účinnosti zejména usnadněním kompletní denaturace templátové DNA;

primery jsou naředěny tak, aby 1  $\mu$ l obsahoval 50 pmolů primeru; vzhledem k tomu, že u většiny PCR reakcí v naší laboratoři využíváme horký start (hot start), je naředěná taq polymeráza přidávána po počáteční denaturaci do každé zkumavky zvlášť (na 50  $\mu$ l reakci připadá 1 U polymerázy); SDW – sterilní destilovaná voda.

Po připravení všech 12 směsí (mastermixů) jsou tyto rozpipetovány do 4 zkumavek, z nichž tři slouží pro přidání templátové DNA z organismů, pro které byl primer připraven, čtvrtá je použita jako negativní kontrola. Je také možné použít méně vzorků templátové DNA a místo toho zbývající alikvoty mastermix využít pro testování PCR podmínek při jiné teplotě přiložení primerů (annealing temperature). Jak vyplývá z tabulky, při optimalizaci jde především o určení vhodné minimální koncentrace  $MgCl_2$ , která rozhoduje o specifitě reakce. U ostatních komponent – především BSA a DMSO - jde o zjištění vlivu jejich (ne)přítomnosti na průběh reakce. Zvyšováním koncentrace  $MgCl_2$  přibývá PCR produktu, ale vzhledem ke snižování specifity reakce (umožněním dosednutí primerů na úseky DNA s menší shodou s primerem) se zvyšuje nebezpečí vzniku nespecifických produktů. Podobný efekt má snižování teploty přisedání primerů (annealing temperature), který lze – místo změn koncentrace  $MgCl_2$  - s výhodou testovat na gradientových PCR cyclerech.

**Tabulka 3. Optimalizace podmínek PCR reakce (všechny údaje uvedené v  $\mu$ l)**

Komponenty												
dNTPs	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
PCR buffer	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
$MgCl_2$	3	6	9	3	6	9	3	6	9	3	6	9
BSA	10	10	10	10	10	10	-	-	-	-	-	-
DMSO	5	5	5	-	-	-	5	5	5	-	-	-
Primer 1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Primer 2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Taq polymeráza	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
DNA	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
SDW	59	54	49	64	59	54	69	64	59	74	69	64
Celkem	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

dNTPs – 10mM;  $MgCl_2$  – 50 mM; BSA – 10mg/ml; primery – 50 pmolů v 1  $\mu$ l; taq polymeráza – 0,5 U/  $\mu$ l

Výsledkem optimalizace PCR reakce by měl být PCR produkt o požadované velikosti, jehož specifitu si lze ověřit buď sekvenováním, nebo například hybridizací s vhodnou sondou.

I přes nezpochybnitelný význam PCR má tato metoda některé problémy, se kterými je nutno počítat a které zde v krátkosti zmíníme. V první řadě **funkce DNA polymeráz** používaných pro syntézu nových řetězců DNA není bezchybná. Běžně používaná taq polymeráza (izolovaná z bakterie *Thermus aquaticus*) je sice účinná, postrádá ale tzv. „3' to 5' exonuclease proofreading aktivity“, tj. schopnost kontrolovat správnost zkopírované DNA. To znamená, že 1 z 9000 nukleotidů zabudovaných do nově syntetizované molekuly DNA je chybný. Vznikne tedy mutovaná molekula DNA, která je během dalších cyklů PCR dále amplifikovaná. Pfu polymeráza (izolovaná z *Pyrococcus furiosus*) kontrolní (proofreading) aktivitu má a četnost zabudování chybného nukleotidu u této polymerázy je pouze 1 v 1,3 miliónech bazí, je však pomalejší a proto se využívá především tam, kde jsou vysoké nároky na přesnost replikace DNA (klonování a podobně).

Další příčinou vzniku mutovaných molekul je přítomnost sekundárních struktur na amplifikované DNA. V důsledku takovýchto struktur může dojít při kopírování DNA k přeskočení krátkého úseku DNA, tedy k delecii, jejímž výsledkem je kratší PCR produkt, tedy opět „mutace“ dále množená v následujících cyklech PCR.

Závažným, často přehlíženým problémem, je vznik tzv. **chimér**, tedy nových molekul DNA, které se nenacházely v původním vzorku/templátu. K tomuto jevu dochází tehdy, když z jakéhokoliv důvodu nedojde v jednom cyklu k dokončení syntézy kopírovaného úseku DNA. Při dalším cyklu může tato krátká molekula DNA nasednout na jinou molekulu DNA, se kterou je v určitém úseku (i odlišném od okrajových oblastí, kde dosedají primery) homologní a je potom dosyntetizována podle tohoto templátu. Vzniklá molekula DNA se pak skládá ze sekvencí ze dvou různých templátů a je tedy zcela nová, v původním vzorku se nevyskytující. Některé zdroje uvádí, že za určitých okolností (například přítomnost malých fragmentů DNA v templátové DNA, které mají za následek předčasné ukončení syntézy DNA v jednom cyklu a její dosyntetizování podle příbuzného ale odlišného templátu v cyklu následujícím; dále přítomnost sekvencí s vysokým procentem konzervovaných úseků DNA, kdy místo primerů k sobě dosednou jiné molekuly DNA a jsou pak chybně dosyntetizovány) mohou chiméry tvořit až 30% molekul PCR produktu. Pokud by tomu tak bylo, význam PCR reakce pro molekulární biologii by byl významně zpochybněn. Vzniku chimér se lze bránit

používáním kvalitní templátové DNA (DNA o vysoké molekulové hmotnosti), prodloužením doby prodlužování primerů (extension) a snížením počtu cyklů PCR. Kromě toho byly vytvořeny programy na detekci chimér, které však spolehlivě fungují jen za předpokladu, že obě sekvence (templátové molekuly DNA) jsou odlišné minimálně 15 %. K odhalení chimér je nutné provádět důkladnou analýzu produktů, jejich sekundární struktury, fylogenetické analýzy různých částí molekul, či sestavit dendrogramy z opačných konců molekul, které – v případě chimér - budou odlišné.

Dalším problémem PCR je tzv. **diferenciální amplifikace**. Teoreticky by měly být v každém cyklu PCR replikovány všechny přítomné templátové molekuly DNA, což by znamenalo, že ve výsledném produktu budou zachovány přesně původní poměry ve vzorku. Pracujeme-li však například s mikrobiální DNA izolovanou z environmentálního vzorku a používáme primery pro 16S rRNA, může dojít k tomu, že vzhledem k odlišnému počtu kopií rDNA v genomu různých bakterií, budou ve výsledném produktu převažovat sekvence z bakterií s vyšším počtem těchto genů a takto dojde ke zkreslení původního složení vzorku. Je také třeba vzít v úvahu heterogenitu rRNA operonů v jednotlivých bakteriích, které mohou mít za následek vytvoření umělé diverzity vzorku (dva různé operony genu 16S rRNA ze stejného organismu budou pokládány za molekuly pocházející ze dvou různých organismů).

Ke zkreslení zastoupení jednotlivých sekvencí představujících různé mikrobiální populace zastoupené v původním vzorku/komunitě může dojít také v případě, že jsou v něm velké rozdíly v početním zastoupení jednotlivých populací mikroorganismů. S přibývajícím počtem cyklů klesá koncentrace primerů a stoupá koncentrace produktů, takže v pozdějších cyklech nemusí vždy dojít k nasednutí primeru na templátovou DNA, ale místo toho může docházet k opětnému spojení dvou templátových molekul (tzv. re-annealing). V tomto případě templát v nadbytku (majoritní/dominantní populace) dosáhne dřív kritické koncentrace, kde pak převládne opětné dosedání templátových molekul k sobě (re-annealing) namísto dosedání primerů na templátovou molekulu a tato DNA se pak již nebude amplifikovat a její množství bude stagnovat, zatímco minoritní templátová DNA (minoritní populace) bude dále amplifikována, takže ve výsledném PCR produktu budou setřeny původní rozdíly v zastoupení jednotlivých populací mikroorganismů.

Z dalších možných příčin diferenciální amplifikace je třeba zmínit rozdíly v obsahu G+C templátu (templáty s vyšším obsahem G+C vzhledem k pevnější vazbě mezi C-G oproti A-T mohou hůře denaturovat a v důsledku toho mohou být

amplifikovány s nižší účinností ve srovnání s templáty s vyšším obsahem A+T), přítomnost sekvencí (i mimo amplifikovaný úsek), které snižují účinnost amplifikace (smyčky/loops interferující s prodlužováním/elongací - extension), nebo modifikace templátu (metylace) zabraňující amplifikaci.

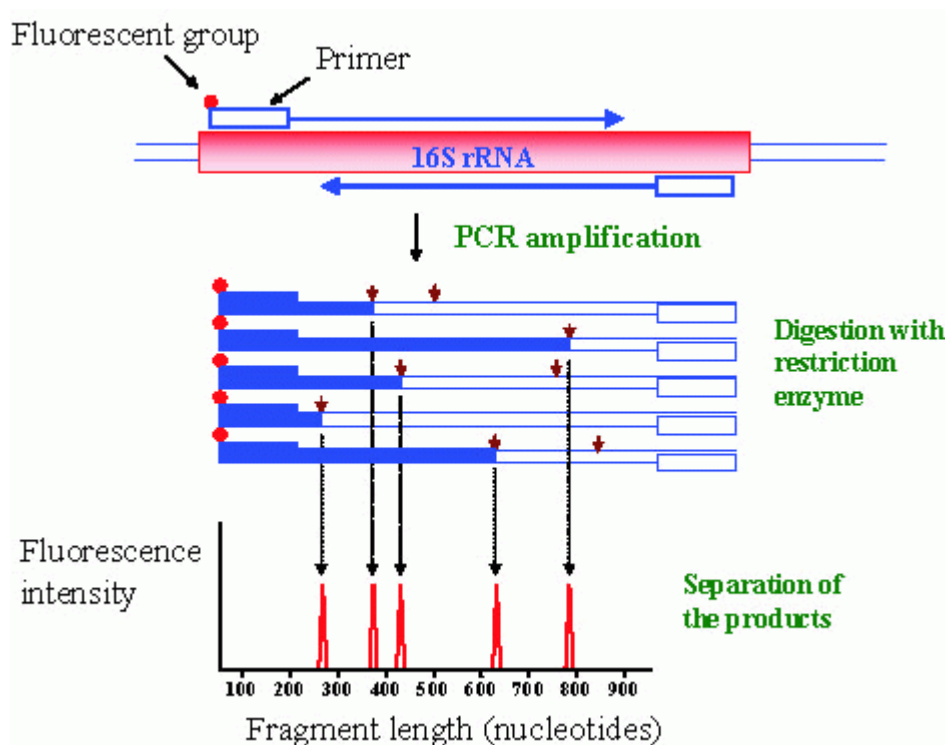
Velký význam má také **účinnost/efektivita a selektivita primerů** – suboptimální vazba primerů snižuje účinnost amplifikace; univerzální primery mohou zapříčinit preferenční amplifikaci některých sekvencí nejpodobnějších primerům; degenerované primery (směs primerů s různou sekvencí) tuto chybu mohou odstranit, ale pokud se liší teplota tání ( $T_m$ ) jednotlivých primerů, různá teplota nasedání primerů bude opět příčinou diferenciální amplifikace. "

Nicméně i přes všechny výše zmíněné problémy přínos této metody přinejmenším vyvažuje zmíněné nedostatky a PCR je proto využívána v řadě molekulárně biologických metod určování diverzity mikrobiálních společenstev, jejichž stručný přehled následuje.

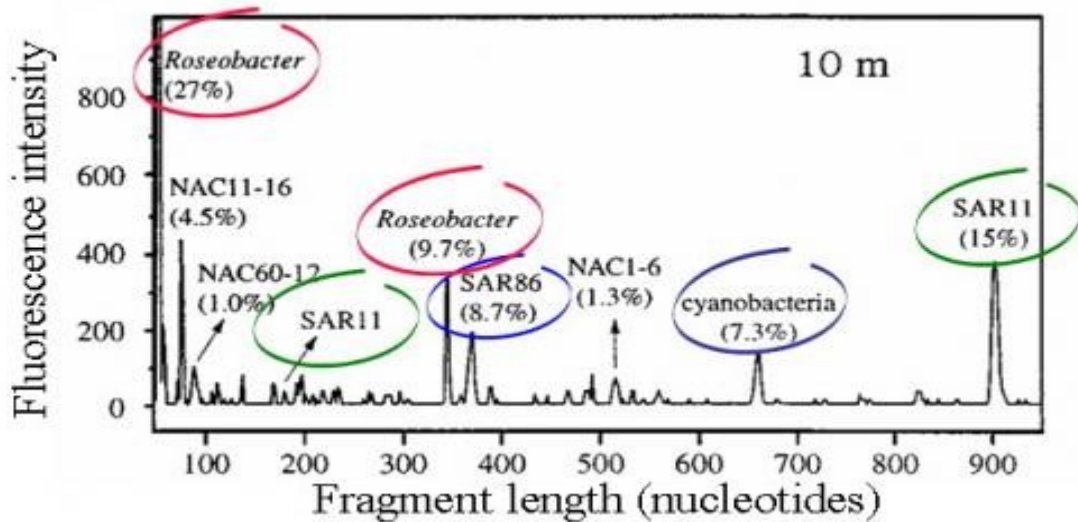
#### **2.2.4.2. Polymorfismus délky restrikčních fragmentů (RFLP, T-RFLP, ARDRA)**

RFLP, restriction fragment length polymorphism, polymorfismus délky restrikčních fragmentů (nebo také ARDRA, Amplified ribosomal DNA restriction analysis), byla první technika analýzy DNA, která doznala významného rozšíření. Při této technice je analyzovaná DNA naštípána restrikčními endonukleázami a vzniklá směs DNA fragmentů rozdělena pomocí elektroforézy, v základní verzi v agarózovém gelu. Poté může za účelem identifikace fragmentů následovat přenos DNA na membránu a hybridizace se značenou sondou. Pomocí RFLP lze od sebe odlišit dvě (a více) příbuzné/homologní molekuly DNA lišící se v jednom či více párech bází (bodová mutace, inserce, delece, inverze, translokace) za předpokladu, že tato odlišnost se nachází buď v místě rozeznávaném použitým restrikčním enzymem, nebo jí dojde ke změně délky restrikčního fragmentu DNA detekovatelné elektroforeticky (pro vyšší citlivost je možné/nutné nahradit elektroforézu v agarózovém gelu elektroforézou v polyakrylamidovém gelu). Tato metoda sehrála významnou roli v mapování genomů a genetické analýze nemocí, byla používána k vytváření prvních genetických fingerprintů, určování paternity, v kriminalistice a k určování genetické diverzity populací (Walker-Jonah *et al.*, 1992; Echt *et al.*, 1994; Umene a Yoshida, 1994; Wu *et al.*, 2009; Chuah *et al.*, 1994).

K charakterizaci diverzity mikrobiálních společenstev vyvinuli Liu *et al* (1997) modifikaci této metody, tzv. T-RFLP, polymorfismus délky terminálních restrikčních fragmentů, který je využíván jak pro ribozomální geny, tak i pro jiné funkční geny (Boyle-Yarwood *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2009; Yarwood *et al.*, 2010). V tomto případě je environmentální DNA použita jako templát pro PCR reakci, kde jeden nebo oba primery jsou fluorescenčně značené a po proběhnutí PCR a naštípání vhodnými endonukleázami a elektroforéze jsou na gelu viditelné pouze terminální restrikční fragmenty (Obr. 2). Výsledkem je zjednodušený/zpřehledněný fingerprint mikrobiálního společenstva, kde je každý druh reprezentován jen jedním nebo dvěma (při značení obou primerů) fragmenty. Detekce fragmentů se v tomto případě většinou provádí na DNA sekvenátoru, který je schopen rozlišit fragmenty lišící se délkou jednoho nukleotidu. Výsledný elektroforegram podá kvalitativní (počet jednotlivých druhů reprezentovaných jednotlivými píky) i semikvantitativní (výška/intenzita píku odráží do určité míry množství jedinců téhož druhu) informaci o složení společenstva(Obr.3) .



**Obr. 2. Princip techniky T-RFLP** (převzato z <http://nodens.ceab.csic.es/t-rfpred/method>; Fernández-Guerra *et al.*, 2010)



**Obr. 3. Příklad analýzy mikrobiálního společenstva pomocí T-RFLP** (převzato z <http://nodens.ceab.csic.es/t-rfpred/method>; Fernández-Guerra *et al.*, 2010)

V porovnání s ostatními fingerprintovými metodami, především s T/DGGE, má tato metoda některé klady i zápory. K výhodám patří použití automatického sekvenátoru, které značně zvyšuje reprodukovatelnost výsledků, které jsou navíc přímo produkovány v digitální formě vhodné k dalšímu, především numerickému zpracování i jednoduchému skladování. K nevýhodám patří především fakt, že každý druh je zastoupen pouze terminálním restričním fragmentem, kde je zvýšená pravděpodobnost, že příbuzné druhy nebudou touto technikou rozlišeny (budou mít společný terminální fragment). Další nevýhodou je nemožnost získat sekvenci a tedy přesnější identifikaci detekovaných píků.

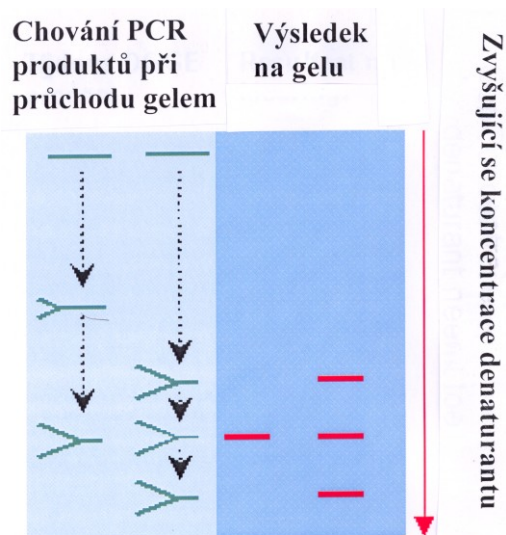
#### 2.2.4.3. Gelová elektroforéza v teplotním/denaturačním gradientu (T/DGGE)

Jednou za základních tzv. fingerprintových metod je DGGE nebo TGGE, tedy Denaturing gradient gel electrophoresis, nebo Temperature gradient gel electrophoresis, česky gelová elektroforéza v denaturačním gradientu nebo gelová elektroforéza v teplotním gradientu. Princip této metody byl známý již dlouho před její aplikací pro environmentální mikrobiologii, kdy byl využíván pro detekci bodových mutací DNA (metoda je v principu schopná odlišit od sebe dvě sekvence lišící se jedním párem nukleotidů). Nová byla její aplikace na gen 16S rDNA spolu s přidáním tzv. GC svorek, tak jak tuto metodu v roce 1993 publikovali Muyzer *et al.* Princip obou metod (DGGE i TGGE) je shodný. PCR produkt migruje v polyakrylamidovém gelu s denaturačním gradientem, který je buď chemický (močovina a formamid), nebo teplotní. Ve skutečnosti jde v obou případech o kombinaci obou přístupů – tedy denaturace je

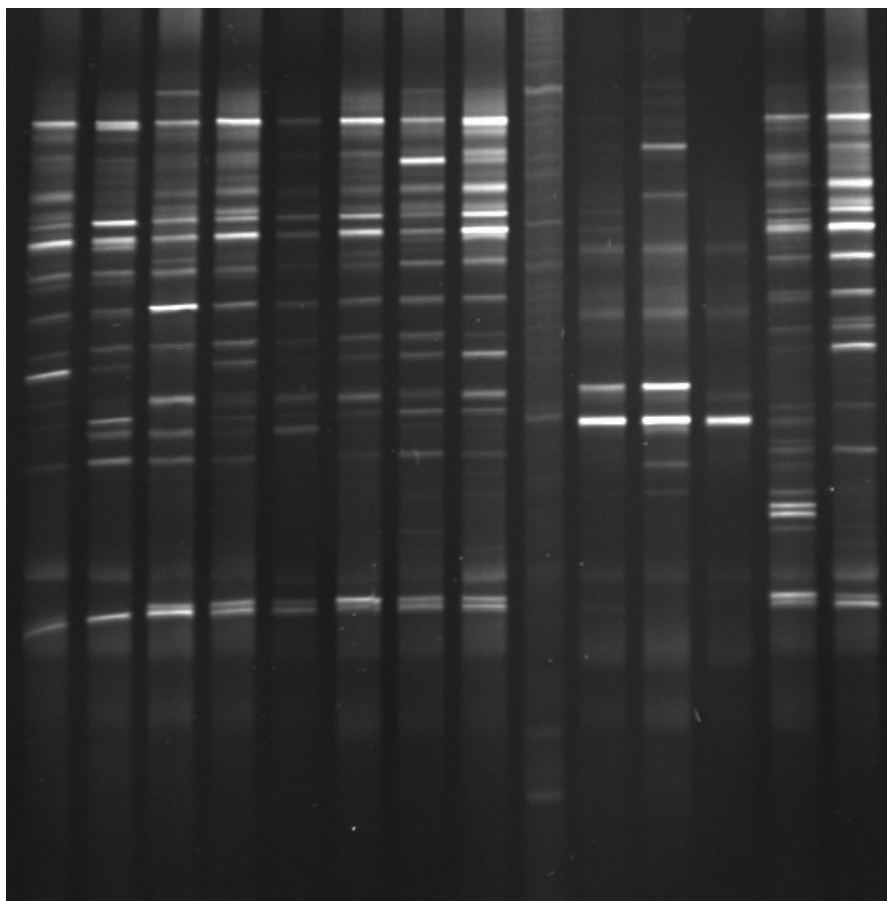


dosaženo kombinací zvýšené teploty a denaturačních chemikálií a rozdíl spočívá jen v tom, čím je tvořen vlastní gradient – buď tedy u DGGE gradient chemický – gradient koncentrace močoviny a formamidu, kdy elektroforéza probíhá za zvýšené teploty (65°C), nebo gradient teplotní u TGGE, kdy je v gelu jednotná koncentrace formamidu a močoviny. Zpočátku molekuly DNA migrují gelem rychle, ale se zvyšujícím se denaturačním gradientem dochází k postupné denuraci molekul DNA, oddělování řetězců DNA, což snižuje rychlost jejich postupu gelem. Průběh této denaturace je specifický dle sekvence analyzované DNA. Vazby mezi G a C se denaturují pomaleji než vazby mezi A a T. V konečném důsledku by došlo k úplnému oddělení dvoušroubovice DNA a vyplavení rychle migrující jednořetězcové DNA z gelu, čemuž je zabráněno přítomností tzv. GC svorky, tedy úseku dlouhého zhruba 40 párů bází skládajícího se téměř výhradně z G a C, který je k analyzovanému úseku přidán (je součástí jednoho z primerů), drží oba řetězce DNA u sebe a má za následek úplné zastavení postupu analyzované molekuly v gelu (Obr.4). To znamená, že při analýze mikrobiální komunity (pomocí 16/18S rDNA, nebo některého funkčního genu) je výsledkem řada proužků, tzv. fingerprint, protože teoreticky každý mikrobiální druh má svou specifickou sekvenci rDNA (případně odlišnou sekvenci funkčního genu) a tomu odpovídá specifická poloha proužku na gelu (Obr. 5.). Tedy opět teoreticky každý mikrobiální druh dá vzniknout jednomu proužku na gelu a naopak, každý proužek reprezentuje jeden mikrobiální druh. Slovo teoreticky jsme zdůraznili proto, že jde opravdu jen o teoretický předpoklad, který ve většině případů také platí, nicméně bylo již prokázáno, že dva organismy mohou dát vzniknout proužku se stejnou polohou na gelu a proto také jeden proužek může odpovídat dvěma a více mikroorganismům (Muyzer a Smalla, 1998) a konečně jeden organismus může (z důvodu přítomnosti více kopií zkoumaného genu – např. 16S rDNA) dát vzniknout více proužkům (Nubel *et al.*, 1996).

Úspěšnost metody je závislá v první řadě na vhodném výběru analyzované DNA sekvence, která musí být dostatečně variabilní, aby opravdu každý druh nebo jiná nomenklaturní jednotka byla reprezentována jedinečnou sekvencí, která umožní její rozlišení na gelu. Nicméně ani potom není zaručeno, že je bude možné na T/DGGE odlišit, tak jak již bylo řečeno. Lze si dobře představit situaci, kdy dva co do sekvence odlišné úseky DNA dají při denuraci vzniknout prostorově shodné sekundární či terciární struktury se shodnou migrací v polyakrylamidovém gelu a vytvoří tedy



**Obr. 4. Princip techniky DGGE**



**Obr. 5. DGGE analýza mikrobiálního společenstva zažívacího traktu včel; jednotlivé běhy představují mikrobiální komunity zažívacího traktu včely medonosné u vzorků odebraných ze včel různého stáří z několika lokalit.**

splývající proužek na tomto gelu. Je také třeba mít na paměti, že fingerprint komunity bude reprezentovat jen nejčtenější představitele komunity, tj. mikrobiální druhy s nízkým počtem jedinců v dané komunitě nebudou s největší pravděpodobností na gelu reprezentovány proužkem (vytvoří na gelu tzv. „smear“, tedy česky šmouhu, či šum nebo pozadí gelu). MacNaughton *et al.* (1999) odhadovali, že pomocí DGGE lze detekovat 1-2% mikrobiální populace představující dominantní druhy v daném vzorku. Toto číslo se nápadně blíží odhadu podílu společenstva, který lze analyzovat pomocí tradičních kultivačních metod. Je tu ale zásadní rozdíl v tom, že u kultivačních metod se jedná o cca 1 % mikroorganismů schopných růstu na kultivačním médiu bez ohledu na jejich úlohu a procentuální zastoupení v dané komunitě, zatímco u T/DGGE jde o 1-2% nejpočetnějších mikroorganismů, o kterých se dá předpokládat, že vzhledem ke svému početnímu zastoupení také plní klíčové role ve společenstvu. Je samozřejmé, že se snižující se diverzitou společenstva podíl jejich členů detekovaných T/DGGE stoupá. Kromě toho existují postupy, jak lze s pomocí T/DGGE detekovat i minoritní populace. V principu lze rozlišit dva přístupy; buď lze aplikovat určitou selekci ještě před vlastním PCR, nebo samo PCR může být selektivní (primery, nested PCR).

Selekce před PCR může být provedena ještě před vlastním odběrem vzorku, nebo až po izolaci DNA. Použití techniky tzv. „buried litter bags“, tedy zakopaných sáčků se substrátem, je příkladem prvního přístupu (Krsek a Wellington, 2001; Metcalfe *et al.*, 2002; Aneja *et al.*, 2004). V tomto případě je vybraný substrát (většinou uzavřený v sáčku z nylonové nebo podobné síťoviny připomínající čajové sáčky) aplikován do přirozeného prostředí a po určité době expozice/kultivace vyjmut a mikroflóra kolonizující tento substrát podrobena analýze (Obr. 6.). Tímto způsobem je možné detekovat i minoritní populace, které by při analýze vzorku získaného přímo z přirozeného prostředí vzhledem k nízkému zastoupení v mikrobiálním společenstvu mohly být pod limitem detekce zvolené metody. Je ovšem třeba mít na paměti, že jde o druh obohacovací kultury (podobného efektu je možné dosáhnout jen prostým obohacením prostředí vybraným substrátem), která výrazně změní původní zastoupení jednotlivých mikrobiálních populací ve vzorku.

Druhou možností je selekce na úrovni izolované DNA. I zde se nabízí více možností, všimněme si alespoň dvou z nich. V obou případech jde o frakcionaci DNA. Jednou z možností je rozdělení DNA na základě obsahu G+C za pomoci barviva bis-benzimidazole. Toto se přednostně váže k sekvenci AT a takto zvyšuje hustotu (buoyan



**Obr. 6. Ukázka techniky zakopaných sáčků se substrátem (buried litter bags)**

density) DNA, kterou lze pak rozdělit v gradientu chloridu cesného. Využitím takto rozdělené DNA lze dosáhnout větší citlivosti při vlastní DGGE. Tento princip využili například Holben a Harris (1995) k monitorování změn ve složení půdní mikrobiální komunity v závislosti na změnách obsahu uhlíku a vody v prostředí a o téměř desetiletí později (Holben *et al.*, 2004) v kombinaci s DGGE ke studiu minoritních mikrobiálních populací mikrobiální komunity zažívacího traktu kuřat. Specifická vazba barviva bis-benzimidazole byla využita i pro jednoduché rozlišení rozdílných sekvencí dvou druhů *Desulfovibrio* při elektroforéze v agarózovém gelu s přídavkem tohoto barviva (Wawer *et al.*, 1995). Jinou možností je již výše zmíněné značení cílových molekul DNA těžkými stabilními izotopy prvků, nejčastěji  $^{13}\text{C}$  (Radajewski *et al.*, 2000). V tomto případě probíhá selekce na základě využití značeného substrátu cílovou skupinou mikroorganismů. Jejich DNA bude po zabudování těžkých izotopů prvků těžší a bude ji možno oddělit od ostatní DNA opět v gradientu chloridu cesného. DGGE fingerprint připravený za použití takto získané DNA bude potom reprezentovat pouze mikroorganismy využívající daný substrát. Jak již bylo zmíněno výše, má tato metoda některá úskalí. V první řadě není vždy jednoduché získat určitý substrát značený těžkým prvkem (jeho výběr je kromě toho omezen prvky tvořícími DNA) a pokud je takový substrát k dispozici, je téměř vždy velice drahý. Dalším problémem metody je možnost

tzv. crossfeedingu, tedy posun značeného prvku potravním řetězcem (čehož - na druhé straně – může být někdy naopak využito právě pro studia zmíněného potravního řetězce). K dosažení dostatečného značení DNA je totiž nutné podat značné množství značeného substrátu a dodržet určitou dobu inkubace, aby byl značený prvek zabudován do DNA. Během této doby už ale také může dojít k rozkladu části značené populace, či exkreci části značeného prvku ve formě nejrůznějších metabolitů a k přijetí těchto substrátů jinými mikroorganismy přítomnými ve sledované komunitě. Kromě toho může nastat i problém s příjmem zvýšeného množství těžkých izotopů prvků organismy. Aplikace této techniky (tzv. SIP – stable isotope probing) díky její náročnosti (drahé substráty) i technickým problémům byla původně omezená především na specializované komunity, kde například možnost crossfeeding je značně omezená (metanotrofní mikroorganismy -Radajewski *et al.*, 2000), nicméně postupně se začaly využívat i při studiu jiných komunit. Například Taubert *et al.* (2012) použili tuto techniku ke studiu síru redukujících a benzen degradujících mikrobiálních společenstev, nebo Xia *et al.* (2011) publikovali článek, ve kterém použili SIP techniku ke studiu amonium oxidujících bakterií a archeí v zemědělské půdě.

Druhý způsob detekce minoritních populací může být založen na specifitě PCR samotné. Úspěšnost/proveditelnost tohoto přístupu závisí na tom, zda existují, nebo je možné vytvořit, selektivní primery specifické pro zkoumanou skupinu mikrobů. V kladném případě je pak možné přímo aplikovat tyto primery a získat fingerprint zkoumané skupiny mikrobů, případně je možné použít tzv. hnízdovou PCR (nested PCR), kdy v prvním kole PCR je využita dvojice univerzálních primerů a teprve ve druhé PCR, kde jako templátová DNA slouží PCR produkt první reakce, jsou aplikovány specifické primery (které však musí ležet uvnitř prvního PCR produktu). V prvním PCR dojde k namnožení cílových sekvencí DNA (včetně sekvencí z minoritních populací) a v druhém kole pak k samotné detekci minoritních populací (Heuer *et al.*, 1997; Dar *et al.*, 2005; Mahmood *et al.*, 2006).

I přes všechny výše zmíněné nedostatky či limity došly metody T/DGGE nejširšího uplatnění v environmentální mikrobiologii. Za použití 16s rDNA genů, ale i funkčních genů, byly použity ke stanovení diverzity nejrůznějších mikrobiálních společenstev, ke sledování změn v jejich složení v čase i v prostoru (Dar *et al.*, 2005; Bodelier *et al.*, 2005; Mahmood *et al.*, 2006; Campbell *et al.*, 2009). Jde o metodu spolehlivou, reprodukovatelnou, rychlou a relativně levnou.

Naše pracoviště na Univerzity of Warwick patřilo k jedněm z prvních, které se metodu T/DGGE snažilo aplikovat ve své výzkumné práci ihned po jejím publikování dr. Muyzerem v roce 1993 (Muyzer et al., 1993), tedy v době, kdy ještě neexistovaly komerčně vyráběné aparatury T/DGGE a zkušeností s touto metodou bylo velmi málo. I přes poněkud komplikované začátky se tato metoda nakonec na našem pracovišti dobře ujala a stala se nedílnou součástí naší práce, jak dokazuje i většina našich publikací. Za stěžejní považujeme náš článek z roku 1997 (Heuer et al., 1997), ve kterém jsme publikovali nové specifické primery pro aktinobakterie a především způsob detekce minoritních populací za využití hnízdové PCR a DGGE (viz. kapitola 3.1. na straně 61). O významu této práce svědčí i počet jejich citací, který dnes převyšuje 600.

#### **2.2.4.4. Polymorfismus konformace jednořetězcových nukleových kyselin (SSCP)**

Podobný princip jako T/DGGE, tedy princip konformační změny molekuly DNA v závislosti na její sekvenci, využívá i metoda SSCP, tedy „single-strand conformation polymorphism“, polymorfismus jednořetězcových nukleových kyselin. Tato metoda využívá faktu, že elektroforetická mobilita jednořetězcové DNA není na rozdíl od dvouřetězcové DNA uniformní (závislá pouze na její velikosti), nýbrž závislá na její sekvenci. Za nepřítomnosti komplementárního řetězce bude docházet k párování bazí v rámci téhož řetězce a výsledkem bude specifická trojrozměrná struktura tohoto řetězce, která ovlivní jeho elektroforetickou mobilitu. Výsledkem elektroforézy bude tedy opět jistý fingerprint analyzované komunity (podobný fingerprintům/gelům DGGE). V porovnání s předešlými metodami, především T/DGGE, se jedná o jednodušší metodu nevyžadující GC svorky ani gradientové gely. I tato metoda má však své problémy. Jedním z nich je fakt, že jeden PCR produkt může dát vzniknout hned třem různým trojrozměrným strukturám – dvě pro každý řetězec DNA a třetí pro dvouřetězcovou DNA. Tomuto se dá zabránit odstraněním jednoho z řetězců (například výrazným přebytkem jednoho z primerů při PCR, nebo odstraněním jednoho z řetězců – fosforylovaného – exonukleázovou aktivitou). Dalším problémem je závislost mobility jednořetězcové DNA na teplotě – elektroforéza musí probíhat za konstantní teploty. A konečně citlivost metody je závislá na pH a na velikosti analyzovaného fragmentu. Z těchto důvodů nedoznala tato metoda rozšíření srovnatelného s ostatními fingerprintovými metodami (DGGE, T-RFLP). Byla využita například pro analýzu změn v bakteriálních komunitách při kompostování (Peters *et al.*, 2000), nebo

k rozlišení mikroorganismů z čistých kultur (Medlin *et al.*, 2006), k porovnání rozdílů dvou rhizosferních mikrobiálních komunit (Schwieger a Tebe, 1998), i ke studiu půdních houbových společenstev (He *et al.*, 2005).

#### **2.2.4.5. Analýza polymorfismu délky intergenového spaceru mezi geny malé a velké ribozomální podjednotky - Ribosomal Intergenic Spacer analysis - RISA**

Metoda RISA je založena na PCR amplifikaci oblasti rRNA operonu *rrl* mezi geny pro malou (16S) a velkou (23S) podjednotkou zvanou intergenic spacer region (ISR). Použité primery využívají konservativních oblastí genů 16S a 23S. Význam ISR oblasti je založen na faktu, že tato oblast vykazuje významnou heterogenitu délkovou i sekvenční využitelnou pro taxonomické účely. RISA využívá délkovou variabilitu oblasti uváděnou v rozsahu 50 – 1500 bp (Ranjard *et al.*, 2001). Výsledkem PCR reakce za použití environmentální DNA je směs fragmentů o různé délce odvozených z jednotlivých členů společenstva, která je následně rozdělena elektroforeticky na polyakrylamidovém gelu. Původní metoda byla vylepšena fluorescenčním značením jednoho z primerů (podobně jako metoda T-RFLP), kde pak k vizualizaci výsledků může být využit sekvenátor a metoda je touto formou automatizována – tzv. ARISA (automated RISA). Podobně jako u jiných metod může být v tomto případě odvozena z výšky píků i semikvantitativní informace o zastoupení jednotlivých skupin organismů ve společenstvu. V porovnání s ostatními výše uváděnými metodami (RFLP, T/DGGE, SSCP) se jedná o velice rychlou a jednoduchou metodu nevyžadující žádné speciální vybavení (samozřejmě v její původní neautomatizované formě - RISA), denaturační gely ani štěpení restrikčními enzymy produkující fingerprint zkoumaného společenstva. Podobně jako například u T/DGGE i dalších metod mohou být proužky gelu separovány a sekvenovány, zde však ve srovnání s například již zmíněnou metodou T/DGGE bude u metody RISA hodnocení získaných výsledků obtížnější, protože velikost ISR databáze není srovnatelná s RDP databází. Také vysoká variabilita v délce zkoumané ISR oblasti zvyšuje nebezpečí diferenciální amplifikace, kdy jsou přednostně amplifikovány kratší sekvence. Nicméně již zmíněná jednoduchost a rychlost předurčuje tuto metodu k využití přinejmenším v laboratořích postrádajících speciální vybavení potřebnou pro jiné molekulární fingerprintové metody. V nedávné minulosti byla metoda využita například pro sledování změn struktury mikrobiálních komunit v PCB kontaminovaných půdách (Petric *et al.*, 2011a), spolu s klonováním a sekvenováním

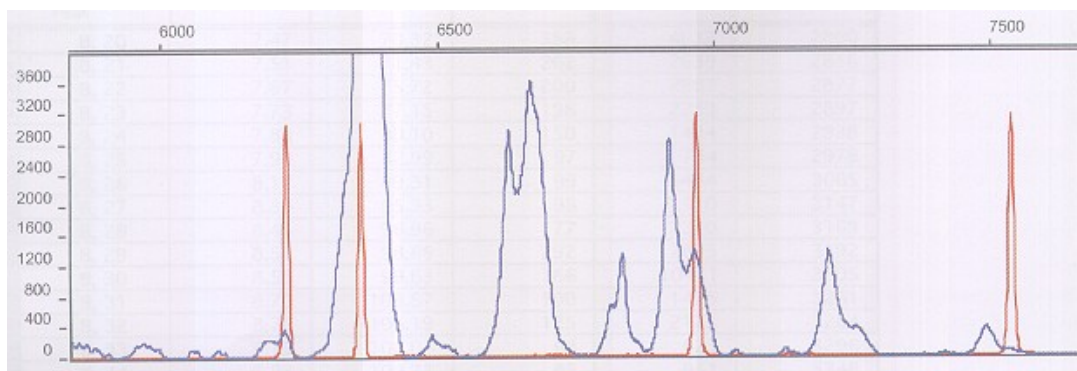
16S rRNA k monitorování mikrobiálních komunit v půdě při uplatnění různých sledů rostlin při pěstování arašídů (Sudini *et al.*, 2011), nebo k hodnocení variability výsledků výše zmíněné metody izolace půdní mikrobiální DNA -ISO standard 11063 "Soil quality - Method to directly extract DNA from soil samples" (Petric *et al.*, 2011b).

#### **2.2.4.6. Délková heterogenita PCR produktů (LH PCR - Length Heterogeneity PCR)**

Při tradičním pojetí PCR se předpokládá, že za použití jednoho páru PCR primerů vznikne produkt o stejné délce dané vzdáleností obou primerů na templátové DNA, který je detekovatelný po elektroforéze v agarózovém gelu jako jeden proužek. Tento předpoklad je platný použijeme-li jako templát DNA izolovanou z čisté bakteriální kultury (i zde může teoreticky vzniknout více odlišných PCR produktů, pokud je v genomu zkoumaného organismu přítomno více odlišných kopií cílového genu). Použijeme-li jako templát DNA izolovanou z přirozeného mikrobiálního společenstva, bude výsledný PCR produkt s největší pravděpodobností na agarózovém gelu také představovat jeden proužek. Podrobíme-li však tento PCR produkt detailnější délkové analýze (např. na sekvenátoru), zjistíme, že se ve skutečnosti jedná o směs produktů přibližně stejné délky (ve speciálních případech – viz např. výše uvedená délková heterogenita operonu *rrl* mezi geny pro malou (16S) a velkou (23S) podjednotkou využívaná metodou RISA - mohou být rozdíly délky velice významné). Toto je způsobeno skutečností, že geny kódující stejnou funkci/vlastnost nejsou v různých organismech zcela identické a s rostoucí fylogenetickou vzdáleností organismů roste i odlišnost těchto genů. V případě LH-PCR se odlišností rozumí délka genu, který například díky delecím či inzercím je buď kratší, nebo delší. Použijeme-li fluorescenčně značené PCR primery a podrobíme-li výsledný PCR produkt analýze na sekvenátoru, výsledkem pak bude elektroforegram, kde jednotlivé píky představují skupiny ve většině případů blízce „příbuzných“ mikroorganismů s velice podobnou/stejnou délkou PCR produktu zkoumané oblasti DNA (Obr. 7.) . Například Ritchie *et al.* (2000) tuto metodu použili ke srovnání 4 odlišných půd lišících se půdním typem nebo historií pěstování rostlin a prokázali, že tato metoda, podobně jako FAME, byla schopna odlišit srovnávané půdy.



Tuto metodu jsme testovali na našem pracovišti na Univerzitě of Warwick (Obr. 7) v rámci práce na EU projektu ACTAPHARM, avšak vzhledem k tomu, že jsme v té době ke studiu diverzity mikrobiálních společenstev již rutinně používali metodu DGGE, neshledali jsme ji přínosnou. Podle našeho názoru může najít uplatnění pouze v laboratořích vybavených klasickým Sangerovým sekvenátorem avšak postrádajících potřebnou výbavu pro jiné fingerprintové metody, jako zmíněné T/DGGE, RFLP a podobně. I z ekonomického hlediska je těžké si představit, že by se dal ospravedlnit nákup sekvenátoru pouze za účelem aplikace LH PCR, když mnohem levněji se dá zakoupit T/DGGE, s jehož pomocí se dají získat mnohem komplexnější a podrobnější výsledky při analyzování mikrobiálních komunit.



**Obr. 7. Příklad LH-PCR profilu půdy za použití PCR primerů specifických pro geny syntézy polyketidů (EU projekt Actapharm); červené píky jsou délkové standardy a modré představují zkoumanou mikrobiální komunitu.**

#### **2.2.4.7. Náhodná amplifikace polymorfni DNA (RAPD, AP-PCR)**

Metoda RAPD (Randomly amplified polymorphic DNA) využívá jednoho náhodného krátkého PCR primeru (kolem 10 bp), který za nepříliš přísných podmínek PCR dosedá na jemu podobná místa na DNA vzorku. V případě, že tato místa jsou nedaleko sebe na protilehlých řetězcích DNA, dojde k vytvoření krátkého PCR produktu a každému přítomnému genomu pak odpovídá několik (5-15) takovýchto amplikonů (Franklin *et al.*, 1999). V porovnání s ostatními diskutovanými metodami nedává RAPD příležitost k získání mnoha taxonomických informací o složení studovaného společenstva a lze ho využít především k prostému konstatování změn v tomto složení (téměř bez jakékoliv specifikace). Vzhledem k možnému velkému počtu produkovaných amplikonů by ho také nebylo vhodné využít ke studii

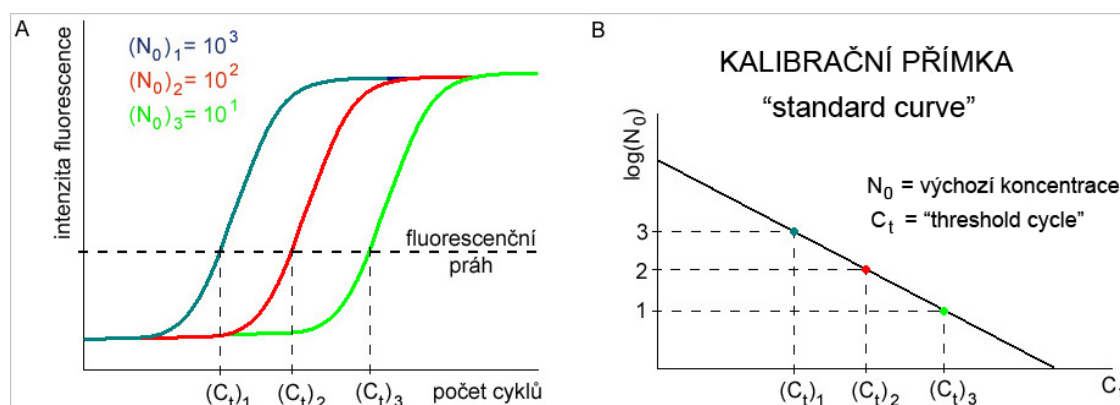
komplexních mikrobiálních společenstev. Na druhé straně se jedná o jednoduchou, rychlou a především levnou metodu bez zvláštních nároků na technické vybavení. Metoda byla využita pro sledování složení akvatických komunit (Franklin *et al.*, 1999), k charakterizaci izolátů aktinobakterií z antarktických půd (Lee *et al.*, 2012), nebo k hodnocení metagenomového složení půd při hledání vhodných mikroorganismů pro účely bioremediace půd po petrochemické kontaminaci (Amorim *et al.*, 2012).

#### **2.2.4.8. Kvantitativní PCR**

Nedílnou součástí analýzy diverzity mikrobiálního společenstva je i určení kvantitativního zastoupení jednotlivých druhů, případně taxonomických skupin. Přímé využití PCR produktů za tímto účelem (například kvantifikace na základě intenzity DGGE bandů) není vhodné díky již zmíněné diferenciální amplifikaci a je ho možné považovat v nejlepším případě za semikvantitativní. Existují však možnosti, jak této kvantifikace dosáhnout. Zhang a Xu (2008) uvádí čtyři možnosti kvantitativní PCR: „limiting dilution PCR“, kinetické PCR, kompetitivní PCR a real-time PCR. V případě „limiting dilution PCR“ je provedeno více PCR reakcí s postupně ředěnou templátovou DNA a pomocí tabulek je pak možné odhadnout původní koncentraci templátu. Kinetická PCR vyžaduje standardní templát známé koncentrace a kvantifikace je založena na zvýšení počtu amplikonů templátové a standardní DNA na jeden PCR cyklus. Je ale třeba podotknout, že název kinetická PCR se často také používá pro označení Real-Time PCR. Při kompetitivním PCR (cPCR) je templátová i standardní (kompetitivní) DNA amplifikována v jedné zkumavce a díky mírně odlišné sekvenci nebo délce jsou potom odděleny gelovou elektroforézou. Množství templátové DNA je pak odhadnuto ze standardní křivky kompetitivní DNA.

Konečně real-time PCR měří DNA koncentraci průběžně během amplifikace monitorováním fluorescence. Jedná se v principu o klasickou PCR reakci, ve které je však množství PCR produktu (či jeho přírůstek) měřeno během každého cyklu reakce, v jednodušším případě nespecifickou reakcí syntetizované DNA s vhodným fluorescenčním barvivem (obvykle SYBR green), nebo specifickou (a dražší) reakcí syntetizované DNA s přítomnou DNA sondou. Množství vznikajícího PCR produktu je tedy možné kvantifikovat buď relativně porovnáním s jinými vzorky, nebo absolutně porovnáním s kalibrační přímkou za využití známého množství DNA. Tímto způsobem je možné určit počáteční koncentraci templátové DNA bez použití kompetitivní DNA.

Amplifikační křivka se skládá ze tří částí: v první „rovinné“ části (tzv. background) je množství nasyntetizované DNA pod detekčním limitem metody/přístroje. Následuje exponenciální část, kde dochází k exponenciálnímu nárůstu množství detekované DNA a poté je dosaženo plató, kdy fluorescenční signál zůstává konstantní vzhledem k nasycení systému (Obr. 8). Čím více je ve zkoumané templátové DNA kopií detekovaného úseku DNA, tím dříve (v ranějším cyklu reakce) dojde k exponenciální fázi (a posléze i nasycení reakce).



**Obr. 8. Real time PCR** (převzato z <http://www.generi-biotech.com/real-time-pcr-sondy-kvantitativni-real-time-pcr/>)

Real-time PCR se dnes i vzhledem ke klesajícím cenám tohoto zařízení stává součástí mnoha environmentálních studií. Již brzy po uvedení prvních modelů Real-time přístrojů na trh jsme je využili ke sledování dynamiky směsných populací acanthamoeb a salmonel velice významných z hlediska přežívání salmonel v životním prostředí se všemi důsledky pro humánní medicínu (článek je v současné době upravován pro opětné podání k publikování).

#### 2.2.4.9. DNA microarray

Jednou z významných aplikací PCR kombinovanou s DNA-DNA hybridizací, která byla poprvé využita před zhruba 20 lety, jsou DNA čipy (DNA chips), nebo také DNA microarrays. Jedná se o soubor velkého množství mikroskopických DNA sond (až 250.000 na jedné destičce) uchycených na pevném nosiči (předchůdcem této metody je Southern hybridizace), ke kterým se za podmínek vysoké specifity hybridizují značené cDNA/RNA ze zkoumaného vzorku. Možnosti aplikace této techniky jsou všestranné, od určování identity bakteriálních druhů (Cho a Tiedje, 2001), přímé detekce 16S rRNA (a jim odpovídajících mikroorganismů) v půdním extraktu (Small *et*

*al.*, 2001), detekce genů v životním prostředí (Pathak *et al.*, 2010) a změny jejich exprese (Mathioni *et al.*, 2011) až po hodnocení mikrobiální diverzity environmentálních vzorků (Greene a Voordouw, 2003). K nesporným výhodám této metody patří fakt, že může současně analyzovat tisíce genových sekvencí. Zároveň je ale nutné brát v úvahu značnou cenu technického zázemí potřebného k této metodě i cenu tvorby takovýchto čipů, které by nebylo ekonomické připravovat k jednomu použití/experimentu, ale předurčuje tuto metodu k opakované aplikaci při studiu nejrozličnějších komplexních problémů/komunit.

#### **2.2.4.10. Klonování, sekvenování a fylogenetická analýza**

K základním metodám určení diverzity mikrobiálního společenstva patří klonování PCR produktů (samozřejmě za předpokladu vytvoření dostatečně velké knihovny), sekvenování získaných klonů a následná fylogenetická analýza. K tomuto účelu je možné využít buď gen pro 16/18S rRNA, případně jiný vhodný gen dle účelu studie. V případě použití univerzálních 16/18S rRNA primerů můžeme studovat diverzitu celého mikrobiálního společenstva, je také ale možné se soustředit na menší skupinu vhodným výběrem specifitějších primerů. Podobné rozlišení je teoreticky možné i v případě primerů pro jednotlivé funkční geny. Základním předpokladem je zde dostatečná databáze sekvencí pro zkoumaný gen umožňující navržení vhodných primerů a v neposlední řadě i charakteristika vlastního genu, který by měl obsahovat části konzervativní pro vytvoření primeru a variabilní umožňující vlastní studium diverzity tak, jak je tomu u genu pro 16/18S rRNA. Po úspěšném vytvoření primerů následuje optimalizace PCR reakce a za předpokladu jejího úspěchu pak klonování vlastních PCR produktů a izolace klonů.

Před vlastním sekvenováním jednotlivých klonů je z ekonomických důvodů vhodné provést screening získaných klonů (například s použitím některé z výše uvedených metod jako například DGGE, T-RFLP a podobně), aby bylo možné sekvenovat vždy jen jednoho představitele z každé vytvořené skupiny představující potenciálně identické klony (představované například proužkem ve stejné poloze na DGGE gelu). Tento přístup však v sobě skrývá úskalí, že budou z analýzy vyloučeny klony jen zdánlivě identické (klony vytvářející identické proužky/bandy na DGGE gelu nemusí být – jak již bylo uvedeno výše - vždy identické) a tímto způsobem dojde k podhodnocení skutečné diverzity. Tento problém by mohlo v brzké budoucnosti

odstranit snižování ceny sekvenování umožňující sekvenaci opravdu všech získaných klonů, tak jak se v minulosti již často dělo u mnohých zahraničních studií, kdy především výzkumné skupiny ze Spojených států, vzhledem k zanedbatelné ceně sekvenování ve velkých výzkumných centrech, zaplavily databáze sekvencemi z nejrůznějších - především mořských - habitatů, což mělo za následek jednak zkreslení výsledků studií z odlišných, především terestriálních habitatů a v neposlední řadě ztížení konkurence pro publikování výsledků u skupin nedisponujících těmito možnostmi.

Po úspěšném sekvenování je možné srovnat získané sekvence s vhodnou databází, jako je například BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), The Basic Local Alignment Search Tool. Tento program najde podobnost vložené sekvence (ať už na úrovni nukleotidů, nebo proteinů) se sekvencí v databázi, spočítá statistický význam této shody a může naznačit funkční a evoluční vztah mezi sekvencemi. Dále je možné provést srovnání všech získaných sekvencí za účelem vytvoření dendrogramu. K tomuto účelu je možné použít mnoho programů. Jedním z nejjednodušších je například ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>), nebo jeho novější verze Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). K sofistikovanějším programům patří například Phylip (the *PHYLogeny Inference Package*). Jedná se o soubor programů k určování fylogenetických vztahů a tvorbě evolučních dendrogramů. Výsledné dendrogramy je možné zobrazit v některém z jednodušších programů, jako je například TreeView (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>).

Vytváření klonových knihoven je rutinní součástí mnoha environmentálních studií a proto jsme je využívali i my při práci na většině projektů. Klonové knihovny jsme vytvářeli při studiu bakteriálních komunit degradujících chitin v rámci programu Soil Biodiverzity ve skotském Sourhope jak s použitím univerzálních 16s bakteriálních primerů (Krsek, Wellington, 2001 – viz. kapitola 3.3. na straně 74), tak i primerů specifických pro bakteriální chitinázy (Metcalfé et al., 2002a,b – viz. kapitoly 3.4. a 3.5. na straně 78 a 80). Knihovny byly také využívány pro mnoho průběžných prezentací v rámci EU programů ACTAPHARM a INDEX (Indicators and thresholds for desertification, soil quality, and remediation), jichž byla naše skupina součástí.

### **3. Komentáře k vybraným článkům**

### 3.1. Analysis of Actinomycete Communities by Specific Amplification of Genes Encoding 16S rRNA and Gel-Electrophoretic Separation in Denaturing Gradients

Heuer H, Krsek M, Baker P, Smalla K, Wellington EM. (1997) Appl Environ Microbiol. 63(8):3233-41.

Aktinobakterie, skupina rodů Gram pozitivních bakterií charakterizovaných vysokým obsahem G a C v DNA, tvoří součást mikrobiálních komunit v nejrůznějších prostředích, kde se spolupodílí na mnoha významných procesech. Zúčastní se rozkladu nejrůznějších organických materiálů v půdě, jsou schopné degradovat různé odpadní látky v zemědělství i v městských komunálních odpadech. Zástupci rodu *Frankia* fixují atmosférický dusík v hlízkách na kořenech dřevin (například olše). Mezi jejich metabolické produkty patří antibiotika, enzymy a další bioaktivní látky. I přesto často tvoří jen minoritní složku přirozených mikrobiálních komunit a proto mohou být při jejich studiu přehlédnuty. Například proužky, detekované u často aplikované fingerprintové metody T/DGGE, představují pouze majoritní populace studovaných komunit a je proto pravděpodobné, že minoritní populace jako aktinobakterie nebudou touto metodou v její standardní verzi detekovány. Prezentovaná práce nabízí dvě možná řešení této situace.

Prvním často aplikovaným řešením je vytvoření primerů specifických pro zkoumanou skupinu mikroorganismů. V naší práci jsme za použití 16S rRNA sekvencí z Ribosomal Databáze Project (RDP) a VSM programu, version 4.0 (Richard Christen, CNRS and Université Paris 6, Villefranche-sur-mer, France) vytvořili dva primery: primer F243 specifický pro aktinobakterie a primer R513GC představující univerzální primer, který se ale díky bázi A na 3' konci přednostně váže k sekvencím G+ bakterií a beta-proteobakterií. PCR produkty získané při použití tohoto páru primerů tedy představují pouze aktinobakteriální část studované komunity.

Práce nabízí ještě druhou, nepřímou možnost detekce aktinobakteriálních populací s použitím DGGE, která ale umožní přímé srovnání získaného aktinobakteriálního fingerprintu s fingerprintem celkové mikrobiální populace studované komunity. K tomuto účelu je využita metoda nested PCR, tedy tzv. hnízdová PCR. V prvním PCR s primery F243 a R1378 je získán fragment 16S rDNA reprezentující pouze aktinobakteriální část studovaného společenstva (díky specificitě primeru F243). Výsledný PCR produkt je pak použit jako templátová DNA pro druhé

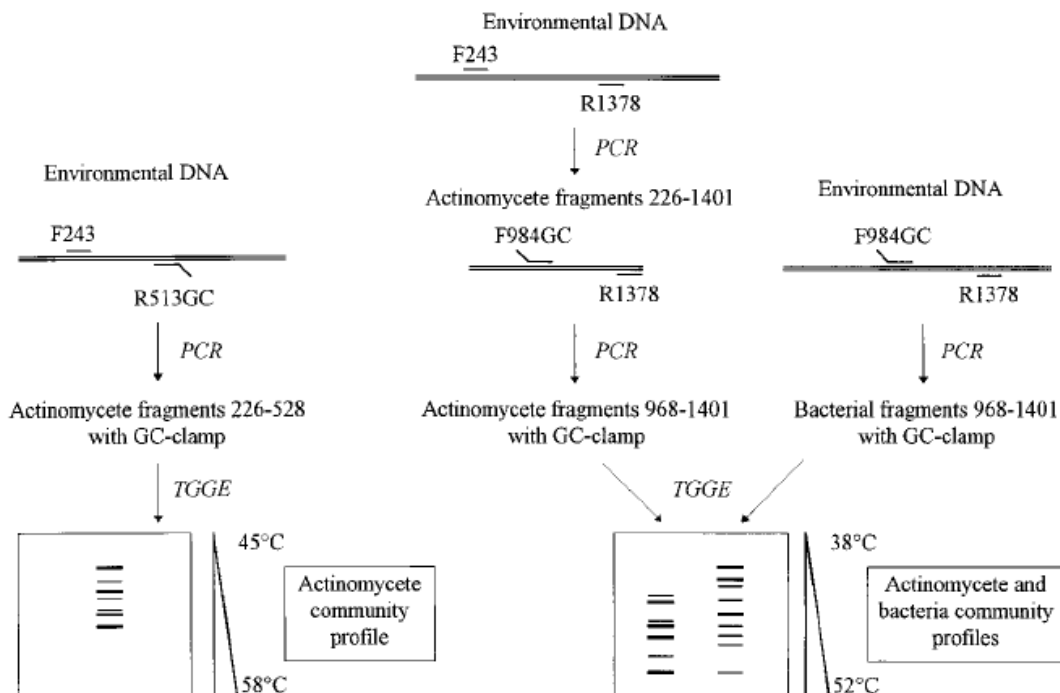
hnízdové PCR s univerzálními primery F984GC a R1378. Proužky fingerprintu této PCR na DGGE tedy opět představují jen aktinobakteriální složku studovaného společenstva. Provedeme-li další PCR reakci s použitím stejných primerů, tedy F984GC a R1378, avšak jako templátovou DNA použijeme původní DNA izolovanou přímo ze studovaného společenstva, výsledný fingerprint bude reprezentovat celkové složení studovaného bakteriálního společenstva a bude ho možné přímo srovnat s fingerprintem aktinobakteriální složky společenstva získaným s použitím hnízdové PCR (Obr. 9). Tímto způsobem bude možné stanovit, zda se některý reprezentant aktinobakteriálního společenstva ve větší míře podílí na složení celkového bakteriálního společenstva (jinými slovy, zda jeho počty dosahují úrovně jiných bakteriálních druhů společenstva) – v tom případě bychom měli být schopni detekovat odpovídající proužky ve stejné poloze v obou fingerprintech.

Kombinace těchto dvou skutečností, tj. navržení nového PCR primeru specifického pro aktinobakterie a aplikace hnízdové PCR pro srovnávací studie mikrobiálních společenstev zřejmě způsobila zvýšenou citovanost tohoto článku, která v současné době dosahuje již více než 600 citací.

Přímá PCR-TGGE analýza aktinobakteriální komunity

Nepřímá PCR-TGGE analýza aktinobakteriální komunity

PCR-TGGE analýza bakteriální komunity



**Obr. 9. Schématické znázornění přímé a nepřímé analýzy aktinobakteriální komunity v environmentálním vzorku. Nepřímá metoda umožní porovnání aktinobakteriálního profilu s profilem bakteriálním studovaného vzorku.**



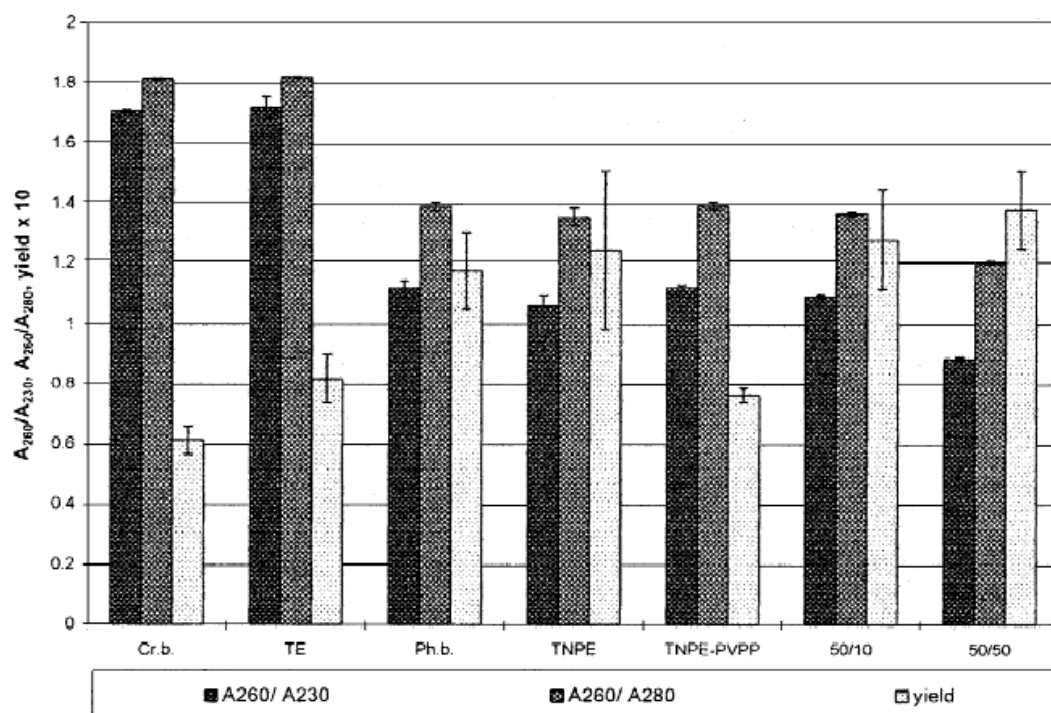
### 3.2. Comparison of different methods for the isolation and purification of total community DNA from soil

Krsek M, Wellington EMH (2001) *Antonie Van Leeuwenhoek*. 79(3-4):261-7.

Existuje celá řada studií věnujících se problematice extrakce mikrobiální DNA z půdy a další jsou neustále publikovány. Přesto však i po 12 letech od svého vydání je naše publikace stále ojedinělá v tom smyslu, že krok za krokem analyzuje vliv jednotlivých kroků v izolaci DNA na kvalitu a kvantitu izolované DNA. Vzhledem k tomu, že izolace R/DNA představuje první a zásadní krok všech molekulárně biologických metod, který do značné míry rozhoduje o úspěchu navazujících metod, budeme věnovat tomuto procesu (a tedy i našemu článku) větší pozornost.

Velký význam má již prvním krok každé izolace, tedy výběr vhodného pufru pro lyzi buněk. Kromě tradičního fosfátového pufru (0,12 M) byly testovány pufrы založené na kombinaci TrisHCl pufru, zajišťujícího požadované pH (všechny testované pufrы měly pH 8,0, tedy mírně alkalické prostředí vhodné pro uvolnění a ochranu R/DNA) a EDTA, chránící svými chelatačními účinky uvolněné nukleové kyseliny před degradací přítomnými endonukleázami. Byl to v první řadě pufr dle Crombacha et al (1972), obsahující 33 mM Tris-HCl a 1 mM EDTA, využívaný například Torsvik et al (1990), ale i klasický TE pufr (Sambrook et al 1989), složený z 10 mM Tris-HCl a 1 mM EDTA, běžně používaný v molekulární biologii pro uchování R/DNA, dále TNPE pufr (Picard et al 1992) zahrnující kromě TrisHCl a EDTA také NaCl a polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) velmi často používaný k odstranění huminových látek (50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8,0, 100 mM NaCl, 1% (w/w) PVPP) a konečně dva pufrы účelově připravené pro naši práci testující vliv zvýšené koncentrace EDTA na čistotu izolované DNA: pufr 50/10: 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA a pufr 50/50: 50 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA. Souhrnné výsledky studia vlivu pufru na čistotu a výnos izolované DNA uvádí Obr. 10 (Fig.3 původního článku), jsou ale i patrné i z dalších obrázků a tabulek prezentovaného článku (Fig.4. a 8 a Tabulky 3 a 4). Nejčistší DNA byla izolována za použití pufru podle Crombacha a TE pufru (tento se však běžně k extrakci DNA nevyužívá), výnos DNA byl však při použití těchto pufrů nejnižší. Vyššího výnosu bylo dosaženo použitím fosfátového pufru a pufrů s vyšším obsahem EDTA (pufrы TNPE a 50/10 a 50/50), zároveň ale také došlo k výraznému snížení

čistoty extrahované DNA. Je tedy zřejmé, že výběr vhodného pufru k extrakci R/DNA bude vždy kompromisem mezi výnosem R/DNA a její čistotou a bude záležet především na půdních podmínkách, který pufr bude nejvhodnější.



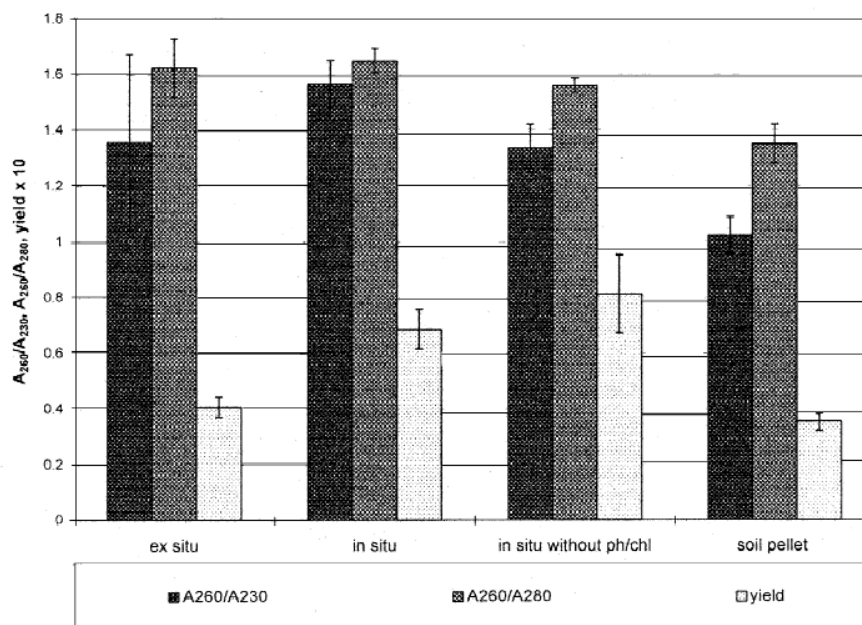
**Obr. 10. Vliv použitého pufru na výnos ( $\mu\text{gDNA/g}$  suché hmoty půdy) a čistotu DNA (poměr absorbancí 260/230 nm a 260/280 nm). Extrakce DNA sestávala z: beat-beating, lyze za pomoci lysozymu a SDS, srážení acetátem draselným a polyetylén glykolem, čištění fenolem a chloroformem, srážení sperminem HCl (detaily jednotlivých kroků uvedeny v textu původního článku). Pufr dle Crombacha (Cr.b.), pufr TE (TE), fosfátový pufr (Ph.p.), pufr TNPE (TNPE), pufr TNPE bez PVPP (TNPE-PVPP), pufr 50/10 (50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA), pufr 50/50 (50 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA).**

Dalším faktorem ovlivňujícím kvalitu i kvantitu izolované DNA je způsob její extrakce, v první řadě to, zda jsou mikrobiální buňky lyzovány v rámci půdní matrice, postup označovaný jako přímá či *in situ* lyze, nebo zda jsou mikrobiální buňky nejprve extrahovány z půdy a teprve takto získaná mikrobiální frakce podrobena lyzi, tedy tzv. nepřímá, *ex situ* lyze.

Vzhledem k množství publikovaných metod pro přípravu půdní mikrobiální frakce nebylo možné testovat všechny varianty izolace mikrobiální frakce a proto jsme

se soustředili na metodu podle Hopkinse (Hopkins *et al.*, 1991a) používající diferenciální centrifugaci. Tato metoda je sama o sobě kombinací více dříve publikovaných metod. Jedná se o metodu intenzivní homogenizace (mixování a třepání) půdního vzorku v roztoku cholátu sodného s následným třepáním půdních peletů získaných po nízkootáčkových centrifugacích (500xg) v dalších pufrch (Tris pufr, opět cholát sodný a 2x voda). Spojené supernatanty jsou pak podrobeny vysokootáčkové centrifugaci (10000xg) a takto je získán sediment sestávající z mikrobiálních buněk, bohužel však kontaminovaný půdními koloidy. V závislosti na druhu použité půdy může tvořit podíl půdních koloidů významnou část sedimentu a značně znesnadňovat další práci s takto získanou mikrobiální frakcí. Půdní koloidy působí problémy při následném resuspendování této frakce a v neposlední řadě mají negativní vliv na čistotu izolované mikrobiální DNA (zvýšením kontaminace huminovými látkami).

Ze získané mikrobiální frakce byla izolována DNA a její čistota a výnos byly porovnány s DNA izolovanou přímo z půdy. V rozporu s publikovanými výsledky byla DNA izolovaná nepřímou, tedy z půdní mikrobiální frakce, více kontaminována huminovými látkami a jak se dalo předpokládat, její výnos byl podstatně nižší než při přímé izolaci. Téměř stejné množství DNA bylo možno izolovat z výsledného půdního sedimentu/peletu po posledním kole třepání a centrifugaci (Obr. 11)



**Obr. 11 Srovnání přímé (*in situ*) a nepřímé (*ex situ*) extrakce DNA z půdy a půdního sedimentu po extrakci mikrobiální frakce při nepřímé metodě izolace; ph/chl – čištění DNA pomocí fenolu a chloroformu; výnos DNA v  $\mu\text{g}$  DNA na gram suché půdy.**

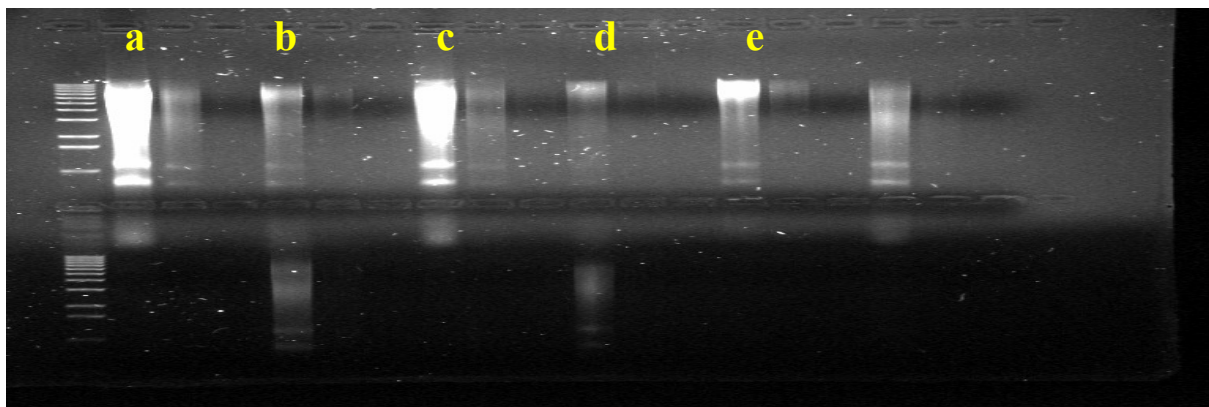
Pokud bychom se pokusili shrnout klady a zápory metody izolace mikrobiální frakce diferenciální centrifugací, musíme konstatovat, že zápory převažují. V první řadě je izolace značně pracná a zdoluhavá (u některých metod zabere izolace mikrobiální frakce i více dnů). Je-li k homogenizaci půdy použito mixování, v závislosti na druhu půdy (obsahu jílovitých a písčitých částic) může docházet k urychlenému opotřebenému ložisek mixeru, které je již po několika cyklech mixování nezbytné měnit, aby se zabránilo protékání zpracovávaného vzorku. Kromě toho se dá předpokládat, že při mixování může docházet k poškozování citlivých buněk, což může mít negativní dopad na další využití získané mikrobiální frakce (snížení počtu kolonií při kultivačních postupech, ztráty R/DNA její degradací po jejím brzkém uvolnění při mixování a podobně). Částice písku a drobné kaménky mohou činit problémy i při použití jiných mechanických metod homogenizace půdních vzorků – například některé metody používají tzv. „stomacher“. Půdní vzorek smíchaný s pufrem a naplněný do polyetylénového sáčku je vložen do zmíněného přístroje, kde je sáček mačkán kolébavým pohybem ploché lopatky o protilehlou stěnu přístroje a takto homogenizován. V případě, že jsou ve vzorku přítomny ostřejší zrnka písku či drobné kaménky (jejichž přítomnost není možné eliminovat ani použitím standardního prosévání vzorků přes síto o průměru ok 2 mm), dochází často k perforaci sáčku a úniku vzorku (naše nepublikované výsledky). Dalším negativem metody diferenciální centrifugace je již dříve zmíněný zvýšený obsah půdních koloidních částic. Kromě problémů při resuspendování může takto získaný sediment obsahovat značné množství huminových látek, které poté kontaminují i izolovanou mikrobiální DNA a značně tak komplikují další práci díky inhibičnímu působení na restriční enzymy, polymerázy a podobně. Tímto způsobem eliminují jednu z hlavních proklamovaných výhod nepřímé izolace, tedy získání čistší DNA.

Na tomto místě je ale třeba podotknout, že jiné způsoby izolace půdní mikrobiální frakce, které jsme však testovali v naší laboratoři až po publikování tohoto článku, mohou značnou část výše uvedených negativ odstranit. Jedná se především o centrifugace v hustotním gradientu. Z mnoha možností uvedených v úvodu práce jsme testovali centrifugaci v Nycodenzovém gradientu, která odstraní většinu negativ metody diferenciální centrifugace. Touto metodou se budeme podrobněji zabývat později v souvislosti s tvorbou metagenomových knihoven.

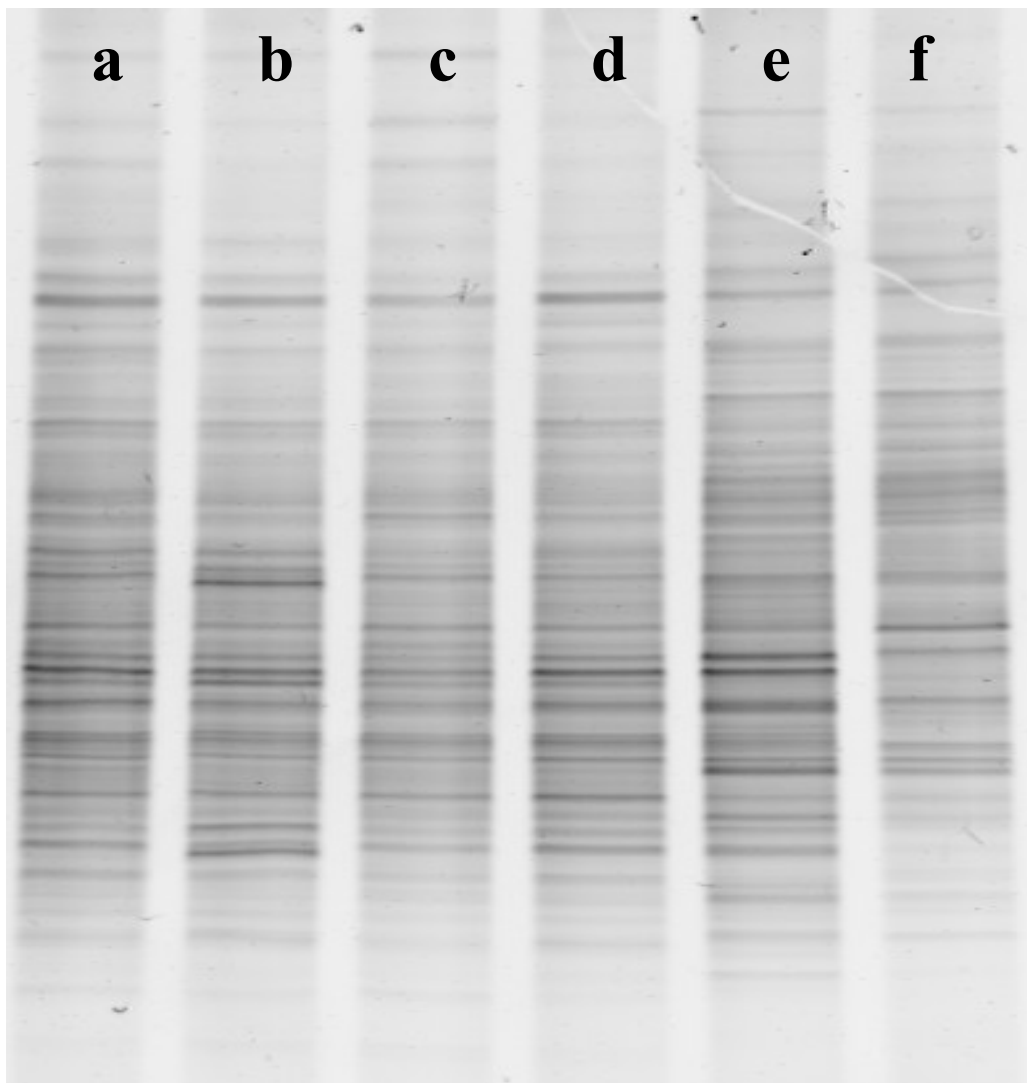
Základním problémem všech metod nepřímé izolace půdní mikrobiální DNA ve srovnání s izolací přímou však zůstává její možná selektivita. Jak již bylo zmíněno výše,

mikrobiální buňky jsou k půdním částicím poutány různými vazbami/mechanismy a proto je velmi obtížné (přesněji asi téměř nemožné) je všechny uvolnit a určitá část jich zůstane vázána na organominerální komplex půdy, se kterým je odstraněna (např. sedimentuje s těmito částicemi při centrifugaci) a není pak přítomna v izolované mikrobiální frakci. Proto není možné extrahovat z půdy 100% všech mikrobiálních buněk. Holben *et al.* (1988) uvádí účinnost extrakce 34% všech bakterií přítomných v půdě, Torsvik *et al.* (1990a) hovoří dokonce o 80% účinnosti extrakce a je nanejvýš pravděpodobné, že účinnost extrakce bude záležet nejen na použité metodě, ale především na půdě, se kterou pracujeme. V každém případě však kterákoliv studie pracující s půdní mikrobiální frakcí, tedy využívající nepřímou metodu izolace půdní mikrobiální DNA, nechává bez povšimnutí významnou část půdní bakteriální diverzity (v 1g půdy může být až  $10^{10}$  mikrobiálních buněk reprezentujících možná desítky tisíc různých druhů; Torsvik a Ovreas 2002), protože se dá předpokládat, že zmíněných 34 až 80% buněk nepředstavuje 34-80% buněk všech mikrobiálních druhů/kmenů zastoupených v půdě, nýbrž 34-80% buněk snáze uvolnitelných z půdní matrice, tedy poutaných slabšími silami. Zbýlých 20-66% buněk poutaných většími silami (což bude pravděpodobně podmíněno kromě jiného i genotypem buněk) nebude přítomno v izolované mikrobiální frakci. Zmíněnou úvahu ilustrují Obr. 12, 13 a 14 z našich pozdějších studií. Obr. 12. představuje agarózový gel s DNA extrahovanou na různých stupních izolace půdní mikrobiální frakce. K extrakci DNA byla použita metoda dle Griffithse *et al.* (2000) využívající intenzivní třepání se skleněnými kuličkami (beadbeater, FastPrep, Ribolyzer) za přítomnosti fenolu, která umožňuje současnou izolaci DNA i RNA. Běh a) představuje DNA izolovanou přímo z půdy bez předchozí izolace mikrobiální frakce, běh b) DNA izolovanou ze sedimentu po homogenizaci půdního vzorku ve Waring blenderu, představující první ztrátu metody izolace mikrobiální frakce, běh c) DNA extrahovanou ze sedimentu z Nycodenzového gradientu, tedy další ztráta metody a konečně běh e) představuje vlastní DNA extrahovanou z mikrobiální frakce izolované na Nycodenzovém gradientu. Již jen pouhé porovnání intenzity proužků/bandů jasně ukazuje na významná množství DNA ztracená během každého kroku izolace mikrobiální frakce – Obr. 12. běhy b) a c) - a poukazuje tak na možné nebezpečí selektivnosti této metody. Přímým důkazem selektivnosti jsou pak změny ve fingerprintech DGGE, jak je ilustrují Obr. 13. a 14. Rozdíly jsou viditelné již mezi intenzitou některých bandů DGGE u DNA extrahovaných přímo z půdy a ze sedimentů při použití mixování ve Waring blenderu i

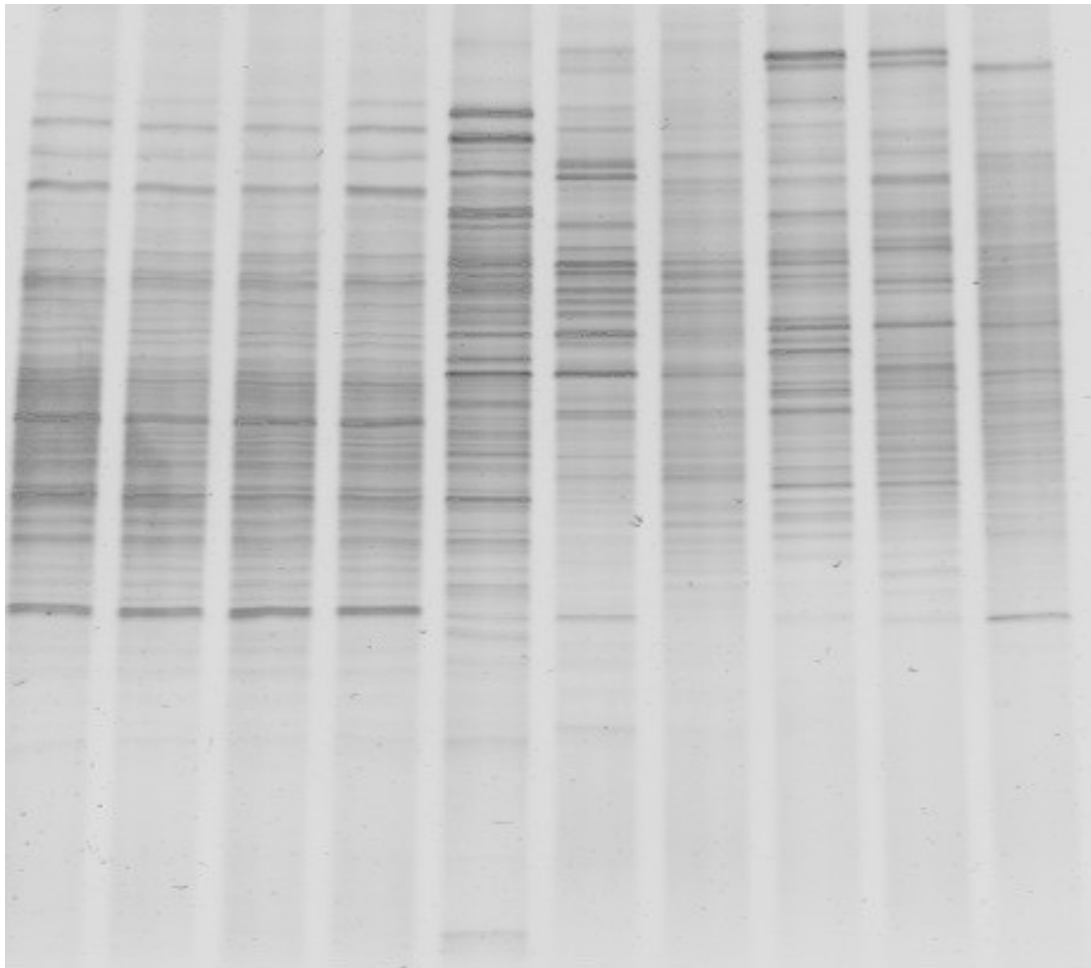
Nycodenzového gradientu – Obr. 13-14, běhy a)-c). Nejlépe jsou rozdíly viditelné srovnáme-li intenzitu jednotlivých proužků (bandů) a především celkovou strukturu fingerprintu získaného z DNA extrahované z mikrobiální frakce - (případně DNA eluované z disku s mikrobiální frakcí) – Obr. 13 běhy e)-f) a Obr. 14 běh e) s PCR produkty z DNA extrahované přímo z půdy či ze sedimentů získaných během izolace mikrobiální frakce (Obr. 13 a 14, běhy a)-c)). V případě zemědělské půdy z předměstí Athén (Obr. 14) je selektivnost metody izolace mikrobiální frakce již velmi dobře patrná, fingerprint mikrobiální frakce zde má málo společných bandů s fingerprintem původní půdy. Tento fakt bude zřejmě způsobený různým půdním druhem a s tím spojenou obtížností izolace půdní mikrobiální populace – půdní mikroorganismy budou k organominerálnímu komplexu půdy poutány různými silami v závislosti na jeho složení. Prezentované obrázky pochází z EU projektu Actapharm (<http://www.ist-world.org/ProjectDetails.aspx?ProjectId=ec6a0c3964924c1dbb00d42def690c2c>), na kterém jsme se podíleli, kde však nebyla prováděna další charakteristika použitých půd.



Obr. 12 **Gelová elektroforéza DNA extrahované na jednotlivých stupních izolace mikrobiální frakce pomocí Nycodenzového gradientu:** a) DNA extrahovaná přímo z půdy; b) DNA extrahovaná ze sedimentu po mixování ve Waring blenderu; c) DNA extrahovaná ze sedimentu z Nycodenzového gradientu; d) DNA extrahovaná z půdního homogenátu použitého pro Nycodenzový gradient; e) DNA extrahovaná z mikrobiální frakce získané Nycodenzovým gradientem. Pro extrakci DNA použita metoda dle Griffithse (Griffiths et al, 2000).



**Obr. 13 DGGE fingerprinty získané z DNA extrahovaných na jednotlivých stupních izolace půdní mikrobiální frakce Nycodenzovým gradientem za použití půdy z oblasti Coventry, Anglie: a) DNA extrahovaná přímo z půdy; b) DNA extrahovaná ze sedimentu po mixování ve Waring blenderu; c) DNA extrahovaná ze sedimentu z Nycodenzového gradientu; d) DNA extrahovaná z půdního homogenátu použitého pro Nycodenzový gradient; e) DNA extrahovaná z mikrobiální frakce získané Nycodenzovým gradientem; f) DNA eluovaná z agarózových plaků s mikrobiální frakcí. K PCR použity univerzální bakteriální primery pro 16sDNA (Muyzer et al. 1993).**



**Obr. 14 DGGE fingerprinty získané z DNA extrahovaných na jednotlivých stupních izolace půdní mikrobiální frakce Nycodenzovým gradientem za použití zemědělské půdy z předměstí Athén, Řecko: a) DNA extrahovaná přímo z půdy; b) DNA extrahovaná ze sedimentu po mixování ve Waring blenderu; c) DNA extrahovaná ze sedimentu z Nycodenzového gradientu; d) DNA extrahovaná z půdního homogenátu použitého pro Nycodenzový gradient; e) DNA eluovaná z agarózových plaků s mikrobiální frakcí. K PCR použity univerzální bakteriální primery pro 16sDNA (Muyzer et al. 1993).**

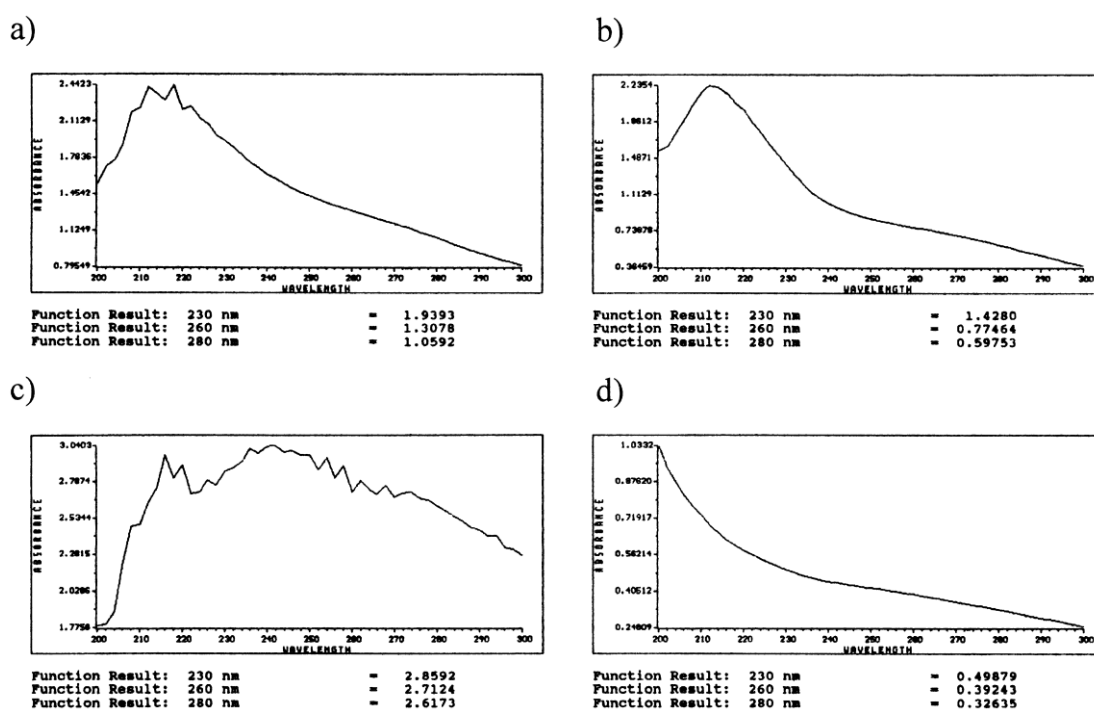
Metody extrakce R/DNA používané při přímé i nepřímé izolaci DNA se v podstatě shodují a můžeme je zhruba rozdělit na mechanické (případně fyzikální), chemické a enzymatické.

Z mechanických lytických ošetření byly v naší práci testovány bead-beating se skleněnými kuličkami v klasickém/původním Braunově homogenizátoru (v době publikování naší práce ještě neexistovaly zařízení typu FastPrep/ribolyzer), sonikace pomocí sonikační sondy a konečně intenzivní třepání se skleněnými kuličkami na horizontální třepače. Z chemických lytických postupů jsme použili SDS, v rámci enzymatických metod jsme testovali lysozym a proteinázu K.



Nejlepší výsledky (čistota i výnos izolované DNA) byly dosaženy kombinací bead-beatingu s lyozymem a SDS, což není příliš překvapivé zjištění. Bead-beating svým mechanickým účinkem rozruší přítomné půdní (mikro)agregáty a tak usnadní/umožní přístup následně použitých chemikálií a enzymů (SDS, lyozym, proteináza K) k uvolněným mikrobiálním buňkám. Kromě toho část buněk i naruší a uvolní tak jejich R/DNA. Zmíněná chemická/enzymatická ošetření působí na rozdílné struktury buněk (lyozym narušuje buněčnou stěnu, SDS cytoplazmatickou membránu) a proto se vhodně doplňují. Z tohoto důvodu samotné mechanické ošetření, podobně jako i chemické nebo enzymatické, nemůže být dostatečné k uvolnění většího množství DNA. V případě sonikace kromě toho docházelo k velice výraznému nastříhání extrahované DNA a proto toto mechanické ošetření nelze pro většinu účelů doporučit.

Jedním z překvapivých výsledků, který jsme získali při testování lytických postupů při extrakci nukleových kyselin z půdy, bylo kladné působení lyozymu a dokonce i pouhého mechanického ošetření vzorků na čistotu extrahované DNA, tedy snížení kontaminace nukleových kyselin huminovými látkami. Vliv lyozymu na přítomnost huminových kontaminantů byl proto posléze testován na půdním extraktu získaném hodinovým autoklávováním půdy, nebo na roztoku komerčních huminových kyselin (Aldrich) a v obou případech došlo po inkubaci s lyozymem k výraznému



**Obr. 15. Vliv inkubace s lyozymem na huminové kyseliny.** Spektrofotometrický skan absorbance půdního extraktu před (a) a po (b) inkubaci s lyozymem; skan roztoku komerčních huminových kyselin před (c) a po (d) inkubaci s lyozymem.

snížení absorbance v oblasti 230nm (viz Obr. 15). Tento jev je možné vysvětlit hydrolyzou glykosidových a jiných vazeb v huminových látkách. Pro snížení kontaminace huminovými látkami po mechanickém ošetření vzorku nemáme žádné vysvětlení.

Ze všech testovaných postupů čištění izolované DNA je třeba v případě použití SDS lyze zmínit nezbytnost ošetření lyzátu přidáním 1/5 objemu 8M acetátu draselného s následnou inkubací na ledu. Vynechání tohoto srážení téměř znemožňovalo následnou izolaci DNA. Z ostatních ošetření mělo kladný vliv na čistotu extrahované DNA samozřejmě srážení proteinů pomocí fenolu/chloroformu a k odstranění huminových kontaminací srážení DNA pomocí PEG místo ethanolu nebo izopropanolu a srážení pomocí spermine-HCl. Často publikovaný kladný vliv PVPP na čistotu extrahované DNA se nepodařilo prokázat. PVPP byl testován jako součást extrakčního pufru nebo jako spin column, avšak zejména PVPP jako součást extrakčního pufru neprokázal žádné zlepšení čistoty extrahované DNA, naopak často došlo ke snížení výnosu DNA. Vliv PVPP jako spin column nebyl výrazný a byl obtížně reprodukovatelný.

Významným zjištěním je různá citlivost testovaných primerů na čistotu DNA. Všechny primery použité v práci byly univerzální primery pro bakteriální (případně aktinobakteriální) 16s rDNA, přesto však pouze dvojice primerů P1-P2 (Muyzer et al 1993) amplifikovala všechny extrahované DNA bez ohledu na jejich čistotu. Stačila pouhá záměna reverzního primeru P2 ve zmíněné reakci za jiný univerzální primer P3 (Teske et al 1996) a ve většině případů již nebyl získán žádný PCR produkt. Toto pozorování má zásadní význam pro veškeré analýzy diverzity mikrobiálních společenstev využívající PCR reakce a bylo v naší laboratoři potvrzeno i v mnoha dalších případech, obzvláště při srovnání citlivosti univerzálních 16s rDNA primerů, vykazujících všeobecně menší citlivost k čistotě templátové DNA a primerů pro funkční geny.

DGGE analýza (Fig. 10 původního článku) DNA izolované za použití různých pufrů a především různých lytických postupů/ošetření poukázala – podobně jako u výše uvedené izolace mikrobiální frakce - na selektivitu některých kroků v extrakci půdní DNA. Fingerpriny vykazují výrazné rozdíly v závislosti na ošetření extrahované DNA a vezmeme-li v úvahu ještě i všeobecně uznávaný fakt, že DGGE fingerprinty reprezentují pouze nejpočetněji zastoupené mikrobiální populace zkoumané komunity, je zřejmé, že otázkám extrakce environmentální DNA je třeba věnovat maximální

pozornost, aby výsledky prováděných pozorování byly co nejméně ovlivněné právě tímto prvním a zásadním krokem každé molekulární analýzy.

### **3.3. Assessment of Chitin Decomposer Diversity within an Upland Grassland.**

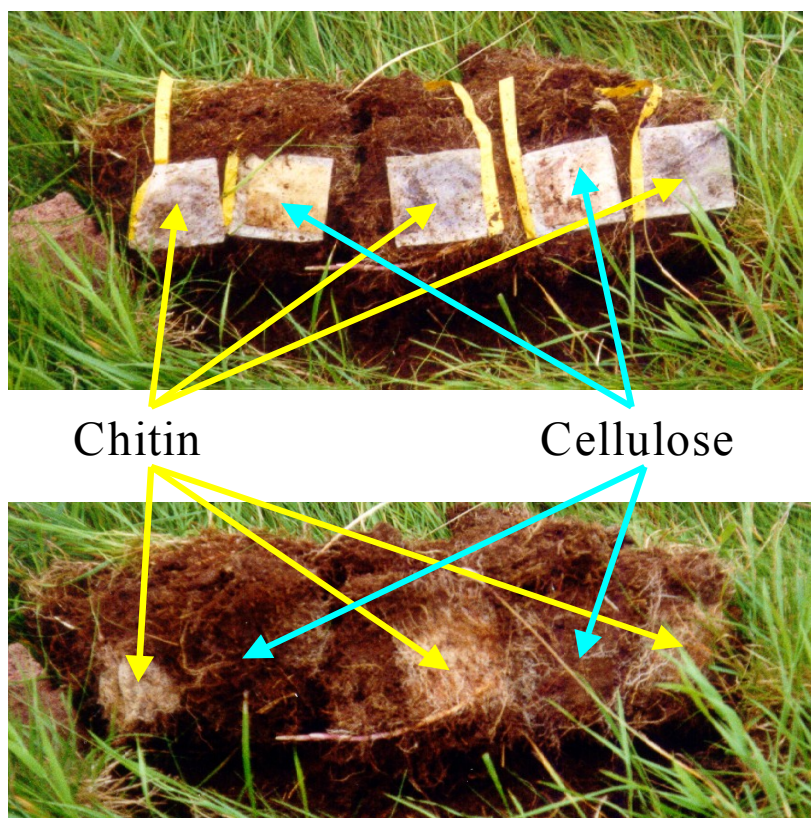
**Krsek, M., and Wellington, E.M.H. (2001) *Antonie van Leeuwenhoek* 79: 261-267.**

Prezentovaná práce je první ze série studií vzniklých na základě účasti naší výzkumné skupiny na Univerzity of Warwick v programu Soil Biodiversity Programme (<http://soilbio.nerc.ac.uk/>) financovaném britským Natural Environmental Research Council na výzkumné ploše v Sourhope, Cheviot Hills, Skotsko. V letech 1997-2004 zde bylo v rámci integrovaného programu výzkumu biologické diverzity půdních organismů a role půdních organismů v klíčových ekologických procesech částkou £5.85 miliónů podpořeno na 30 výzkumných projektů, na kterých pracovalo kolem 120 vědců na nejrůznějších britských univerzitách a výzkumných ústavech. Sourhope se tak stal bezesporu jedním z nejprobadanějších kousků země na světě. Je jen ironií, že v současné době jsou jeho přesnou polohu schopni určit opravdu jen účastníci tohoto programu, protože z původně pečlivě oploceného a obhospodařovaného pozemku je dnes opět jen neohraničená pastvina, takže i my, jako jeho více než aktivní účastníci (zúčastnili jsme se tří projektů v rámci programu: Assessment of chitin decomposer diversity: the role of actinomycetes and other bacteria in C and N cycling in limed and unlimed grasslands, Carbon flow through mycorrhizal mycelial systems to soil microbial populations- their impact of microarthropod diversity, Provision of a molecular archive for microbial diversity within treatments plots at Sourhope.), jsme před několika lety, kdy jsme plochu opět navštívili za účelem odběru dalších půdních vzorků, měli problémy vlastní plochu a především polohu jednotlivých experimentálních parcel přesně lokalizovat.

Náš první článek prezentující výsledky získané na této výzkumné ploše sleduje vliv vápnění na diverzitu mikrobiálních komunit degradujících chitin, nejrozšířenější přirozený polymer obsahující dusík (a druhý nejrozšířenější biopolymer po celulóze). Vzhledem k významu chitinu v přírodě (v terestriálních ekosystémech se nachází v buněčné stěně hub a skeletu hmyzu, v akvatických systémech tvoří kromě jiného schránky nejrůznějších korýšů a je proto i významným odpadním produktem při zpracování některých plodů moře) je jeho degradace významná i z hlediska koloběhu uhlíku a dusíku.

V práci byly použity dva přístupy ke studiu chitinolytických komunit. Jednak obohacovací *in situ* přístup za použití techniky tzv. buried liter bags, někdy překládané jako technika odpadních sáčků, tedy sáčků z nylonové síťoviny naplněných sterilním chitinem a zakopaných na určitou dobu na výzkumné ploše a *ex situ* přístup využívající mikrokosmů s půdou z výzkumné plochy obohacenou chitinem a uhličitánem vápenatým. Práce zahrnovaly jak tradiční kultivační postupy (počty bakterií a aktinobakterií), tak i molekulární studie za použití univerzálních i aktinobakteriálních 16s rDNA primerů.

Vápnění a především obohacení chitinem prokázaly výrazný kladný vliv na počty bakterií i aktinobakterií v mikrokosmech, nejvýraznější přírůstek cfu byl konstatován u kombinovaného ošetření. Také chitinolytická aktivita byla zvýšena jak přidáním uhličitánu vápenatého, tak především chitinu samotného. Kombinace obou ošetření v tomto případě již nevedla k dalšímu zvýšení chitinolytické aktivity společenstva v porovnání se samotným přidáním chitinu nebo vápněním. Tento jev se dá vysvětlit zvýšením pH vlivem amonných iontů uvolněných při degradaci chitinu, kdy by vápnění (nebo přesněji jím způsobené zvýšení pH) již nemělo vliv na chitinolytickou aktivitu, případně jistým „nasyčením“ systému chitinolytických enzymů, kdy ani zvýšení pH již nemohlo jejich činnost ovlivnit/zvýšit. Při odebrání sáčků s chitinem po jejich inkubaci na výzkumné ploše jsme byli překvapeni hustou spleť kořenů travního společenstva, která sáčky s chitinem uložené horizontálně v hloubce zhruba 8 cm pokrývala. Že šlo opravdu o produkty rozkladu chitinu (s největší pravděpodobností o dusík), které zajímaly kořeny rostlin, potvrdil fakt, že žádná spleť kořenů nebyla pozorována, pokud byl chitin v sáčcích nahrazen celulórou (Obr. 16). Zdůrazňuje to význam degradace všudypřítomného chitinu pro koloběh látek v přírodě a zvláště pak význam dusíku, prvku nejvíce limitujícího jakoukoliv biologickou aktivitu v půdních podmínkách. Jeho význam potvrdil i velký úbytek chitinu v sáčcích – po 5 týdnech inkubace bylo degradováno 40% chitinu. DGGE analýza bakteriální i aktinobakteriální populace mikrokosmů i chitinových sáčků odhalila výrazný vliv chitinu (i vápnění) na složení půdních bakteriálních společenstev.



**Obr. 16 Srovnání vlivu přítomnosti a absence chitinů na kořenovou spleť na horní straně sáčku se substrátem**

Zajímavé bylo i zjištění sezónnosti chitinolytické populace zakopaných sáčků (DGGE profil se lišil u jednotlivých odběrů). Studium klonové knihovny vytvořené z DNA izolované ze zakopaných chitinových sáčků odhalilo velký podíl neznámých/nekultivovatelných bakterií na chitinolytické populaci. Nejvíce klonů bylo podobných *Stenotrophomonas maltophilia*.

Dalšími důležitým zjištěním, přesahujícím významem téma této publikace, bylo opětovné potvrzení různé citlivosti požitých 16s rDNA primerů vůči inhibičním látkám v DNA izolované z půdního prostředí, které konstatovala i naše předchozí práce. Kromě jiného to například znamená, že všechny environmentální studie zabývající se PCR detekcí nejrozličnějších skupin půdních mikroorganismů by měly být doplněny testem na možnost inhibic, což se velmi často neděje. DGGE fingerprinty získané při přímé detekci chitinolytických populací a při použití nested PCR pro stejný účel potvrdily užitečnost techniky nested PCR tak, jak byla námi publikovaná v naší práci z roku 1997 (Heuer *et al.*, 1997). Pozornost si také zaslouží DGGE fingerprinty bakteriálních populací kolonizujících chitin získané při různých odběrech, které mohou naznačovat jak sukcese při kolonizaci/degradaci chitinu, tak již výše zmíněnou sezónnost mikroflóry

kolonizující chitin. Konečně výsledky klonování a následného sekvenování klonů získaných z DNA izolované z bakterií kolonizujících chitin potvrdily známý fakt, že údaje získané tradičními kultivačními postupy v žádném případě nerepresentují skutečnou diverzitu environmentálních bakteriálních/mikrobiálních společenstev.

### 3.4. Molecular Analysis of a Bacterial Chitinolytic Community in an Upland Pasture.

Metcalf, A.C., Krsek, M., Gooday, G.W., Prosser, J.I., and Wellington, E.M.H. (2002a) *Appl. Envir. Microbiol.* 68: 5042-5050.

I naše další práce pokračovala ve studiu chitinolytických populací na pokusné ploše v Sourhope. V této práci jsme se kromě vápnění zaměřili i na další ošetření často používané na zemědělské půdě, na aplikaci odpadních kalů. Opět byla použita technika sáčků s chitinem (buried litter bags) a ke studiu chitinolytických populací byly tentokrát kromě bakteriálních 16S rDNA primerů použity i naší skupinou dříve publikované primery specifické pro vybrané bakteriální chitinázy (Williamson et al 2000). Podobně jako u předešlé práce bylo prokázáno zvýšení pH půdy po aplikaci vápnění, kaly neprokázaly žádný vliv na půdní pH. Chitinolytická aktivita byla nejvyšší po aplikaci kalů, která zvýšila i podíl aktinobakterií v chitinolytickém společenstvu v chitinových sáčcích, zároveň ale dramaticky snížila diverzitu mikrobiálního společenstva v sáčcích.

Snímky pořízené skanovacím elektronovým mikroskopem potvrdily kolonizaci chitinu houbovým myceliem i četnou bakteriální populací často reprezentovanou řetízky spor připomínajících spory streptomycet. Chitinolytická aktivita i počty aktinobakterií na chitinu ze sáčků poukázaly na kladný vliv aplikace odpadních kalů na degradaci chitinu. Nejvyšší chitinolytická aktivita byla naměřena u chitinu z ploch s aplikací odpadních kalů a počty aktinobakterií byly vyšší jak u ošetření kaly, tak i u kombinovaného ošetření kaly a vápněním. Aplikace kalů prokázala i výrazný vliv na diverzitu chitinolytických populací. Klonové knihovny připravené pomocí specifických primerů pro vybrané bakteriální chitinázy poukázaly na výrazně sníženou a změněnou diverzitu chitinolytických bakterií po aplikaci odpadních kalů. Knihovny z kontrolních neošetřených políček a vápněných políček prokázaly vyšší diverzitu a dominantní zde byly sekvence podobné chitinázám již výše zmíněného *Stenotrophomonas maltophilia*, které však nebyly vůbec zastoupeny v knihovnách z ošetření kalem. Zde byly naopak dominantní chitinázy podobné aktinobakteriálním chitinázám *Arthrobacter* sp., které na druhé straně chyběly v kontrolních knihovnách. Zajímavým poznatkem byla absence jakýchkoliv sekvencí podobných chitinázám rodu *Bacillus*, jehož přítomnost v půdě je známá a které by měly být zachyceny použitými primery. Na druhé straně nepřekvapila



absence chitináz z mořských mikroorganismů, kterými jsou díky studiím především z Chesapeake Bay finančně dobře zajištěných výzkumných skupin z USA doslova zaplaveny molekulární databáze (např. Ramaiah *et al.*, 2000). Všechny naše získané poznatky jak z kultivačních studií, tak studií vytvořených knihoven, poukazují na význam aktinobakterií pro degradaci chitinu v půdních podmínkách. Zároveň toto srovnání opět do značné míry potvrdilo známou diskrepanci mezi výsledky získanými z tradičních kultivačních metod (mezi izoláty dominovaly streptomycety) a molekulárními metodami (klonové knihovny odhalily kromě streptomycet početné zástupce *Stenotrophomonas maltophilia* a *Arthrobacter* sp.). Celkově tedy je možné konstatovat, že aplikace odpadních kalů zvýšila chitinolytickou aktivitu a podpořila rozvoj aktinobakteriálních degradátorů chitinu, měla však negativní dopad na diverzitu bakteriálních společenstev v půdě, což by při dlouhodobé aplikaci kalů mohlo mít výrazně negativní vliv na složení půdní mikroflóry a tím i úrodnost půd. Toto zjištění má zásadní význam. Znamená to, že k využívání kalů z čističek odpadních vod a s největší pravděpodobností i aplikaci kejdy z chovu hospodářských zvířat je třeba přistupovat uvážlivě a v žádném případě těmito jinak pozitivními zásahy nepřetěžovat zemědělské půdy.

### 3.5. Molecular diversity within chitinolytic actinomycetes determined by *In situ* analysis.

Metcalf, A.C., Williamson, N., Krsek, M., and Wellington, E.M.H. (2002b) *Actinomycetol.* 17: 18-22.

Náš třetí článek zabývající se chitinázami na výzkumné stanici Sourhope sumarizuje naše předchozí výsledky a doplňuje naše analýzy o chitinázy skupiny 19 (family 19). Na rozdíl od předchozího článku, který využíval primery specifické pro chitinázy skupiny 18 (family 18), nacházející se ve většině bakterií, ale také houbách, rostlinách, živočiších a virech, se tento článek věnoval i chitinázám skupiny 19, o kterých se původně předpokládalo, že se nachází jen v rostlinách. Teprve později byla jejich přítomnost prokázána i v bakteriích rodu *Streptomyces*, poté v dalších zástupcích třídy *Actinobacteria*, ale také třeba v nematodech. Chitinázy skupiny 19 jsou naprosto odlišné od chitináz skupiny 18. Mezi těmito dvěma skupinami chitináz neexistuje žádná homologie sekvencí a také 3D struktura je zcela odlišná. S tím souvisí i jejich odlišné vlastnosti, například chitinázy skupiny 18 jsou inhibovány allosamidinem, který nepůsobí na chitinázy skupiny 19. Původ chitináz skupiny 19 v bakteriích je zřejmě odvozen od podobných chitináz nacházejících se v rostlinách, se kterými jsou některé aktinobakterie v těsném kontaktu. Sekvenční analýzy proužků z DGGE gelů získaných aplikací primerů pro chitinázy skupiny 19 na DNA extrahovanou z chitinových sáčků potvrdila přítomnost chitináz z *Streptomyces griseus* a *S. coelicolor*, což koresponduje s poznatky získanými s primery pro chitinázy skupiny 18, i s kultivačními metodami a potvrzuje to významnou roli chitináz z rodu *Streptomyces* v degradaci chitinu, kterým přítomnost chitináz z obou skupin, skupiny 18 i 19, umožňuje využívat chitin jako jediný zdroj uhlíku. Zvolené metody také opět potvrdily rozdíl výsledků získaných kultivačními metodami, které indikovaly přítomnost především bakterií rodu *Streptomyces*, a molekulárních metod, které odhalily přítomnost zástupců rodu *Arthrobacter*.

### 3.6. Resolving functional diversity in relation to microbial community structure in soil: exploiting genomics and stable isotope probing.

Wellington, E.M.H., Berry, A., and Krsek, M. (2003) *Curr. Opin. Microbiol.* 6: 295-301.

Náš další článek se zabývá jedním ze základních problémů mikrobiální ekologie, pochopením způsobu, jak mikrobiální populace v přirozených prostředích fungují, jak jednotlivé skupiny mikroorganismů spolu spolupracují, aby naplnily své základní poslání, tj. udržely v chodu koloběh všech prvků a tak zajistily fungování přírody jako celku. Molekulární metody umožnily studium diverzity bakteriálních a do určité míry i houbových společenstev, nicméně vzhledem k problému nekultivovatelnosti většiny mikrobiálních populací je stále obtížné dát do vztahu strukturu společenstev a jejich funkci. Situace je dál komplikovaná snadností, s jakou může být genetická informace přenášena mezi jednotlivými skupinami mikroorganismů, tj. tzv. horizontálním přenosem genů (HGT – horizontal gene transfer).

Většina metod analýzy mikrobiální diverzity je založena na izolaci a studiu DNA, která poskytuje informace o struktuře společenstev a jejich potenciální aktivitě. Vzhledem k pokroku aplikace metody PCR s reverzní transkripcí (reverse transcription PCR – RT-PCR) je již také možno studovat aktivní část mikrobiálního společenstva, ať už s využitím rRNA, nebo mRNA. Při práci s rRNA a především při interpretaci jejich výsledků je však třeba mít na paměti, že například zvýšený obsah rRNA nemusí vždy korespondovat se zvýšenou aktivitou příslušných mikrobiálních buněk (viz například vysoký počet ribosomů u spor streptomycet). Konečně i detekce mRNA se ještě nemusí ihned odrazit ve fenotypu buněk (posttranslační úpravy) a kromě toho nemusí být vždy snadné ani na základě sekvence tuto jednoznačně přiřadit k určitému taxonu (HGT).

Jedním ze základních a proto často studovaných půdních procesů je cyklus dusíku. Za tímto účelem byly vyvinuty DNA microarrays/čipy pro detekci různých genů cyklu dusíku, jako *nifH*, *amoA*, *nirK* a *nirS*. Pro studium bakterií oxidujících  $\text{NH}_4^+$  byly vyvinuty i 16S rRNA PCR primery schopné detekovat známé členy této funkční skupiny. Fylogenetické srovnání 16S rRNA a *amoA* genů naznačuje, že u této skupiny mikroorganismů nedochází k horizontálnímu transferu genů a proto sekvence *amoA* genů nám v tomto případě může dát i informaci o jejich taxonomickém původu. V

případě denitrifikace je však situace mnohem komplikovanější a podobné závěry dávající do souvislosti geny s organismy, ze kterých pochází, zde s největší pravděpodobností nelze učinit. Také v případě námi studovaných chitináz skupiny 18 je bez dalších, především asi metagenomových studií, velice obtížné identifikovat hlavní skupiny organismů zapojených v chitinolytických procesech jen na základě studia diverzity *chi* sekvencí.

Významným přínosem ke studiu vztahů struktury a funkce mikrobiálních společenstev je metoda stabilních izotopů (stable isotope probing – SIP), jejímž principem je degradace/využití substrátu značeného stabilním izotopem (většinou uhlíku –  $^{13}\text{C}$ ), jeho zabudování do mikrobiální buňky s následnou detekcí použitého izotopu v biologickém materiálu. Metodu detekce takto značené DNA poprvé použili Radajewski *et al.* (2000) ke studiu metylotrofních mikroorganismů v půdě. Metylotrofové rostoucí na  $^{13}\text{CH}_3\text{OH}$  zabudovali těžký izotop uhlíku  $^{13}\text{C}$  do své DNA, která pak byla pomocí centrifugace v hustotním gradientu oddělena od lehčí DNA ostatních mikroorganismů neschopných využívat tento zdroj uhlíku a energie. Následné studium takto získané DNA pomocí 16S rDNA primerů a primerů pro *mxoF* (aktivní místo podjednotky metanol dehydrogenázy) potvrdilo přítomnost alfa-proteobakterií, známých schopností metylotrofie, ale také členů skupiny *Acidobacterium*, u jejichž kultivovatelných zástupců nebyla tato schopnost nikdy pozorována. Později byla metoda SIP aplikována i na studia RNA. Například Manefield *et al.* (2002) použili tuto metodu ke studiu degradace fenolu v průmyslovém anaerobním bioreaktoru. I přes velké možnosti, které tato metoda skýtá, má i své úskalí. Prvním problémem je nutnost masivního značení detekovaného substrátu (R/DNA, mastné kyseliny, atd) vyžadující substrát téměř 100% značený těžkým izotopem sledovaného prvku, což není vždy uskutečnitelné a v každém případě velmi drahé. Dalším důležitým předpokladem je téměř 100% využití značeného substrátu pro růst mikroorganismu, přesněji zabudování značeného izotopu do buněčných biomolekul. Konečně potřeba výrazného značení biomolekul vyžaduje delší doby inkubace komunity se značeným substrátem, v důsledku čehož může dojít k tzv. “cross-feeding”, tedy přenosu značeného prvku z primárního konzumenta na další členy mikrobiálního společenstva, kteří nemají s degradací/využitím předkládaného substrátu nic společného.

Jednou z nejvýznamnějších metod ke studiu struktury a funkce přirozených mikrobiálních společenstev zůstávají metagenomové knihovny, ať už ve formě bakteriofágu lambda, cosmidu, fosmidu, nebo BAC zahrnující v sobě genetickou

informaci z kultivovatelných i nekultivovatelných mikroorganismů. Pomineme-li technické problémy provázející jejich konstrukci, základní otázkou zůstává, zda jsme schopni zkonstruovat knihovny dostatečně velké, aby v sobě zahrnovaly genetickou informaci opravdu ze všech členů studovaného mikrobiálního společenstva. Pokud vezmeme v úvahu fakt, že například půdní společenstva zahrnují možná tisíce různých druhů, existuje zde velice reálné nebezpečí, že druhy reprezentované nízkým počtem buněk nebudou v knihovně zastoupeny, i když jejich funkce ve společenstvu může být důležitá.

Jedním z prvních významných úspěchů v oblasti metagenomových knihoven byla práce Rondona *et al.* (2000), kteří zkonstruovali knihovnu o téměř 25 tisících klonů s průměrnou velikostí DNA 45kb, což v konečném důsledku znamenalo více než 1Gb DNA. I tato práce potvrdila poznatek Radajewského *et al.* (2000), tedy významný podíl bakterií ze skupiny *Acidobacteria* na složení půdních mikrobiálních společenstev. V době vzniku knihovny byly známy jen 3 kultivovatelní zástupci této skupiny.

BAC knihovny představují velice významný přínos ke studiu struktury a funkce mikrobiálních společenstev nezátížený problémy PCR. Výše zmíněnou možnost přehlédnutí některých méně početných, ale významných členů studovaného společenstva, je možné eliminovat některými obohacovacími metodami, nebo i kombinací výše zmíněné metody SIP s tvorbou těchto knihoven. Je ale také třeba se zmínit o metodách studia vytvořených knihoven, o detekci funkčních genů. Určitou informaci je možné získat sekvenací knihoven a srovnáním se známými geny. Toto je však možné jen v případě studia/detekce známých funkcí/genů. K objevení nových vlastností/funkcí je potřeba zvolit jiný přístup, snažit se exprimovat klonované geny. Zde však narážíme na řadu potenciálních problémů. V první řadě musí být v daném klonu přítomný celý gen případně metabolická dráha. Dalším problémem mohou být rozdíly v používaných kodonech a regulačních mechanismech, které se mohou lišit u původního organismu ve srovnání s použitým vektorem/hostitelem. Z tohoto důvodu je třeba věnovat zvýšenou pozornost výběru/konstrukci vhodného vektoru použitého ke klonování a následné expresi klonované genetické informace.

I přesto, že byl tento náš článek publikován již před 10 lety a mapoval tedy především situaci na poli metod využívaných v mikrobiální ekologii v době svého vzniku, bylo by jej možné - snad jen s malými úpravami a doplněními o poslední trendy ve studiu mikrobiální ekologie - publikovat i dnes. Řeší totiž základní problém

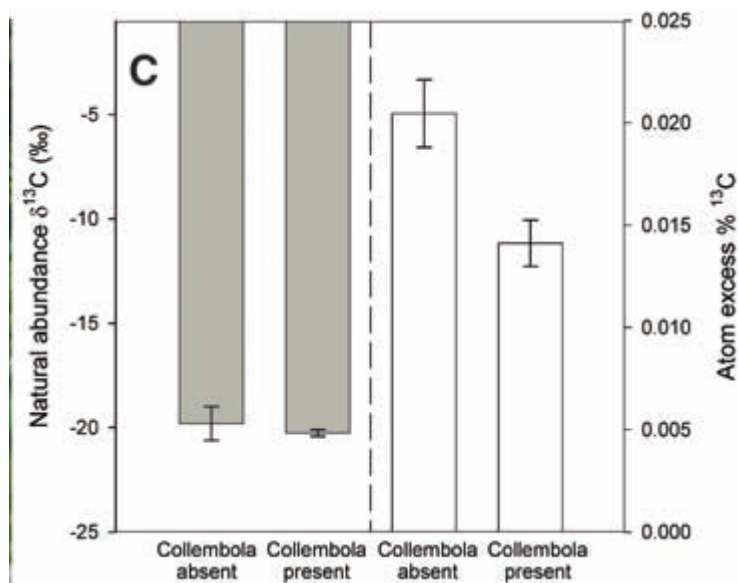
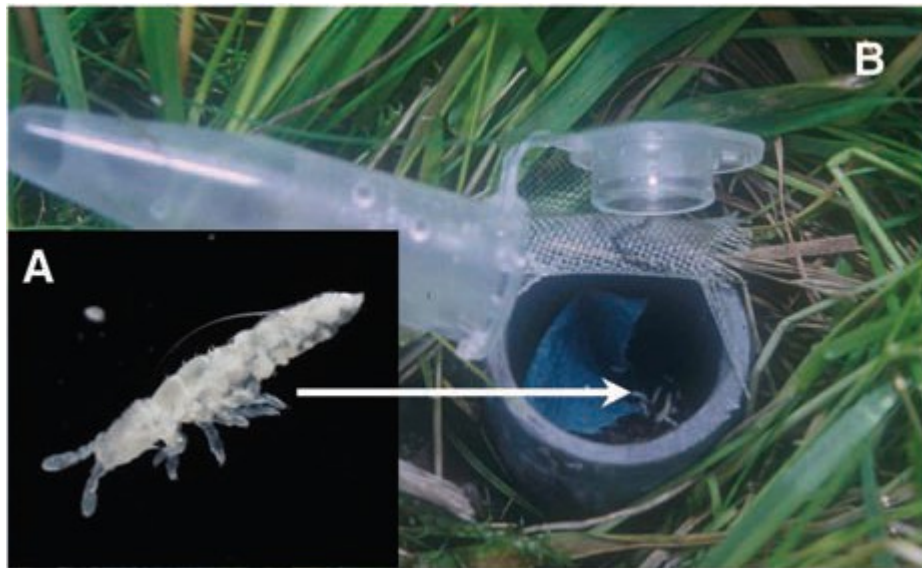
mikrobiální ekologie, totiž spojení informace o složení mikrobiálních společenstev s jejich funkcí.

### 3.7. Soil Invertebrates Disrupt Carbon Flow Through Fungal Networks.

Johnson, D., Krsek, M., Wellington, E.M.H., Stott, A.W., Cole, L., Bardgett, R.D., Read, D.J., and Leake, J.R. (2005) *Science*: 1047.

I tato naše práce vznikla na pokusne ploše ve skotském Sourhope. Jejím cílem tentokrát bylo prokázat význam mykorhizních hub pro transport asimilátů z rostlin do půdní mikroflóry a vliv půdních bezobratlých živočichů na tento transport. Účelem experimentu bylo zjistit, zda vybrané druhy chvostoskoků, kteří se živí převážně houbovým myceliem, jsou touto svojí činností schopné narušit tok uhlíku fixovaného rostlinami přes mykorhizní houby do půdní mikroflóry a takto zhodnotit význam mykorhizních hub pro transport uhlíku (i jiných prvků) v půdním prostředí. Experimenty byly provedeny přímo na trvalém travním porostu v Sourhope. Nejprve byly odebrány vzorky půdy z experimentální plochy a zbaveny půdních bezobratlých hlubokým zmražením na  $-80^{\circ}\text{C}$ . Takto ošetřená půda byla vpravena do uzavřených plastových trubic s otvory vyřezanými v bočních stěnách překrytými nylonovou síťovinou s velikostí ok 35  $\mu\text{m}$  umožňující prorůstání houbového mycelia, avšak zabraňující proniknutí zmíněných bezobratlých. Trubice byly vloženy do travního porostu na experimentální ploše a ponechány zde po dobu šesti týdnů k ustanovení mykorhizního spojení s okolní nenarušenou půdou. Po té bylo do poloviny trubic přidáno 20 jedinců chvostoskoků *Protaphorura aromata*. Po dalších 4 týdnech klidu byla vegetace v okolí trubic po 7 hodin vystavena atmosféře, kde byl normální  $^{12}\text{CO}_2$  nahrazen  $^{13}\text{CO}_2$ . Po dalších 16 hodinách byly trubice vyjmuty z půdy a byla stanovena přítomnost značeného  $^{13}\text{CO}_2$  ve vzduchu uvolňovaném z půdy v trubicích (respirace). Porovnáním obsahu  $^{13}\text{C}$  ve vzorcích vzduchu nad trubicemi s chvostoskoky s trubicemi bez chvostoskoků prokázalo 32% pokles  $^{13}\text{C}$  u trubic s chvostoskoky, což potvrdilo naši hypotézu, že přítomnost půdních bezobratlých narušuje tok uhlíku z kořenů rostlin přes mykorhizní houby dále do půdního prostředí (Obr. 17). Tento fakt byl potvrzen i studiem mastných kyselin fosfolipidů (PLFA) extrahovaných z půdy z pokusných trubic, kde analýzy za pomoci plynového chromatografu a hmotnostního spektrometru prokázaly výrazné obohacení mastných kyselin 16:1 $\omega$ 5 izotopem  $^{13}\text{C}$  uhlíku v trubicích bez chvostoskoků. Mastné kyseliny 16:1  $\omega$  5 jsou specifické pro arbuskulární mykorhizní houby. Práce tedy jasně prokázala význam houbového mycelia pro transport

látek v půdě i roli, kterou narušováním houbového mycelia hrají různé půdní organismy. Je také dobrým příkladem potenciálu metod SIP pro ekologické studie.



**Obr. 17. (A-B) Vkládání chvostoskoků do pokusných trubic. (C) Vliv přítomnosti a absence chvostoskoků na přirozené množství/výskyt  $^{13}\text{C}$  izotopu uhlíku v trubicích bez expozice značenému uhlíku a jeho nadbytek ve vzduchu uvolněném 16 hodin po značení.**



### **3.8. Nucleic acid extraction and metagenomic library construction from soil**

**Krsek, M., Wellington, E.M.H. (2006)**

**Powerpoint prezentace na SGM Meeting, University of Warwick, Coventry**

Významnou technikou využívanou ke studiu mikrobiálních společenstev (velmi často za účelem praktického využití metabolických schopností půdní mikroflóry) jsou bezesporu již několikrát zmiňované genomové knihovny. Jejich vytvoření byl i náš poslední úkol v rámci Soil Biodiversity Programme v Sourhope.

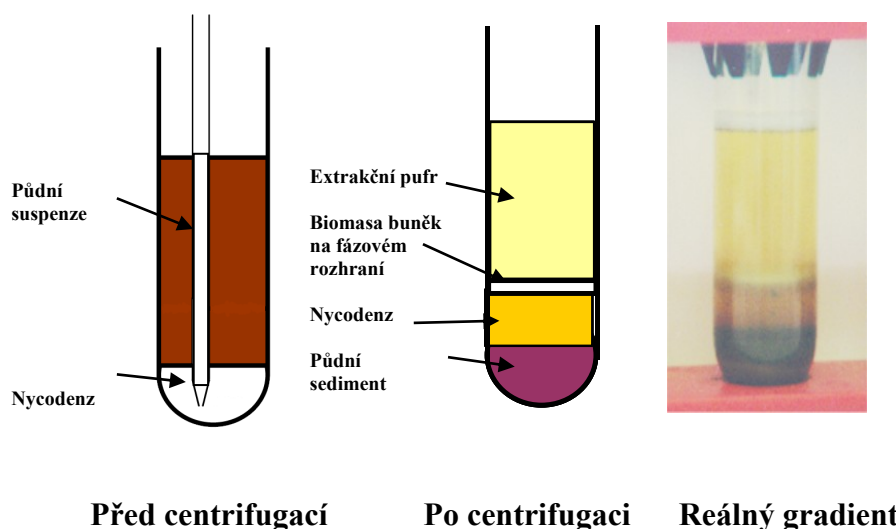
Vzhledem k významu programu a jeho známosti ve vědeckých kruzích nejen ve Velké Británii, bylo jen logické, že naše výzkumná skupina byla vyzvána, aby o svém projektu metagenomových knihoven (projektu, který v té době zdaleka nebyl rutinní záležitostí) referovala na konferenci Britské mikrobiologické společnosti (SGM – Society for General Microbiology) v roce 2006. V následujících řádcích shrneme základní poznatky námi prezentované na tomto vědeckém fóru, které podle našeho názoru vhodně doplňují naše pojednání o metodách studia mikrobiálních komunit.

Celý proces tvorby knihoven je možné rozdělit do tří částí, z nichž každá má svá úskalí či specifika: extrakce environmentální DNA, výběr nebo tvorba vhodného vektoru a konečně studium připravené knihovny.

Extrakcí environmentální DNA jsme se již podrobně zabývali v předchozích kapitolách, avšak extrakce pro účely metagenomových knihoven klade zvýšené nároky na kvalitu extrahované DNA. V první řadě jde o velikost/molekulovou hmotnost fragmentů DNA. Běžnými postupy extrakce jsou získávány fragmenty maximálně o velikosti několika desítek kb (běžně 20-30 kb). Vzhledem k tomu, že účelem tvorby metagenomových knihoven je dosáhnout maximálního pokrytí veškeré genetické informace ve zkoumaném vzorku a zároveň studium ucelených metabolických drah, cílem extrakce je izolovat co nejdelší fragmenty DNA. Z tohoto důvodu je nutné minimalizovat veškeré mechanické operace s DNA a naprostá většina metod proto využívá lyze předem izolované mikrobiální frakce v bločcích z agarózy o nízkém bodu tání.

V naší laboratoři jsme se tvorbou knihoven s velkými DNA fragmenty zabývali již v letech 1997/9 ve spolupráci s ChromaXome Corporation. Tedy již v době, kdy termín metagenomové knihovny ještě neexistoval, jsme se snažili z půd bohatých na aktinobakterie izolovat velké fragmenty DNA potenciálně obsahující ucelené

metabolické dráhy produkující nová, do té doby neznámá antibiotika. Za tímto účelem jsme testovali nejrůznější způsoby přípravy půdní bakteriální frakce (Faegri *et al.*, 1977; Torsvik, 1980; Bakken, 1985; MacDonald, 1986 a,b,c; Steffan *et al.*, 1988; Torsvik *et al.*, 1990; Hopkins *et al.*, 1991 a,b) a získanou frakci lyzovali v agarózových terčících. Když jsme se k této činnosti vrátili o deset let později, na základě našich dřívějších zkušeností jsme se zaměřili na izolaci půdní mikrobiální frakce pomocí Nycodenzového gradientu. Při jeho použití je půdní vzorek mixován ve vhodném pufru (často jen sterilní destilovaná voda) a po krátkém usazení půdy je horní tekutá frakce půdního homogenátu vpravena do centrifugační zkumavky a suspenze Nycodenzu o hustotě  $1,3\text{ g ml}^{-1}$  (8 g Nycodenzu v 10 ml vody) je napipetována pod tuto frakci. Poté je vzorek centrifugován ve výkyvném rotoru po dobu 20-60 minut při  $10.000\text{ xg}$ . Po centrifugaci je na dně zkumavky půdní sediment, nad ním do žluta až hněda (dle obsahu humusových kyselin ve zpracovávaném vzorku) zbarvený Nycodenz, na něm bělavý proužek mikrobiální frakce a vše je převrstvené vrstvou pufru použitého pro homogenizaci vzorku (Obr. 18 ). Mikrobiální frakce se získá odpipetováním bělavé mezivrstvy mezi Nycodenzem a pufrem a Nycodenz je z odpipetované mikrobiální frakce vymyt přidáním pufru/vody k této frakci a její následnou centrifugací.



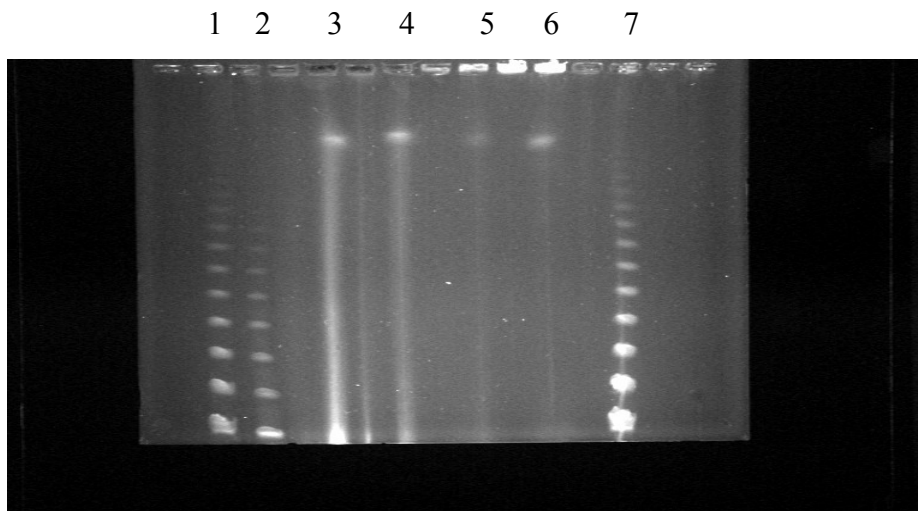
**Obr. 18** Schematické znázornění tvorby Nycodenzového gradientu

Při testování této metody jsme nejprve připravili čisté kultury bakterií (včetně sporulujících), aktinobakterií i mikroskopických hub. Všechny byly postupně podrobeny centrifugaci v Nycodenzovém gradientu a po proběhlé centrifugaci je všechny bylo možné detekovat v mezivrstvě mezi Nycodenzem a horní vrstvou pufru. Můžeme tedy konstatovat, že při použití Nycodenzového gradientu je možné získat bakterie včetně vláknitých forem a spor, ale také mikromycety. Tento poznatek je v rozporu s faktem, že centrifugace v hustotním gradientu by podle většiny literárních zdrojů měla sloužit k získání čisté bakteriální frakce (bez eukaryotických mikroorganismů). Získaná mikrobiální frakce je prostá kontaminace půdními koloidy a v důsledku toho je DNA extrahovaná z této frakce čistá bez kontaminace huminovými látkami.

Vzhledem k našim dřívějším zkušenostem (nižší výnos a především selektivita *ex situ* lyze) jsme metodu nepřímé izolace půdní mikrobiální DNA srovnali i s přímou izolací environmentální DNA, kdy byl vzorek půdy přímo homogenizován s vodou ve třecí misce a takto připravená emulze byla smíchána s agarózou o nízké teplotě tání. Po utužení byly připraveny bločky agarózy o vhodné velikosti a tyto byly podrobeny – spolu s obdobnými bločky připravenými z mikrobiální frakce získané pomocí Nycodenzového gradientu – lyzi. V našem případě šlo o lyzi pomocí lysozymu a enzymů izolovaných z mikromycet zajišťujících lyzi houbového mycelia - z *Rhizoctonia solani* (glukanázová aktivita) a *Trichoderma harzianum* (celulázová, proteázová a chitinázová aktivita) v Sarkosylu a deoxycholátu sodném následovanou lyzí pomocí proteinázy K.

Jak je patrné z Obr. 19 velikost fragmentů DNA získaných po lyzi mikrobiální frakce (běh 5) i po přímé lyzi půdní suspenze (běhy 3 a 4) byla shodná a blížila se 1 Mb. Z obrázku je také patrné množství DNA uvolněné z bakteriální frakce a přímo z půdy, kde množství DNA získané při přímé izolaci převyšuje množství DNA získané z mikrobiální frakce. Následující slide naší prezentace (gel z tohoto slidu prezentuje i výše uvedený Obr. 12) také jasně poukazuje na množství DNA (nebo lépe mikrobiálních buněk), které je během přípravy mikrobiální frakce „zanecháno“ v sedimentu po mixování půdy a po centrifugaci v gradientu Nycodenzu (běhy b) a c)).

Proto také nepřekvapí značné rozdíly ve fingerprinttech DGGE gelu získané s použitím univerzálních bakteriálních primerů (Muyzer *et al.*, 1993) a templátovou DNA izolovanou na jednotlivých stupních přípravy mikrobiální frakce (Obr. 13 a 14).



**Obr. 19 Srovnání molekulové hmotnosti DNA izolované z bločků agarózy o nízké teplotě tání s půdní suspenzí a mikrobiální frakcí izolovanou z téže půdy: běh 1,2,7 – 1 Mb DNA ladder; 3,4 – DNA izolovaná z půdní suspenze; 5 – DNA izolovaná z půdní mikrobiální frakce; 6 – DNA izolovaná z čisté kultury mikromycet.**

Následující slidy sumarizují náš přístup ke tvorbě genomových knihoven s přímou lyzí půdy v agarózových bločcích, následovanou nastříháním restrikčními enzymy a uvolněním získaných fragmentů a upozorňují na možná úskalí jednotlivých kroků: nutnost optimalizace restrikčního štěpení uvolněné DNA pro každou půdu zvlášť (množství enzymu a doba štěpení je individuální pro každou půdu), což je zřejmě způsobeno různým obsahem huminových látek a jiných inhibitorů restrikčních enzymů ve zkoumaných půdních vzorcích; způsob dělení nastříhané DNA pomocí agarózové elektroforézy v pulzním poli (z důvodů odstranění malých fragmentů DNA je nejprve nutné aplikovat tzv. „pre-run“, tj. elektroforézu v opačném směru); a konečně problémy s uvolněním fragmentů DNA o vhodné velikosti po pulzní elektroforéze (nebo lépe delikátnost práce s těmito fragmenty). Takto získaná DNA je připravena k vložení do vhodného vektoru.

V závislosti na velikosti fragmentů DNA lze jako vektor zvolit plasmidy (pro malé fragmenty o velikosti 5-10 kb), kosmidy nebo fosmidy (40-50 kb), nebo v případě metagenomových knihoven asi nejčastěji BAC (bacterial artificial chromosome) nebo podobné konstrukty (100-300 kb, případně i větší fragmenty). Výběr vhodného vektoru tedy závisí v první řadě na velikosti klonovaných fragmentů, ale i na účelu tvorby knihovny. Má-li knihovna sloužit například pro hledání nových antibiotik aktinobakteriálního původu, nemusí být BAC z důvodů exprese v prostředí *E. coli* vždy

nejvhodnější a proto například naši spolupracovníci na EU projektu Actapharm vyvinuli vektor pPAC-S1 (ESAC) schopný inkorporovat až 300 kb odvozený od BAC, ale schopný se stabilně udržet v buňkách rodu *Streptomyces* (Sosio *et al.*, 2000). Další spolupracovníci (Robert van der Geize, Univ. Groningen) na téže projektu vyvinuli vektor pBAC-S8 také odvozený od BAC a schopný být zaveden jak do rodu *Streptomyces*, tak i *Rhodococcus*.

Po úspěšném klonování a inkorporaci vektoru do vhodného hostitele (v obou případech se nejedná o triviální záležitost) dojde na stadium/screening vytvořené knihovny. Ten je možné provádět buď na základě exprese klonovaných genů (z tohoto důvodu je nezbytné, aby klon zahrnoval celou metabolickou dráhu, což ale stále samo o sobě negarantuje expresi dráhy), případně je možné provést screening pomocí PCR za předpokladu, že je na základě známých sekvencí možné vytvořit PCR primery schopné detekce požadované metabolické dráhy. Závěr naší prezentace pak uvádí příklady knihoven vytvořených ve spolupráci s výzkumnými skupinami v rámci projektu ACTAPHARM i dalších projektů.

### **3.9. Studies of microbial community structure and function below ground in a managed upland grassland site at Sourhope Research Station.**

**Krsek, M., Wellington, E.M.H. (2006) *Appl Soil Ecol.* 33: 127-136.**

Náš poslední článek věnovaný programu Soil Biodiversity Programme ve skotském Sourhope shrnuje výzkumné techniky použité všemi výzkumnými skupinami na této experimentální ploše k získání informací o roli jednotlivých mikrobiálních skupin a jejich ovlivnění různými agrotechnickými zásahy běžně aplikovanými na travní porosty.

Zajímavé výsledky při studiu cyklů uhlíku a dusíku v půdě byly získány pomocí techniky stabilních izotopů (SIP). Na výzkumné ploše byla instalovaná mobilní laboratoř (tzv. SID - stable isotope delivery systém) umožňující provádění komplikovaných experimentů, kdy pomocí cylindrů z plexiskla (a kilometrů hadic) bylo možné vystavit travní porosty na jednotlivých pokusných parcelách (a tím i s nimi spojenou podzemní mikroflóru) řízené atmosféře, ve které byl normální izotop uhlíku v CO<sub>2</sub> nahrazen stabilním izotopem <sup>13</sup>C. Pomocí této techniky Staddon *et al.* (2003) sledovali vliv vápnění na tok uhlíku v čase (2 hodiny – 62 dnů) a místě (přímo pod cylindry a do 50 cm od nich). Jejich nejzávažnějším zjištěním byl vliv vápnění na zvýšený výskyt mykorhizních hub naznačující jejich možný význam pro transport uhlíku. Ten potvrdil Johnson *et al.* (2002) pomocí plastových trubic s půdou použitých i v naší pozdější již výše zmíněné studii (Johnson *et al.*, 2005), která kromě toho vyzdvihla význam půdních mikroarthropod, které konzumací mycelia mykorhizních hub mohou tento transport narušit.

Transport uhlíku přes mykorhizní houby do mikrobiální R/DNA studovali i Ostle *et al.* (2003). Podle jejich zjištění je obrat mikrobiální RNA 20% za den s tím, že značený uhlík bylo možné v RNA detekovat až do 15.-20. dne po značení. Jejich práce opět potvrdila rychlý transport fotosyntetátů do půdní mikroflóry a zároveň jeden z problémů (nebo i výhody) metody SIP, tedy rychlý transport uhlíku i mezi jednotlivými mikrobiálními skupinami v půdě. Další práce (Rangel-Castro, 2005a,b) potvrdily pozitivní vliv vápnění na příjem kořenových exudátů mikrobiálními společenstvy. Aktivní mikrobiální společenstva ve vápněných půdách byly podle

výsledků DGGE ve srovnání s kontrolou komplexnější a aktivnější v příjmu značeného  $^{13}\text{C}$ .

Cole *et al.* (2004a,b) studovali vliv mikroarthropod na počty mikroorganismů v půdě a soutěžení o půdní organický dusík mezi mikroby a rostlinami a konstatovali, že příjem dusíku nebyl ovlivněn přítomností mikroarthropod, avšak jejich zvýšená hustota (počty) zvýšila uvolňování živin z půdy, snížila půdní respiraci a hmotnost nadzemních částí rostlin, ale neměla žádný vliv na mikrobiální biomasu v půdě.

Zajímavou techniku detekce  $^{13}\text{C}$  značených asimilátů v půdě použili Bruneau *et al.* (2002). Tenké řezy z neporušených půdních bločků impregnovaných PEG 8000 vystavili působení laseru a ve vznikajících párách určovali pomocí IRMS (Isotope-ratio mass spektrometry) přítomnost  $^{13}\text{C}$ . Je jen škoda, že tuto techniku nelze aplikovat na půdní mikroorganismy – průměr plochy vypálené laserem je vzhledem ke své velikosti (100  $\mu\text{m}$ ) vhodný pouze k detekci značených prvků ve větších organismech/strukturách, v tomto případě kořenech rostlin.

Zajímavé bylo také srovnání metod využitých ke studiu mikrobiálních komunit a komunit vyšších organismů. Pro studium mikrobiálních komunit byla využita kombinace tradičních kultivačních metod s molekulárními metodami (v průběhu programu byla dokonce vyvinuta a publikována metoda současné izolace RNA i DNA - Griffiths *et al.*, 2000- která pak byla využita v mnoha studiích programu), zatímco ke studiu komunit vyšších eukaryot byly požitý téměř výhradně pouze klasické metody – izolace, pozorování a kultivace. Také jen minimum projektů sledovalo všechny úrovně mikrobiálních potravinových řetězců. Dawson *et al.* (2003) studovali vliv dusíku, vápnění a ošetření insekticidy na dynamiku kořenového systému travin a kromě bakterií a hub také izolovali hmyz, mezofaunu i půdní nematoda. Zjistili, že ošetření insekticidy snížilo nejen počty hmyzu, ale i půdní mikrobiální biomasu – zaznamenali snížený výnos PLFA charakteristických jak pro bakterie, tak pro mikromycety.

Studie dalších autorů zabývajících se půdní mezofaunou ukázaly, že se zvyšující se úrodností půdy se zvyšuje i množství mikroarthropod v dané lokalitě (Cole *et al.*, 2005) a že například i pro identifikaci půdních nematod jsou přesnější molekulární metody než klasické morfologické metody (Floyd *et al.*, 2002). Zůstává však otázkou, do jaké míry výsledky získané molekulárními metodami odpovídají výsledkům získaným klasickými metodami (Blaxter a Floyd, 2003).

Z hlediska půdní mikrobiologie byly zajímavé pokusy prováděné na mikrokosmech vystavených periodicky vysychání. To bylo vždy provázeno výrazným

snížením počtu aktivních bakteriálních buněk (Whiteley *et al.*, 2003), ke změně celkových počtů bakteriálních buněk a jejich diverzity však nedošlo, což svědčí o tom, že procesy vysychání a ovlhčování jsou v půdě běžné a půdní mikroflóra je tomuto přizpůsobena. Závažné však bylo zjištění, že i DGGE profily bakteriálních společenstev získané s použitím RNA a DNA byly totožné (Griffiths *et al.*, 2003, 2003), což by zpochybňovalo použití RNA technik k charakterizaci aktivní části bakteriálních populací.

Aktivita půdní fauny byla monitorována i za pomoci lokalizace jejich exkrementů v půdním profilu, která jasně prokázala zonálnost její aktivity a dominanci několika málo skupin ve vrchním organickém horizontu půdy (Davidson *et al.*, 2002). Další studie sledovaly vliv agrotechnických zásahů (včetně ošetření insekticidy) na půdní organismy a s tím související dynamiku kořenového systému. Význam půdních bezobratlých pro půdní prostředí je s největší pravděpodobností stále nedoceněn, i když některé studie naznačují, že hmotnost půdní fauny živící se kořeny rostlin převyšuje hmotnost herbivorů pasoucích se na nadzemních částech rostlin travních porostů (Sims a Singh, 1978). Dawson *et al.* (2003) svým výzkumem v rámci programu prokázali, že aplikace insekticidů snížila biomasu kořenů i rychlost spásání a tvorby nových kořenů. Naopak aplikace dusíku a vápnění zvýšila spásání a tvorbu nových kořenů.

Celkově je možné konstatovat, že Soil Biodiversity Programme představuje opravdu unikátní výzkumný projekt, který šíří svého záběru i získanými poznatky najde i v celosvětovém měřítku jen ztěží nějakou paralelu a je škoda, že po jeho skončení došlo k totálnímu opuštění výzkumné plochy, jak už jsme konstatovali výše.



### 3.10. Metagenomic analysis of a southern maritime antarctic soil.

Pearce, D.A., Newsham, K.K., Thorne, M.A., Calvo-Bado, L., Krsek, M., Laskaris, P., Hodson, A., Wellington, E.M. (2012) *Front Microbiol.* 2012;3:403, 1-13.

Poslední předkládaná práce ilustruje možný přístup k tvorbě a analýze metagenomových knihoven tak, jak ho umožňuje pokrok ve vývoji molekulárně biologických metod, především 454 sekvenování a následná analýza získaných výsledků. Pro tvorbu knihoven byly odebrány vzorky antarktické půdy z lokality Mars Oasis na Alexander Island. Po extrakci DNA a její aplikaci na gel z agarózy o nízkém teplotě tání byl po elektroforéze vyříznut pruh gelu s DNA fragmenty o velikosti 35-45 kbp, DNA byla uvolněna z gelu za použití Gelasy a po nutných úpravách („end-repair“) byly fragmenty DNA ligovány do pEpiFOS-5 fosmidu. Připravené klony byly vpraveny do fágu lambda a vzniklá knihovna byla transdukcí vložena do buněk *E. coli* EPI-100. Specifické primery byly použity pro detekci virových, houbových a fosfonátových genů a genů cyklu N v metagenomové knihovně.

Buňky z 25 mikrotitračních destiček představující 10% z celkového počtu získaných transformantů byly smíchány, kultivovány a jejich koncentrát po centrifugaci použit pro konstrukci 10.000 Gbp knihovny pro 454 pyrosekvenování. Sekvenováním bylo získáno 262.086 sekvencí o průměrné délce 441 bp, které byly analyzovány na serveru MG-RUST. Sekvence byly porovnávány s databázemi RDP, Green-genes a SEED. Celkově bylo detekováno 261.840 sekvencí obsahujících taxonomické informace. 322 bakteriálních, virových, eukaryotických a archeálních „phyla hits“ bylo získáno porovnáním těchto sekvencí s databází SEED a v konečné analýze bylo identifikováno 1.160 rodů. Analýza knihovny založená na funkci detekovaných genů odhalila vedle největší skupiny genů s neznámou funkcí nejčastěji geny s rolí v dělení buněk a buněčném cyklu (metabolismus karbohydrátů, proteinů, aminokyselin, DNA, RNA atd.), což naznačuje, že jde o aktivní mikrobiální komunitu. Přítomnost genů rezistence k antibiotikům a jiným toxickým látkám ukazuje potenciál k aktivní kompetici ve zkoumaných půdách a koreluje s množstvím detekovaných aktinobakteriálních sekvencí v knihovně. Překvapivě malý byl výskyt genů stresové odezvy a genů pro fotosyntézu. Celkově lze konstatovat, že zkoumané půdy mají ve srovnání s půdami v mírnějších klimatických podmínkách nižší bakteriální diverzitu s častým výskytem proteobakterií, aktinobakterií a i sinic.

Komentovaný článek názorně ilustruje, jak nové metody sekvenování a zpracování získaných sekvencí ovlivňují environmentální metagenomové studie. Původně metagenomové studie spoléhaly na klonování a následný screening získaných klonů, který – jak již bylo uvedeno výše - může být založený na sekvenování, nebo na funkční detekci klonovaných genů. „Klasický“ sekvenační přístup předpokládá určitou znalost sekvencí/genů, které jsou detekovány za použití primerů nebo sond. Pyrosekvenování vnáší do tohoto procesu novou kvalitu.

Pyrosekvenování, nebo také 454 sekvenování (název odvozený od společnosti „454 Life Science“), technika vyvinutá v roce 1996, se zásadně liší od dosud nejrozšířenější metody sekvenování, tzv. Sangerovy metody, která spočívá na principu náhodného ukončení syntézy sekvenovaného řetězce DNA zabudováním jednoho ze čtyř dideoxynukleotidů. Pyrosekvenování je založeno na detekci pyrofosfátu uvolněného při zabudování každého nukleotidu při syntéze sekvenované DNA. Hlavní rozdíl/inovace této metody ale je v objemu dat generovaném touto metodou. Veškerá zkoumaná DNA (genomová nebo metagenomová) je nastříhána a získané fragmenty jsou pomocí adaptéru navázány po jednom na kuličky. Po amplifikaci DNA jsou kuličky s jednořetězcovou DNA umístěny do pikotitračních jamek nosiče (podobně jako u mikročipů) a začne vlastní sekvenování, kdy je přidáván vždy jen jeden nukleotid (spolu s ostatními potřebnými chemikáliemi a enzymy) a případná emise světla, ke které dojde při každém zabudování nukleotidu, je zaznamenána kamerou. Jedním z hlavních limitů této metody (společným i pro ostatní tzv. „next generation“ sekvenační systémy/metody) byla délka získaných sekvencí, která při objevení této metody sekvenování začínala na několika desítkách párů bází, v současné době však již dosahuje 500-700 bp, což je stále kratší než u Sangerovy metody (ta dosahuje až 900 bp), dá se však předpokládat, že se bude i nadále prodlužovat. Tato nevýhoda je však více než vyvážena množstvím dat, které je možné získat díky možnosti paralelního sekvenování během jedné reakce. Nové systémy umožňují sekvenovat i několik set tisíc úseků DNA zároveň, takže výsledkem je získání sekvencí o celkové velikosti několika desítek milionů bp během jedné sekvenační reakce. Kromě toho tato metoda nevyžaduje kolonování zkoumané DNA a takto se vyhýbá mnoha úskalím, které jsou spojené s tímto krokem metagenomového přístupu.

Je logické, že generování takového množství dat vyžaduje i nové, velice efektivní a rychlé metody zpracování těchto dat. Jednou z možností je využití

metagenomového serveru RAST (MG-RAST) založeného v roce 2007. Server umožňuje zpracování a analýzu dat metagenomových souborů v rozsahu mega až terabází. Po vložení dat na server následuje kontrola jejich kvality podle zvoleného „filtru“, zkontrolovaným datům je přiřazeno přístupové číslo a jsou zařazeny do „fronty“ na anotaci. Malé soubory jsou zpracované během několika hodin, zpracování velkých souborů může zabrat i více týdnů. Program hledá podobnosti v databázi proteinů a nukleových kyselin (pro sekvence podobné sekvencím 16S a 18S), na základě kterých jsou vytvořeny anotace sekvencí.

Na podobném principu pracuje program MEGAN (MEtaGenome ANalyzer). Data, která mají být zpracována tímto programem, je nutné nejprve srovnat s vybranou databází (například pomocí algoritmu BLASTX s NCBI-NR databází) a zkoumané sekvence i s BLASTX výsledky importovat do programu MEGAN, který pak provede/vypočítá taxonomickou a případně i funkční klasifikaci. K tomuto účelu může použít – podobně jako výše zmíněný MG-RAST – například databázi SEED. Kromě toho je možné do programu MEGAN vložit pro srovnání i více souborů sekvencí.

Databáze SEED umožňuje kategorizaci množství dat získaných v předchozích programech. Znamená to, že data s významnou GenBank afiliací jsou v SEED databázi za použití subsystémového přístupu seřazena/utříděna podle předpokládaných funkcí do příbuzných biologických procesů. Databáze SEED umožňuje rychlou a spolehlivou anotaci metagenomových sekvencí podle podobnosti s dříve popsány genovými produkty. Základním principem databáze SEED je to, že klíčem ke zlepšení anotací kvanta metagenomových dat je anotace jednotlivých subsystémů experty specializovanými na jednotlivé subsystémy na rozdíl od dřívější praxe, kdy jeden odborník prováděl anotaci všech genů zkoumaného genomu. Každý takový odborník pak provádí anotaci „svého“ subsystému ve velké kolekci genomů (nebo celého metagenomu). Tento přístup vede k zpřesnění a zkvalitnění všech anotací. Subsystémem pak rozumíme soubor funkčních rolí, které dohromady realizují určitý biologický proces nebo strukturální komplex. Subsystémem můžeme rozumět generalizaci termínu „dráha“ (Overbeek et al., 2005).

Jedním z významných úskalí všech metod založených na PCR je možná přítomnost chimér v databázích. Tento problém řeší u 16s sekvencí databáze Greengenes, která umožňuje provést kontrolu na přítomnost chimér. Je schopná data srovnat podle sekvencí a přiřadit jednotlivým sekvencím taxonomickou klasifikaci za použití různých publikovaných taxonomií.

Můžeme tedy konstatovat, že nástup sekvenačních metod nové generace s sebou přinesl i nové přístupy k environmentálním a především metagenomovým studiím. Kromě nových metod analýzy dat stručně zmíněných výše, umožnilo pyrosequenování za určitých předpokladů obejít časově i finančně náročný krok tvorby environmentálních knihoven. Především v případě, že účelem studie je „pouhé“ určení diverzity zkoumaného společenstva, případně porovnání více společenstev, je možné po extrakci RNA/DNA provést přímo její sekvenování. Získaná data nám umožní ohodnotit diverzitu zkoumaného společenstva a posoudit jeho (potenciální) aktivity, pokud by však účelem byla detekce nových zajímavých metabolických drah nebo bioaktivních produktů, úspěch by při současných technických možnostech závisel především na povaze hledaného genu nebo produktu, na úrovni jeho genetických znalostí a databází sekvencí. Funkce genu nemusí být na první pohled z jeho sekvence patrná.

Avšak i přes významný pokrok všech metod a především samotného sekvenování, není stále reálné získat ucelené sekvence celého půdního metagenomu. I přes donedávna nemyslitelné možnosti pyrosequenování není příliš reálná představa sestavení ucelených mikrobiálních genomů z jednotlivých kontigů získaných při přímém sekvenování půdního metagenomu. Správnému propojení jednotlivých kontigů z jednoho mikroorganismu brání podobnosti v mikrobiálních geomech – podobné, či téměř totožné metabolické dráhy, snadný přenos genetické informace mezi mikroorganismy (horizontální transfer genů). Stejně tak je i nereálná představa vytvoření dostatečně velké klonové knihovny toto umožňující (obsahující celý genom zvláště u představitelů minoritních mikrobů). Handelsman *et al.* (1998) odhadli, že pro reprezentativní pokrytí půdní mikrobiální komunity by bylo třeba vytvořit knihovny s  $10^7$  plasmidy o průměrné velikosti inzertů 5 kb, nebo  $10^6$  u BAC klonů o průměrné velikosti 100 kb. A to vše ještě za předpokladu, že všechny druhy jsou v půdě stejně zastoupené, což v žádném případě neodpovídá skutečnosti. Proto k dosažení reprezentace i vzácných organismů by bylo třeba 100-1000 násobné pokrytí metagenomu v knihovně (Reisenfeld *et al.*, 2004), což odpovídá 10.000 Gp, nebo  $10^{11}$  BAC klonů (Kakirde *et al.*, 2010). Tato čísla jsou stále nad veškeré možnosti současných molekulárněbiologických metod.

#### 4. Přínos vlastní vědecké práce

Po celou dosavadní činnost, ať už ve výzkumné skupině prof. Wellington na Univerzity of Warwick, nebo na současném pracovišti mikrobiologie ÚEB MU, byla stěžejním tématem naší práce mikrobiální ekologie se speciálním zaměřením na půdní prostředí. Již naše první práce, *Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients* (Heuer et al., 1997) řeší problematiku detekce významné skupiny půdních (a nejen půdních) mikroorganismů, aktinobakterií, které jsou známy produkcí nejširšího spektra sekundárních metabolitů využívaných v nejrůznějších sférách lidské činnosti. V práci jsme publikovali ve své době velmi ojedinělé PCR primery specifické pro tyto bakterie, o jejichž významu svědčí fakt, že jsou úspěšně využívány do dnešních dnů. Dalším neméně významným přínosem byla inovativní metoda detekce minoritních populací za použití již zmíněných specifických primerů a hnízdové PCR, která při využití DGGE umožňuje vizualizovat minoritní populace a určit jejich zastoupení v mikrobiálním společenstvu studované lokality. Tím se naše metoda významně odlišuje od jiných publikovaných metod využívajících hnízdové PCR. O přínosnosti této naší publikace svědčí i počet jejich citací přesahující v současné době 600.

Druhá práce vznikající souběžně s první publikovanou prací, *Comparison of different methods for the isolation and purification of total community DNA from soil* (Krsek a Wellington, 1999) se věnuje základnímu problému většiny molekulárních ekologických studií, tj. izolaci mikrobiální R/DNA ze studovaného prostředí. Zařazuje se tak po bok množství podobných článků neustále publikovaných v nejrůznějších odborných periodikách. Od většiny těchto publikací se však výrazně liší tím, že jeden po druhém analyzuje jednotlivé kroky při izolaci R/DNA a hodnotí jejich vliv na kvalitu i kvantitu izolovaných nukleových kyselin. Pokud je nám známo, jde o naprosto ojedinělý přístup a uváděné výsledky mohou výrazně přispět k optimalizaci mnoha jiných publikovaných metod a být vodítkem při odstraňování možných problémů při izolaci mikrobiální DNA z environmentálních vzorků za použití nejrůznějších metod, včetně komerčních kitů. Podobně přínosná byla i naše prezentace na konferenci SGM na Univerzity of Warwick v roce 2006 zabývající se jednotlivými kroky při tvorbě metagenomových knihoven (především metodami izolace DNA o vysoké molekulové hmotnosti), tato však bohužel nebyla publikována v žádném odborném periodiku.

Další významný výsledek naší výzkumné činnosti potvrzený ve více našich publikacích (Krsek a Wellington, 1999, 2001) je rozdílná citlivost PCR primerů k čistotě izolované DNA. Opakovaně jsme se setkávali se situací, že tentýž vzorek DNA dal PCR produkt při použití univerzálních 16s rDNA primerů, avšak při použití primerů pro funkční geny byl výsledek PCR reakce negativní. Různá citlivost byla však potvrzena i mezi primery pro 16s rDNA geny. Na první pohled by se mohlo zdát, že se nejedná o nijak významné zjištění. Vezmeme-li však v úvahu, jak často se například přítomnost či nepřítomnost nějakého mikroorganismu (často patogenního) hodnotí právě pouze pomocí výsledku PCR reakce (pozitivní/negativní), jedná se o zjištění naprosto zásadní s možnými dalekosáhlými důsledky. Tento fakt – tedy různá citlivost PCR primerů k inhibitorům přítomným v extrahované R/DNA – je však v literatuře naprosto pomíjený a zasloužil by si mnohem větší publicitu.

Z ekologického hlediska považujeme za významné také zjištění negativního vlivu aplikace kalů z čistíren odpadních vod na diverzitu půdních mikrobiálních společenstev (Metcalfé et al, 2002a), které je nutné brát v úvahu při aplikaci těchto materiálů na zemědělskou půdu.

Konečně je třeba zmínit naši publikaci studující tok rostlinných asimilátů z rostlin do půdního prostředí, která potvrdila významnou roli mykorhizních hub v transportu asimilátů z rostlin do půdního prostředí a v neposlední řadě schopnost půdních mikroarthropod narušit tento transport konzumací mycelia mykorhizních hub (Johnson et al, 2005). Jde o pionýrskou studii jasně demonstrující provázanost všech forem života v biosféře. Jedná se také o příklad využití techniky stabilních izotopů ke studiu složitých environmentálních pochodů.

## 5. Závěr

Jak vyplývá z celé naší práce, možnosti molekulárních metod jsou téměř nevyčerpatelné. To, co se před několika lety zdálo být nepřekonatelnou překážkou, se dnes stává rutinní záležitostí. Například i výše zmíněné sestavování ucelených genomů jednotlivých organismů z metagenomových knihoven se dnes již nejeví tak nemožné. Nové metody jako „single cell analysis“ (například Stepanauskas 2012) a „single cell genomics“ (Wang a Bodovitz, 2010) spolu s novými metodami amplifikace DNA založenými na jiných metodách než PCR – např. metoda „multiple displacement amplification“ (Spits et al., 2006) – umožňují analýzu mRNA i další analýzy z velké rodiny metod „omics“, jako proteomics, metabolomics z jednotlivých buněk i sestavení jejich (téměř) uceleného genomu. Toto se samozřejmě týká jak kultivovatelných, tak i tzv. vitálních, ale nekultivovatelných buněk. Všechny tyto i další výtobytky moderních molekulárních metod před námi otevírají neuvěřitelné bohatství genetické informace, z něhož bude lidstvo těžit po mnoho následujících desetiletí. Proto máme pocit, že ukončit naši práci vyslovením jakýchkoliv závěrů (kromě nedozírných možností i výzev, které před námi nové molekulární metody otvírají) by bylo nejen předčasné ale i velice nerozumné.