



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

Bi6420

Ekotoxikologie mikroorganismů

<https://is.muni.cz/el/1431/jaro2012/Bi6420/index.qwarp>

Doc. RNDr. Jakub Hofman, Ph.D.

hofman@recetox.muni.cz

jaro 2012



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Inovace tohoto předmětu je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

Bi6420: Ekotoxikologie mikroorganismů

Část 4: Sledované parametry mikrobiální ekotoxikologie a působení toxických látek na ně



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Inovace tohoto předmětu je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

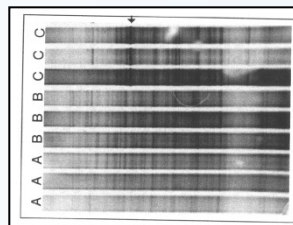


Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

Diverzita mikroorganismů v ekotoxikologii



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Inovace tohoto předmětu je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

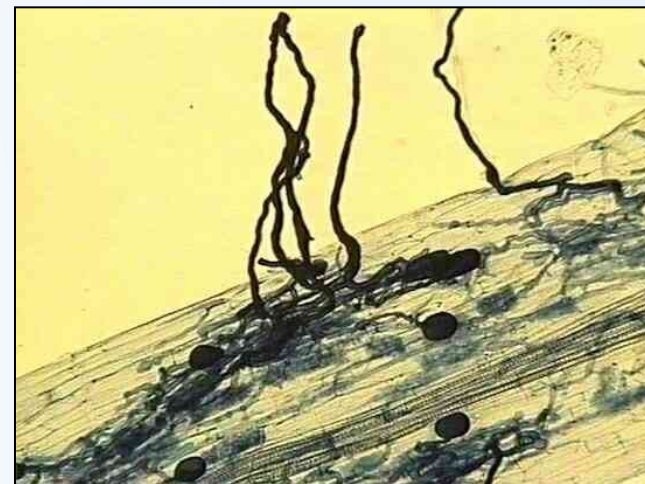
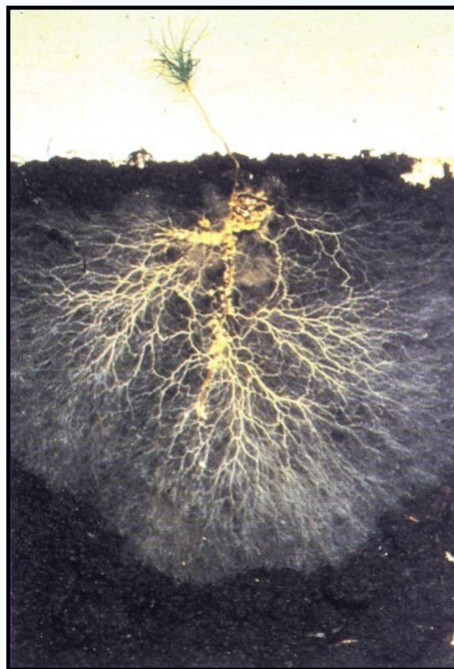
Společenstva mikroorganismů

Společenstva mikroorganismů

= složitý systém vazeb mezi sebou i s okolním prostředím

Hlavní mechanismy mezi- a vnitrodruhových procesů:

- kooperace (u mikroorganismů nejčastěji substrátová)
- kompetice (antibiotika)
- symbiózy s rostlinami (jsou často sledovány jako eko(toxiko)logický endpoint)



Společenstva mikroorganismů

Příklad – mikrobiální společenstva půd – dominují tři skupiny mikroorganismů

| charakteristika | bakterie | aktinomycety | houby |
|---|--|--|-------------------------------|
| populace | nejčetnější | středně početné | nejméně početné |
| biomasa | bakterie a aktinomycety mají stejnou biomasu | | nejvyšší biomasa |
| buněčná stěna | murein, teikoové kyseliny, lipopolysacharidy | murein, teikoové kyseliny, lipopolysacharidy | chitin nebo celulóza |
| kompetitivita pro jednoduché org.slouč. | nejkompetivnější | nejméně kompetivní | středně kompetivní |
| tolerance k vlhkosti | nejméně tolerantní | středně tolerantní | nejvíce tolerantní |
| optimální pH | 6-8 | 6-8 | 6-8 |
| pH pro kompetici | 6-8 | >8 | <5 |
| půda pro kompetici | všechny typy půd | dominují v suchých půdách s vysokým pH | dominují v půdách s nízkým pH |

Selekce a strategie

Hlavní hybatele evoluce: selekce, diverzita, sukcese

Strategie a selekce: r a K strategové

Během studia mikrobiálních společenstev bylo prokázáno, že mikroorganismy praktikují buď jednu, či druhou strategii.

| Kritérium | r - strategové | K - strategové |
|--------------------------|--|---|
| Růst společenstva | Rychlý, vysoká reprodukce, „growers“ | Mírný, konzervativní, „non-growers“ |
| Ekologické zařazení | Zymogenní, kolonizace nových prostředí, generalisti | Autochtonní, přežívají v diverzifikovaném společenstvu, specialisti |
| Využití substrátu | vysoké nároky na živiny, nižší schopnost využití | průměrné nároky na živiny, vyšší schopnost využití substrátu |
| Strategie | Růst, jinak ne příliš schopní kompetice | Pečlivé využití zdrojů a specializace |
| Substrátová diversita | jednoduché, lehce dostupné | komplexní různorodé substráty |
| Dominantní morfologie | malé buňky, rozptýlené mycelium, fenotypově plastické | velké buňky, složitá, vyvinutá mycelia, fenotypově monomorfní |
| Způsoby reprodukce | jednoduchá, malá výměna genetické informace | komplexnější výměna genetického materiálu |
| Populační dynamika | prudký nárůst, nezávislé na hustotě, vysoká míra migrace, časté nové kolonie | prostorová kompetice, malá migrační tendence |
| Tolerance k přesahu niky | vysoká | nízká |

Lze stanovit např.:

- jejich podíly na substrátem indukované respiraci (SIR)
- lze inhibovat r strategý v pokusech s minimálním přídatkem substrátu (např. acetát)

Biodiverzita

- je funkcí ekosystému (ekosystém má mnoho/málo nik ==> biodiverzita je velká/malá)

Nerovnováha: ekosystém má mnoho nik a ty nejsou zaplněny (např. ve zničených či stresovaných ekosystémech)

Stabilita: stabilní vztahy mezi populacemi, uvnitř populací a mezi organismy a prostředím

Stability je většinou dosaženo na konci sukcese (nebo pravdivěji v jejím subfinálním stádiu)

Diverzita = rovnoměrnost rozložení jedinců do skupin = informace

Větší diverzita = větší "pool" informací (strategií, enzymů, genomů ...) = menší energie nutná na udržení celku = vyšší stability

Specifika mikroorganismů: různé druhy a rody mohou zastávat podobné funkce (větší smysl má tedy funkční než taxonomická diverzita)

Vysoká diverzita zajišťuje stabilitu ekosystému

Pokud je zásah, je tolerance vyšší u diverzifikovaného společenstva

Často má inverzní vztah s produktivitou

2 možné scénáře

Málo druhů
Hodně jedinců

Hodně druhů
Málo jedinců

Diverzita

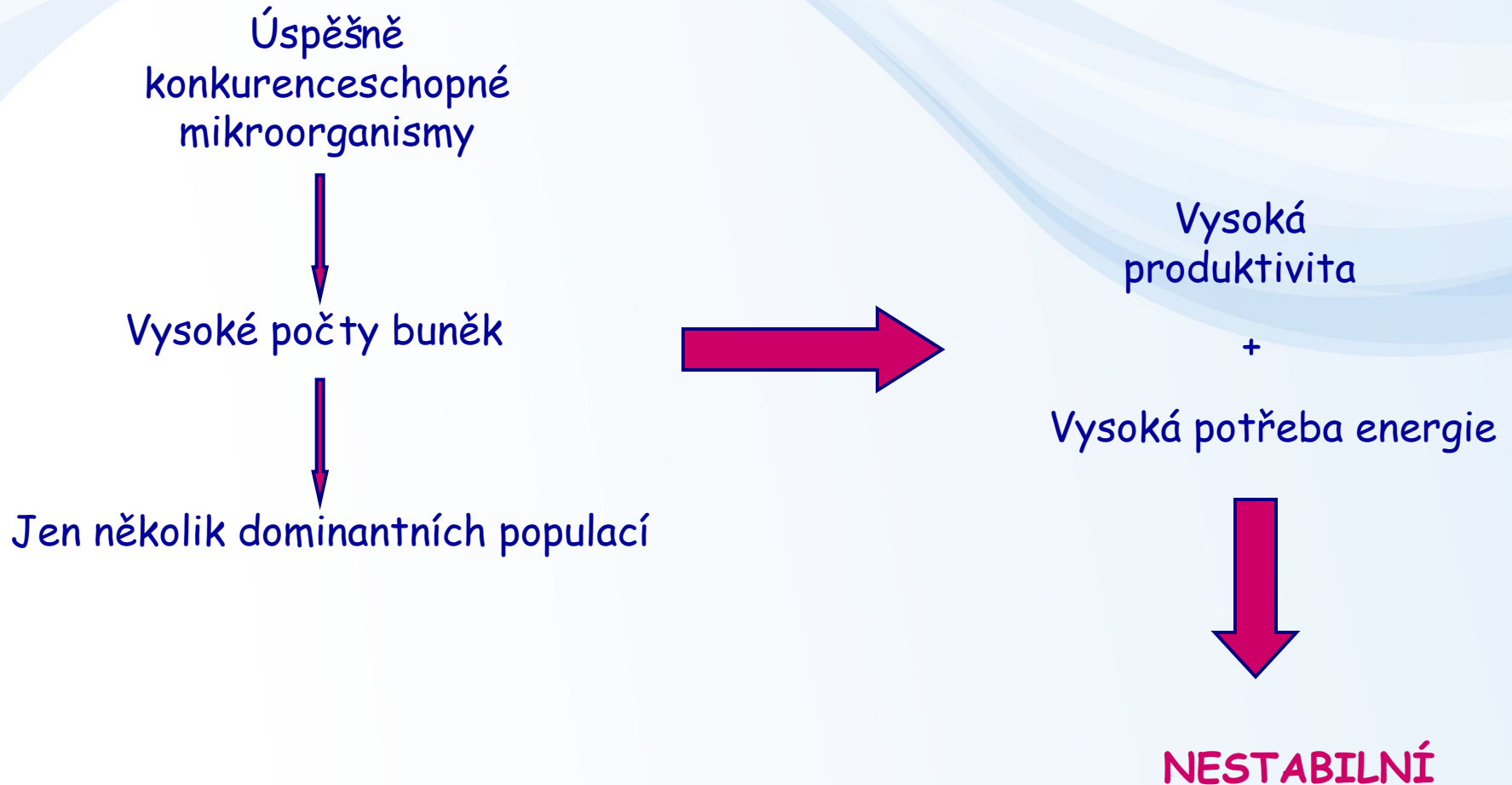
Nízká

Vysoká

Pozn: uvažujeme zatím pouze druhovou diverzitu

Biodiverzita mikroorganismů

Malá druhová diverzita



Biodiverzita mikroorganismů

Vysoká druhová diverzita

Vysoká druhová
bohatost
(= je hodně druhů)

↓

Méně jedinců

↓

Komplexní struktura



Menší energetické nároky

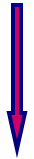


STABILNÍ SPOLEČENSTVO

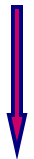
Biodiverzita mikroorganismů

Malá druhová diverzita – relevance k environmentálním zásahům

Upřednostněn je rychlý
růst několika málo
druhů

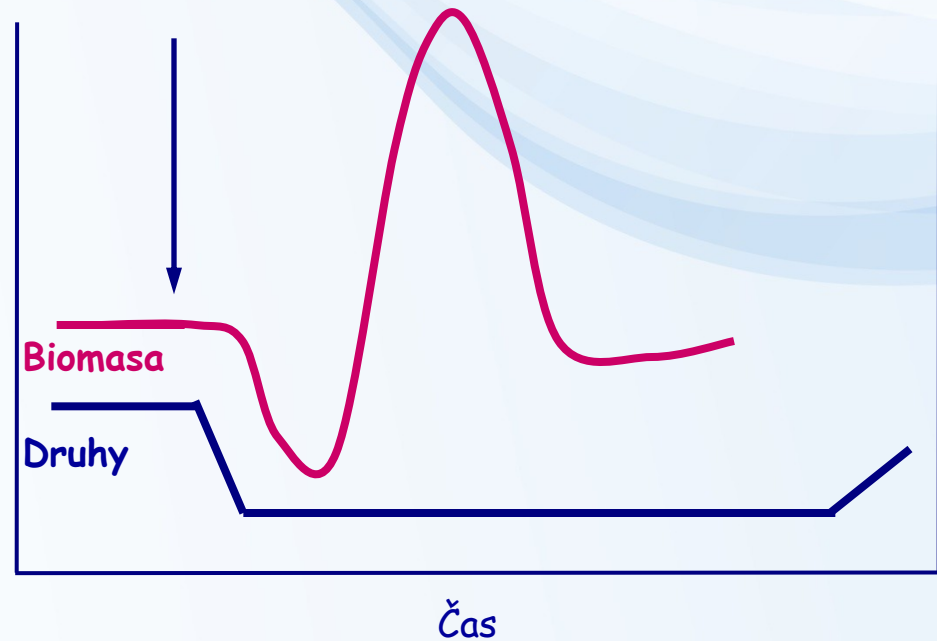


Vysoká spotřeba energie



Vývoj jednoduchého
společenstva

Environmentální změna



Biodiverzita mikroorganismů

Co kontroluje biodiverzitu?

1. Ekosystémy, kde jsou to fyzikálně – chemické faktory prostředí: např. kyselá rašeliniště, horké prameny, pouště, znečištěné půdy ...

= specializované ekosystémy, kde je jeden faktor určující (tzv. variant)

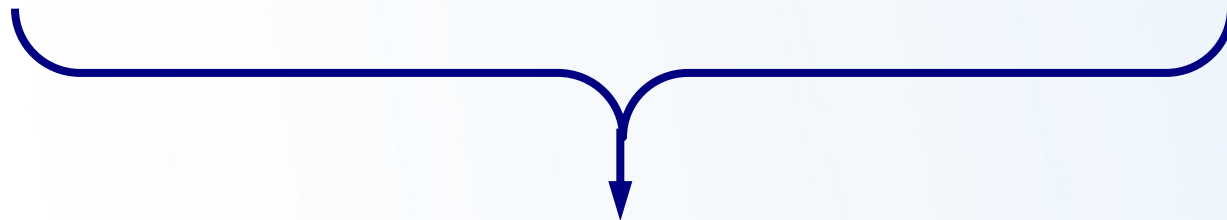
Malá diverzita
prostředí



Adaptace



Nejvyšší priorita
= přežít



Nízká druhová diverzita

Biodiverzita mikroorganismů

Co kontroluje biodiverzitu?

2. Ekosystémy, kde jsou to biologické faktory



Přirozený stav pro mikrobiální společenstva je vysoká diverzita

- je snižována stresem a negativními zásahy, kdy se „vyhraňují“ vlastnosti prostředí (ad 1)

→ biodiverzita mikroorganismů je ideální mírou biologické kvality systému

- vyjadřování diverzity
- lze použít stejné indexy, jen místo druhů budou např. funkční skupiny mikroorganismů a místo jedinců biomasa ...

Table 6.1
Examples of diversity indices

Species richness (d)

$$d = \frac{S-1}{\log N} \quad \text{where } S = \text{number of species}$$

$N = \text{number of individuals}$

Shannon-Weaver index of diversity (H)

$$\bar{H} = \frac{C}{N} (N \log N - \sum n_i \log n_i)$$

where $C = 2.3$

$N = \text{number of individuals}$

$n_i = \text{number of individuals in the } i^{\text{th}} \text{ species}$

Evenness (e)

$$e = \frac{\bar{H}}{\log S} \quad \text{where } \bar{H} = \text{Shannon-Weaver diversity index}$$

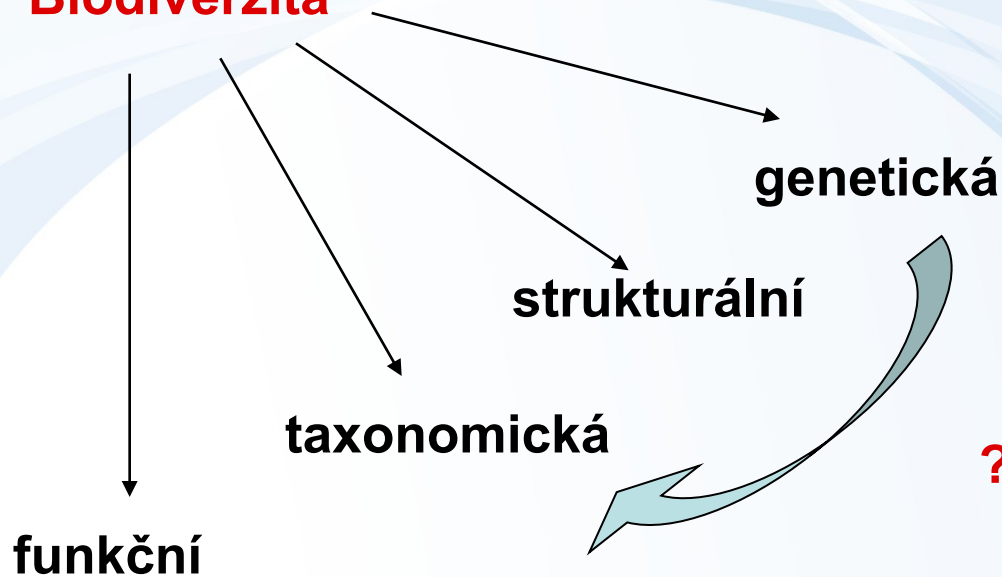
$S = \text{number of species}$

Equitability (J)

$$J = \frac{\bar{H}}{H_{\max}} \quad \text{where } \bar{H} = \text{Shannon-Weaver diversity index}$$

$H_{\max} = \text{theoretical maximal Shannon-Weaver diversity index for the population examined—assumes each species has only one member.}$

Biodiverzita



?? interpretace ??

?? kvantitativní míry ??

?? vzájemné vztahy markerů ??



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

Analýzy lipidů: biomarkery a diverzita



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Inovace tohoto předmětu je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky



Analýza lipidů: biomarkery a diverzita

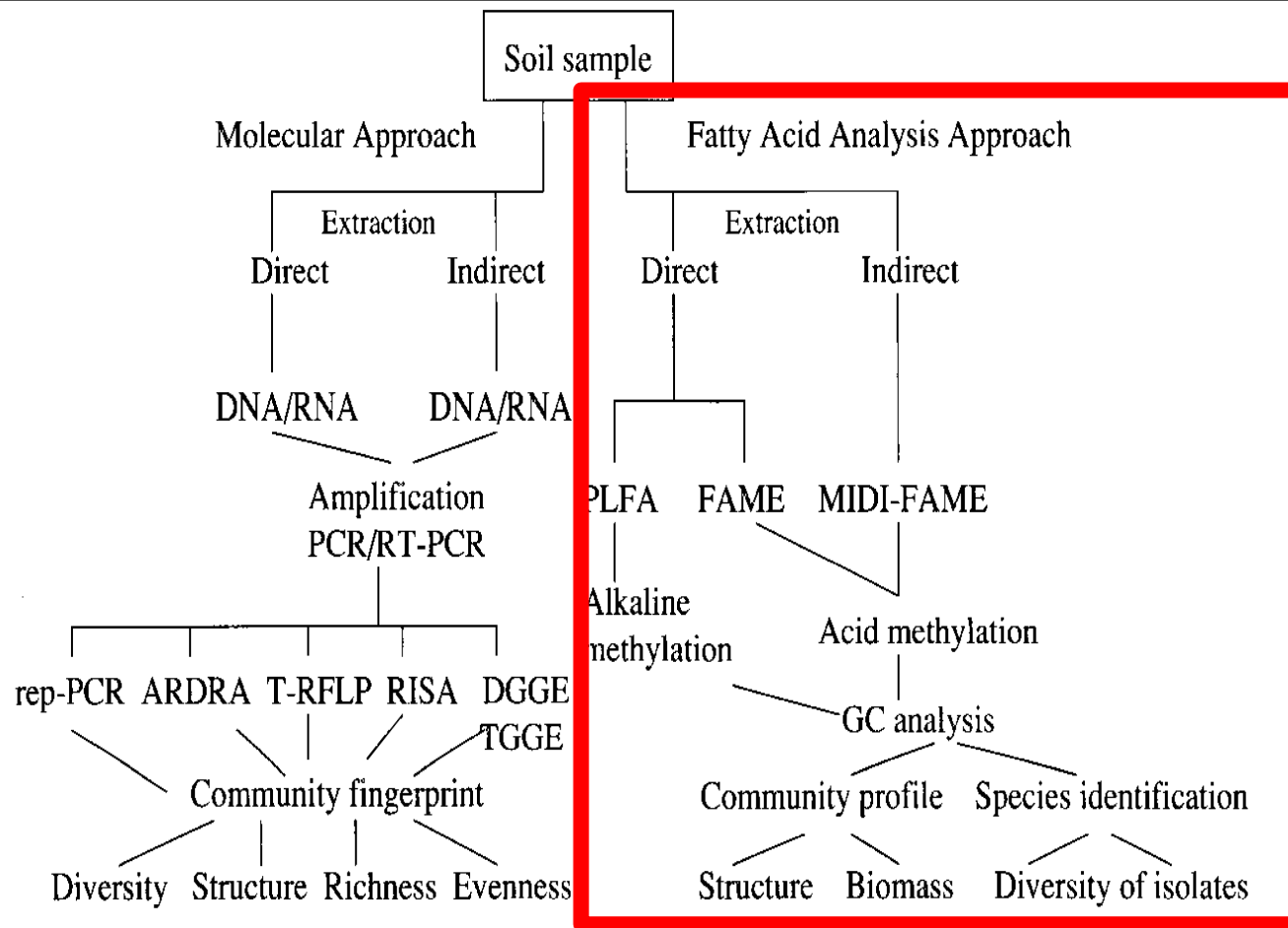


Fig. 1. Current approaches available for microbial community fingerprinting in soil perturbed with chemicals. The plot presents techniques that are discussed in this review.

Analýza lipidů: biomarkery a diverzita

- lipidy buněčných membrán jsou tak specifické, že mají povahu až biomarkerů ==> **SLB - signature lipid biomarkers**
- každý mikroorganismus má charakteristický "pattern" složení lipidů, který může být užit jako diagnostický parametr

Příklad:

rod *Micrococcus* dle větvených nenasycených FA:

| | |
|--------------------------|-----------------------|
| C_{27}, C_{28}, C_{29} | <i>M. luteus</i> |
| C_{25}, C_{26}, C_{27} | <i>M. varians</i> |
| C_{30}, C_{31}, C_{32} | <i>M. sedentarius</i> |

Analýza lipidů: biomarkery a diverzita

- lipidy buněčných membrán jsou tak specifické, že mají povahu až biomarkerů ==> **SLB - signature lipid biomarkers**

- jsou velmi diverzifikované: několik skupin a v rámci nich jsou lipidy s mnoha strukturálními variacemi:

1) Jednu velkou skupinu tvoří mastné kyseliny vázané v původní makromolekule fosfolipidu esterovou vazbou (**EL-PLFA**):

a) nasycených PLFA (**SATFA** - saturated fatty acids)

b) mono-nenasycených (**MUFA** - mono-unsaturated fatty acids)

c) vícenásobně nenasycených (**PUFA** - poly-unsaturated fatty acids)

d) hydroxy-substituovaných (**PLOH**)

2) Druhou velkou skupinu tvoří mastné kyseliny vázané v původní makromolekule přes neesterovou vazbu (**NEL-PLFA**):

a) **UNSFA** - nasycené i nenasycené mastné kyseliny a hydroxy-substituované (**UNSOH**)

Konkrétní sloučeniny mastných kyselin jsou stanovovány stejné v obou frakcích, tedy EL-PLFA i NEL-PLFA. Liší se tedy pouze způsobem navázání v molekule fosfolipidu.

UNSFA tedy zahrnují stejné molekuly jako SATFA+MUFA+PUFA, pouze místo karboxylového konce, mají jiné zakončení pocházející z hydrolýzy neesterové vazby.

Analogicky totéž platí pro PLOH a UNSOH.

Analýzy lipidů - názvosloví

- základní část vlastního názvosloví tvoří poměr $X:Y$, kde X je počet uhlíků v řetězci kyseliny a Y značí stupeň nenasycenosti, tedy počet dvojných vazeb v makromolekule
- pozice dvojných vazeb je pak číslo v závorce s tím, že pokud je u něj c , respektive t , znamená to *cis*, respektive *trans* konfiguraci
- písmeno n znamená normální nevětvený řetězec
- zkratka br znamená rozvětvenou molekulu o methylovou skupinu
- písmena i a a pak znamenají *iso* a *anteiso* pozici methylové skupiny
- písmeno p či p následováno číslem znamená pozici methylové skupiny od karboxylového konce molekuly
- cyklopropylové skupiny na PLFA mají v názvosloví zkratku cy
- pozice hydroxy skupiny v řetězci je vyznačena jako α , β od karboxylového konce, či od alifatického konce řetězce symbolem ω následovaným číslem, například $\omega-1$
- písmeno d znamená dikarboxylové mastné kyseliny

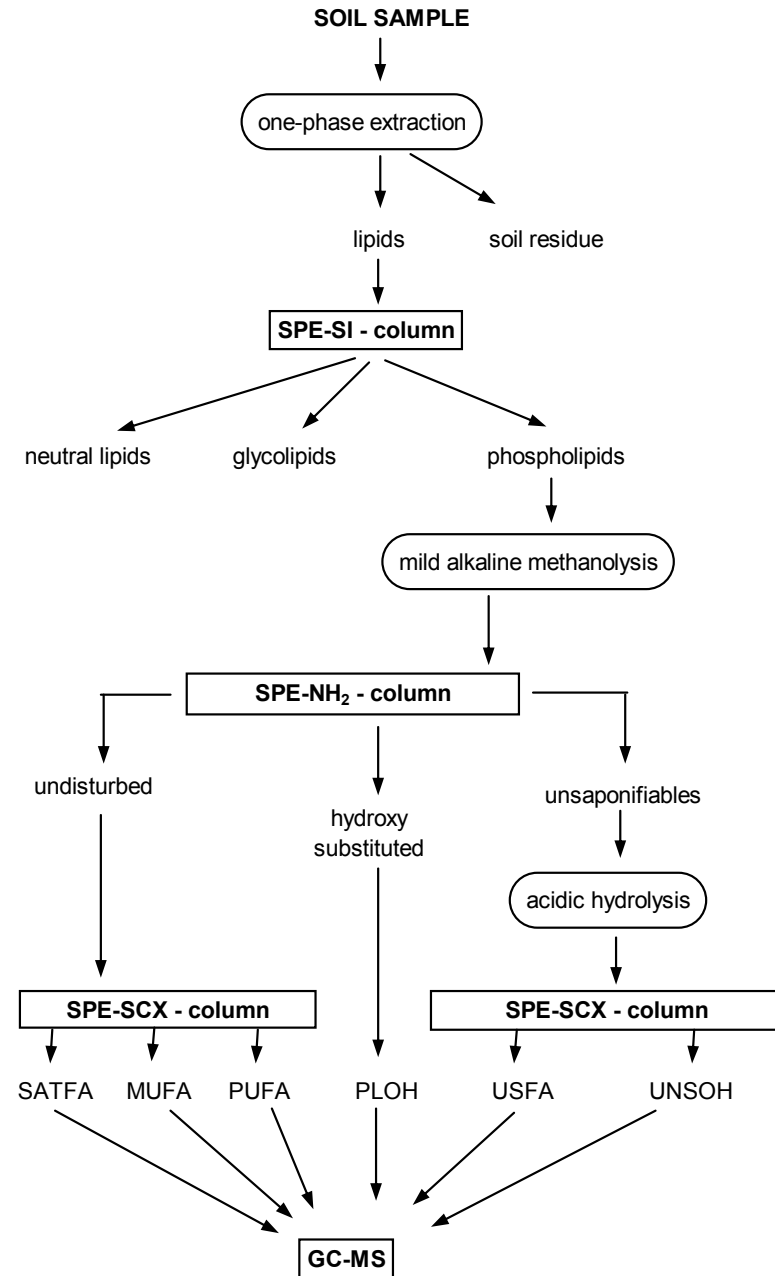
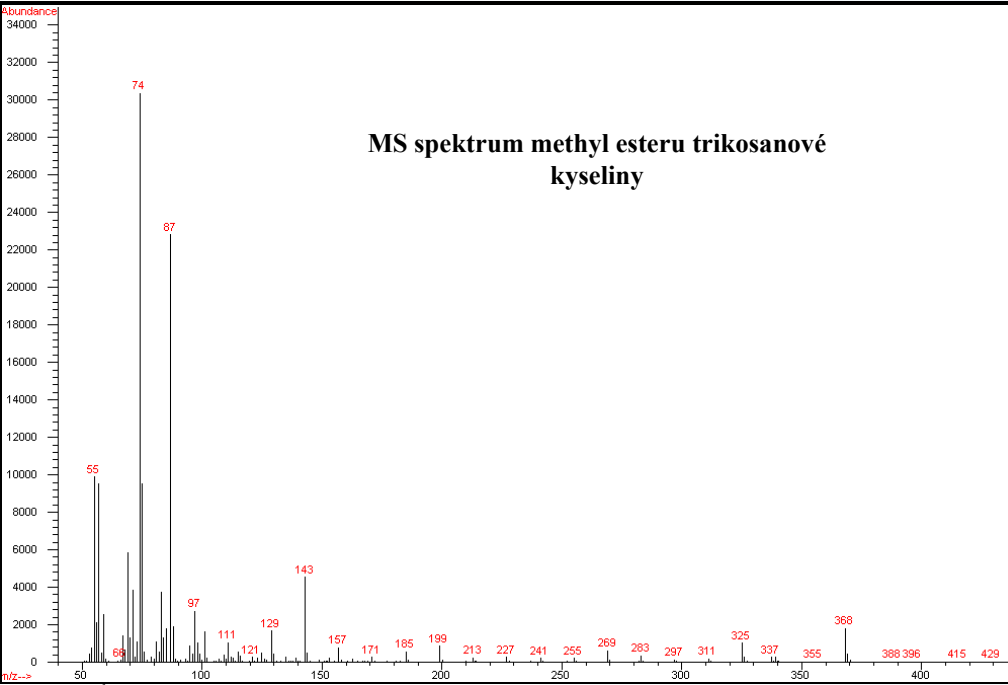
Analýza lipidů: biomarkery a diverzita

Analýzy lipidů - analýza

- složitá separace a extrakce; esterifikace na FAME

- analytická koncovka je GC-MS: na základě MS je identifikována mastná kyselina a na základě retenčního času pak již může být rutinně analyzována

- existují knihovny FA pro MS



Analýza lipidů: biomarkery a diverzita

Analýzy lipidů - PLFA jako biomarkery

- informují o složení mikrobiálního společenstva:

| | |
|--|---------------------------------|
| větvené PLFA | typicky bakteriálního původu |
| PUFA, zejména 18:2 | charakteristické pro Eukaryota |
| suma relativní abundance iso a anteiso izomerů 15:0 větvených PLFA | reprezentují bakterie |
| poměr mezi iso(anteiso) 15:0 větvenými PLFA a 16:0 větvenými PLFA | = relativní zastoupení bakterií |
| 18:2 ω FA | = houby |

- poskytují ale i další informace:

| | |
|---|--|
| poměr cis a trans izomerů MUFA | pokud vyšší než 1 může značit strádání či env. stres |
| poměr nasycených / nenasycených | indikace stresu |
| poměr cyklopropyl FA / jejich monoenoic prekursory | |
| poměr iso 15:0 / anteiso 15:0 a iso 17:0 / anteiso 17:0 | |

Analýza lipidů: biomarkery a diverzita

Analýzy lipidů - PLFA jako biomarkery

Table 2
Marker fatty acids (FAs) of selected microbial groups inhabiting soil ecosystem

| Microbial group | Fatty acids (FAs) | Source |
|---|---|--|
| Gram-negative bacteria | OH FAs (usually 3 OH) monounsaturated FAs (e.g. 16:1w7t, 16:1w5c, 18:1w7) cy17:0, cy19:0 | Cavigelli et al. (1995) Zelles (1999a), Zelles (1999b) |
| Gram-positive bacteria <i>Actinomycetales</i> | Iso- and anteiso FAs (e.g. i15:0, A15:0, i16:0, i17:0, a17:0) 10 Me FAs (e.g. 10 Me16:0, 10 Me17:0, 10 Me18:0) 16:1w5c | Pennanen et al. (1998), Zelles (1999a,b) Frostegård et al. (1993), Kelly et al. (1999) Frostegård et al. (1993), Kelly et al. (1999) |
| <i>Cytophaga</i> – <i>Flavobacterium</i> – <i>Bacteroides</i> <i>Pseudomonas</i> | FAs with odd number of C 16:0 and 16:1w7c (equiv. proportions), 18: 1w7c/w9t/w12t FAs with even number of C a15:0 and a17:0 (high proportions) 16:1w5c (in arbuscular fungi) | Olsson and Persson (1999) Haack et al. (1994) |
| <i>Arthrobacter</i> Fungi | 1 8:2w6,9c 18:1w9c, 20:4 23:0, 25:0, 21:0 | Olsson and Persson (1999) Haack et al. (1994) Olsson (1999) Frostegård et al. (1993, 1996) |
| Eukaryotic algae and <i>Protozoa</i> | Polyunsaturated FAs (e.g. 16:1w4, 16:3, 18:4w3, 20:4, 20:5, 22:6) | Lindahl et al. (1997) Zelles (1999b) Findlay (1996), Frostegård et al. (1997) |

Analýza lipidů: biomarkery a diverzita

Table 1. Common phospholipid biomarkers and their interpretations

| Indicator | Interpretation | Origin of Sample | Source | Comments |
|---------------------------------------|------------------------------------|-----------------------|-------------|---|
| Polyunsaturates | * Microeukaryotes | Isolates | [23, 32] | Do not occur in bacteria |
| 18:2w6c (12:26:9) | * Fungi | Isolates | [39] | |
| 10Me18:0 | * Actinomycetes | Isolates | [21] | |
| 18:3, 20:3, 20:4, 16:1w5c | * Mycorrhizae | Isolates | [27] | |
| Branched (i, a, Me) | * Gram-positive bacteria | Isolates | [17] | Also in Gram-negative bacteria |
| Cyclopropyl 17 & 19 | Aerobic bacteria | Sediment in microcosm | [30] | |
| | Anaerobic bacteria | Soil in microcosm | [13] | |
| | Starvation | Isolate | [14] | |
| Cyclo/precursor ratio | * Stress indicator | Isolate | [20] | High in acidic conditions, low O ₂ , and high temp |
| | | Isolates | [22] | High in late logarithmic and stationary growth phase |
| <i>trans/cis</i> ratio | * Stress indicator | Isolate | [36] | High in starved conditions |
| | | Isolates | [14] | High with starvation |
| | | Isolates | [19] | Ratio increased with desiccation in Gram-negative, but not Gram-positive bacteria |
| 18:1w8c | * Type II methanotrophs | Isolates | [5, 24, 25] | |
| | | Soil | [26, 31] | Enriched in soil exposed to methane |
| Monounsaturated 16 carbon fatty acids | * Type I methanotrophs | Isolates | [5, 24] | Not specific to Type I methanotrophs; very low occurrence in soil exposed to methane [25] |
| 10Me16:0 | <i>Desulfobacter</i> | Isolates | [7] | When not with 10Me18:0 |
| i17:1w7 | <i>Desulfovibrio</i> | 3 strains | [8] | |
| | <i>Desulfovibrio desulfuricans</i> | Isolate | [32] | Not found in sediments with known sulfate reduction (31) |
| 17:1w6 | <i>Desulfobulbus</i> | 3 strains | [29, 33] | |



Analýza lipidů: biomarkery a diverzita

Table 2. Ratios and sums of PLFA used in data analysis

Lordinální (pau)

| Name | Definition |
|--|---|
| Fungal/bacterial biomass (fung/bact) | $18:2\omega6c/i15:0 + a15:0 + 15:0 + i16:0 + 16:1\omega5c + i17:0 + a17:0 + 17:0cy + 17:0 + 18:1\omega7c + 19:0cy$ |
| Cyclopropyl 17/precursor (cy17/pre) | $17:0cy/16:1\omega7c$ |
| Cyclopropyl 19/precursor (cy19/pre) | $19:0cy/18:1\omega7c$ |
| Total monounsaturated/total saturated (mono/sat) | $14:1\omega5c + 15:1\omega6c + 16:1\omega7c + 16:1\omega5c + 17:1\omega9c + 18:1\omega9c + 18:\omega7c/12:0 + 13:0 + 14:0 + 15:0 + 16:0 + 17:0 + 18:0 + 20:0$ |
| Total hydroxy | $15:0\ 3OH + 16:1\ 2OH + 16:0\ 2OH + 18:0\ 2OH$ |

Analýza lipidů: biomarkery a diverzita



Table 1. Metal impact on selected phospholipid fatty acids (PLFAs) in forest humus in Scandinavia. The ratio between the relative abundance in metal rich soil to that of noncontaminated soil is given.

| Metal | PLFA | | | |
|---------------------------------------|---------|---------|---------|-----------|
| | i16:0 | br17 | br18 | 20:4 |
| Cd, Cu, Ni, Pb, or Zn ^{a)} | 0.8–2.3 | 1.5–4.4 | 1.2–1.9 | 0.02–0.06 |
| Mainly Cu ^{b)} | 1.7 | 2.9 | 3.5 | 0.07 |
| Cd, Cu, Pb, and Zn a.o. ^{c)} | 1.7 | 2.2 | 2.3 | 0.38 |
| Pb ^{d)} | 1.4 | 7.9 | 15.3 | 0.22 |

a) Laboratory study (20)

b) Field data, Harjavalta smelter, Finland (22)

c) Field data, Rönnskär smelter, Sweden (22)

d) Field data, naturally Pb-rich soil, Norway (Bååth, Díaz-Raviña, Bakken, unpubl. data)

Další indikátorové látky - biomarkery

ergosterol - houby (HPLC)

muramová a diaminopimelová kyselina - prokaryota (HPLC)

lipopolysacharidový lipid A mastné kyseliny a kyselina teichoová -
G- a G+ (GC/MS)

hydroxy FA, plasmalogeny a sfingolipidy - anaerobní populace
bakterií



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

Funkční diverzita - systém BIOLOG



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

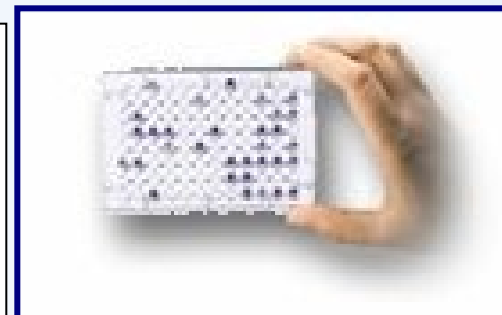
Inovace tohoto předmětu je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

Funkční diverzita – systém Biolog

- systém BIOLOG využívá jednoduchých uhlíkatých substrátů, které se většinou vyskytují přirozeně v půdním prostředí; tyto jsou v 96-jamkových mikrodestičkách spolu s barvivem a na základě schopnosti, či neschopnosti mikroorganismů využívat jednotlivé substráty vzniká specifický "fingerprint", který buď identifikuje mikroorganismus (**identifikační přístup**), nebo fyziologický potenciál společenstva (**funkční diverzita** - ekologický přístup)
- v prvním případě je použita monokultura, která je po izolaci identifikována pomocí mikrodestiček s 96 uhlíkatými substráty (barvivo je TTC ---> TPF; $\lambda=590$ nm) - GN2 Microplate™ a GP2 Microplate™ - **rutinní využití k identifikacím mikroorganismů v celé řadě oborů**
- druhý způsob využití, méně častý a poměrně nový, je přístup hodnocení diverzity mikroorganismů technikou **fyziologické profilace na úrovni společenstva** (CLPP - community level physiological profiles); pro tento účel byly vyvinuty BIOLOG EcoPlates™ - mikrodestičky, které obsahují 3 krát 31 vybraných uhlíkatých substrátů a jejichž schopnost profilovat metabolický "fingerprint" společenstva je využitelnější zejména pro statistické hodnocení (méně "proměnných")



Funkční diverzita – systém Biolog

- systémem BIOLOG je možné rychle a laboratorně nenáročně získat širokosubstrátový "fingerprint" izolovaných kultur, který umožňuje s pomocí v současné době nejrozsáhlejších databází (zahrnují více než 1900 mikroorganismů) jejich identifikaci
- identifikaci obstarává několik typů software od firmy BIOLOG, které na základě metabolického "otisku" bakterie identifikují o který druh se jedná
- systémy se liší cenou a vybavením - nejjednodušší verzí je **MicroLog 1™**, který obsahuje pouze prohledávač databází "fingerprintů", které se objednávají zvlášť dle potřeby (GP, GN bakterie, kvasinky apod.)

Srovnání:

databáze BIOLOG pro gram negativní bakterie obsahuje 501 aerobních druhů ×

- Bio Mérieux API 20E® & NFT obsahuje asi 180 aerobních druhů
- Bio Mérieux API 20E® GNI+ obsahuje 104 aerobních druhů

databáze BIOLOG pro gram pozitivní bakterie obsahuje 318 aerobních druhů ×

- Bio Mérieux Vitek® GPI obsahuje 49 aerobních druhů
- Bio Mérieux API® Staph, 20 Strep, & coryne asi 106 aerobních druhů

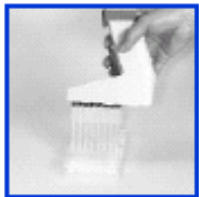
Funkční diverzita – systém BIOLOG



1. KROK: Izolace čisté monokultury na mediu od firmy BIOLOG a různá barvení a testy pro identifikaci testovacího protokolu (čas a teplota inkubace destičky).



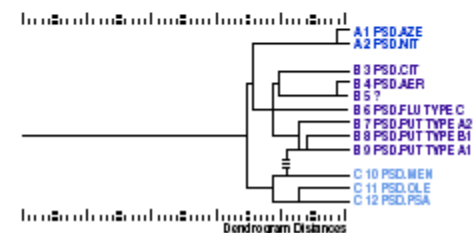
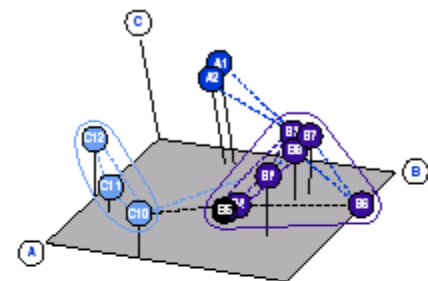
2. KROK: Příprava inokula o požadované hustotě.



3. KROK: Inokulace mikrodestičky a kultivace při daných teplotních podmínkách.



4. KROK: Identifikace "fingerpruntu" na mikrodestičce pomocí softwaru a datbázi BIOLOG.



Funkční diverzita – systém Biolog

GP2 MicroPlate™

| | | | | | | | | | | | |
|----------------------------|----------------------------------|----------------------|------------------------|--------------------|----------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|
| A1 Water | A2 α-Cyclodextrin | A3 β-Cyclodextrin | A4 Dextrin | A5 Glycogen | A6 Inulin | A7 Mannan | A8 Tween 40 | A9 Tween 80 | A10 N-Acetyl-D-Glucosamine | A11 N-Acetyl-D-Mannosamine | A12 Amygdalin |
| B1 L-Arabinose | B2 D-Arabitol | B3 Arbutin | B4 D-Cellobiose | B5 D-Fructose | B6 L-Fucose | B7 D-Galactose | B8 D-Galacturonic Acid | B9 Gentiobiose | B10 D-Gluconic Acid | B11 α-D-Glucose | B12 m-Inositol |
| C1 α-D-Lactose | C2 Lactulose | C3 Maltose | C4 Maltotriose | C5 D-Mannitol | C6 D-Mannose | C7 D-Melaxitose | C8 D-Melibiose | C9 α-Methyl D-Galactoside | C10 β-Methyl D-Galactoside | C11 3-Methyl Glucose | C12 α-Methyl D-Glucoside |
| D1 β-Methyl D-Glucoside | D2 α-Methyl D-Mannoside | D3 Palatinose | D4 D-Palucose | D5 D-Raffinose | D6 L-Rhamnose | D7 D-Ribose | D8 Salicin | D9 Sedoheptulosan | D10 D-Sorbitol | D11 Stachyose | D12 Sucrose |
| E1 D-Tagatose | E2 D-Trehalose | E3 Turanose | E4 Xylitol | E5 D-Xylose | E6 Acetic Acid | E7 α-Hydroxy Butyric Acid | E8 β-Hydroxy Butyric Acid | E9 γ-Hydroxy Butyric Acid | E10 p-Hydroxy Phenyl Acetic Acid | E11 α-Keto Glutaric Acid | E12 α-Keto Valeric Acid |
| F1 Lactamide | F2 D-Lactic Acid Methyl Ester | F3 L-Lactic Acid | F4 D-Malic Acid | F5 L-Malic Acid | F6 Methyl Pyruvate | F7 Mono-methyl Succinate | F8 Propionic Acid | F9 Pyruvic Acid | F10 Succinamic Acid | F11 Succinic Acid | F12 N-Acetyl L-Glutamic Acid |
| G1 L-Alaninamide | G2 D-Alanine | G3 L-Alanine | G4 L-Alanyl-glycine | G5 L-Asparagine | G6 L-Glutamic Acid | G7 Glycyl- L-Glutamic Acid | G8 L-Pyroglutamic Acid | G9 L-Serine | G10 Putrescine | G11 2,3-Butanediol | G12 Glycerol |
| H1 Adenosine | H2 2'-Deoxy Adenosine | H3 Inosine | H4 Thymidine | H5 Uridine | H6 Adenosine-5'-Monophosphate | H7 Thymidine-5'-Monophosphate | H8 Uridine-5'-Monophosphate | H9 Fructose-6-Phosphate | H10 Glucose-1-Phosphate | H11 Glucose-6-Phosphate | H12 D-L-α-Glycerol Phosphate |

Funkční diverzita mikrobiálních společenstev

BIOLOG mikrodestička EcoPlate™ byla vyvinuta speciálně pro účel studia funkční diverzity mikroorganismů a ekologie mikroorganismů

Zaznamenává **"fingerprint" metabolického potenciálu společenstva**, založený na principu utilizace vybraných zdrojů uhlíku

metabolický potenciál společenstva = funkční diverzita = blízký vztah k ekologické významům

Funkční diverzita mikrobiálních společenstev

Studie byly publikovány ve všech oblastech enviromentalistiky, asi nejvíce je ovšem studium mikrobiální biodiverzity rozvinuto u půdních mikrobiálních společenstev

BIOLOG systém byl úspěšně využit pro posouzení vlivu zemědělského managementu, degradace chemikálií, vlivu pH, vlivu zaplavování půdy pro půdní mikrobiální společenstva

Preston-Mafham et al., 2002. FEMS Microb Ecol 42,1.

| Application | Number of papers |
|--|------------------|
| Terrestrial (soil) | 102 |
| Methodology (development, comparisons or analysis) | 31 |
| Pollution | 24 |
| Management impacts (incl. fertilisers) | 19 |
| Aquatic | 10 |
| Rhizosphere | 10 |

Funkční diverzita – systém Biolog

EcoPlate™

| | | | | | | | | | | | |
|------------------------------|--------------------------------------|--|---------------------------|------------------------------|--------------------------------------|--|---------------------------|------------------------------|--------------------------------------|--|---------------------------|
| A1 Water | A2 β -Methyl-D-Glucoside | A3 D-Galactonic Acid γ -Lactone | A4 L-Arginine | A1 Water | A2 β -Methyl-D-Glucoside | A3 D-Galactonic Acid γ -Lactone | A4 L-Arginine | A1 Water | A2 β -Methyl-D-Glucoside | A3 D-Galactonic Acid γ -Lactone | A4 L-Arginine |
| B1 Pyruvic Acid Methyl Ester | B2 D-Xylose | B3 D-Galacturonic Acid | B4 L-Asparagine | B1 Pyruvic Acid Methyl Ester | B2 D-Xylose | B3 D-Galacturonic Acid | B4 L-Asparagine | B1 Pyruvic Acid Methyl Ester | B2 D-Xylose | B3 D-Galacturonic Acid | B4 L-Asparagine |
| C1 Tween 40 | C2 l-Erythritol | C3 2-Hydroxy Benzoic Acid | C4 L-Phenylalanine | C1 Tween 40 | C2 l-Erythritol | C3 2-Hydroxy Benzoic Acid | C4 L-Phenylalanine | C1 Tween 40 | C2 l-Erythritol | C3 2-Hydroxy Benzoic Acid | C4 L-Phenylalanine |
| D1 Tween 80 | D2 D-Mannitol | D3 4-Hydroxy Benzoic Acid | D4 L-Serine | D1 Tween 80 | D2 D-Mannitol | D3 4-Hydroxy Benzoic Acid | D4 L-Serine | D1 Tween 80 | D2 D-Mannitol | D3 4-Hydroxy Benzoic Acid | D4 L-Serine |
| E1 α -Cyclodextrin | E2 N-Acetyl-D-Glucosamine | E3 γ -Hydroxybutyric Acid | E4 L-Threonine | E1 α -Cyclodextrin | E2 N-Acetyl-D-Glucosamine | E3 γ -Hydroxybutyric Acid | E4 L-Threonine | E1 α -Cyclodextrin | E2 N-Acetyl-D-Glucosamine | E3 γ -Hydroxybutyric Acid | E4 L-Threonine |
| F1 Glycogen | F2 D-Glucosaminic Acid | F3 Itaconic Acid | F4 Glycyl-L-Glutamic Acid | F1 Glycogen | F2 D-Glucosaminic Acid | F3 Itaconic Acid | F4 Glycyl-L-Glutamic Acid | F1 Glycogen | F2 D-Glucosaminic Acid | F3 Itaconic Acid | F4 Glycyl-L-Glutamic Acid |
| G1 D-Cellobiose | G2 Glucose-1-Phosphate | G3 α -Ketobutyric Acid | G4 Phenylethyl-amine | G1 D-Cellobiose | G2 Glucose-1-Phosphate | G3 α -Ketobutyric Acid | G4 Phenylethyl-amine | G1 D-Cellobiose | G2 Glucose-1-Phosphate | G3 α -Ketobutyric Acid | G4 Phenylethyl-amine |
| H1 α -D-Lactose | H2 D,L- α -Glycerol Phosphate | H3 D-Malic Acid | H4 Putrescine | H1 α -D-Lactose | H2 D,L- α -Glycerol Phosphate | H3 D-Malic Acid | H4 Putrescine | H1 α -D-Lactose | H2 D,L- α -Glycerol Phosphate | H3 D-Malic Acid | H4 Putrescine |

FIGURE 1. Carbon Sources in EcoPlate



Funkční diverzita – systém Biolog

Table 1

Carbon substrates in Biolog ECO microplates. Assignment to biochemical categories follows that of Insam (1997)

Polymers

α -cyclodextrin
glycogen
Tween 40
Tween 80

Carbohydrates

D-cellobiose^a
i-erythritol
D-galactonic acid γ -lactone
N-acetyl-D-glucosamine
glucose-1-phosphate
 β -methyl-D-glucoside
D,L- α -glycerol phosphate
 α -D-lactose
D-mannitol
D-xylose^a

Carboxylic acids

γ -hydroxybutyric acid
 α -ketobutyric acid
D-galacturonic acid
D-glucosaminic acid
itaconic acid
D-malic acid^a
pyruvic acid methyl ester

Amino acids

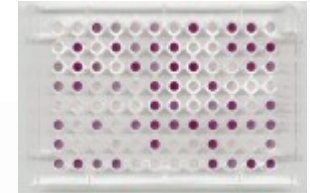
L-arginine^a
L-asparagine
glycyl-L-glutamic acid
L-phenylalanine
L-serine
L-threonine

Amines

phenyl ethylamine
putrescine

Phenolic compounds

2-hydroxybenzoic acid^a
4-hydroxybenzoic acid^a



^a Indicates substrates not present in GN plates.

Funkční diverzita – systém Biolog



Soil sampling



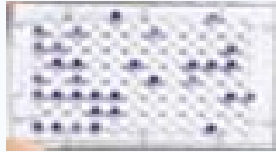
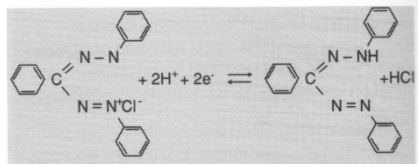
Laboratory test

Sieving ?
Freezing ?
How long to store ?

EXTRACTION:
Optimal dilution:
 $10^5 - 10^8$ cells ?
 $1 \mu\text{g } C_{\text{bio}}\text{-SIR ?}$
 $10^{-2} - 10^{-4} ?$
What to use:
NaCl, Ringers, buffer ?

Centrifugation ?
To use sediment or supernatant ?

Inoculation
Cultivation:
when to read ?
 $15 - 28 \text{ } ^\circ\text{C ?}$



Parameters ?
Statistical analysis ?

RECOMMENDATION:

$$\text{Abs} = \text{Abs}_{\text{well}} - \text{Abs}_{t=0}$$

BIOLOG DATA = raw absorbances for N × 31 substrates repeatedly measured in time

Parameters considering 31 solely substrates - multivariate results:

- Raw absorbances - A
- Normalized absorbances (divided AWCD) - AN
- Trapezoid areas (TA)
- POS/NEG of substrates
- Kinetic parameters - LAG, μ , K

$$TA = \frac{1}{2} \times \sum_{i=1}^{n-1} \dots$$

Parameters calculated from 31 substrates - univariate results:

- AWCD - Average well color development
- ATA - Average TA
- Richness - number of POS substrates
- Diversity - Shannon-Weaver index

$$AWCD = \sum (A_j - A_k) / 31$$

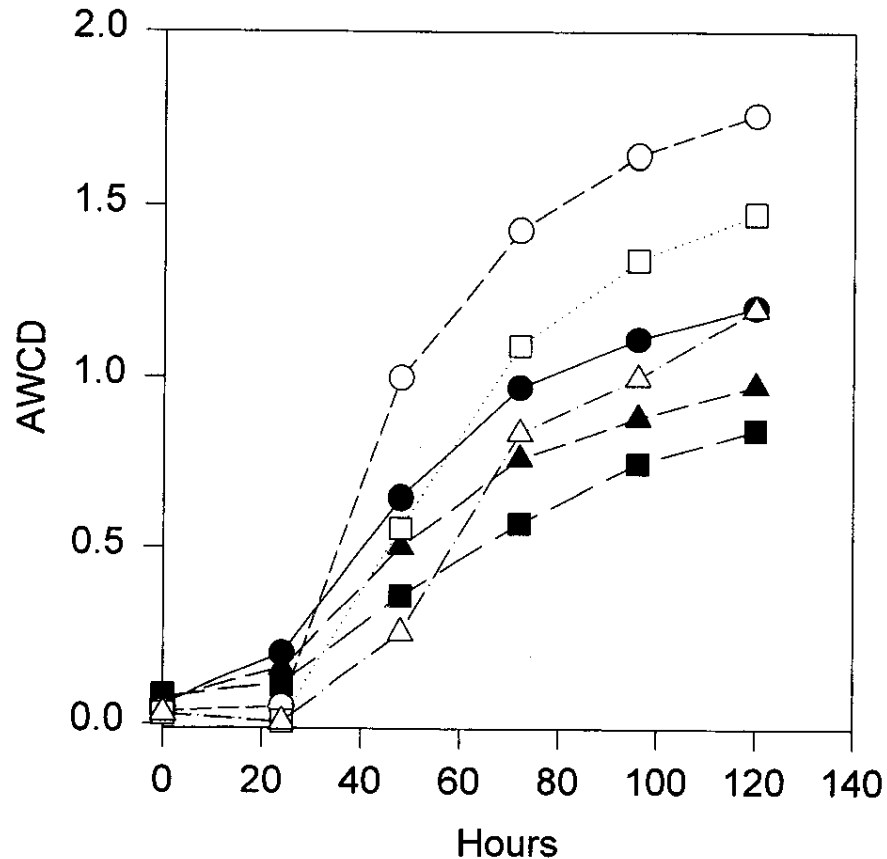
$$H = -\sum p_i (\ln p_i)$$

Funkční diverzita – systém Biolog

System BIOLOG - hodnocení

AWCD (average well color development)

GN plates



ECO plates

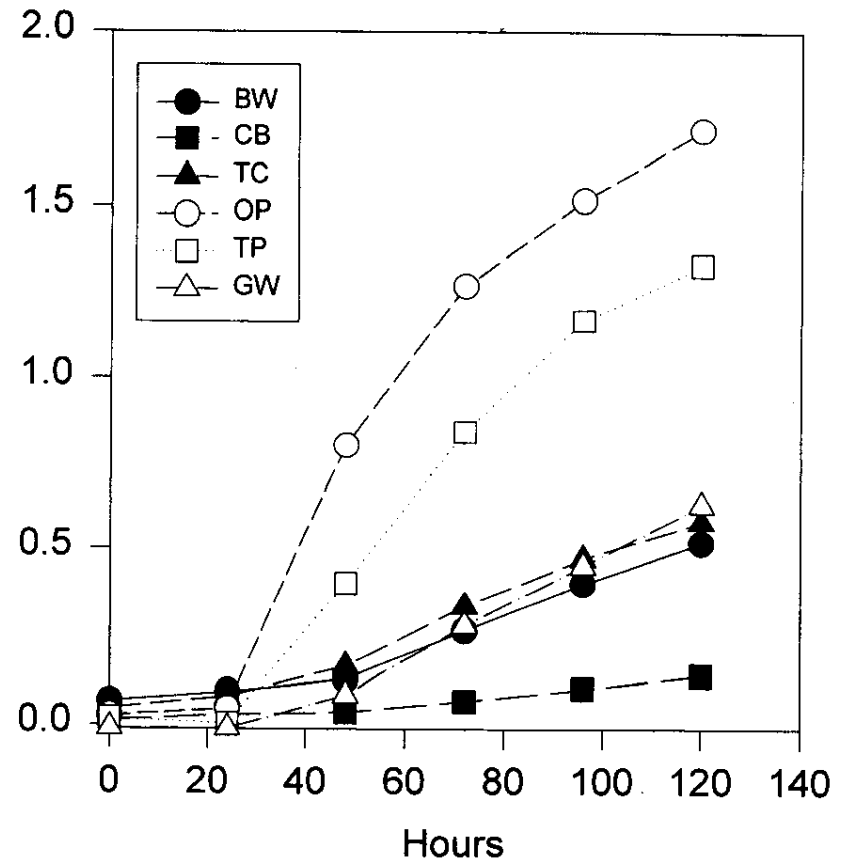


Fig. 1. Variation in average well color development (AWCD) over time in Biolog's GN and ECO plates (BW=Ballast water, CB=Chesapeake Bay, TC=Tidal creek, OP=Oceanography Pond, TP=Tony's Pond, GW=Groundwater; open symbols indicate freshwater environments, filled symbols indicate saltwater environments). For GW, one of the four replicate ECO plates was lost in processing; therefore, in this and subsequent figures, ECO plate data were generated by only three replicates.

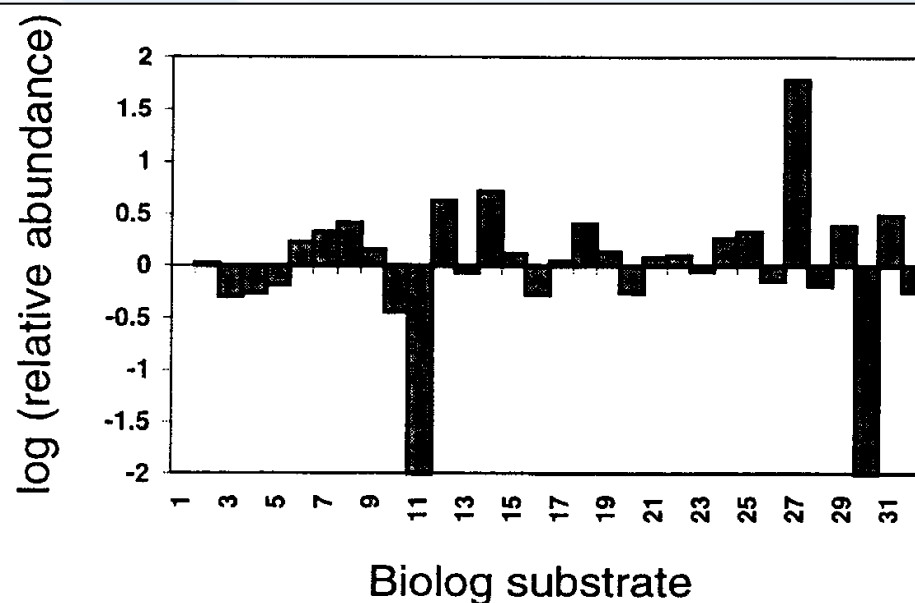
System BIOLOG - hodnocení

Při vyhodnocení se často vytváří tzv. **CLPP - community level physiological profile**:

- každá jamka mikrodestičky představuje potencionální mikrobiální funkci s výstupem ano/ne (reagovalo/nereagovalo) - tento výstup však **nemá pravděpodobnostní charakter a pro jakékoliv statistické metody představuje problém**

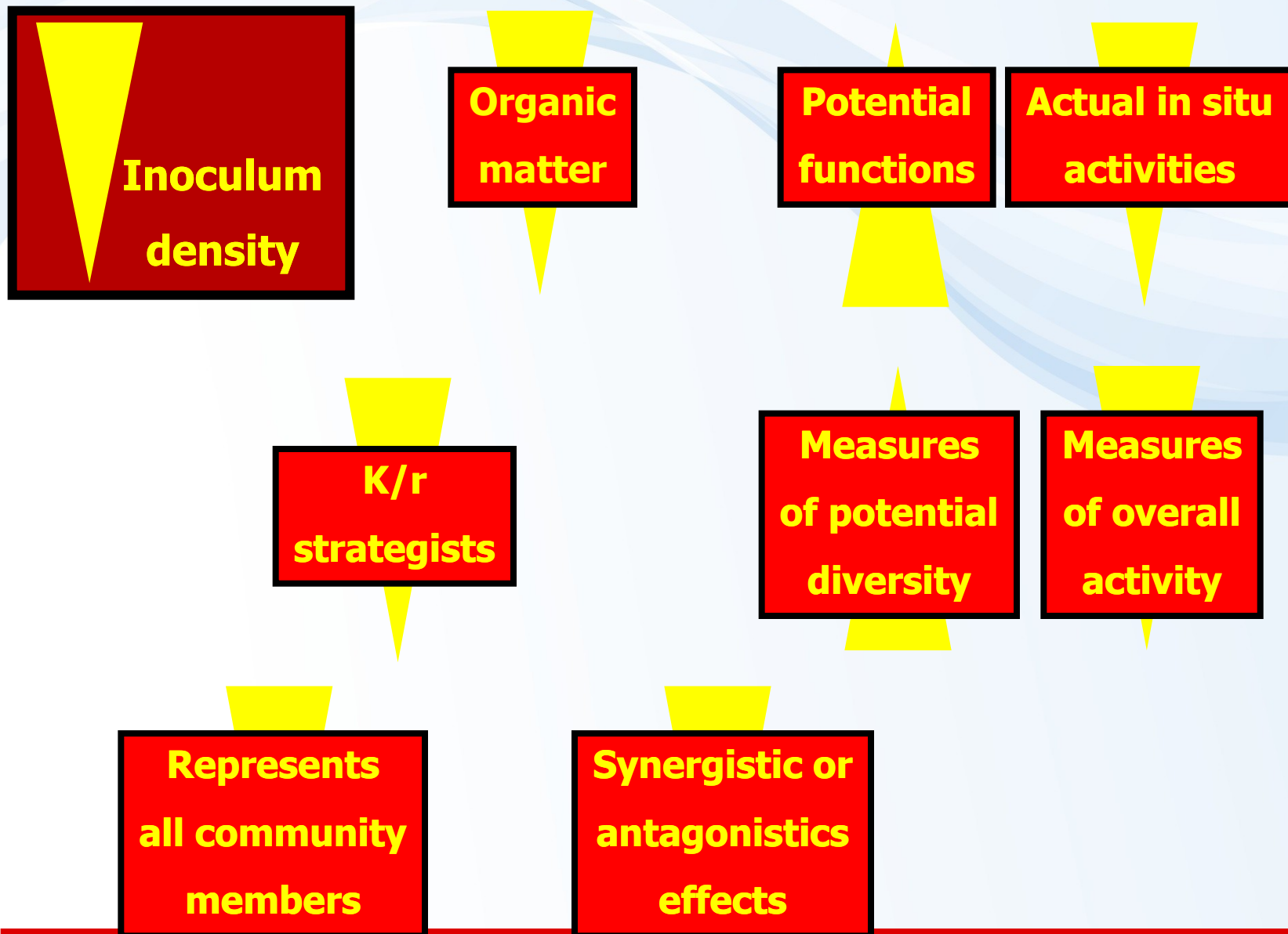
- proto se při několikerém zopakování vytváří hodnota ekologické abundance (pro každou jamku) - tedy např. pozitivní reakce 9 krát z 10 = 90%

- vznikají pseudo spojitá čísla, se kterými se pak vstupuje do vícerozměrných analýz

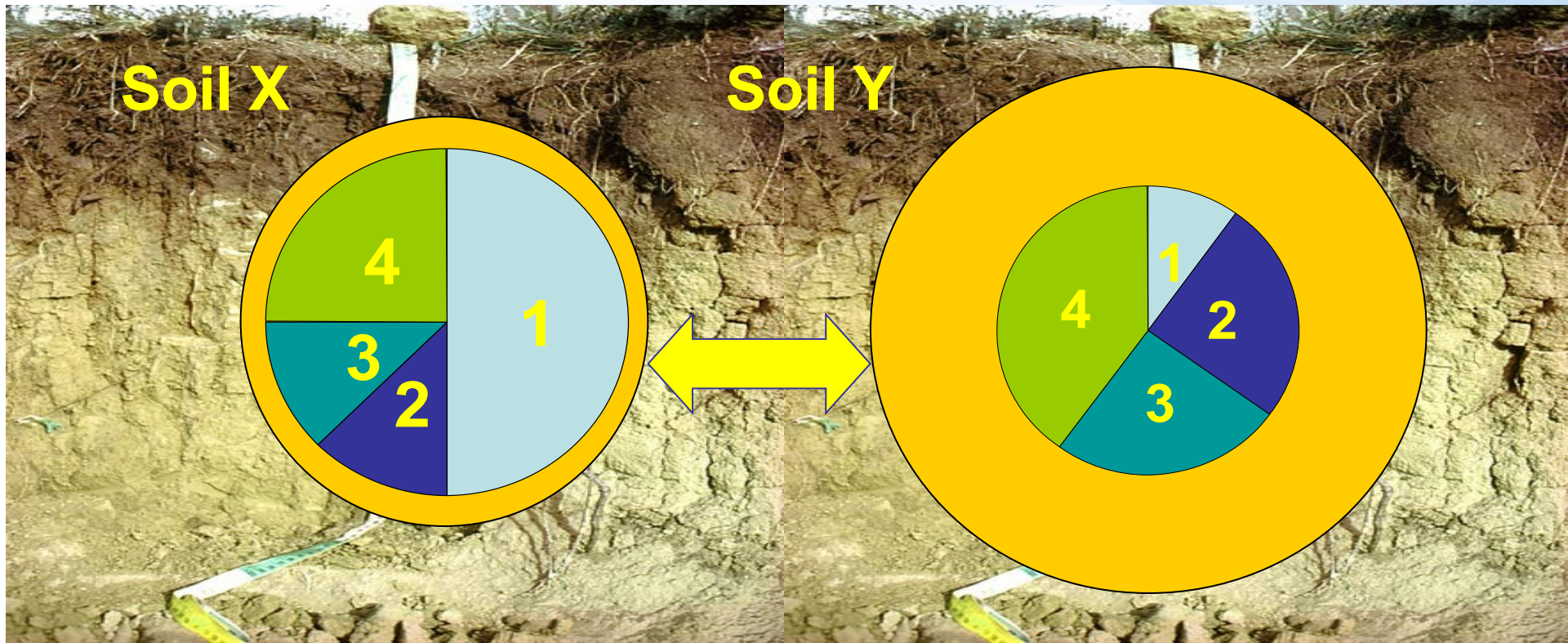
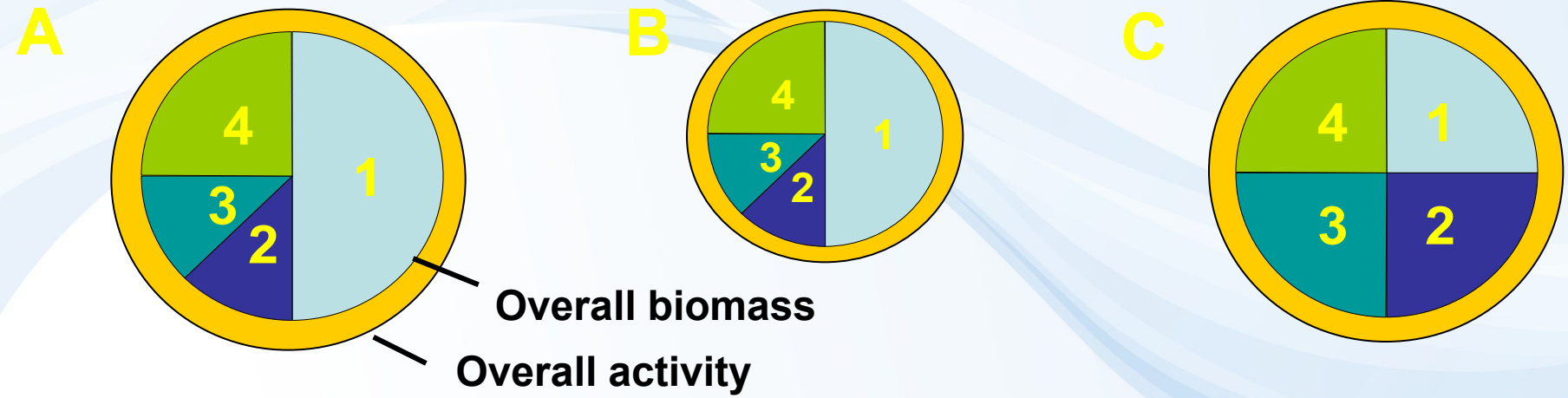


Example of a community-level physiological profile (CLPP) obtained from Biolog multiwell plate incubations (31 substrates; 1 blank) with a terrestrial microbial community. The bars indicate relative abundance (RA) values for different Biolog substrate conversions. The log RA values range typically from -2 to $+2$ (4 orders of magnitude difference in abundance value). Inoculum standardisation was applied according to a not yet published method.

Funkční diverzita – systém Biolog



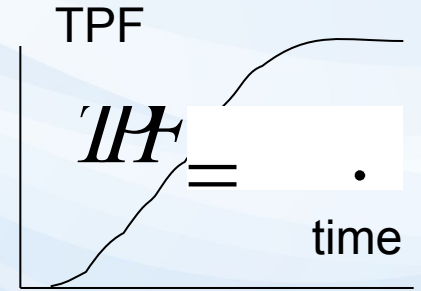
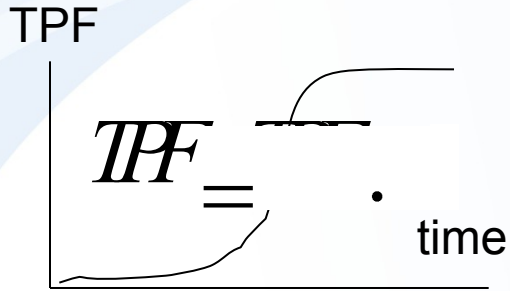
Funkční diverzita – systém Biolog



Funkční diverzita – systém Biolog

growing (r) ←

→ non-growing (K)



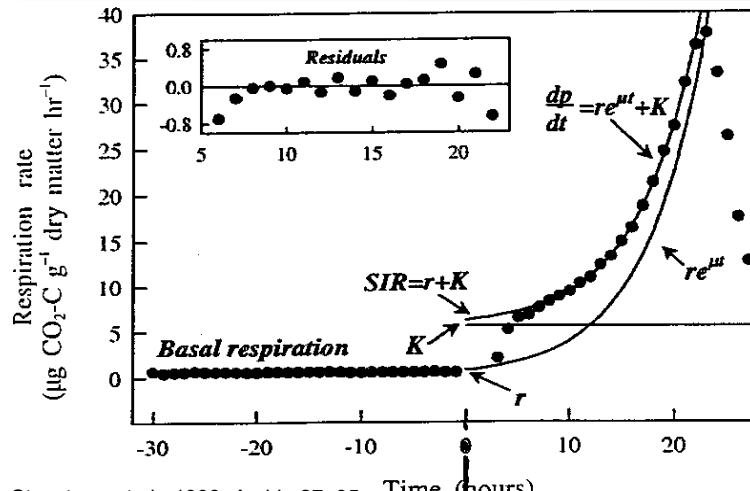
- 1) K / r proportion ?
- 2) growth/maintenance

Can be distinguished ?

Timing of action ?

Monod

Michaelis - Menten



Stenstrom et al., 1998. Ambio 27, 35.

- 3) enzyme concentration changes
- 4) different q and Y

- 5) different enzyme affinity
- 6) stress inhibition (activation)

HOW TO SOLVE THIS PROBLEM ?

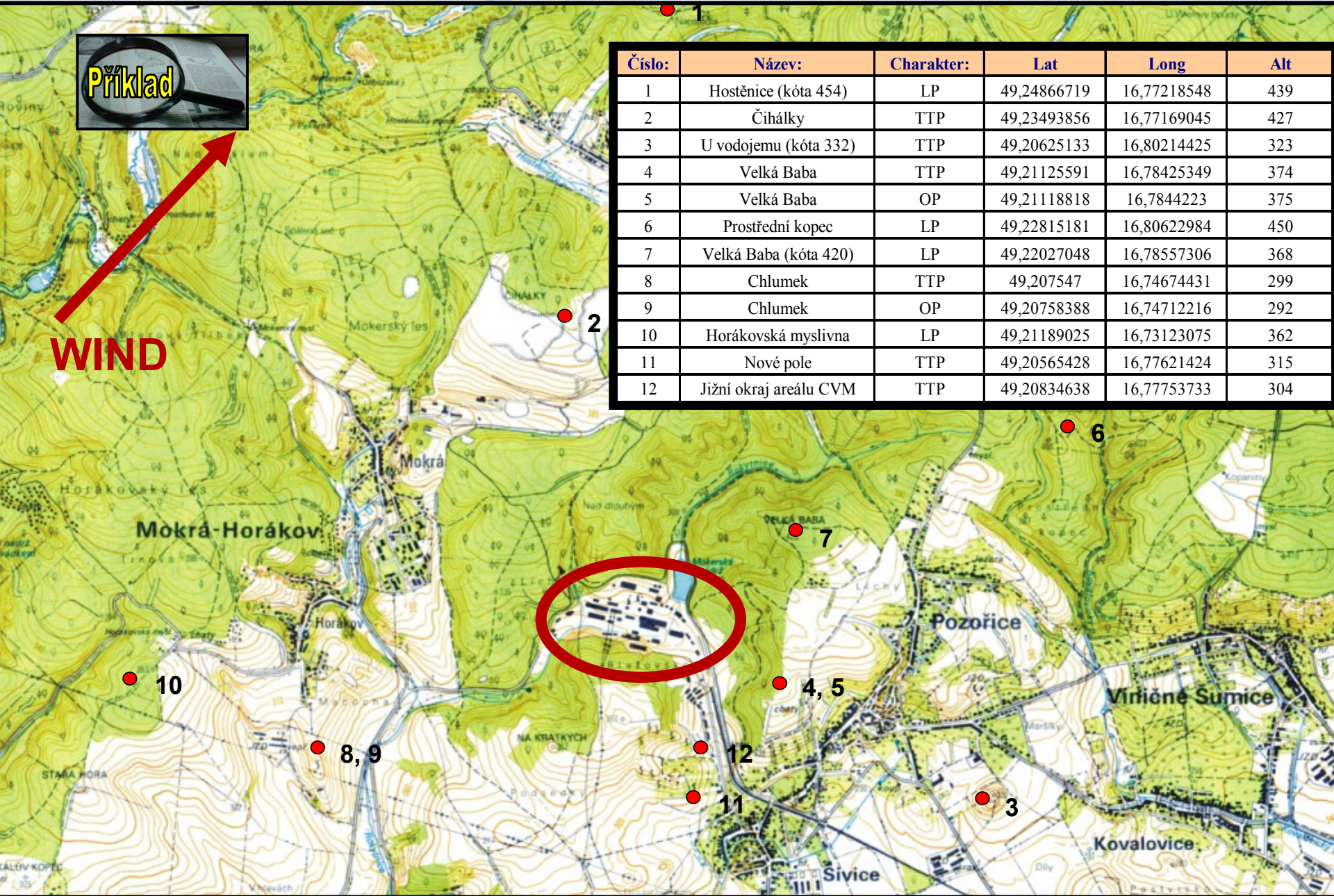
- 1. Methodical standardization = inoculum of the same density (activity ?)**
- 2. Normalization of the data - dividing by AWCD**
- 3. Reading the data when AWCD reach e.g. 0,5 or 50% of the wells are positive**
- 4. Use of kinetic parameters like μ , lag or K**

Funkční diverzita – systém Biolog



WIND

| Číslo: | Název: | Charakter: | Lat | Long | Alt |
|--------|------------------------|------------|-------------|-------------|-----|
| 1 | Hostěnice (kóta 454) | LP | 49,24866719 | 16,77218548 | 439 |
| 2 | Čihálky | TTP | 49,23493856 | 16,77169045 | 427 |
| 3 | U vodojemu (kóta 332) | TTP | 49,20625133 | 16,80214425 | 323 |
| 4 | Velká Baba | TTP | 49,21125591 | 16,78425349 | 374 |
| 5 | Velká Baba | OP | 49,21118818 | 16,7844223 | 375 |
| 6 | Prostřední kopec | LP | 49,22815181 | 16,80622984 | 450 |
| 7 | Velká Baba (kóta 420) | LP | 49,22027048 | 16,78557306 | 368 |
| 8 | Chlumek | TTP | 49,207547 | 16,74674431 | 299 |
| 9 | Chlumek | OP | 49,20758388 | 16,74712216 | 292 |
| 10 | Horákovská myslivna | LP | 49,21189025 | 16,73123075 | 362 |
| 11 | Nové pole | TTP | 49,20565428 | 16,77621424 | 315 |
| 12 | Jižní okraj areálu CVM | TTP | 49,20834638 | 16,77753733 | 304 |



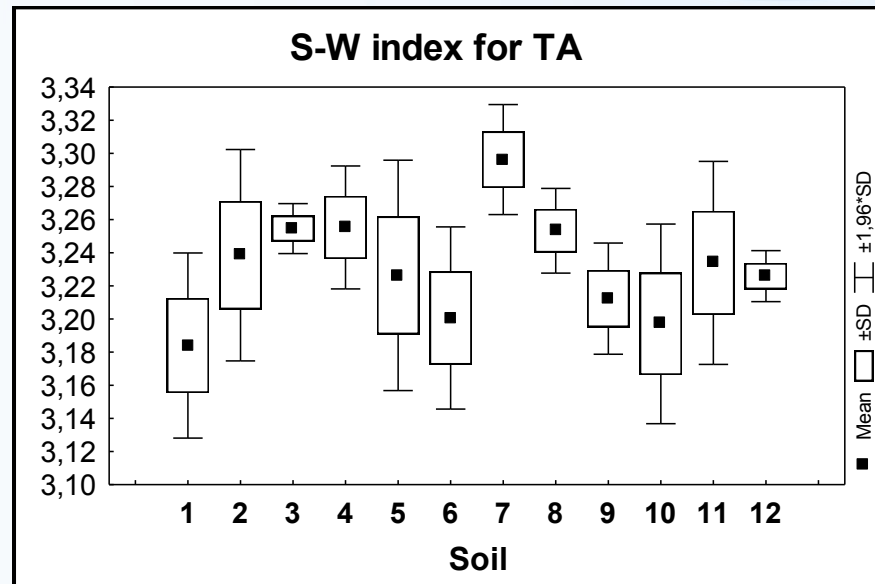
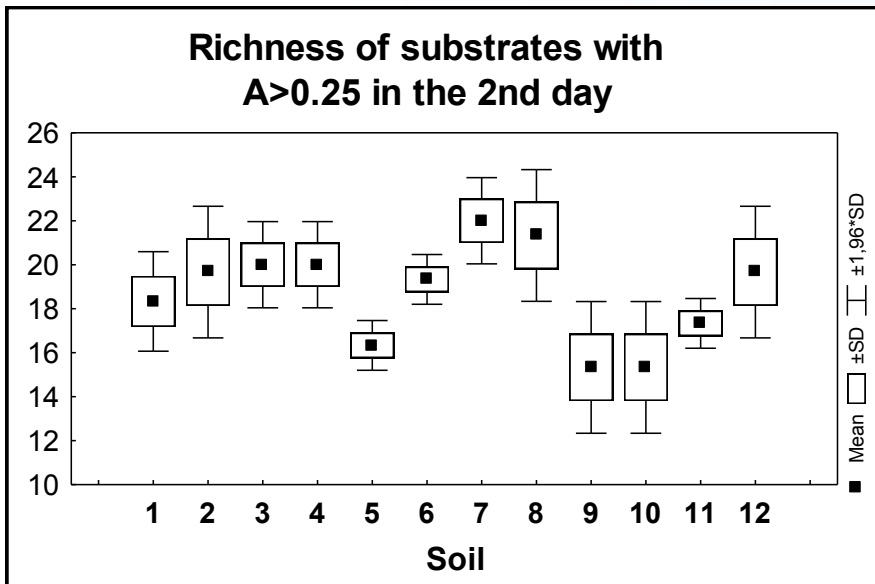
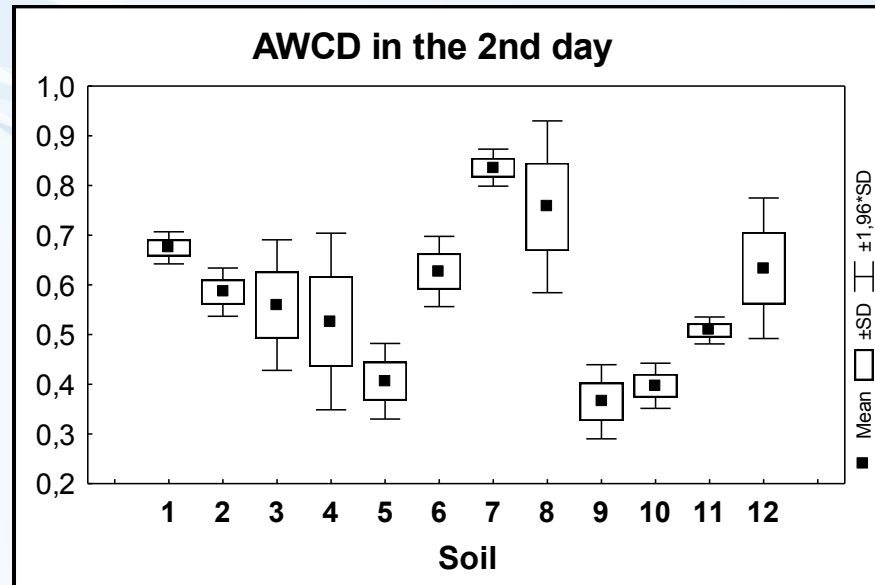
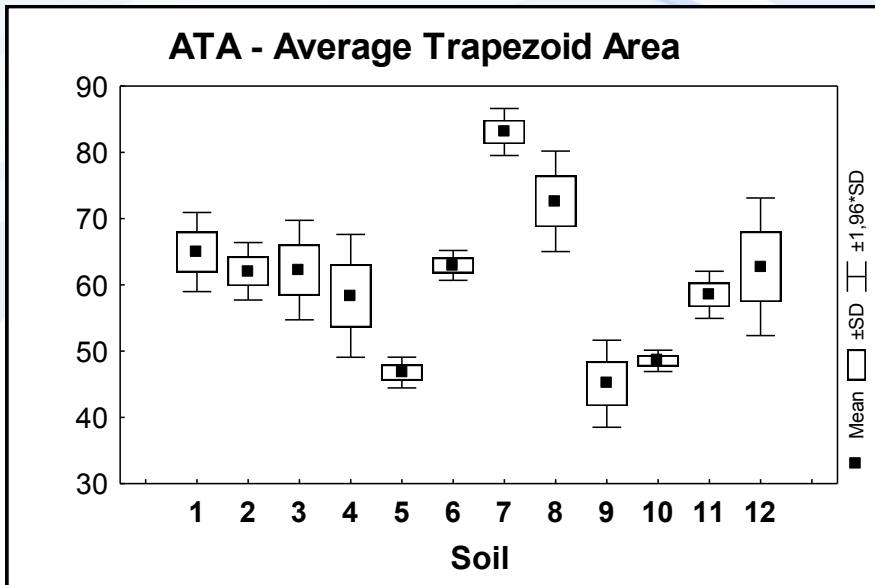


Experimental design

1. Methodical standardization = 1 μg Cbio-SIR per well
2. cca 10^{-2} in 0,85% NaCl agitated and centrifuged at 3000 g
3. 150 μl inoculated to EcoPlates; 27°C; readed for 5 days cca every 12 hours (590 nm)
4. Raw absorbances back corrected against time = 0
5. AWCD, AN, TA, ATA, S-W index computed
6. Statistical analysis
7. Comparison with soil characteristics



Funkční diverzita – systém Biolog





Funkční diverzita – systém Biolog

**Spearman rank correlations
(soil 8 and 10 excluded)**

**C_{org} is driving factor
responsible for overall color
development**

**Relationship with pollutants in
soil is probably mediated by
C_{org}**

**Independency of richness and
evenness = show new
information (what ?)**

| | ATA | AWCD 48 | S-W TA | Rich 48 |
|----------|-------|---------|--------|---------|
| ATA | | | | |
| AWCD 48 | 0,96 | | | |
| S-W TA | -0,03 | 0,02 | | |
| Rich 48 | 0,55 | 0,61 | 0,71 | |
| Cbio | 0,87 | 0,83 | -0,25 | 0,39 |
| BR | 0,39 | 0,28 | -0,44 | -0,19 |
| PR | 0,90 | 0,88 | -0,02 | 0,62 |
| pH(KCl) | -0,47 | -0,47 | 0,10 | -0,25 |
| Corg | 0,95 | 0,89 | -0,22 | 0,43 |
| CEC | 0,28 | 0,25 | -0,30 | -0,07 |
| Clay | -0,08 | -0,07 | 0,08 | 0,05 |
| Cd | 0,99 | 0,95 | -0,05 | 0,51 |
| Pb | 0,93 | 0,90 | -0,21 | 0,39 |
| Zn | 0,35 | 0,38 | -0,01 | 0,12 |
| PAHs | 0,59 | 0,41 | -0,07 | 0,15 |
| PCBs | 0,90 | 0,82 | -0,13 | 0,41 |
| DDT | -0,54 | -0,58 | -0,02 | -0,49 |
| PCDDs/Fs | 0,09 | -0,14 | -0,60 | -0,46 |





Funkční diverzita – systém Biolog

Pearson parametric correlation

| | | | | | | | | | |
|---------|--------|--------|-------|-------|------|------|---------|-------|--------|
| Abs 72 | 0,87 | | | | | | | | |
| AN 48 | 0,93 | 0,83 | | | | | | | |
| AN 72 | 0,81 | 0,95 | 0,87 | | | | | | |
| TA | 0,92 | 0,99 | 0,87 | 0,93 | | | | | |
| TAN | 0,85 | 0,94 | 0,91 | 0,99 | 0,95 | | | | |
| Abs 0,5 | 0,96 | 0,82 | 0,96 | 0,82 | 0,87 | 0,87 | | | |
| Abs 1 | 0,85 | 0,94 | 0,86 | 0,96 | 0,94 | 0,97 | 0,84 | | |
| Abs 16 | 0,91 | 0,78 | 0,92 | 0,77 | 0,83 | 0,83 | 0,93 | 0,78 | |
| Abs 24 | 0,90 | 0,97 | 0,88 | 0,95 | 0,97 | 0,95 | 0,86 | 0,97 | 0,82 |
| | Abs 48 | Abs 72 | AN 48 | AN 72 | TA | TAN | Abs 0,5 | Abs 1 | Abs 16 |

several parameters show very similar information - effect of inoculum standardization ?

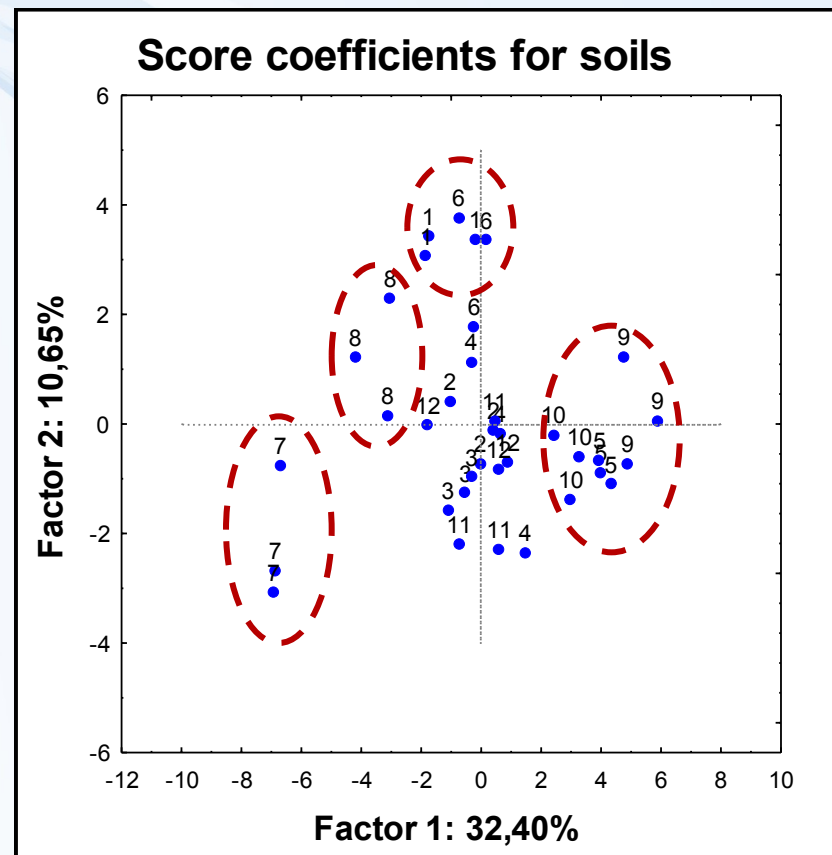
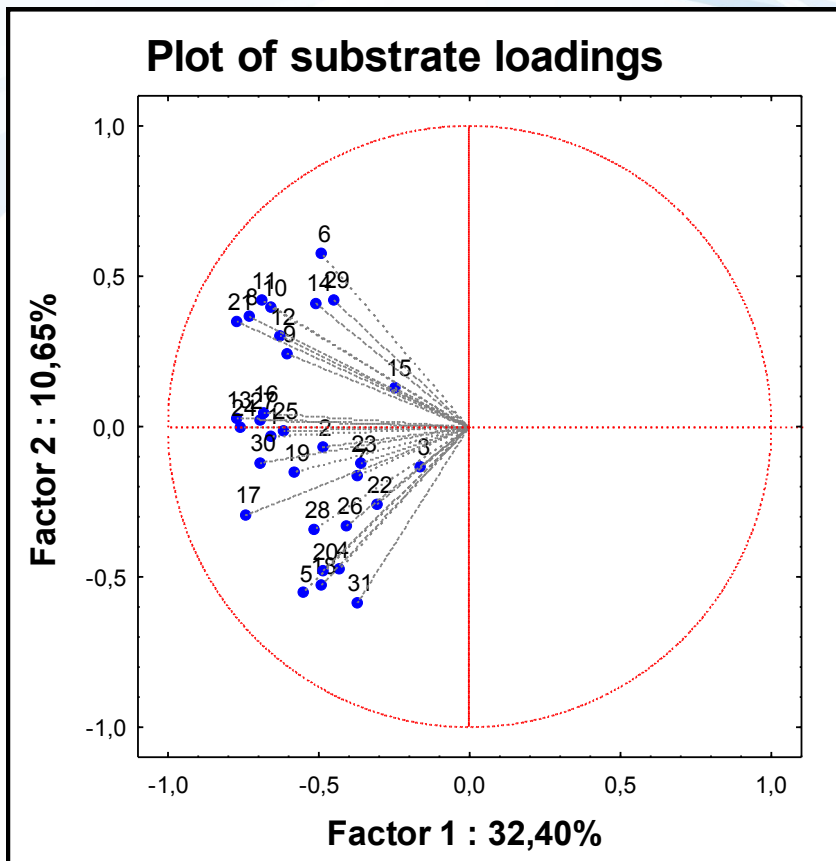
time of reading is most important factor giving different results

every parameter can be used in MV statistics and very distinct results are then obtained



Funkční diverzita – systém Biolog

TA in principle component analysis



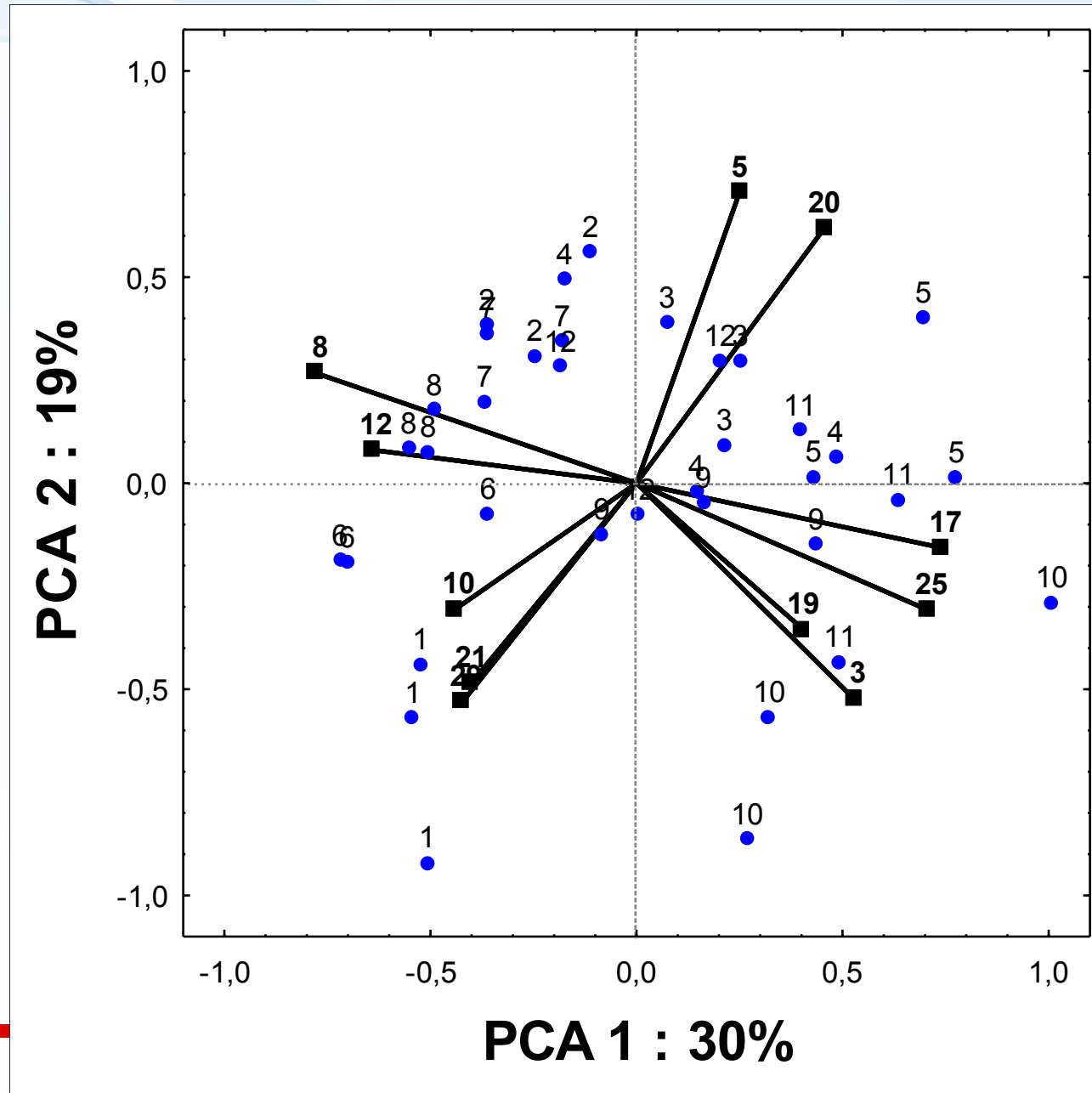
- it seems that the main component binds main part of variance, caused especially overall activity differences
- other components shows differences based on other patterns (diversity ?)
- nearly half of the substrates on EcoPlates are redundant - to exclude them ?



Funkční diverzita – systém Biolog

TAN for selected substrates (ANOVA $p < 0.01$) in PCA

biplot of substrate loadings and soil scores (divided by 4)





Conclusions

- 1. Inoculum standardization helped to solve inoculum density effect but not totally**
- 2. ATA, AWCD described overall activity and S-W index and richness revealed another information**
- 3. Organic matter was driving factor for the results**
- 4. Use of BIOLOG in routine monitoring could be suitable only if the results would be properly evaluated**
- 5. Evaluating at least one not-normalized (e.g. TA) and one normalized parameter (e.g. TAN) is recommended keeping in mind that they reveal different information**



Experimental design of laboratory tests

Real uncontaminated agricultural soil (cambisol) with indigenous microflora:

$\text{pH}_{\text{KCl}} = 7 - 7.5$ $\text{C}_{\text{bio}} = 400 - 700 \mu\text{g}\cdot\text{g}_{\text{d.w.}}^{-1}$
 $\text{C}_{\text{org}} = 1.5\%$ $\text{BR} = 0.5 - 0.7 \mu\text{g CO}_2\text{-C}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}_{\text{d.w.}}^{-1}$
sand = 70%



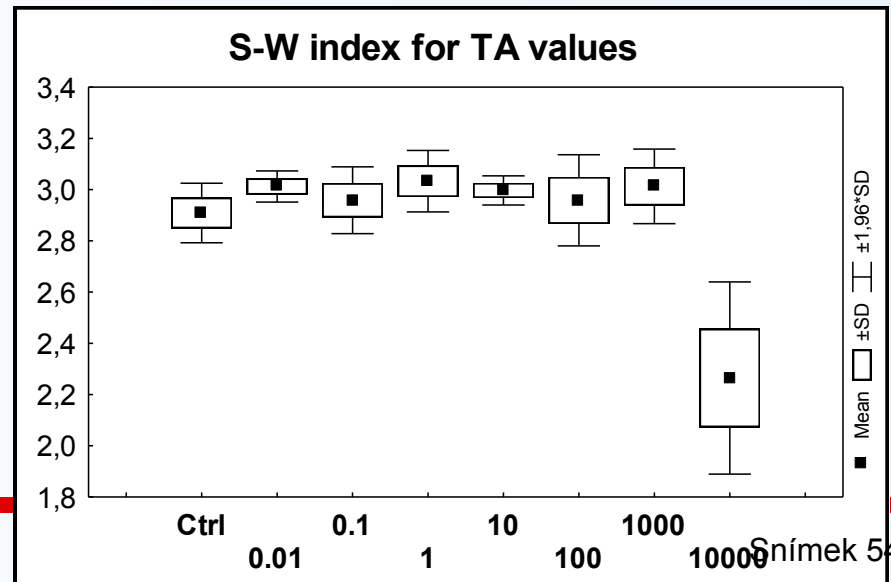
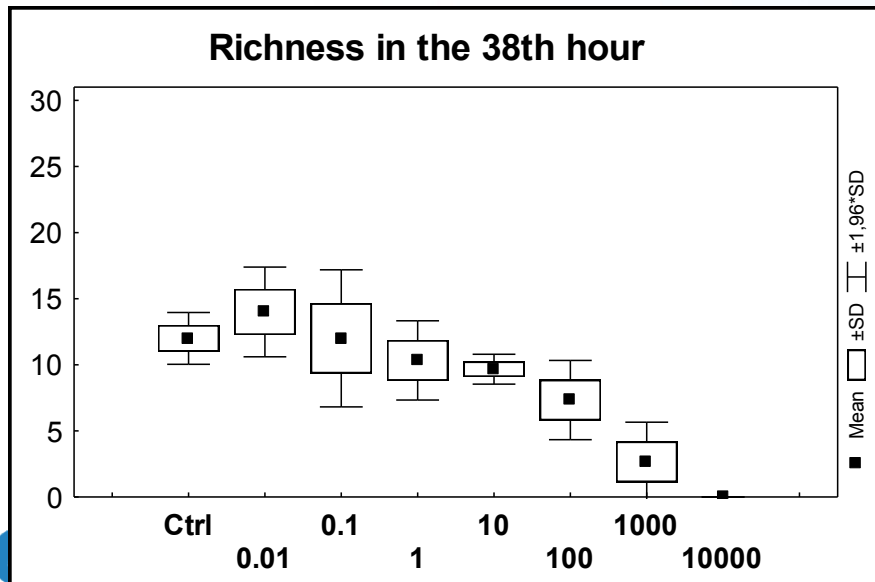
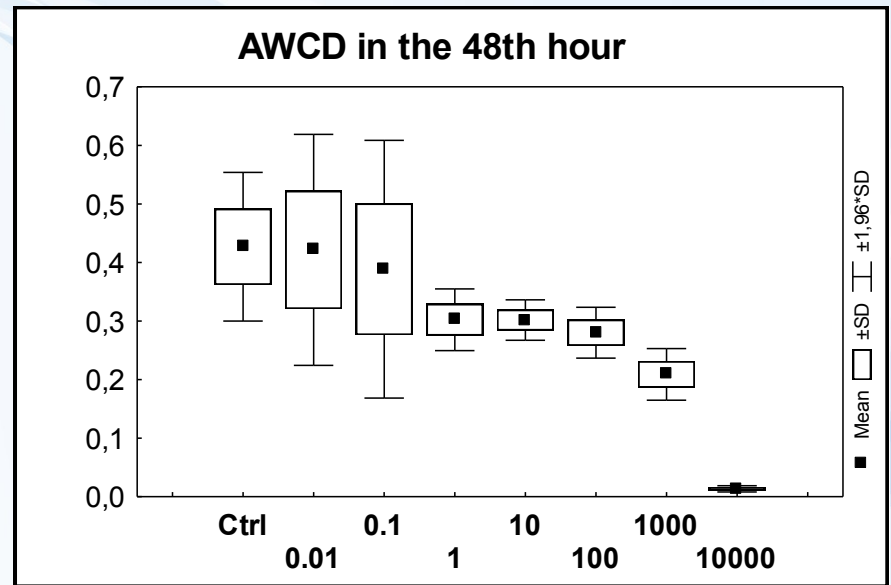
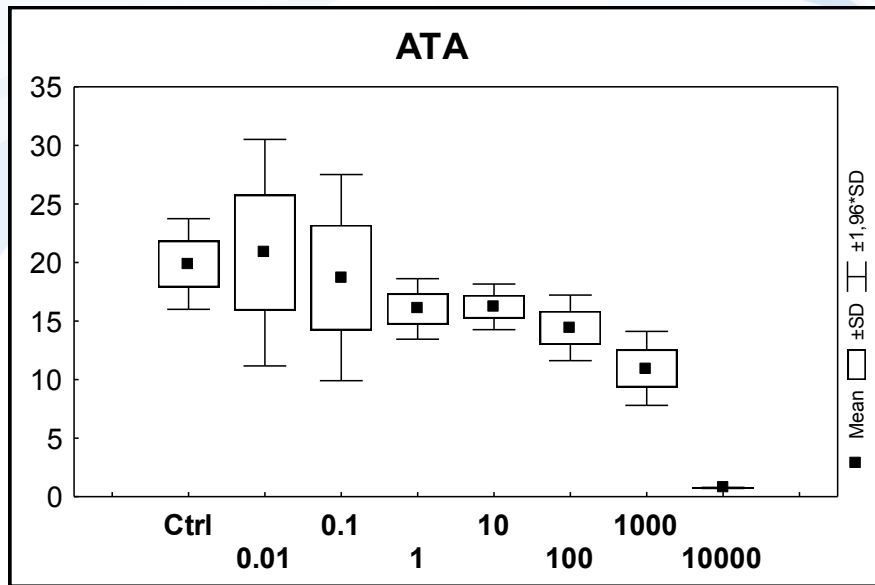
Test of effects on soil microflora according ISO, OECD, SETAC, BBA etc. guidelines:

- incubation of the soil samples (10g per replicate) in aerobic conditions; 60% WHC; 22°C
- tested substance is added dissolved in water or volatile solvent to get dose range in soil samples
- controls are water and used solvents
- after 14 and 28 days BILOG is measured



Funkční diverzita – systém Biolog

toxicity of cadmium in concentration 0.01 – 10 000 mg.kg⁻¹ was tested



Funkční diverzita – systém Biolog

BIOLOG mikrodestička představuje ideální zminimalizovaný systém, kde můžeme paralelně sledovat průběh 31 až 95 biochemických reakcí:

- jednoduchý kolorimetrický výstup
- možnost vynesení křivek dávka odpověď

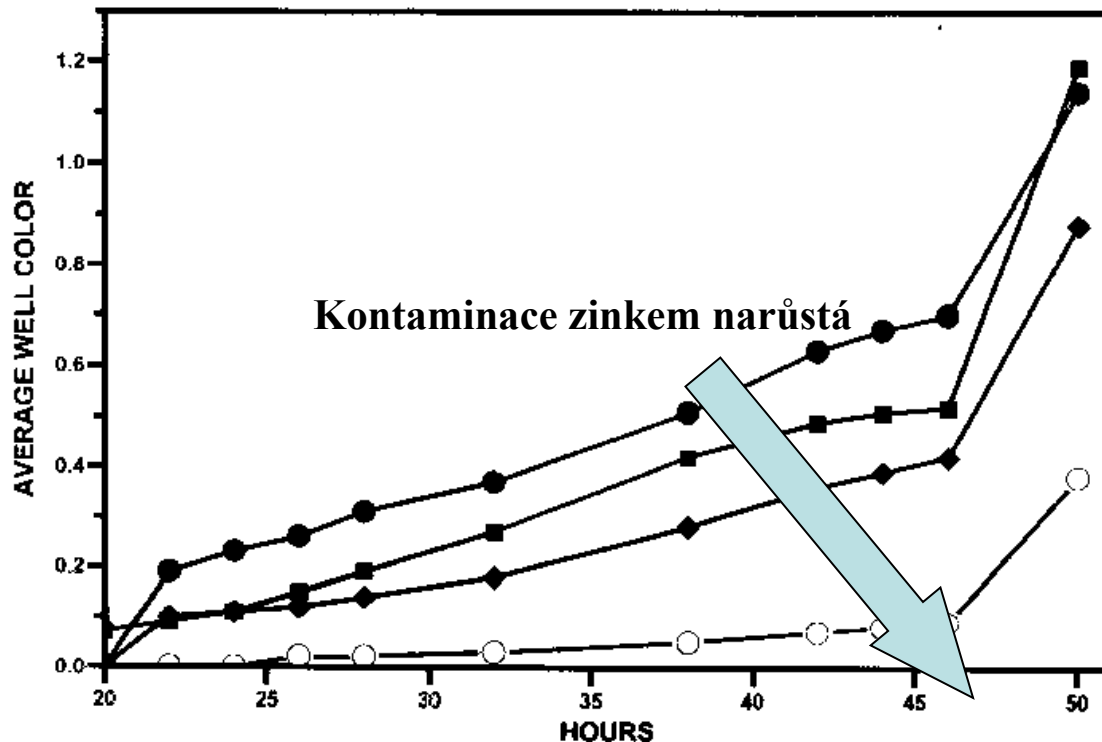


Fig. 1. Comparison of rate of color development on BIOLOG plates for soil samples collected in the Fall of 1995 from four sites in the vicinity of a Zn smelter. Average well color is the mean of the net optical density for all 95 substrate wells on a plate. Each data point represents the mean AWCD value for three BIOLOG extractions from each site (Site A ■, Site B ●, Site C ◇, Site D ○).



Funkční diverzita – systém Biolog

Systém BIOLOG - využití pro hodnocení PICT (Pollution induced community tolerance)

- je založeno na přirozené schopnosti mikroorganismů tolerovat do určité míry kontaminanty v prostředí
- při působení kontaminantu na mikroorganismy se projevuje jejich mechanická, genetická a fyziologická adaptace na nové podmínky a dochází k odumření citlivějších společenstev

Vlastnímu měření musí předcházet chemická analýza, která má za úkol zjistit, v jaké koncentraci a o jaký kontaminant se jedná. Poté se udělá extrakt z půdy a mikroorganismy se očkují do několika mikrodestiček s rostoucí koncentrací kontaminantu v jednotlivých destičkách. Hodnotí se vývoj barvy. Hodnota EC50 se odvozuje z typické reakce 85 – 90 různých pozitivních mikrobiálních reakcí v mikrodestičce, tedy koncentrace kontaminantu versus aktivita mikroorganismů. Hodnotí se posun křivek v jednotlivých ředěních a jejich rozložení. PICT tedy ukazuje míru toxického poškození společenstva v ekosystému. Před vlastním měřením musí být tedy prokázán toxický efekt kontaminantu na strukturu a funkci ekosystému.

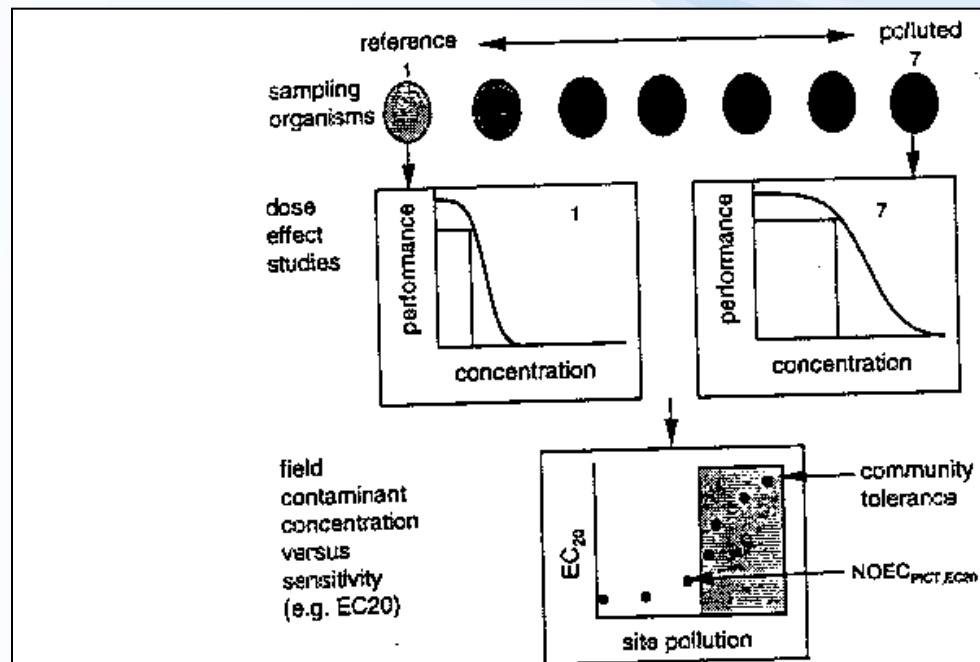


Figure 1. Schematic representation of the experiment for determination of pollution-induced community tolerance (PICT) (redrawn from Posthuma 1997).





Funkční diverzita – systém Biolog

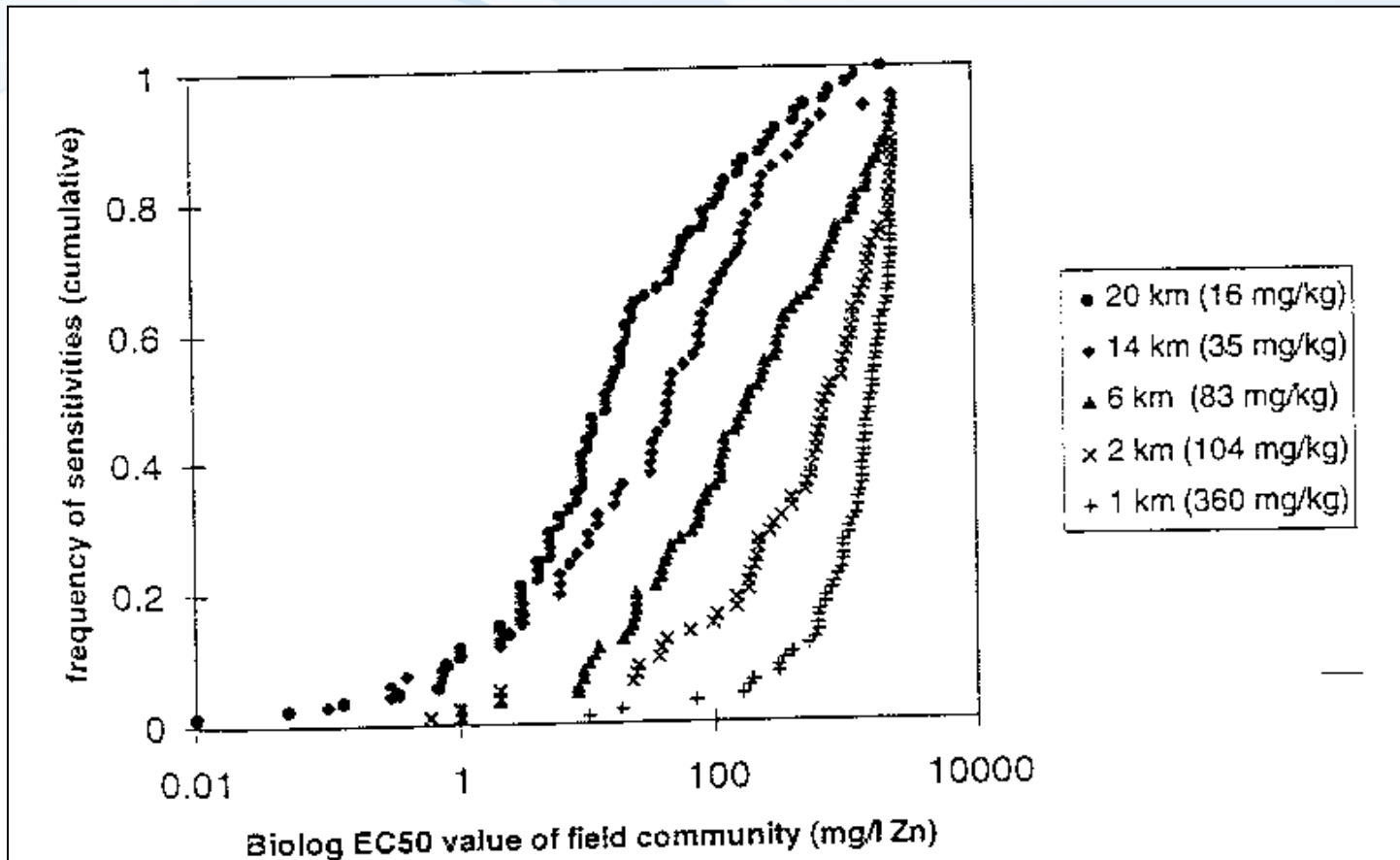


Figure 3. Cumulative frequency of EC_{50}^{BIOLOG} of microbial activities around a zinc smelter near Budel. The figure shows EC_{50}^{BIOLOG} values for each positive Biolog substrate (78 - 89) and 5 different field communities (●,◆,▲,×,+) with various levels of exposure. The distance to the zinc smelter (in km) and the contamination level are given (between brackets: total zinc concentration in mg zinc per kg DW soil).

Funkční diverzita – systém Biolog

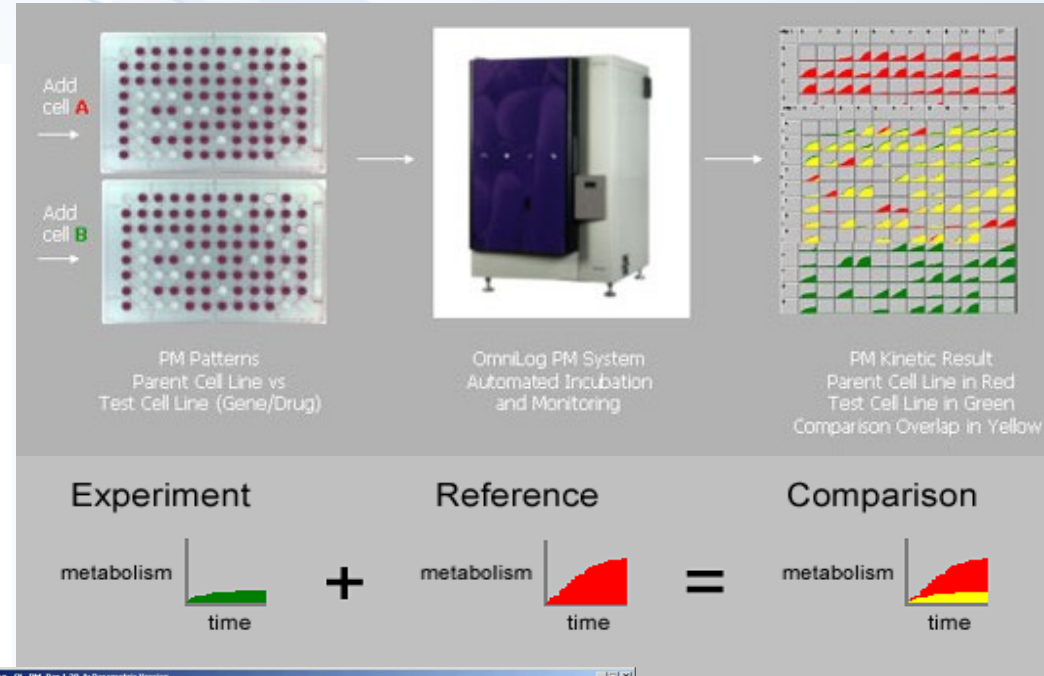
- nejnovějším produktem jsou tzv. Phenotype Microarrays™



Phenotype MicroArrays™

PM1 MicroPlate™ Carbon Sources

| | | | | | | | | | | | |
|---------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------|--------------------|--------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|--------------------------------|-------------------------|-----------------------|---------------------|
| A1 Negative Control | A2 L-Arabinose | A3 N-Acetyl-D-Glucosamine | A4 D-Saccharic Acid | A5 Succinic Acid | A6 D-Galactose | A7 L-Aspartic Acid | A8 L-Proline | A9 D-Alanine | A10 D-Trehalose | A11 D-Mannose | A12 Dulcitol |
| B1 D-Serine | B2 D-Sorbitol | B3 Glycerol | B4 L-Fucose | B5 D-Gluconic Acid | B6 D-Gluconic Acid | B7 D,L-α-Glycerol-Phosphate | B8 D-Xylose | B9 L-Lactic Acid | B10 Formic Acid | B11 D-Mannitol | B12 L-Glutamic Acid |
| C1 D-Glucose-6-Phosphate | C2 D-Saccharic Acid-γ-Lactone | C3 D,L-Malic Acid | C4 D-Ribose | C5 Tween 20 | C6 L-Rhamnose | C7 D-Fructose | C8 Acetic Acid | C9 α-D-Glucose | C10 Malic Acid | C11 D-Melibiose | C12 Thymidine |
| D1 L-Asparagine | D2 D-Aspartic Acid | D3 D-Gluconic Acid | D4 1,2-Propanediol | D5 Tween 40 | D6 α-Keto-Glutaric Acid | D7 α-Keto-Butyric Acid | D8 α-Methyl-D-Galactoside | D9 α-D-Lactose | D10 Lactulose | D11 Sucrose | D12 Uridine |
| E1 L-Glutamine | E2 M-Tartaric Acid | E3 D-Glucose-1-Phosphate | E4 D-Fructose-6-Phosphate | E5 Tween 80 | E6 α-Hydroxy Gluconic Acid-γ-Lactone | E7 α-Hydroxy Butyric Acid | E8 β-Methyl-D-Glucoside | E9 Adonitol | E10 Melibiose | E11 D-Deoxy Adenosine | E12 Adenosine |
| F1 Glycyl-L-Aspartic Acid | F2 Citric Acid | F3 Melitobitol | F4 D-Threonine | F5 Fumaric Acid | F6 Brause Succinic Acid | F7 Propionic Acid | F8 Malic Acid | F9 Glyoxylic Acid | F10 Glyoxylic Acid | F11 D-Cellobiose | F12 Inosine |
| G1 Glycyl-L-Glutamic Acid | G2 Tricarballic Acid | G3 L-Serine | G4 L-Threonine | G5 L-Alanine | G6 L-Alanyl-Glycine | G7 Acetoacetic Acid | G8 N-Acetyl-β-D-Mannosamine | G9 Mono Methyl Succinate | G10 Methyl Pyruvate | G11 D-Malic Acid | G12 L-Malic Acid |
| H1 Glycyl-L-Proline | H2 Dihydroxy Phenyl Acetic Acid | H3 α-Hydroxy Phenyl Acetic Acid | H4 Tyramine | H5 D-Palose | H6 L-Xylose | H7 Glucuronamide | H8 Pyruvic Acid | H9 L-Galactonic Acid-γ-Lactone | H10 D-Galacturonic Acid | H11 Phenylethylamine | H12 D-Ambrosianol |





Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

Molekulárně biologické techniky



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Inovace tohoto předmětu je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

Molekulárně biologické techniky

Díky rozvoji genetiky a molekulární biologie obrovský boom v minulých 20 letech

Díky těmto metodám se zjistilo, jak obrovská je diverzita mikroorganismů v prostředí, např. v půdě – v gramu půdy je 10^{10} buněk a až 10^6 druhů !!!

Primárně používány pro:

- identifikaci předdefinovaných mikroorganismů,

ale sekundárně využitelné i při:

- hodnocení biodiverzity

- jako biomarkery skupin mikroorganismů zastávajících určitou funkci

- jako indikace existence nějaké metabolické funkce či dráhy

Největší výhoda = odpadá nutnost kultivací a izolací mikroorganismů:

- získáváme nezkrácenou, nelimitovanou představu o celé diverzitě – tzv. (meta)genomu celého společenstva

- nejen aktuálně realizované funkce, ale i potenciální (uložené v genech, ale nyní „spící“) – dnešní techniky je dokáží rozlišit (sledování exprese, sledování mRNA ...)

- dnešní techniky dokáží sledovat s minimální mírou zkreslení „míru“ aktivit mikroorganismů bez nutnosti kultivace MO či env. vzorků v laboratoři

Molekulárně biologické techniky

- základem většiny genetických technik je klonování fragmentu DNA (není nutná kultivace), RNA se používá méně často (její extrakce a stabilita je horší)
- na druhou stranu pro studium diverzity a taxonomického zařazení mikroorganismů (bakterií) je v současné době nejoblíbenější 16S rRNA respektive ji kódující úsek DNA - 16S rDNA
- **Sekvence 16S (18S) rRNA jsou považovány za ukazatele diverzity MO**

Důvody pro 16S (18S) rRNA:

- univerzálně rozšířená
- obsahuje vysoce konzervativní úseky potřebné k taxonomickému zařazení = je typická pro každý druh
- obsahuje naopak i variabilní úseky k fylogenetickému srovnávání
- přirozeně existuje v mnoha kopiích
- dobře prozkoumána a databázována
- **Nevypovídá ale o metabolických aktivitách daného kmene ...**

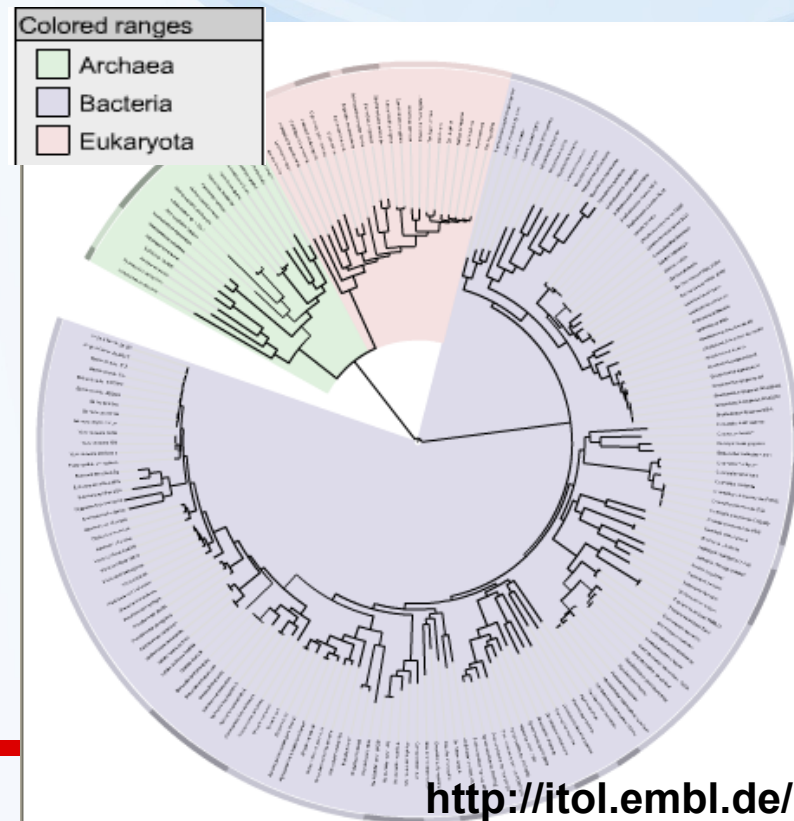
Hodnocení genetické diverzity je založeno na hodnocení heterogenity DNA společenstva

Obecné schéma:

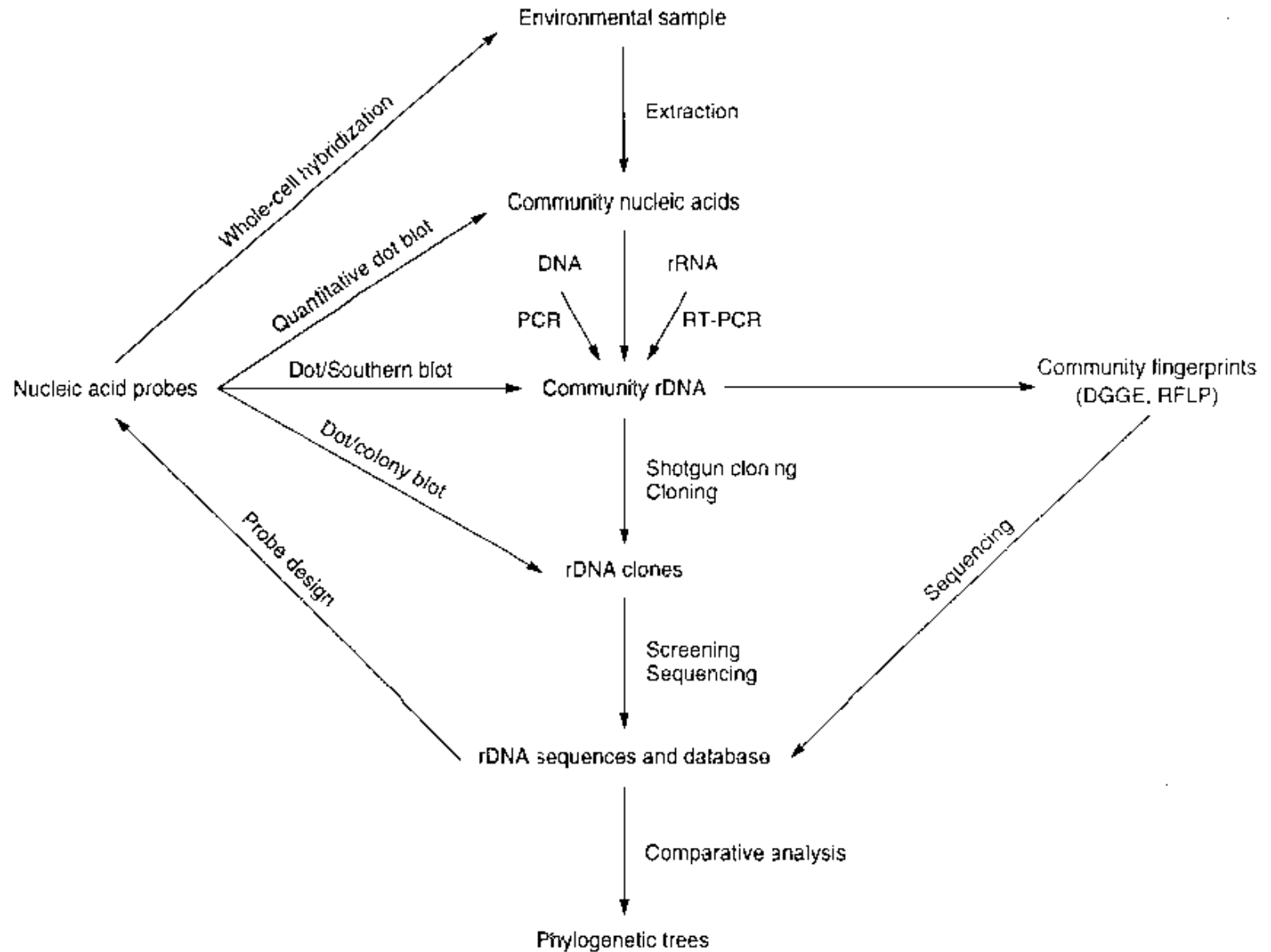
- extrakce DNA či RNA společenstva ze vzorku
- purifikace NA
- pokud se jedná o RNA, tak zpětné vytvoření DNA (je stabilnější) reverzní transkripcí (RT)
- namnožení NA (amplifikace) pro získání dostatečného množství (celého genomu, či jen vybrané části)
- případně: separace na elektroforéze
- dále následují jednotlivé techniky s cílem:
 - a) detekce specifických organismů/funkcí (pomocí genových proub apod.)
 - b) kvantifikace určitých skupin MO, či funkcí
 - c) informace o diverzitě celého genomu či diverzitě určité skupiny
 - d) sekvenace

Molekulárně biologické techniky

- Vztah s taxonomickou diverzitou, fylogenetikou
- Využívá se izolace DNA ze vzorku, amplifikaci úseku kódujícího 16S rRNA (u prokaryot) či 18S RNA (u eukaryot) pomocí PCR, sekvenaci tohoto úseku a srovnání s databázemi, kladogramy



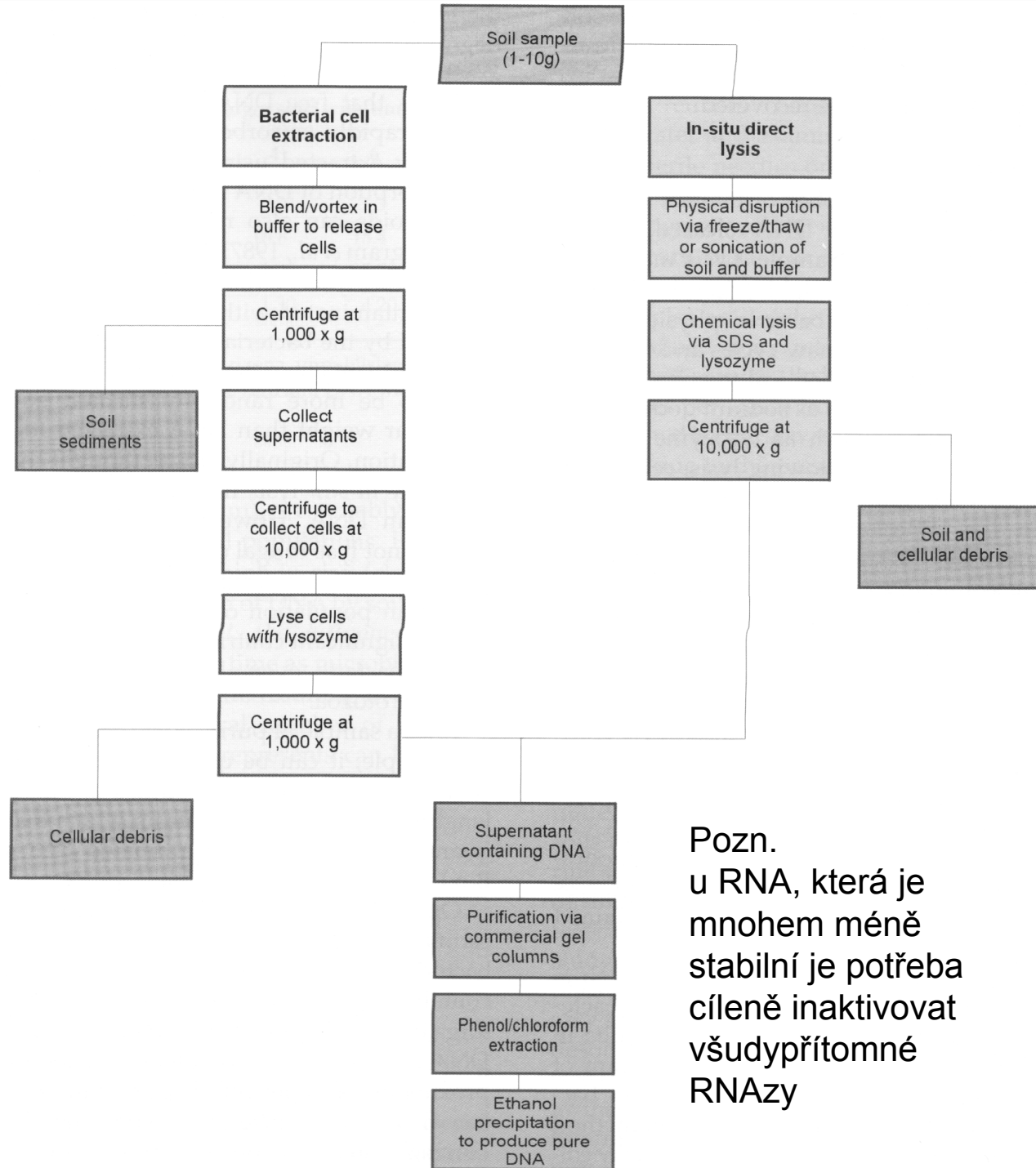
Molekulárně biologické techniky – obecné schéma



Extrakce NA ze vzorků

a) extrakce, promývání a frakcionace buněk gradientovou centrifugací, následuje homogenizace buněk, lýze a extrakce NA

b) lýze buněk *in situ*, extrakce, separace NA od C_{org} (chromatografie, elektroforéza, srážení, extrakce, centrifugace)



Pozn.
u RNA, která je mnohem méně stabilní je potřeba cíleně inaktivovat všudypřítomné RNAzy

Extrakce NA ze vzorku

Metody lýze:

- chemická: např. SDS (sodium-dodecyl-sulfate)
- enzymatická: např. lysozym
- fyzikální: např. zahřátí, rozbití buněk
- kombinace: viz příklad

Table 1
Treatments for cell lysis in different methods

| Method | Cell lysis treatment | | |
|--------|---------------------------------|--------------------------|------------------------------------|
| | Chemical | Enzymatic | Mechanical |
| 1 | SDS (0.5%) | Proteinase K (100 µg/ml) | – |
| 2 | SDS (1%) | Lysozyme (5 mg/ml) | – |
| 3 | SDS (1%) | Proteinase K (200 µg/ml) | – |
| | Guanidine isothiocyanate | Lysozyme (5 mg/ml) | – |
| 4 | SDS (1%) | Proteinase K (200 µg/ml) | – |
| | Guanidine isothiocyanate | Lysozyme (5 mg/ml) | Bead beating |
| | Detergent (Mo Bio Laboratories) | Proteinase K (200 µg/ml) | Freezing and thawing |
| 5 | | – | Bead beating (Mo Bio Laboratories) |

Extrakce NA ze vzorků

TABLE 8.3 Comparison of Bacterial Fractionation and *In Situ* Lysis Methodologies for the Recovery of DNA from Soil

| Issue | Bacterial fractionation | <i>In situ</i> lysis |
|-------------------------------|--|--|
| Yield of DNA | 1–5 $\mu\text{g/g}$ = nižší výtěžek | 1–20 $\mu\text{g/g}$ |
| Representative of community | Less representative because of cell sorption | More representative, unaffected by cell sorption |
| Source of DNA recovered | Only bacteria | Mostly bacteria |
| Degree of DNA shearing | Less shearing | More shearing |
| Average size of DNA fragments | 50 kb | 25 kb |
| Degree of humic contamination | Less contaminated | More contaminated |
| Ease of methodology | Slow, laborious | Faster, less labor intensive |

**ruší jíly, huminové látky,
těžké kovy**

Rychlost annealingu – odhad diverzity DNA:

- extrakce DNA
- čištění DNA
- denaturace
- měření času opětovného spojení řetězců (annealing)

$C_0 \cdot t_{1/2}$ iniciální koncentrace nukleotidů v jednořetězcové DNA × čas, který je potřeba na reannealing poloviny

Rychlost je spojena s podobností fragmentů:

rychlý reannealing ==> malá diverzita

Např. v půdě $C_0 \cdot t_{1/2} = 4600$ odpovídá 4000 různých genomů (cca 200× vyšší diverzita než byla naměřena u stejné půdy izolačními technikami)

Rychlost annealingu – odhad diverzity DNA:



Journal of Biotechnology 64 (1998) 53–62

Review article

Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments

Vigdis Torsvik *, Frida Lise Daae, Ruth-Anne Sandaa, Lise Øvreås

Department of Microbiology, University of Bergen, Jahnebakken 5, N-5020 Bergen, Norway

Table 1
Bacterial diversity in soils and marine environments as determined by reassociation kinetics ($C_0t_{1/2}$: moles $\times 1^{-1} \times$ s at 50% reassociation), and number of 'genomes'

| DNA source | $C_0t_{1/2}$ | No. of genomes ^b |
|---|--------------|-----------------------------|
| <i>E. coli</i> | 0.79 | 1 |
| Forest soil | 4500–4700 | 6000 |
| Forest soil, plate count community ^c | 28 | 35 |
| Pristine sediment | 9000 | 11 400 |
| Fish farm sediment | 10 | 13 |
| Fish farm sediment amended with 100 ppm oxolinic acid | 5 | 6 |
| Abandoned fish farm sediment | 1300 | 1700 |
| Sewage sludge amended soil; uncontaminated | 7800 | 10 000 |
| Sewage sludge amended soil; low metal contaminated | 3700 | 4700 |
| Sewage sludge amended soil; high metal contaminated | 1200 | 1500 |
| Model experiment; control agricultural soil | 5700 | 8000 |
| Model experiment; methane amended agricultural soil | 270 | 380 |

Where nothing else is mentioned DNA were extracted from the bacterial fraction of environmental samples.

^a In $6 \times$ SSC, 30% DMSO.

^b Equivalent to *E. coli* genome; 4.1×10^6 bp.

^c DNA from a mixture of 206 isolates.

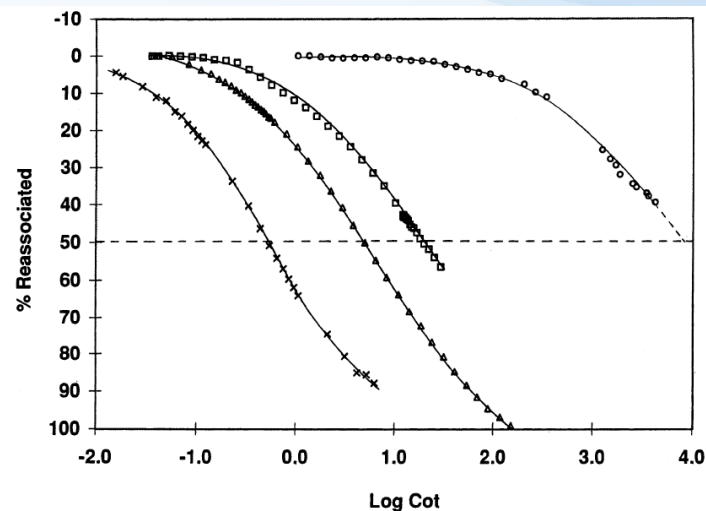


Fig. 2. Reassociation (C_0t plot) of DNA from the bacterial fraction of a pristine marine sediment ($\circ - \circ -$), mesocosm with fish farm sediment ($\square - \square -$), mesocosm with fishfarm sediment given 100 ppm oxolinic acid ($\Delta - \Delta -$), and *E. coli* ($\times - \times -$). Reassociations were performed in $6 \times$ SSC and 30% DMSO. The DNA was sheared to about 420000 dalton and reassociated at 50°C. Abscissa: Log initial concentration of single stranded DNA (C_0 in moles nucleotides l^{-1}) multiplied by time in seconds. Ordinate: Percent reassociated DNA.

Amplifikace DNA

PCR - polymerase chain reaction

- dojde k amplifikování určitého fragmentu NA (nebo celé NA)
- minimální nutné vybavení - termocycler
- užití pro detekci specifických mikrobiálních skupin či při tvorbě „community fingerprintu“

Princip:

- 2 primery
- DNA polymeráza
- směs nukleosidfosfátů
- cykly inkubačních podmínek v termocycleru (disociace, annealing, extenze)
- detekce na gelové elektroforéze po barvení ethidium bromidem

PCR

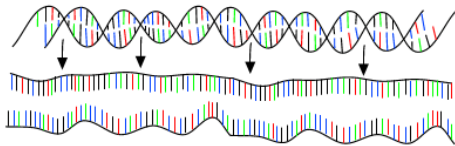
Amplifikace DNA

PCR : Polymerase Chain Reaction

30 - 40 cycles of 3 steps :

Step 1 : denaturation

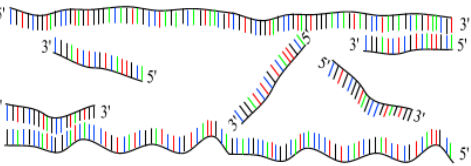
1 minut 94 °C



Step 2 : annealing

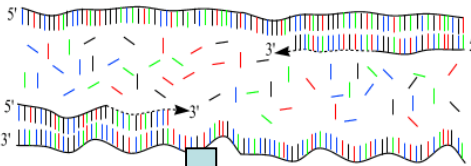
45 seconds 54 °C

forward and reverse primers !!!



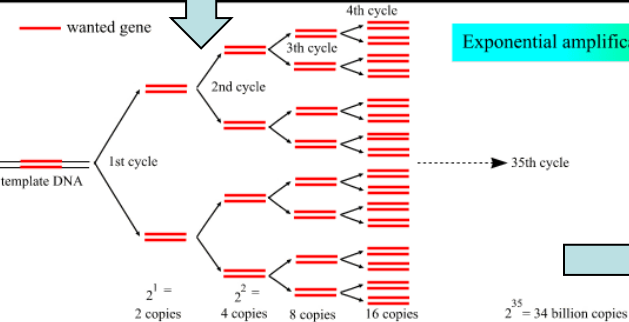
Step 3 : extension

2 minutes 72 °C
only dNTP's



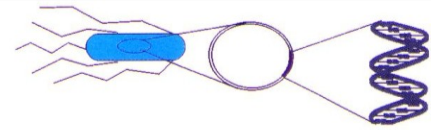
(Andy Vierstraete 1999)

Exponential amplification



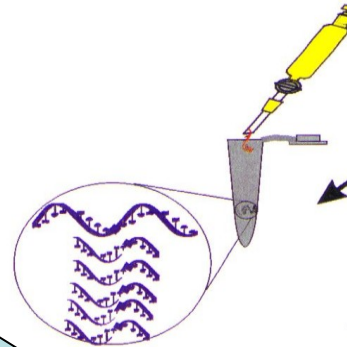
(Andy Vierstraete 2001)

Step 1. DNA containing the target sequence is released from sample to provide the template for the PCR.

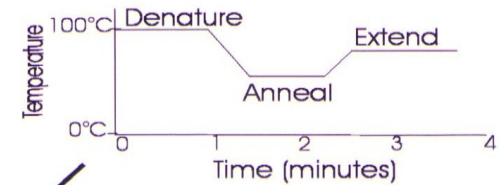
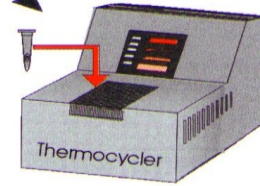


Step 2. Template is combined with a PCR mixture in a microcentrifuge tube.

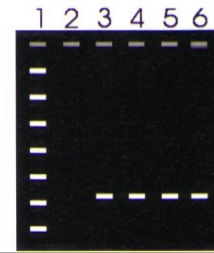
- A. PCR buffer
- B. Mg^{2+}
- C. Nucleotides (ATP, GTP, CTP, TTP)
- D. Thermostable polymerase
- E. Forward and reverse oligonucleotide primers specific for the target sequence



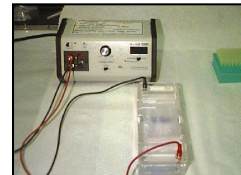
Step 3. Microcentrifuge tube is placed in a thermocycler and subjected to 25 - 50 cycles of denaturation, annealing and elongation temperatures.



Step 4. Amplified product is analyzed by molecular weight separation on an agarose gel using electrophoresis and detected by staining with ethidium bromide.



Lane 1. 100bp DNA ladder
Lane 2. Negative control
Lanes 3-6. Target PCR products



Separace NA

Gelová elektroforéza (ELFO)

- agarózová či polyakrylamidová, gradient teploty (TGGE) či chemický (DGGE)
- na základě velikosti fragmentů (kilobáze) dojde k separaci (malé jsou nejrychlejší) – proužek (band) má stejnou velikost, ale různou sekvenci
- porovnání proužků s markery o známé hmotnosti
- určitý úsek lze eluovat a podrobit dalším postupům, např. sekvenaci

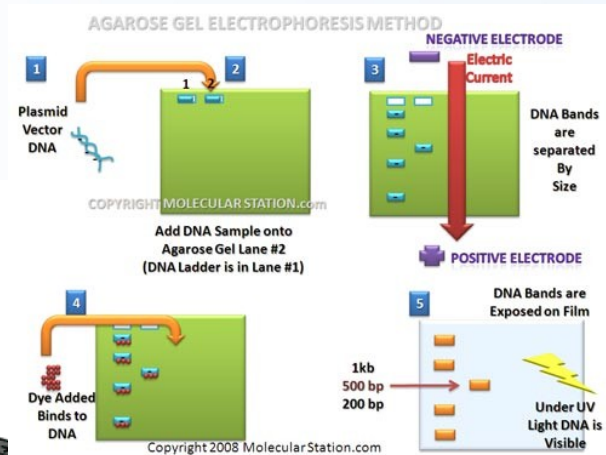
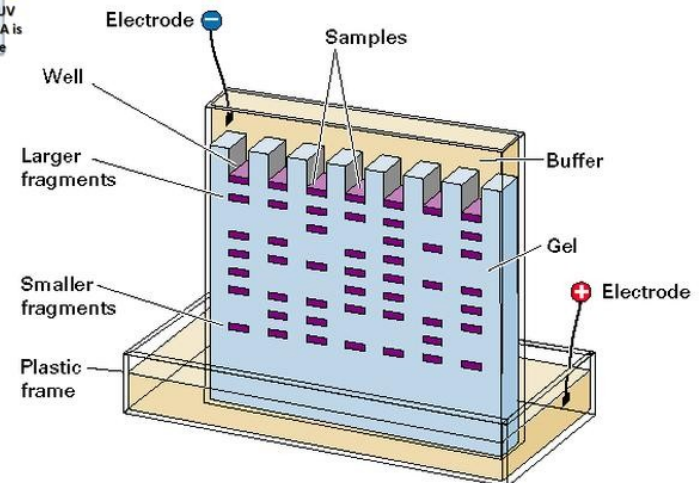
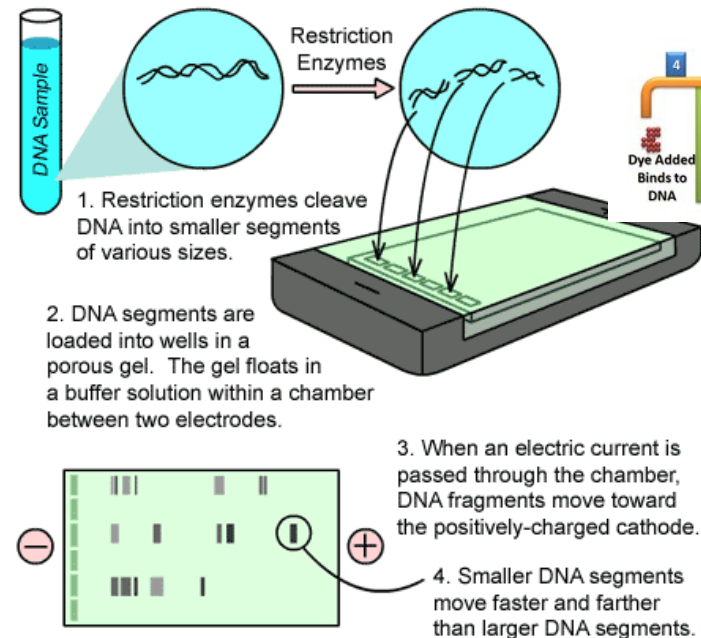


Figure S-2: Gel Electrophoresis

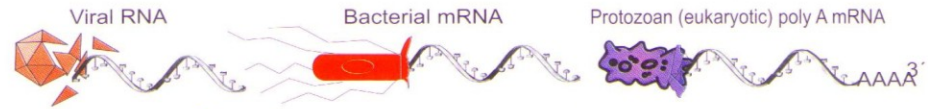


RT-PCR

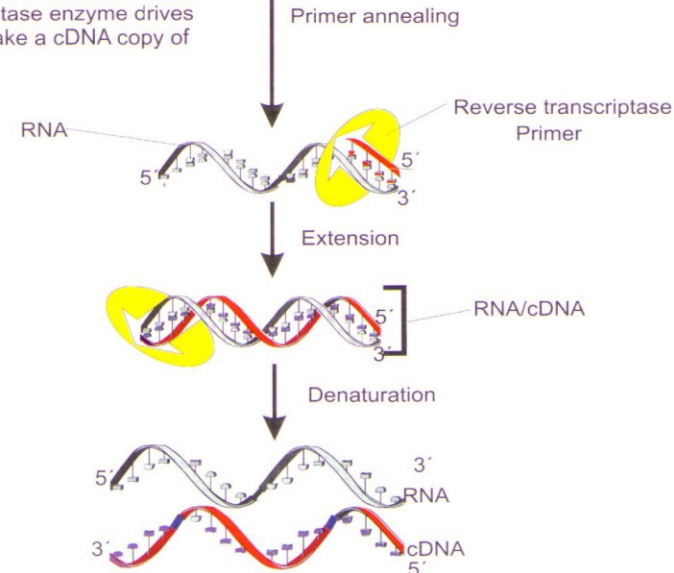
reverse transcriptase - polymerase chain reaction)

- zahrnuje enzym reverzní transkriptázu
- vytvoří DNA kopii z RNA (complementary DNA - cDNA)
- využitelná i při analýze mRNA, která dovoluje odhadnout míru metabolické aktivity – analýza exprese, tj. realizované genetické informace
- použitím malých primerů dojde k reverzní transkripci RNA a poté je použita PCR

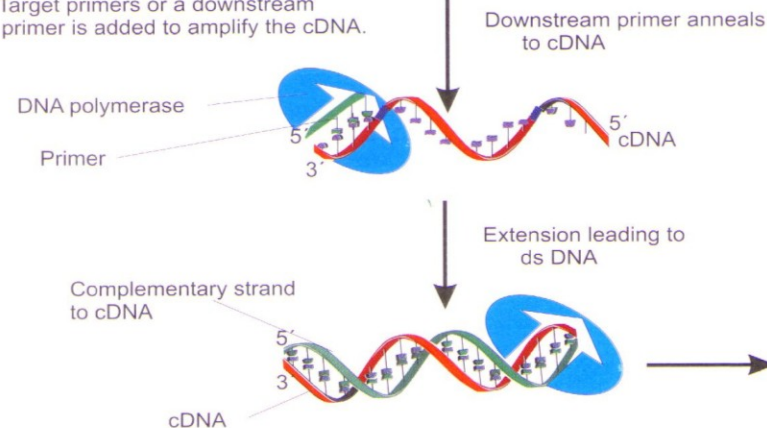
Step 1. Target RNA is isolated from the sample.



Step 2. Oligonucleotide anti-sense primer or random hexamers anneal to RNA. Reverse transcriptase enzyme drives the reaction to make a cDNA copy of the RNA.



Step 3. Target primers or a downstream primer is added to amplify the cDNA.



Step 4. Regular PCR amplification of dsDNA.

FIGURE 13.11 RT-PCR amplification of RNA. RNA is reverse transcribed to synthesize cDNA by random hexamers or a specific antisense primer. PCR can then be performed on the cDNA template.

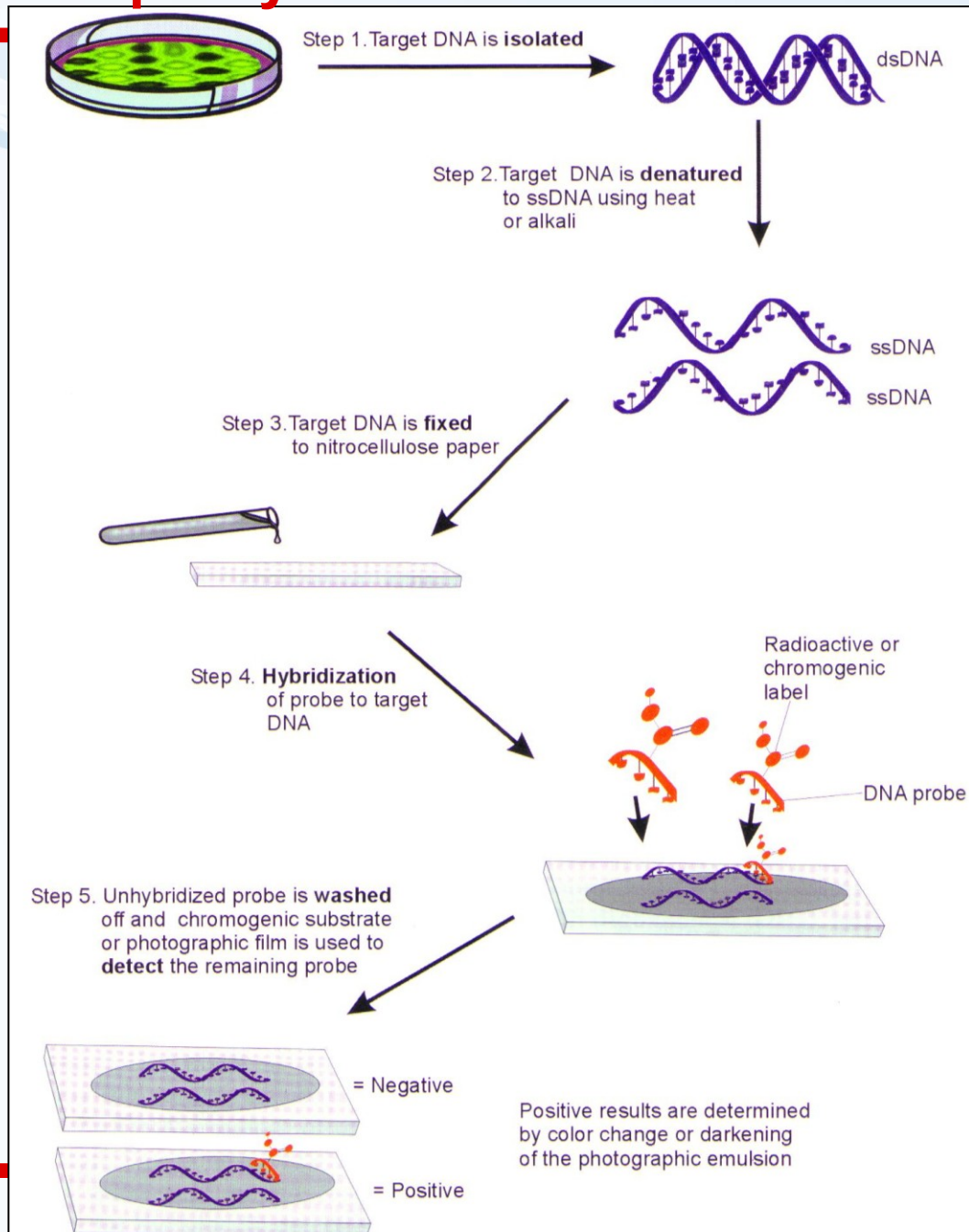
Genové próby

próby DNA – identifikují druh bakterie v extraktu či u izolovaného druhu

slouží k detekci specifické NA sekvence a ke kvantifikaci jejího množství

DNA je po extrakci, izolaci a purifikaci a denaturaci fixována na membráně a hybridizována s DNA próbami

próby jsou značeny radioaktivně (^{32}P), digoxigeninem (DIG), biotinem či fluoresceinem apod.



Genové próby

detekce přímá pomocí autoradiografie (fotografický obraz) nebo nepřímá navázáním protilátky či konjugátu a následné detekce fluorescence, chemiluminiscence či kolorimetricky

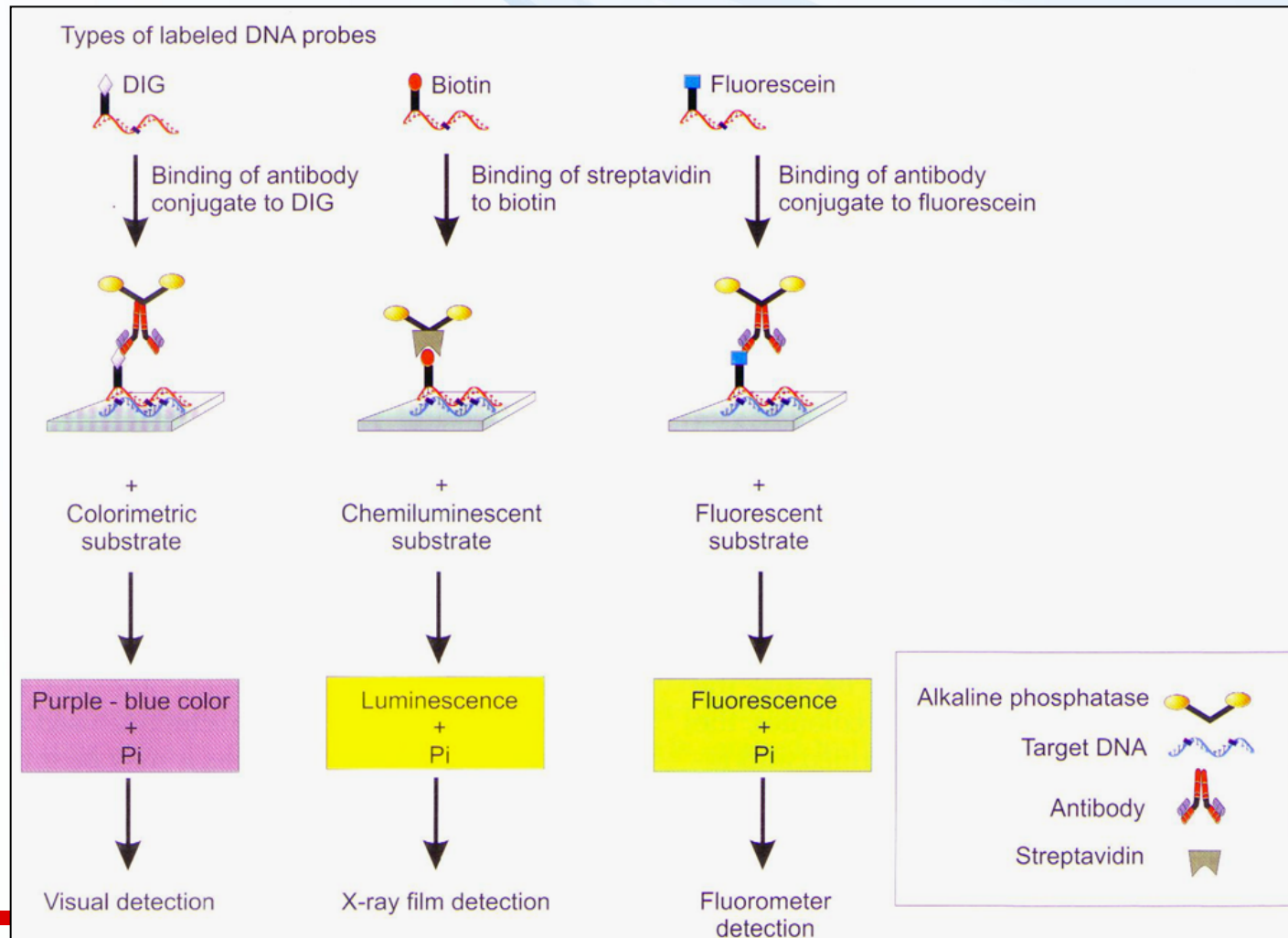


FIGURE 13.2 Gene probe detection of a DNA sequence.

Colony hybridization

aplikace pro celé kultury na agarových plotnách

Princip:

filtrační papír je otisknut na Petriho misce, takže dojde k adhezi buněk z kolonií

následuje lýze buněk

označení radioaktivními próbami a detekce

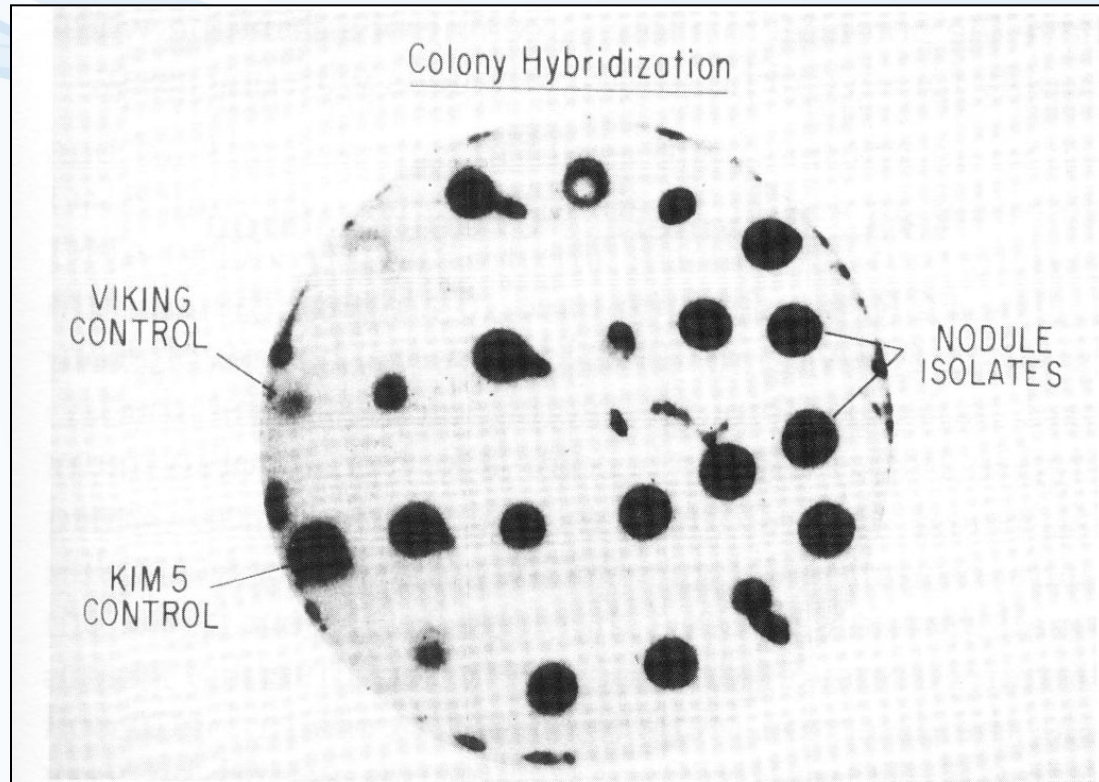


FIGURE 13.4 A colony lift from a petri plate containing a mixed population of the nitrogen-fixing bacteria rhizobia isolated from root nodules. The gene probe was constructed from a unique plasmid associated with the isolate known as KIM 5. (Reprinted from *Soil Biol. Chem.*, 21, I. L. Pepper *et. al.*, "Strain identification of highly competitive bean rhizobia isolated from root nodules: use of fluorescent antibodies, plasmid profiles and gene probes," pp. 749–753, © 1989 with permission from Elsevier Science.)

Southern blotting

identifikuje DNA

northern blotting

identifikuje RNA

Princip:

NA jsou separovány gelovou elektroforézou

po separaci jsou přemístěny (= blotting) na membránu hybridizace s próbami

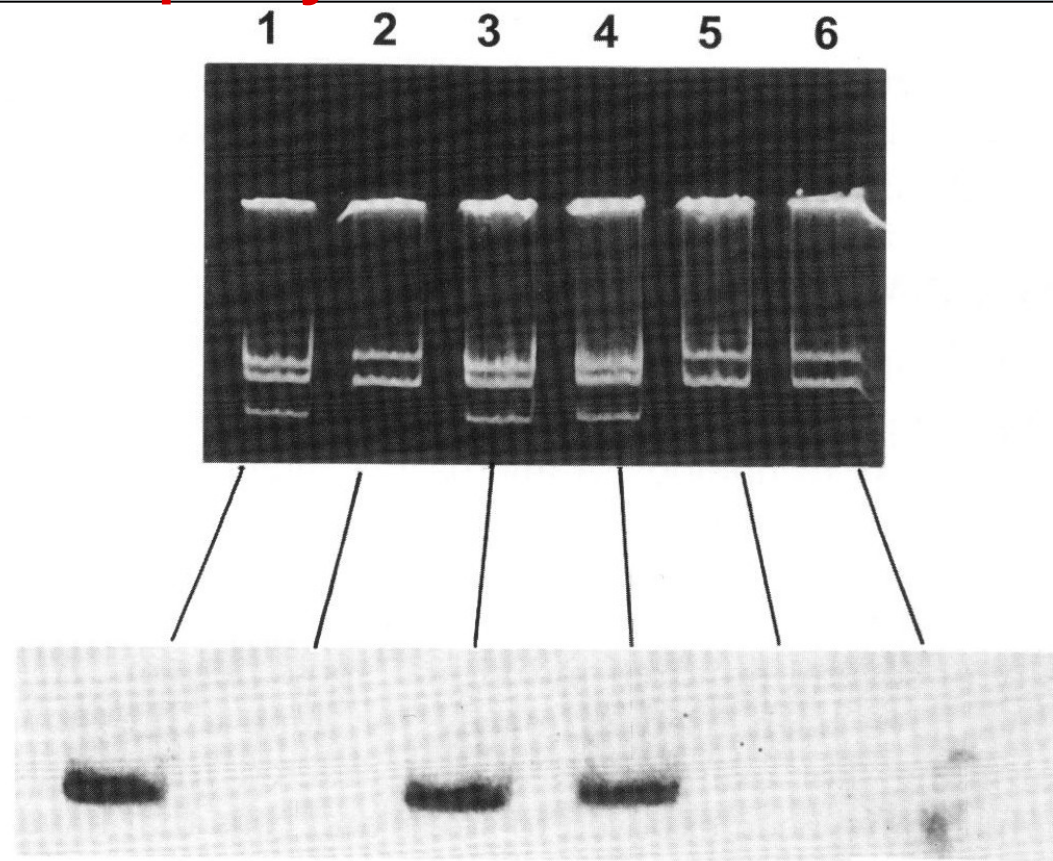
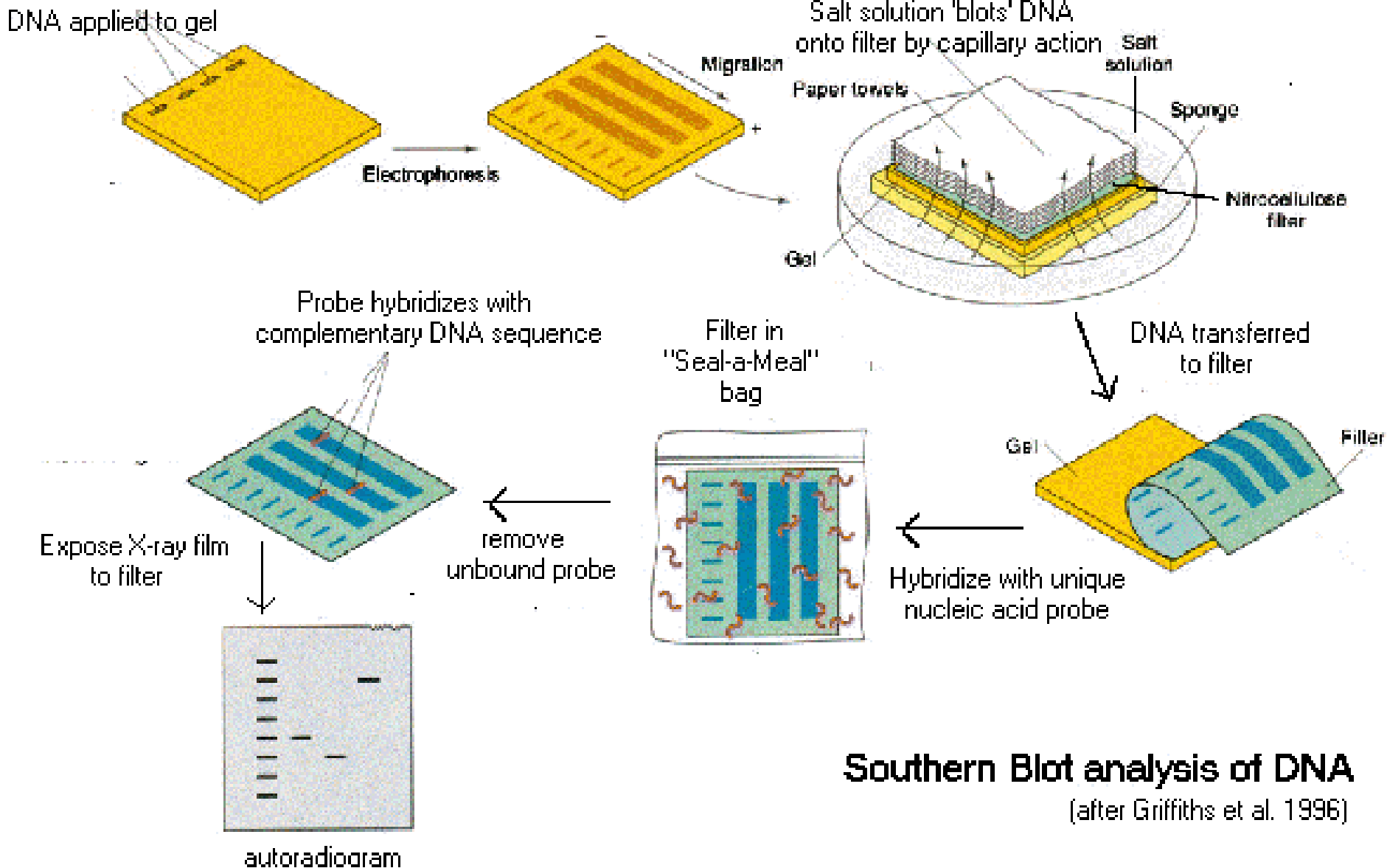


FIGURE 13.5 Southern blot of a DNA sequence associated with a unique plasmid contained within the rhizobial strain KIM 5. The upper portion of the figure shows the original plasmid profiles of two different rhizobial isolates. The gene probe was constructed from the smallest plasmid associated with this strain. Isolates that do not contain the small plasmid are not detected. The bottom portion of this figure shows the Southern blot. (Reprinted from *Soil Biol. Chem.*, 21, I. L. Pepper *et al.*, "Strain identification of highly competitive bean rhizobia isolated from root nodules: use of fluorescent antibodies, plasmid profiles and gene probes," pp. 749–753, © 1989 with permission from Elsevier Science.)

Genové próby

Southern blotting



Southern Blot analysis of DNA

(after Griffiths et al. 1996)

Dot blotting

technika hodnotící přítomnost dané sekvence NA bez přecházející separace na gelu

Princip:

identická množství NA jsou přeneseny na nitrocelulózový filtrační papír a následně próbovány

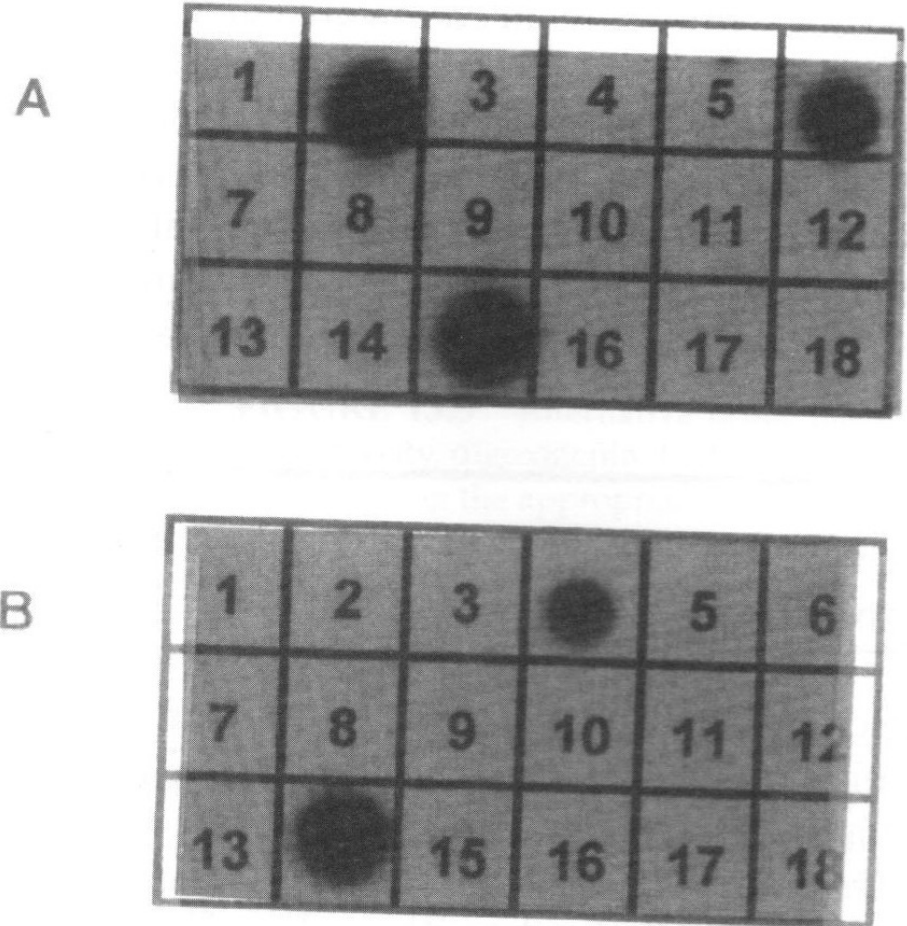


FIGURE 13.6 Dot blot hybridization showing detection of two bacterial isolates. *Arthrobacter* isolates that degraded toluene, ethylbenzene, and xylene (TEX) and *Sphingomonas* isolates that degraded xylene (X) were detected by the use of two individual gene probes. (Photos courtesy E. M. Jutras.)

Genové próby

In situ hybridization

- užívá próby, které přímo hybridizují s cílem uvnitř buněk, nejčastěji hybridizace na 16S rRNA, což je výhoda neboť rRNA je v buňkách mnoho (10^4) -> silný signál
- síla signálu je úměrná počtu ribozómů a tím pádem indikuje růstovou rychlost mikroorganismů
- signál detekován epifluorescenčním mikroskopem
- FISH (fluorescent in situ hybridization) – fluorescenční in situ hybridizace
- FISH-MAR(FISH-microautoradiography)–FISH-mikroautoradiografie

Table 13-2 DNA Probes

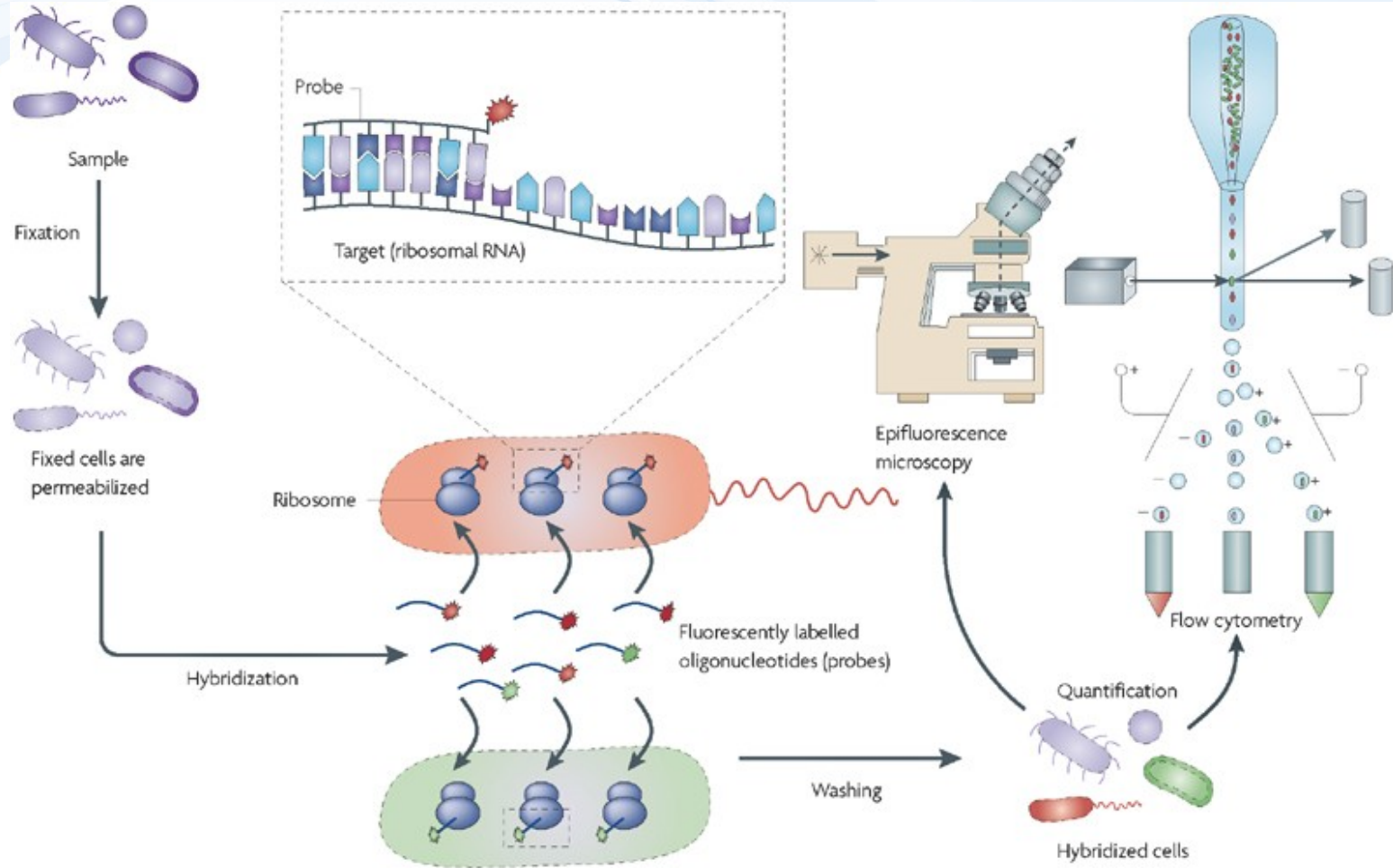
| Probe | Sequence | Reference |
|---|-----------------------|-----------|
| Archaeobacterial probe | TCCGGCRGGATCAACCGGAA | 17 |
| Eukaryotic probe | GGGCATCACAGACCTG | 17 |
| Eubacterial probe | ACCGCTTGT-GCGGGCCC | 17 |
| Universal probe | GWATTACCGCGGCKGCTG | 17 |
| Control probe | GTGCCAGCMGCCGCGG | 17 |
| ALF1b, alpha 16s proteo bacteria ^a | CGTTCG(C/T)TCTGAGCCAG | 27 |
| BET42a, beta 23S proteobacteria | GCCTTCCCACCTTCGTIT | 27 |
| GAM42a, gamma 23S proteobacteria | GCCTTCCCACATCGTIT | 27 |
| EUB338, eubacteria 16S | GCTGCCTCCCGTAGGAGT | 2, 52 |
| Eucaryotic | ACCAGACTTGCCCTCC | 2 |

R = purine; W = A or T; K = G or T; M = A or C.

^aAlso detects some non-alpha group bacteria.

Molekulárně biologické techniky

FISH



Nature Reviews | Microbiology

Nejčastější metody pro získání „genetického fingerprintu společenstva“

ARDRA - amplifikovaná ribosomální DNA restrikční analýza

RFLP - restrikční analýza mnohotvárnosti délky fragmentů

T-RFLP - koncová restrikční analýza mnohotvárnosti délky fragmentů

DGGE - denaturující gradientová gelová elektroforéza

TGGE - teplotní gradientová gelová elektroforéza

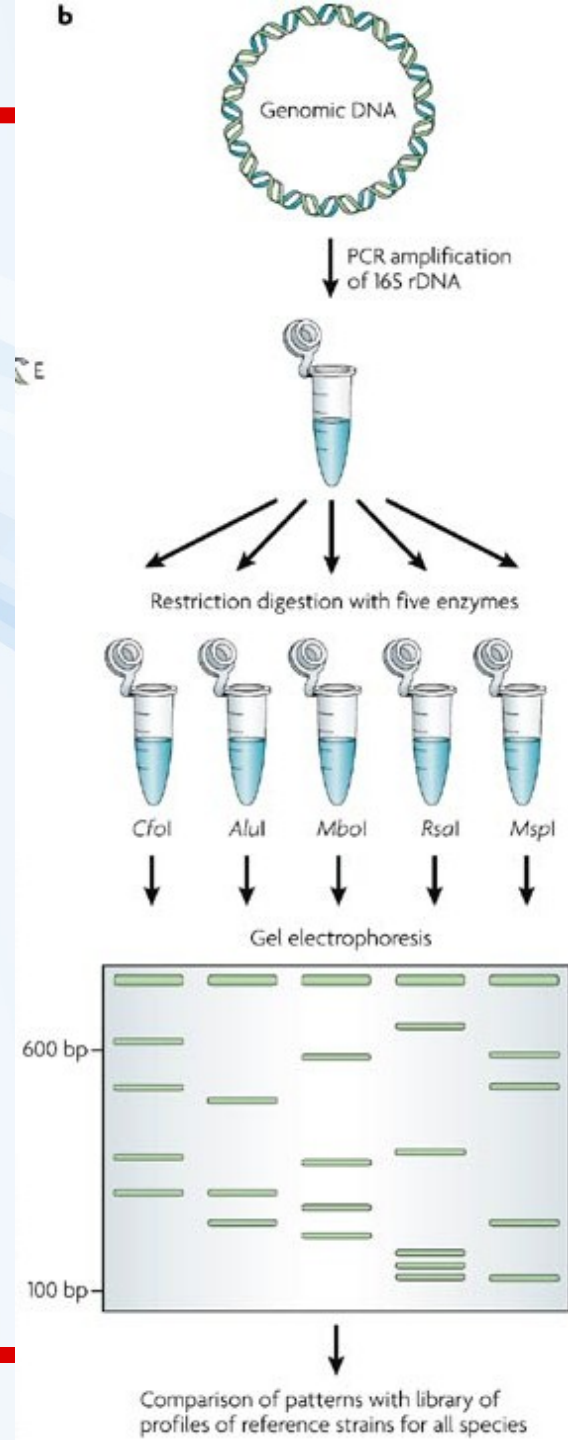
ARISA – automated ribosomal intergenic spacer analysis - různorodost délek mezi geny malé a velké ribozomální podjednotky

Microarrays - mikročipy

SIP (stable isotope probing) – značení stabilními izotopy

ARDRA

- extrakce, izolace a purifikace DNA
- PCR amplifikace
- fragmentace pomocí nesespecifických restričních enzymů
- rozdělení fragmentů pomocí ELFO





Detection of shifts in microbial community structure and diversity in soil caused by copper contamination using amplified ribosomal DNA restriction analysis

FEMS Microbiology Ecology 23 (1997) 249–261

Eric Smit*, Paula Leeflang, Karel Wernars

National Institute of Public Health and the Environment (RIVM), P.O. Box 1, NL-3720 BA Bilthoven, The Netherlands

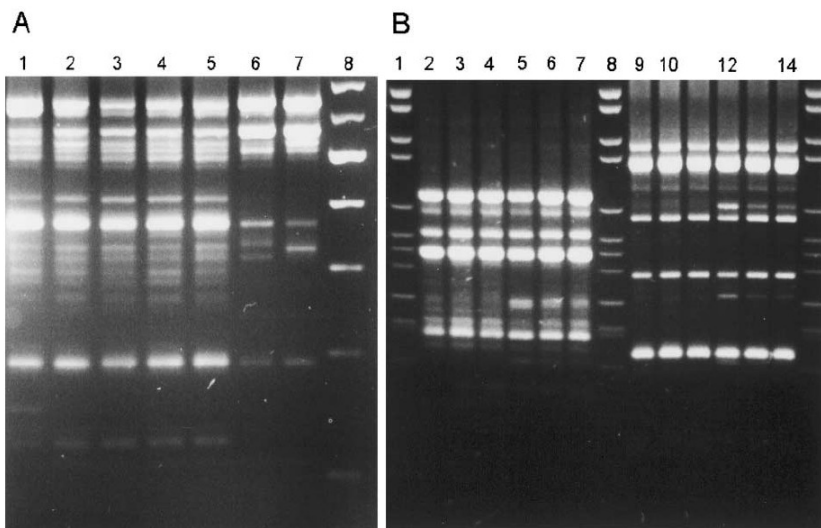


Fig. 3. Whole community ARDRA patterns of Wildekamp (W), Flevo (F) and Lovinkhoeve (L) soil. A: Whole community ARDRA patterns generated with primers for eubacteria digested with *Taq*I. Lane 1, F 2 February 1995; lane 2, F 6 August 1995; lane 3, L 29 September 1995; lane 4, L 31 January 1996; lane 5, L 1 May 1996; lane 6, W with copper contamination; lane 7, W without copper contamination; lane 8, marker. B: Whole community ARDRA patterns of Wildekamp soil samples, with and without copper contamination, generated with primers for eubacteria: lane 1, marker; lanes 2, 3, 4, control soil samples digested with *Aha*I; lanes 5, 6, 7, soil with 750 kg Cu ha⁻¹ digested with *Aha*I; lanes 9, 10, 11, control soil samples digested with *Hin*II; lanes 12, 13, 14, soil samples with copper digested with *Hin*II.

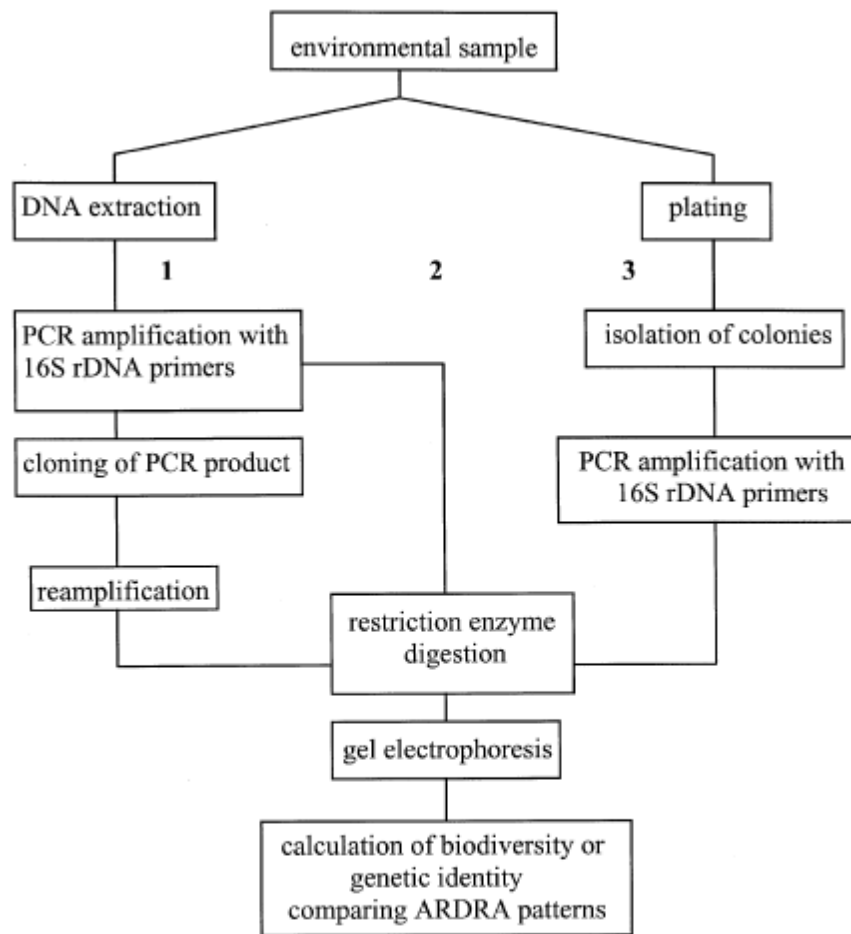


Fig. 1. Schematic representation of the experimental set-up; (1) ARDRA analysis of 16S rDNA clones, (2) whole community ARDRA patterns, (3) ARDRA analysis of isolates.



GENETIC FINGERPRINTING - AP-PCR (arbitrarily primed PCR)

Princip:

nespecifické primery (10 - 20 base pairs - bp)

nespecifická amplifikaci genomu

separace na gelové elektroforéze

barvení a získání fingerpintu



FIGURE 13.14 Illustration of AP-PCR. Here a single arbitrary primer (682) generates unique DNA fingerprints from 18 different bacterial genomes (lanes 1–18). Lane N is a negative control. Lane M is a 123-bp DNA size ladder in which the size of each successive band increases by 123 bp. (Photo courtesy J. L. Pepper.)

RFLP

- fragmentace pomocí restričních enzymů

- srovnává délku fragmentů pro různé druhy; vychází s předpokladu, čím vzdálenější jsou fylogeneticky organismy, tím více se liší jejich sekvence DNA

- lze výborně použít pro studium společenstva (studium genové heterogenity)

Princip: fragmentace DNA na malé oligonukleotidy (4-6 bp); separace fragmentů na ELFO; hybridizace s próbami; barvení ethidium bromidem

T-RFLP – využívá jen koncových úseků a značených primerů

RFLP analysis

DNA from nuclei

Test locus
(to be probed)

Digest with restriction enzyme

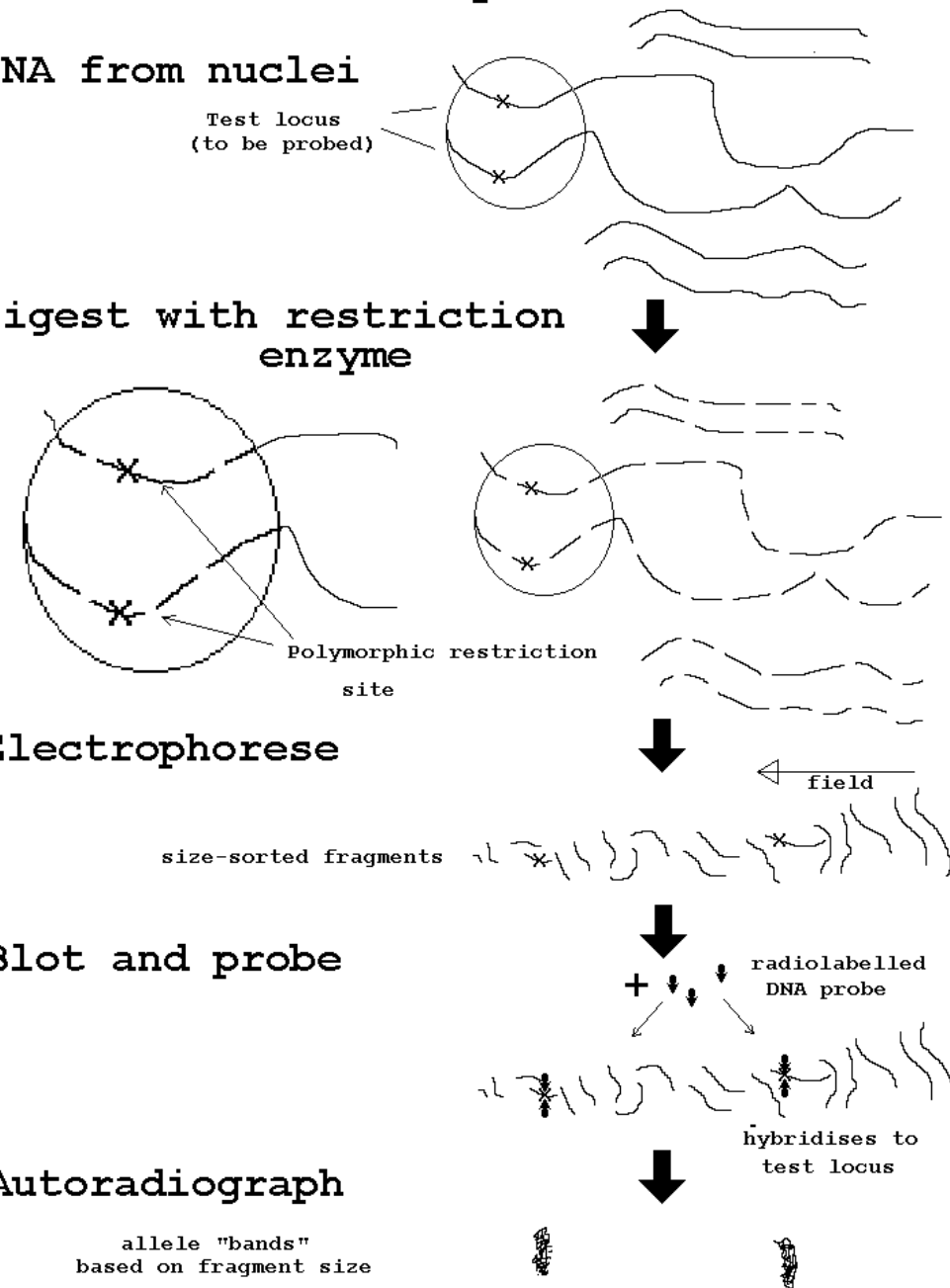
Electrophoresis

Blot and probe

Autoradiograph

allele "bands"
based on fragment size

0 10 20
kilobases



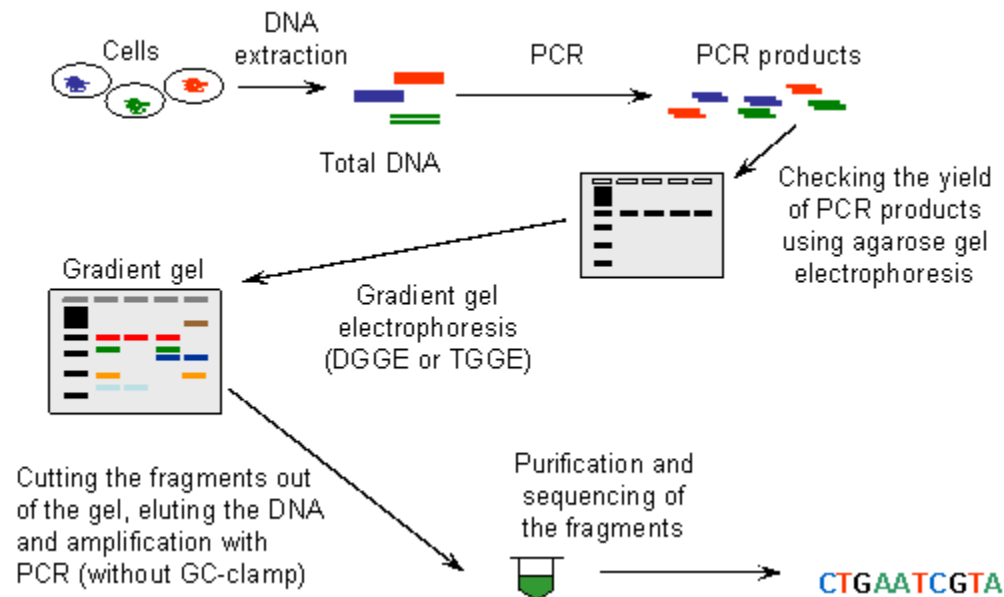
Molekulárně biologické techniky

DGGE - denaturing gradient gel electrophoresis

TGGE - temperature gradient gel electrophoresis

Princip:

- aplikace nespécifických primerů z oblasti 16S rDNA v PCR dá vznik amplifikované 16S rDNA
- vznikají fragmenty téměř stejné délky (cca 500 bp) ale jiného složení
- separace na gelové elektroforéze je pak založena na různé migraci v závislosti na lineárně se zvyšujícím gradientu DNA denaturantů (močovina/formaldehyd či teplota)
- čím více je restrikčních proužků, tím vyšší je diverzita - **vzniká charakteristický fingerprint**





Molekulárně biologické techniky

- Autoři srovnávali tři půdy různě kontaminované rtutí: A - 7 $\mu\text{g/g}$, B - 28 $\mu\text{g/g}$, C - 511 $\mu\text{g/g}$.
- Počet DGGE proužků se významně lišil mezi půdami, nejvyšší byl v půdě A a nejnižší v půdě C.
- Vysoká koncentrace rtuti významně ovlivnila složení mikrobiálního společenstva.

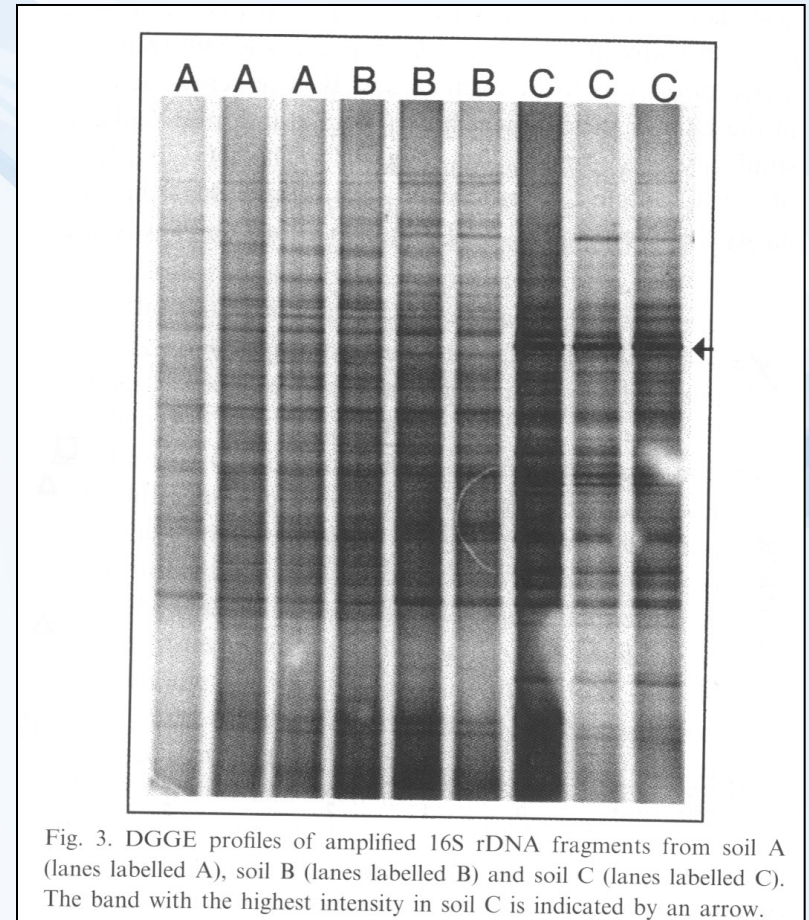
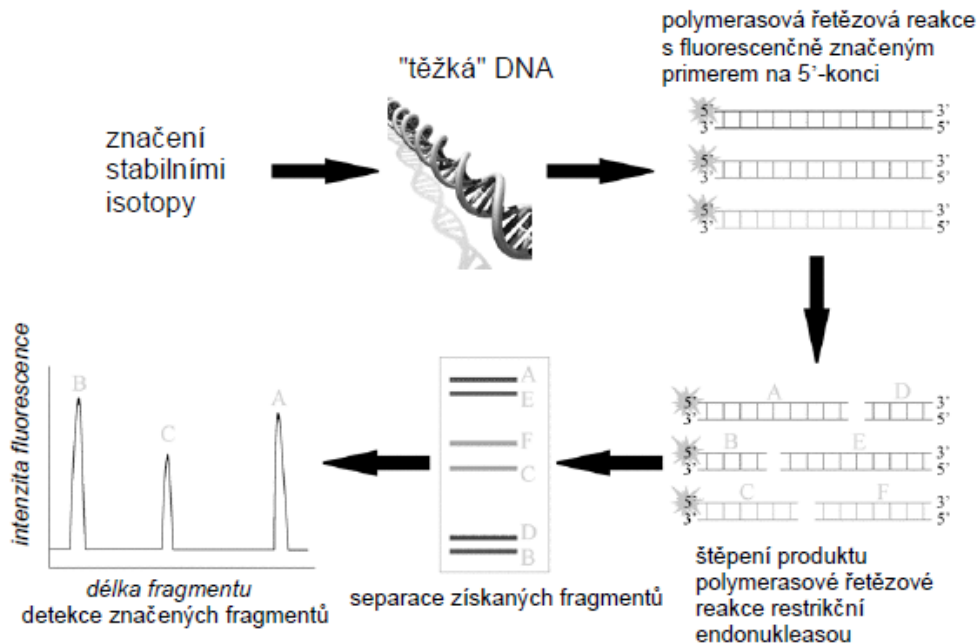
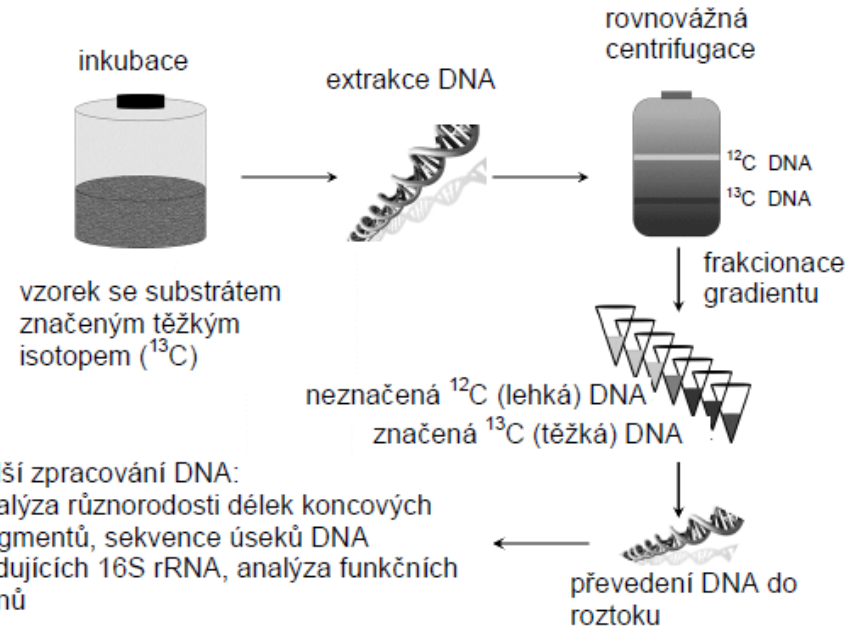


Fig. 3. DGGE profiles of amplified 16S rDNA fragments from soil A (lanes labelled A), soil B (lanes labelled B) and soil C (lanes labelled C). The band with the highest intensity in soil C is indicated by an arrow.

Značení stabilními izotopy (SIP)

- Dlouho se vědci snažili najít způsob jak sledovat aktivity mikroorganismů bez nutnosti jejich kultivace v laboratoři
- Molekulárně – biologické techniky, zdá se, mají řešení jak popsat aktivity mikroorganismů tak, jak probíhají přímo v prostředí
- Klasické hodnocení sekvencí (např. 16S, 18S rRNA) nedává odpověď na metabolickou aktivitu MO
- SIP umožňuje detekovat MO aktivně se účastnící metabolického pochodu
- SIP identifikuje MO, které jsou schopny využívat daný substrát (polutant ...) a následně geny, které jsou do využití zapojeny
- Využívá se ^{13}C či ^{15}N



Chem. Listy 102, 474–479 (2008)



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

Srovnání všech přístupů



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Inovace tohoto předmětu je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky



Srovnání všech přístupů

TABLE 1

Advantages, disadvantages, and pertinent information provided by current soil microbiological analyses

| Analysis | Advantages | Disadvantages | Information Provided |
|---------------------------------------|--|---|--|
| Culturable species Plate counts | rapid procedure inexpensive isolates individual species | most species are not culturable at this time limited information | diversity measures of culturable species |
| Substrate Utilization | rapid procedure inexpensive reliable fingerprints of microbial communities | plates are not designed for soil analyses relativity of relationships | <ul style="list-style-type: none"> • provide similarity indices for communities • metabolic potential |
| Gas chromatography whole-soil FAME | rapid procedure reliable fingerprints of lipid profile identification of biomarkers | detects live and dead microbes detects plant and humic materials | <p>provides similarity indices for communities</p> <p>individual peaks have been identified as biomarkers can be used for isolates or whole soil</p> |
| Phospholipid FAME | reliable fingerprints of live microbial community identification of biomarkers indicator of biomass | long procedure toxic chemicals generated | <ul style="list-style-type: none"> • provides similarity indices for communities • individual peaks have been identified as biomarkers • can be used for isolates or whole soil |

Srovnání všech přístupů

Nucleic acid
PCR

selective amplification of
16S rRNA gene frag-
ments from mixed DNA
faster process

production of chimeric
products when
extracting DNA
sequences may be
preferentially selected

provides information used in
further analyses
can amplify specific genes

RT

more rigorous nucleic acid
extraction techniques
can be applied
selective retrieval of rRNA
sequence information

DGGE

rapid evaluation of distribu-
tion of amplifiable
sequence types
allows separation of PCR
products from different
organisms
separation of PCR products
from complex mixtures
may not be possible

not detecting all populations
limited sequence data
separation reduced for
fragments longer
than 500 bp

used to infer phylogenetic
affiliations of community
members
discover populations that can't be
identified by cloning