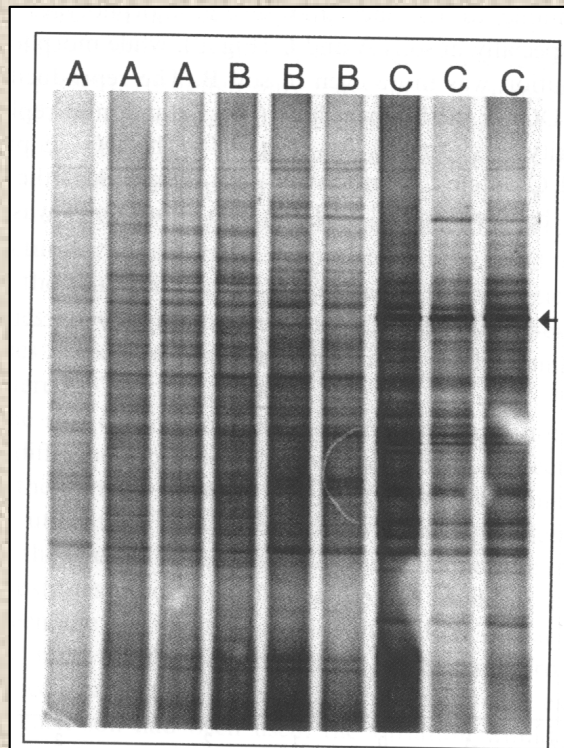


Diverzita mikrobiálních společenstev

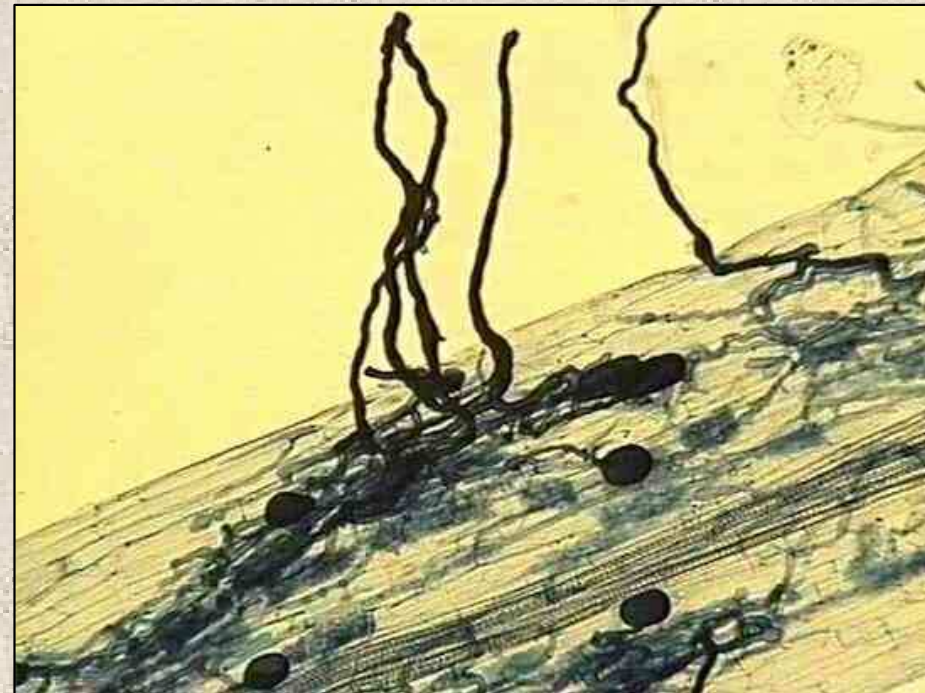
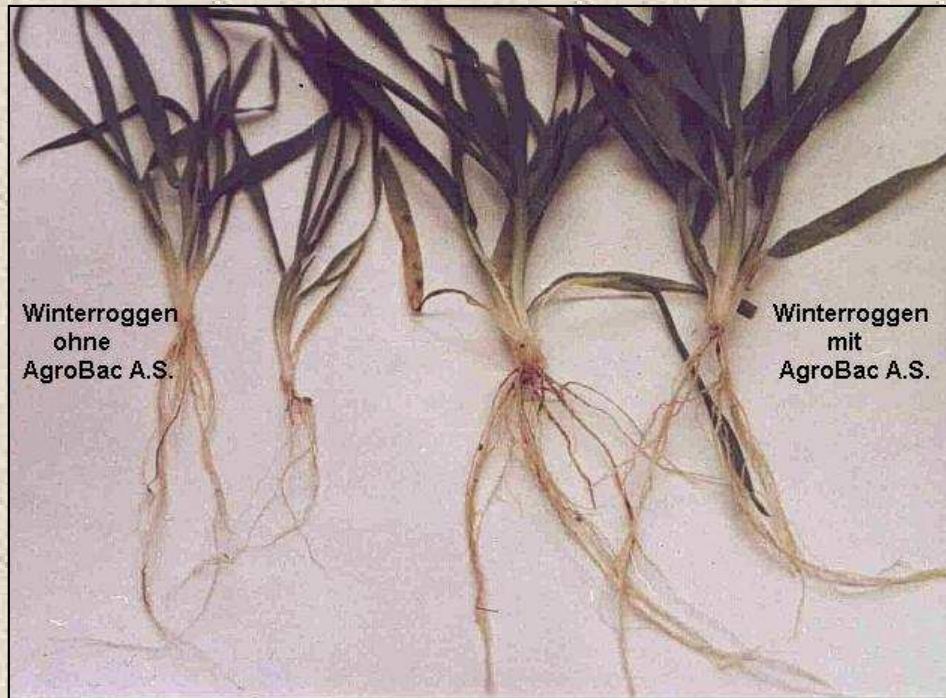


Společenstva mikroorganismů

= 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)



Selekce, strategie

Hlavní hybatele:

- selekce
- diverzita
- sukcese

Strategie a selekce:

r a K strategové - lze je vidět v rovnici růstu:

$$\frac{dX}{dt} \cdot \frac{1}{X} = r - \left(\frac{r}{K} \cdot X \right)$$

r = rychlost růstu populace na jednotku kapacity prostředí

K = únosná kapacita prostředí

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

Selekce, strategie

r strategové

- vysoká reprodukce
- strategie je růst, jinak ne příliš schopni kompetice
- většinou zymogenní org.
- začínají kolonizaci nových prostředí
- strategie maximálního růstu (μ_{max})
- lépe přežívají v nízkých hustotách společenstva, v prostředích nelimitovaných substrátem
- "growers"

K strategové

- konzervativní
- využívají "pečlivě" zdrojů
- většinou autochtonní
- lépe přežívají v diverzifikovaném společenstvu
- závisí na svých specializacích (na daném prostředí)
- "non growers"

Lze stanovit např.:

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

Biodiverzita

- je funkcí ekosystému (ekosystém má mnoho/málo nik \implies 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

Biodiverzita

- tíhne být nízká ve specializovaných ekosystémech, kde je jeden faktor určující (variant)

Přirozený stav pro mikrobiální společenstva je vysoká diverzita - snižována je stresem a negativními zásahy.

=====> **biodiverzita mikroorganismů je ideální mírou biologické kvality systému**

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 = 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 = number of individuals

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

Evenness (e)

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

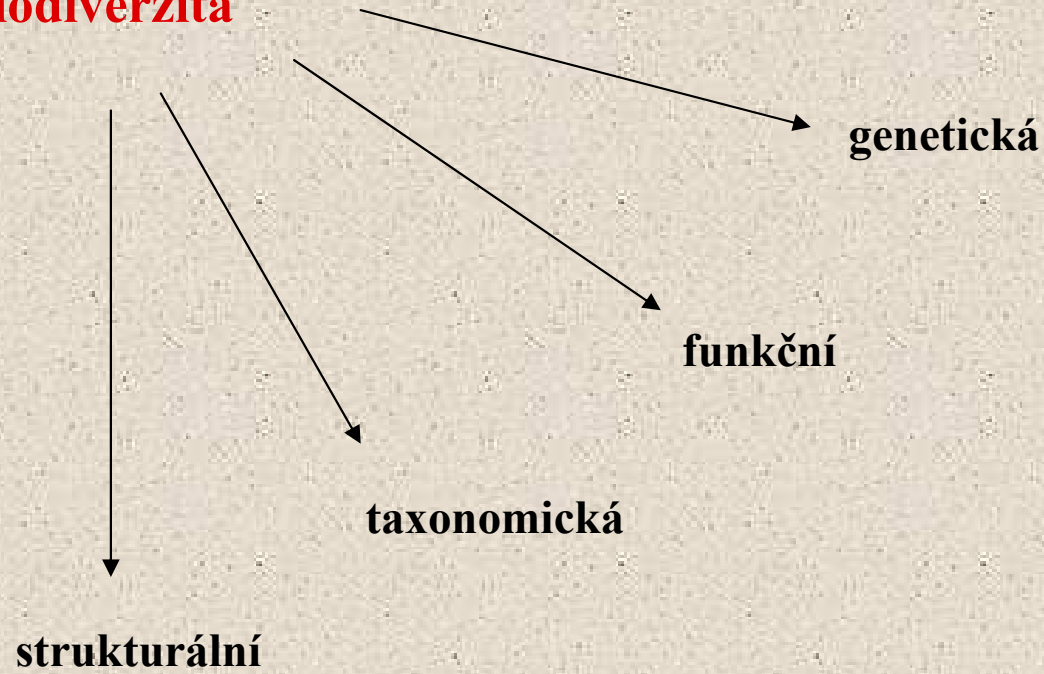
S = number of species

Equitability (J)

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

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

Biodiverzita



?? interpretace ??

?? kvantitativní míry ??

?? vzájemné vztahy markerů ??

A. Genetické a molekulární techniky

Genetické a molekulární techniky

- primárně používány pro identifikaci, ale sekundárně využitelné i při hodnocení biodiverzity (proto uvedeny v této části), jako biomarkery apod.

Příklady:

- próby DNA - identifikace typů bakterií
- RT-PCR (reverse transkriptase - polymerase chain reaction) - určí, které geny jsou funkční na vyizolovaných bakteriích atd.

Ale i přímé hodnocení genetické diverzity - vyjádří heterogenitu DNA společenstva:

Rychlost reannealingu:

extrakce DNA - čištění DNA - měření opětovného spojení řetězců po denaturaci (reannealing)

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

- rychlost je spojena s podobností fragmentů: **rychlý reannealing \implies malá diverzita**

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

není nutná
kultivace
mikroorganismů

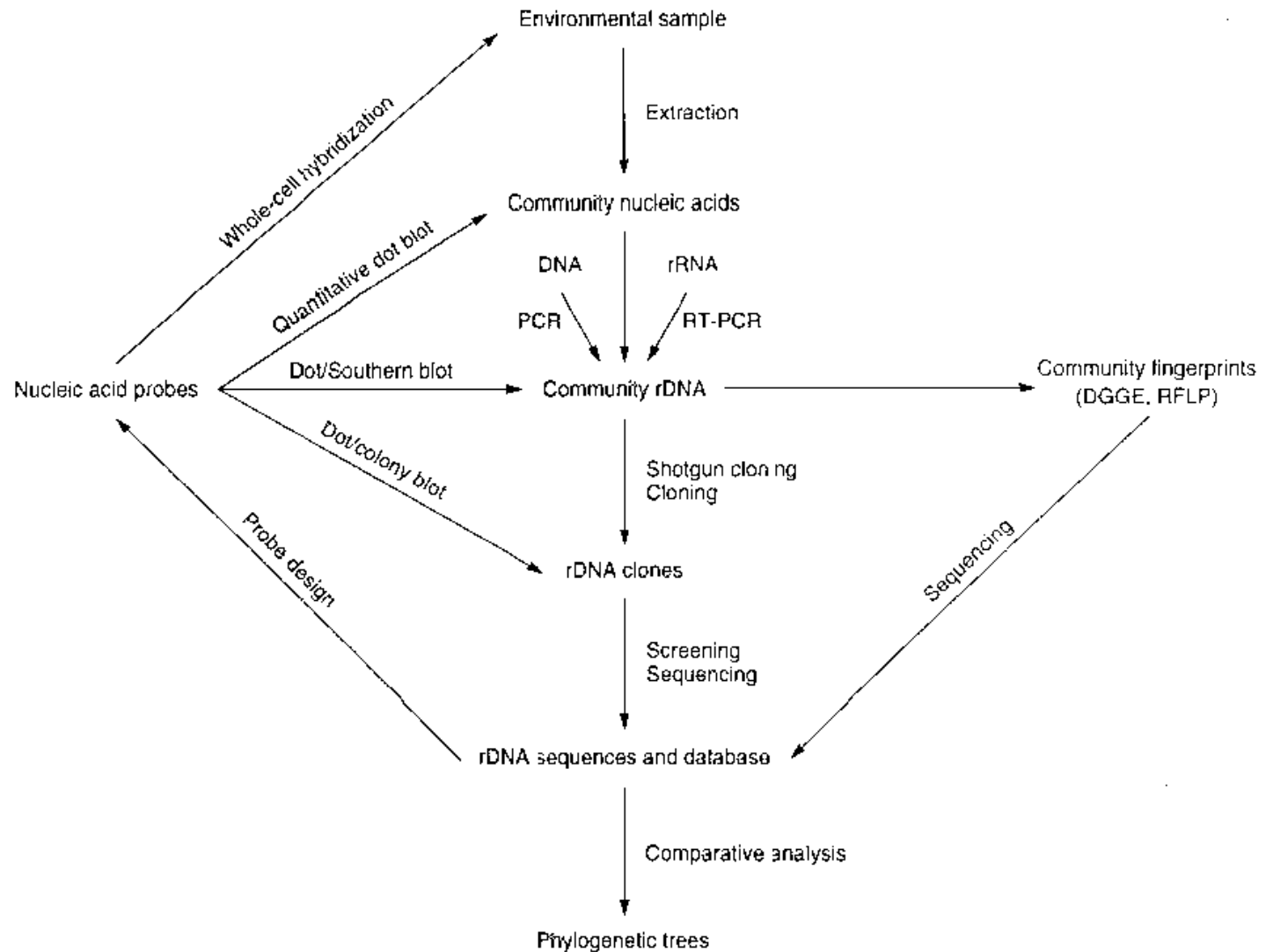


Figure 7.7

Phylogenetic relationships of microorganisms in environmental samples can be determined without viable culturing based on nucleic acid analyses. In particular, analysis of ribosomal RNA genes provides the tools for identifying specific microbial populations. Reverse transcription (RT) and amplification of DNA using the polymerase chain reaction (PCR) are useful in obtaining sufficient quantities of target nucleic acid sequences for analyses. Based on specific diagnostic gene sequences, gene probes can be designed to detect specific target organisms. In this manner complex microbial communities can be analyzed. (Note: DGGE = denaturing gradient gel electrophoresis, RFLP = restriction fragment length polymorphism.) (Source: Pace 1996.)

Genetické a molekulární techniky

- základem většiny genetických technik je klonování fragmentu DNA (není nutná kultivace), RNA se používá méně často (její extrakce a stabilita je horší)

Kroky obecně:

1) extrakce DNA

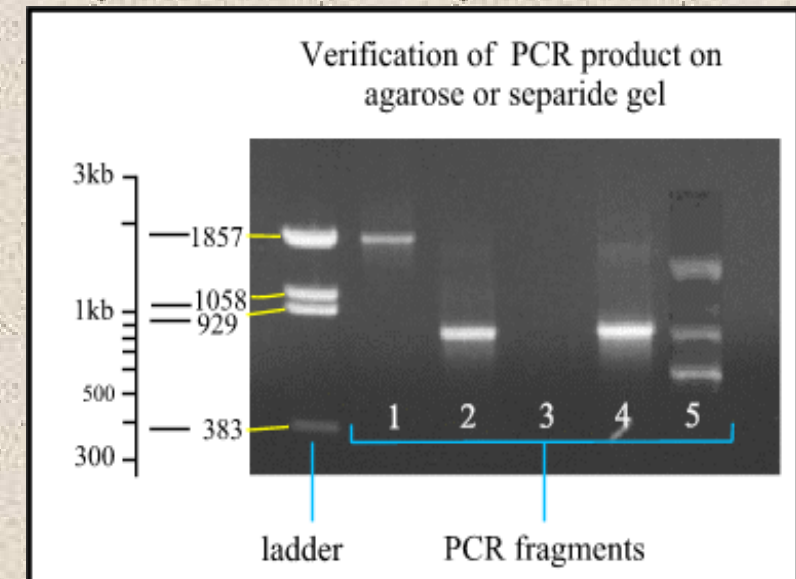
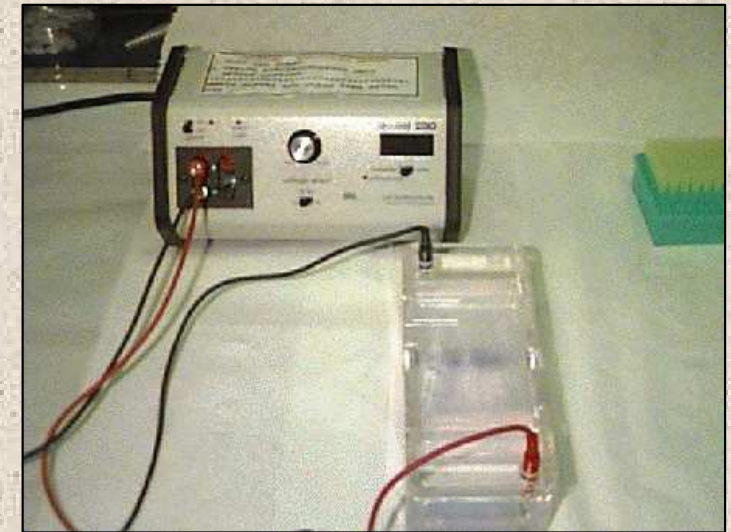
- promývání a frakcionace buněk gradientovou centrifugací, následuje lýze a extrakce
- lýze buněk *in situ*, extrakce, separace DNA od Corg (chromatografie, elektroforéza, srážení, extrakce, centrifugace)

2) fragmentace <====> hybridizace

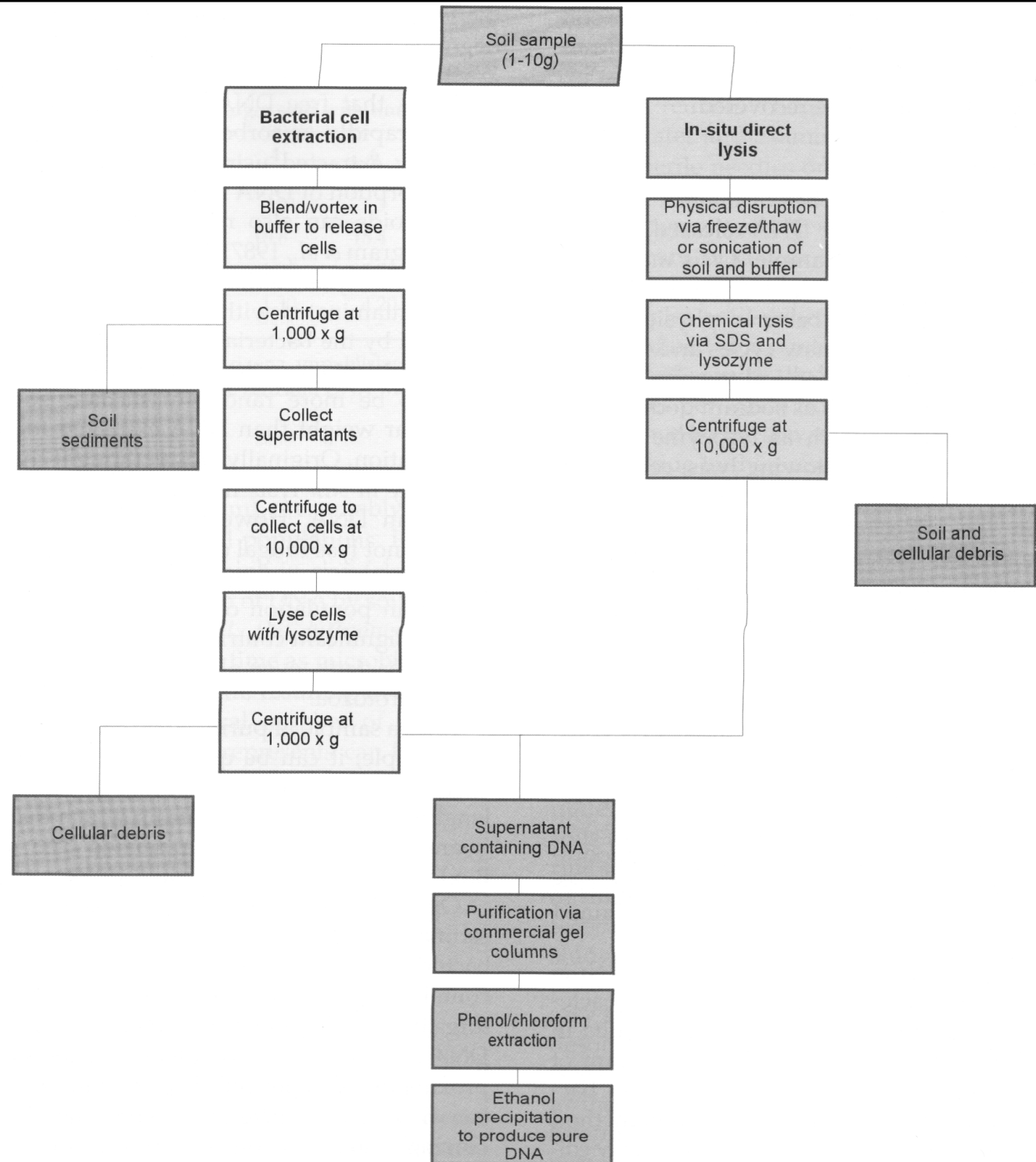
Fragmentace - využití restrikčních enzymů; **Denaturace** - chemická či teplotou

3) detekce, např. separace na gelové elektroforéze

- agarózová či polyakrylamidová
- na základě velikosti fragmentů (kilobáze) dojde k separaci (malé jsou nejrychlejší)
- porovnání proužků s markery o známé hmotnosti



Genetické a molekulární techniky - extrakce DNA z půdy



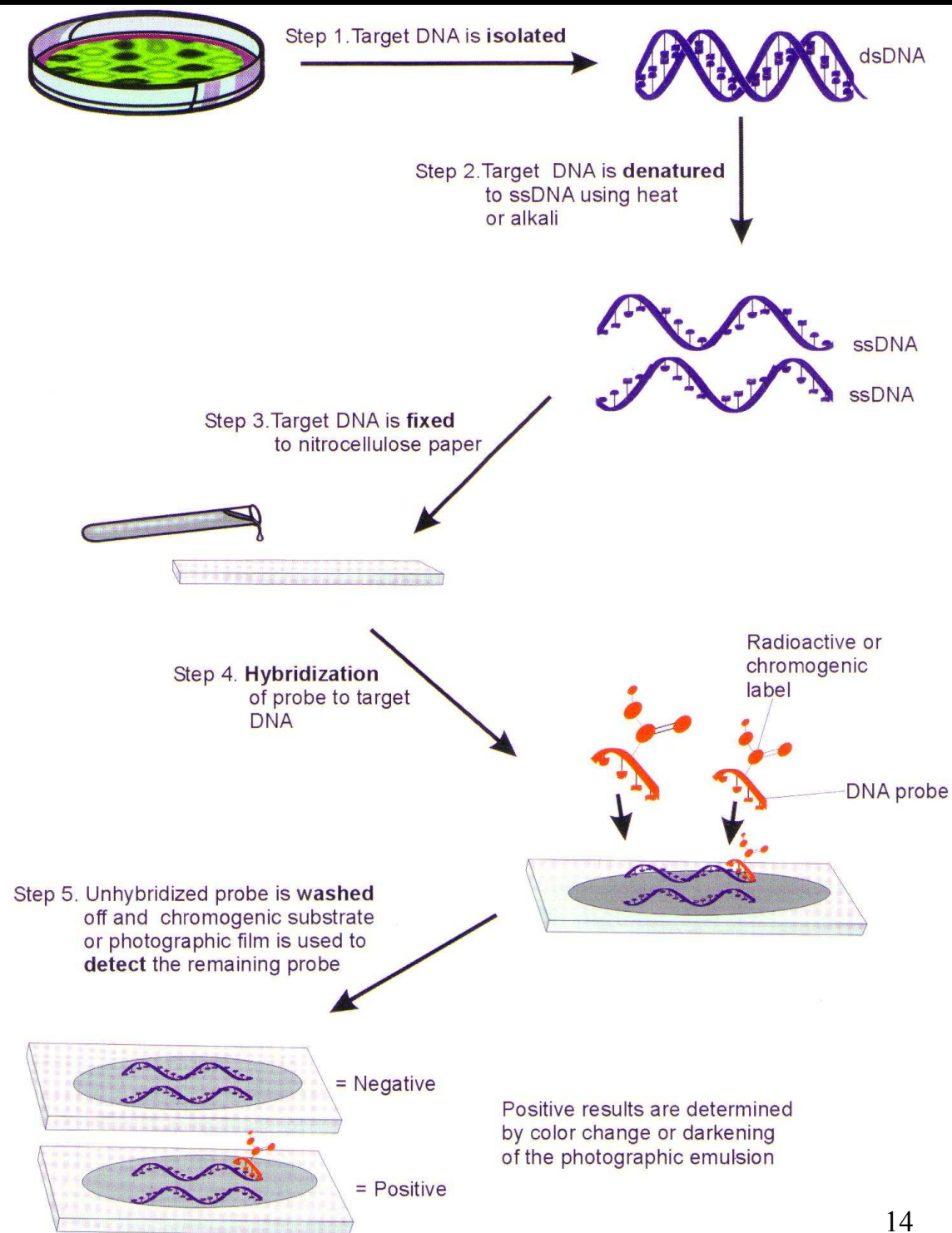
Genetické a molekulární techniky - extrakce DNA z půdy

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 $\mu\text{g/g}$	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

Genové próby

- slouží k detekci specifické NA sekvence a ke kvantifikaci jejího množství
- DNA je po extrakci, izolaci a purifikaci fixována na membráně, denaturována a hybridizována s DNA próbami
- próby jsou značeny radioaktivně (^{32}P), digoxigeninem (DIG), biotinem či fluoresceinem



Genové próby - pokračování

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

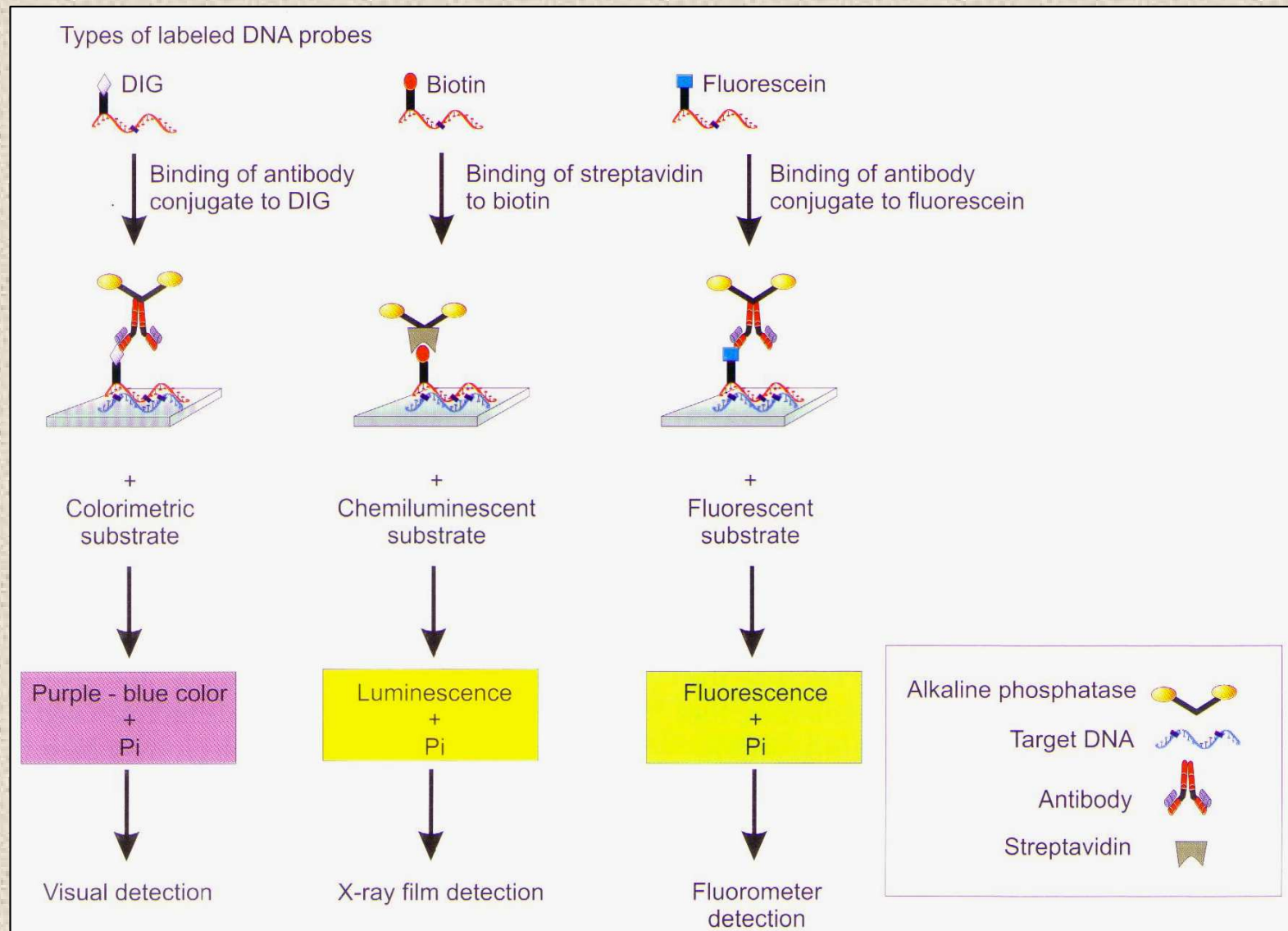


FIGURE 13.2 Gene probe detection of a DNA sequence.

Genové próby - aplikace

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 detekování

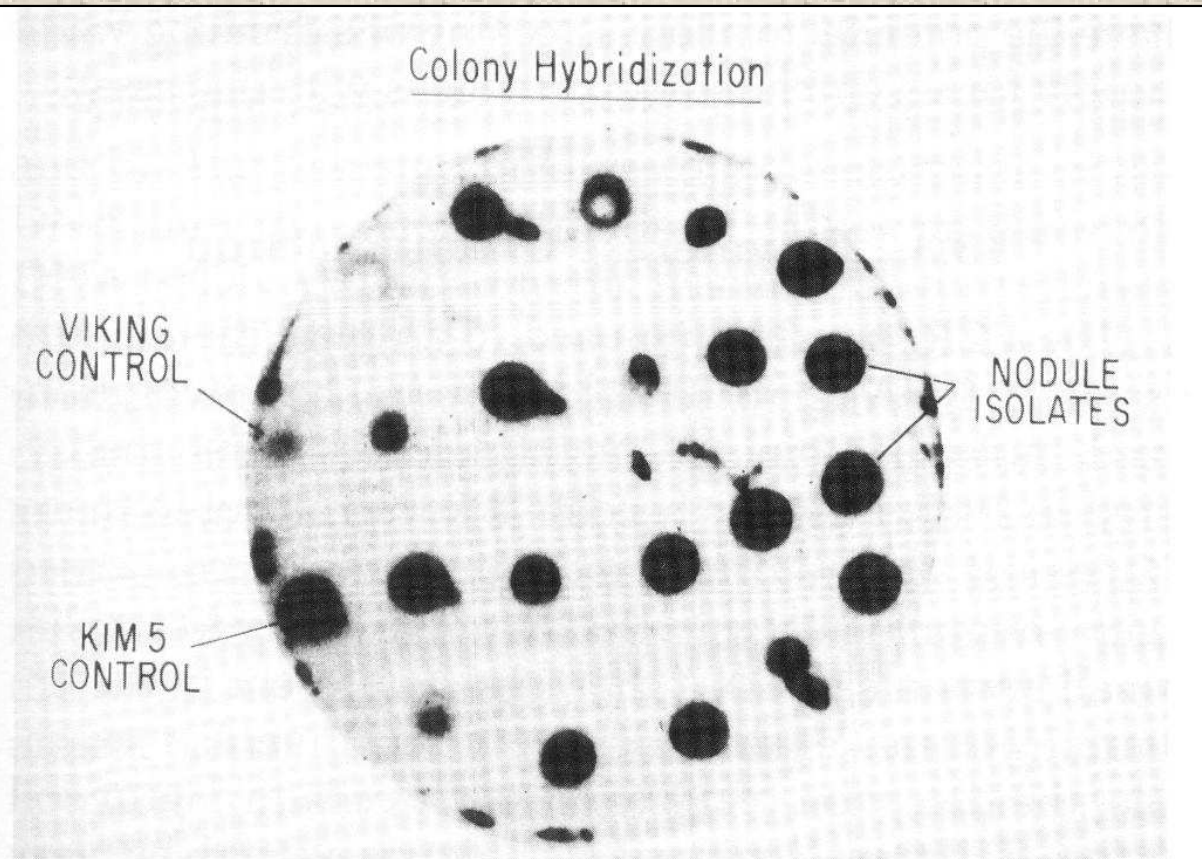


FIGURE 13.4 A colony lift from a petri plate containing a mixed population of the nitrogen-fixing bacteria rhizobia isolated from root nodules. The gene probe was constructed from a unique plasmid associated with the isolate known as KIM 5. (Reprinted from *Soil Biol. Chem.*, 21, I. L. Pepper *et. al.*, "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.)

Genové próby - aplikace

Southern and northern blotting

- southern blotting identifikuje DNA,
northern RNA

Princip: NA jsou separovány gelovou elektroforézou a následně přemístěny (= blotting) na membránu, kde jsou hybridizovány s próbami

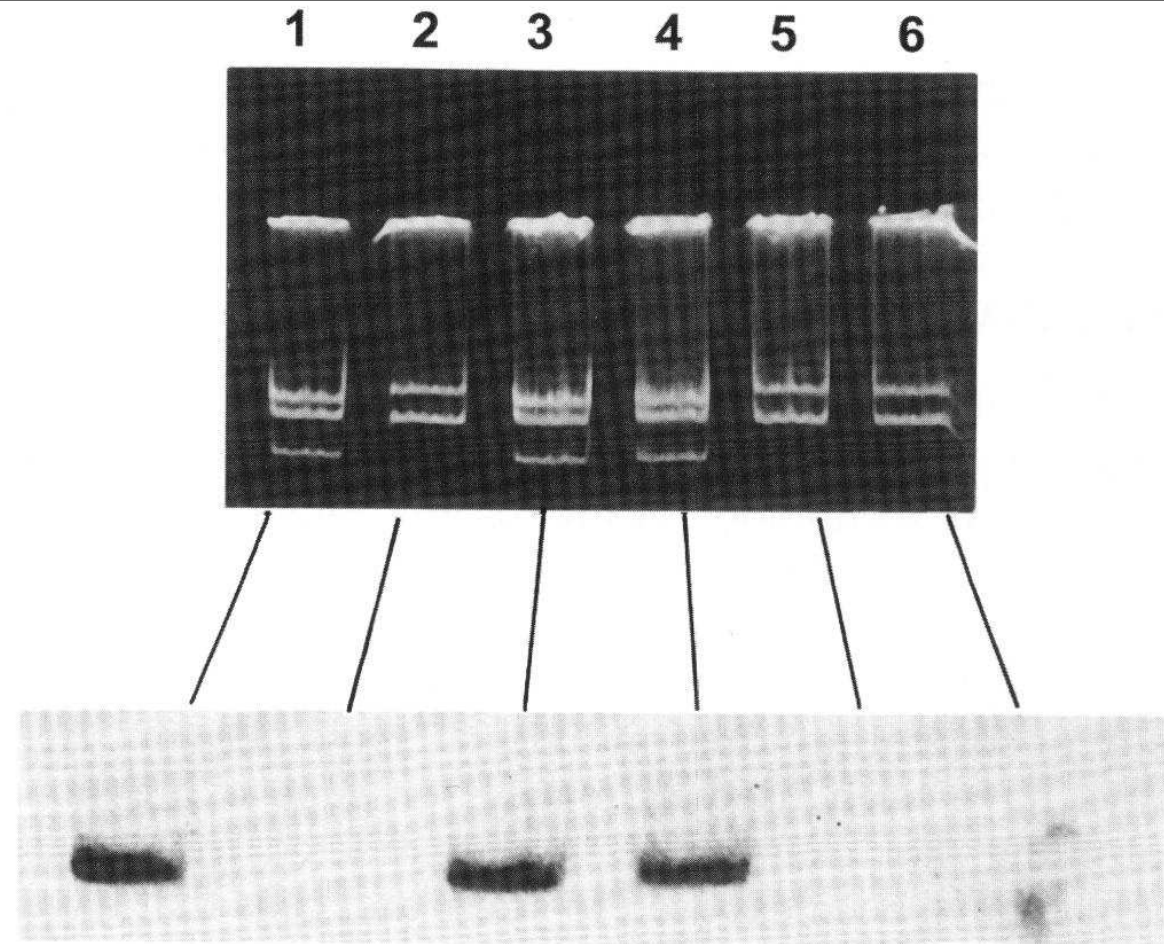


FIGURE 13.5 Southern blot of a DNA sequence associated with a unique plasmid contained within the rhizobial strain KIM 5. The upper portion of the figure shows the original plasmid profiles of two different rhizobial isolates. The gene probe was constructed from the smallest plasmid associated with this 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.)

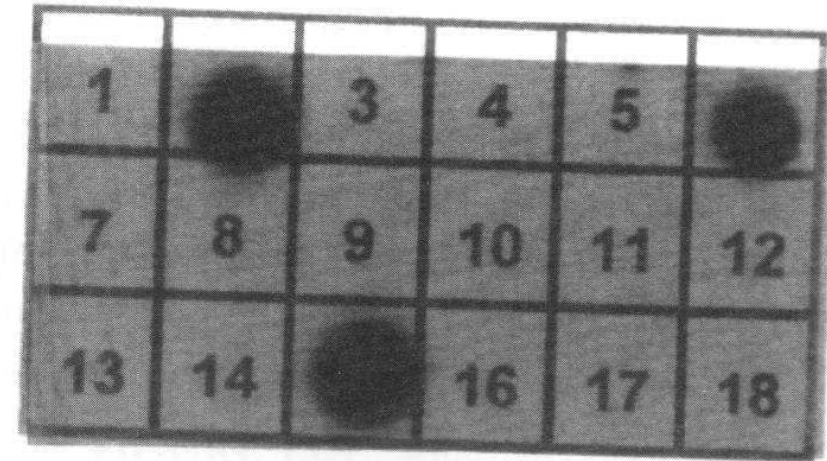
Genové próby - aplikace

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

A



B

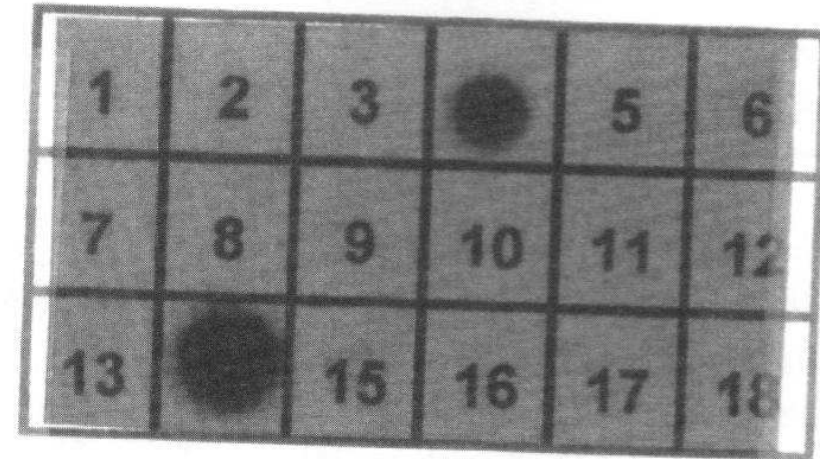


FIGURE 13.6 Dot blot hybridization showing detection of two bacterial isolates. *Arthrobacter* isolates that degraded toluene, ethylbenzene, and xylene (TEX) and *Sphingomonas* isolates that degraded xylene (X) were detected by the use of two individual gene probes. (Photos courtesy E. M. Jutras.)

Genové próby - aplikace

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

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*	CGTTCG(C/T)TCTGAGCCAG	27
BET42a, beta 23S proteobacteria	GCCTTCCCACCTCGTIT	27
GAM42a, gamma 23S proteobacteria	GCCTTCCCACATCGTIT	27
EUB338, eubacteria 16S	GCTGCCCTCCCGTAGGAGT	2, 52
Eucaryotic	ACCAGACTTGCCCTCC	2

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

*Also detects some non-alpha group bacteria.

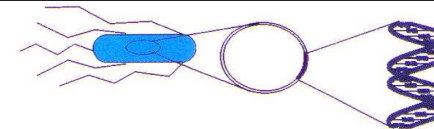
PCR - polymerase chain reaction

- dojde k naamplifikování určitého fragmentu NA
- dnes již v podobě kitů
- minimální vybavení (termocycler)
- užití pro detekci specifických mikrobiálních skupin

Princip: máme 2 primery, DNA polymerázu, směs nukleosidfosfátů; cykly inkubačních podmínek v termocycleru (disociace, annealing, extenze); **detekce na gelové elektroforéze po barvení ethidium bromidem**

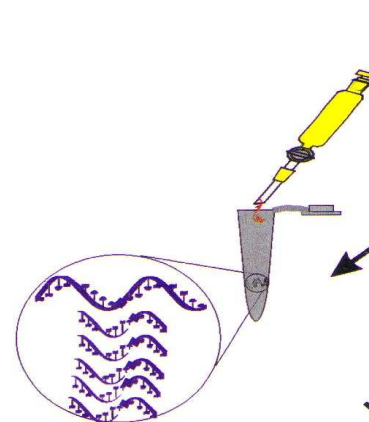


Step 1. DNA containing the target sequence is released from sample to provide the template for the PCR.

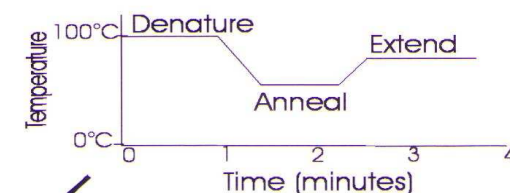
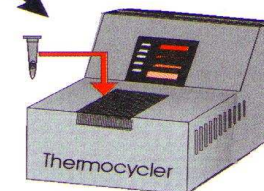


Step 2. Template is combined with a PCR mixture in a microcentrifuge tube.

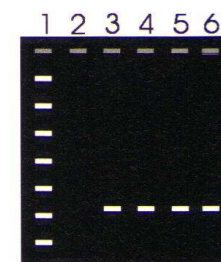
- A. PCR buffer
- B. Mg^{2+}
- C. Nucleotides (ATP, GTP, CTP, TTP)
- D. Thermostable polymerase
- E. Forward and reverse oligonucleotide primers specific for the target sequence



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

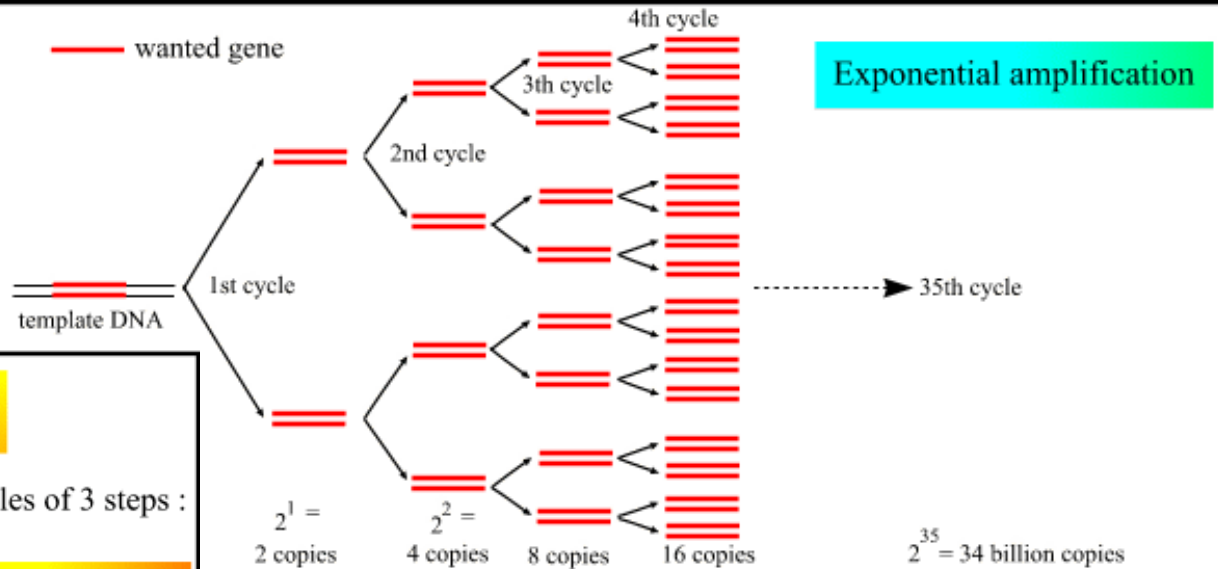


Step 4. Amplified product is analyzed by molecular weight separation on an agarose gel using electrophoresis and detected by staining with ethidium bromide.



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

PCR - polymerase chain reaction



PCR : Polymerase Chain Reaction

30 - 40 cycles of 3 steps :

Step 1 : denaturation

1 minut 94 °C

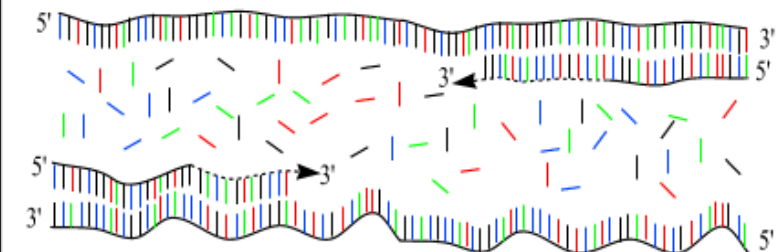
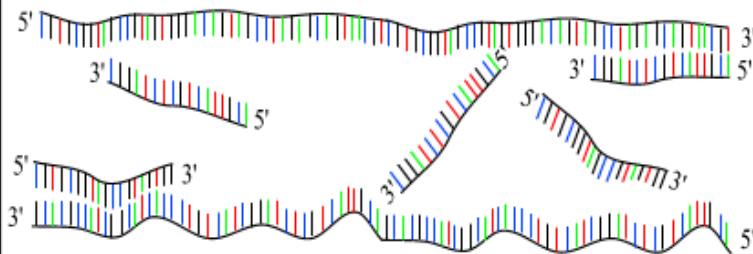
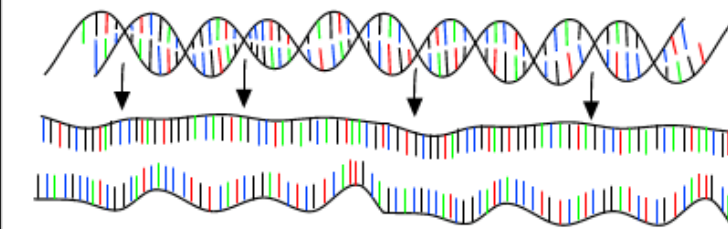
Step 2 : annealing

45 seconds 54 °C

forward and reverse primers !!!

Step 3 : extension

2 minutes 72 °C
only dNTP's



PCR - polymerase chain reaction - GENETIC FINGERPRINTING

Princip: použijeme nespecifické primery (např 10 - 20 base pairs - bp), dojde k nespecifické amplifikaci genomu; následuje separace na gelové elektroforéze, barvení a získání fingerprintu

- několik metod, např. AP-PCR (arbitrarily primed PCR)



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. J. Pepper.)

PCR - modifikace = RT PCR

- zahrnuje enzym reverzní transkriptázu

- vytvoří DNA kopii z RNA (complementary DNA - cDNA)

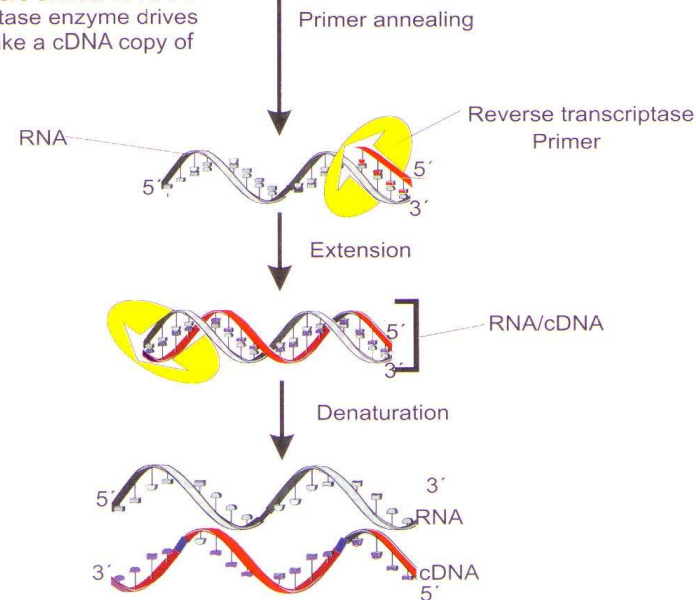
- využitelná je analýza mRNA, která dovoluje odhadnout míru metabolické aktivity

Princip: použitím malých primerů dojde k reverzní transkripci RNA; poté je použita PCR

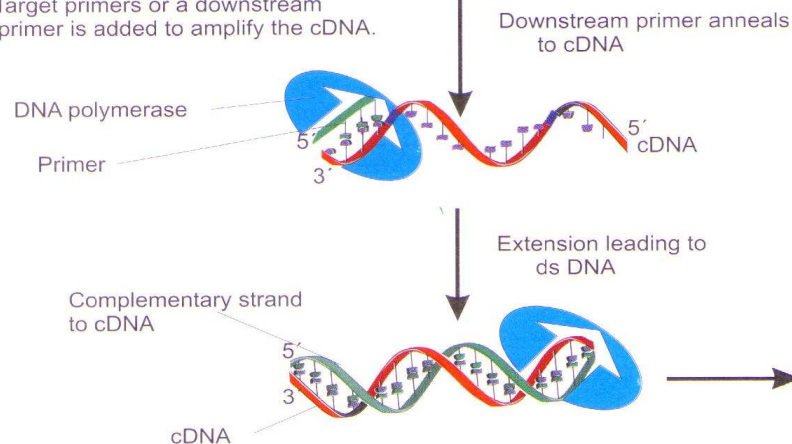
Step 1. Target RNA is isolated from the sample.



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.

RFLP - restriction fragment length polymorphism analysis

- založeno na působení restrikčních 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)

TABLE 13.3 Target Sites for Some Restriction Endonucleases^a

Organism	Restriction endonuclease	Site
<i>Anabaena variabilis</i>	<i>Ava</i> I	C ↓ $\begin{pmatrix} C \\ T \end{pmatrix}$ CG $\begin{pmatrix} A \\ G \end{pmatrix}$ C
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H	<i>Bam</i> HI	G ↓ GATCC
<i>Bacillus globigii</i>	<i>Bgl</i> II	A ↓ GATCT
<i>Escherichia coli</i> RY13	<i>Eco</i> RI	G ↓ A [*] ATTC
<i>Escherichia coli</i> R245	<i>Eco</i> RII	↓ CC $\begin{pmatrix} A \\ T \end{pmatrix}$ GG
<i>Haemophilus aegyptius</i>	<i>Hae</i> III	GG ↓ $\overset{\bullet}{C}$ C
<i>Haemophilus gallinarum</i>	<i>Hga</i> I	GACGC
<i>Haemophilus haemolyticus</i>	<i>Hha</i> I	G $\overset{\bullet}{C}$ G ↓ C
<i>Haemophilus influenzae</i> Rd	<i>Hind</i> II	GT $\begin{pmatrix} C \\ T \end{pmatrix}$ ↓ $\begin{pmatrix} A \\ G \end{pmatrix}$ $\overset{\bullet}{A}$ C
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	<i>Hind</i> III	$\overset{\bullet}{A}$ ↓ AGCIT
	<i>Hpa</i> I	GTT ↓ AAC
	<i>Hpa</i> II	C ↓ $\overset{\bullet}{C}$ GG
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Kpn</i> II	GGTAC ↓ C
<i>Moraxella bovis</i>	<i>Mbo</i> I	↓ GATC
<i>Providencia stuartii</i>	<i>Pst</i> I	CTGCA ↓ G
<i>Serratia marcescens</i>	<i>Sma</i> I	CCC ↓ GGG
<i>Streptomyces stanford</i>	<i>Sst</i> I	GAGCT ↓ C
<i>Xanthomonas maloncellarum</i>	<i>Xma</i> I	C ↓ CCGGG

Data from Old and Primrose (1989).

^a Recognition sequences are written from 5' to 3', only one strand being given, and the point of cleavage is indicated by an arrow. Bases written in parentheses signify that either base may occupy that position. Where known, bases modified by a specific methylase, are indicated by an asterisk. $\overset{\bullet}{A}$ is N⁶-methyladenine, and $\overset{\bullet}{C}$ is 5-methylcytosine.

RFLP - restriction fragment length polymorphism analysis

Princip: fragmentace DNA na malé oligonukleotidy (4-6 bp); separace fragmentů na gelové elektroforéze; hybridizace s próbami; barvení ethidium bromidem; výsledek je tzv. **GENETICKÝ FINGERPRINT** - srovnání s databázemi

- velmi často se užívá pro rRNA mikroorganismů

TABLE 13.2 List of Computerized Databases with Information Relevant to Bacterial Systematics

DATABASE producer and e-mail address	Scope and comments
DBIR, Directory of Biotechnology Information Resources E-mail: request@atcc.nih.gov	Online directory of organizations, databases, networks, publications, and nomenclature resources relevant to biotechnology
DDJ, DNA Databank of Japan, National Institute of Genetics, Yata, Mishima, Japan E-mail: tgojobor@d.dbj.nih.ac.jp	Collection and dissemination of nucleotide sequence data generated in Japan
GenBank E-mail: info@nibi.nlm.gov	Database of reported nucleotide sequences.
EMBL, EMBL-News, EMBL-Daily UEMBL: European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg, Germany E-mail: datalib@embl-heidelberg.de	Nucleotide sequence databanks and related information

Data from Canhos *et al.* (1993).

DGGE - denaturing gradient gel electrophoresis or TGGE - temperature gradient gel electrophoresis

Princip: aplikace nespecifických primerů z oblasti 16S rDNA (=DNA kódující 16S rRNA) v PCR dá vznik amplifikované 16S rDNA; vznikají fragmenty téměř stejné délky 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**

Příklad:

- 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.

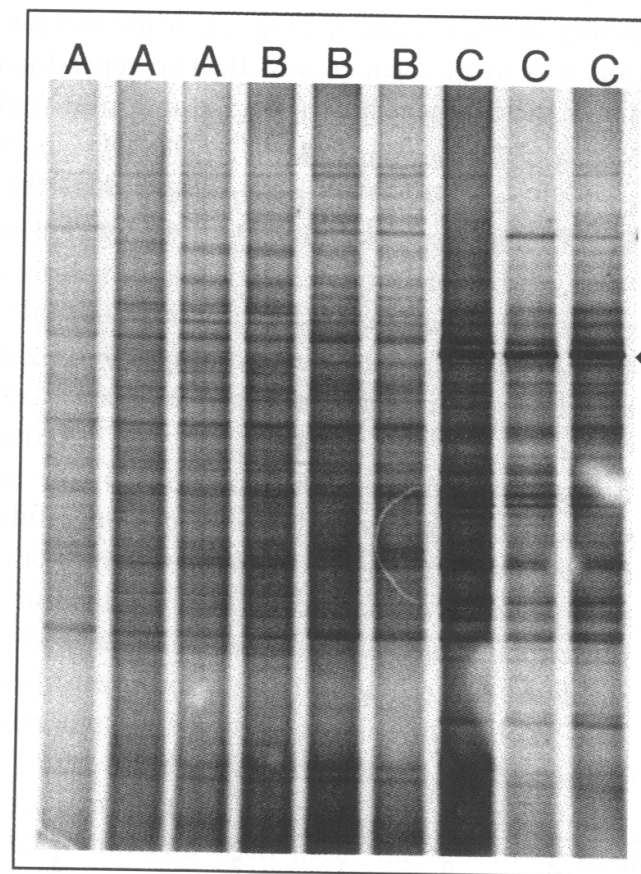


Fig. 3. DGGE profiles of amplified 16S rDNA fragments from soil A (lanes labelled A), soil B (lanes labelled B) and soil C (lanes labelled C). The band with the highest intensity in soil C is indicated by an arrow.

B. Analýzy lipidů: biomarkery a diverzita

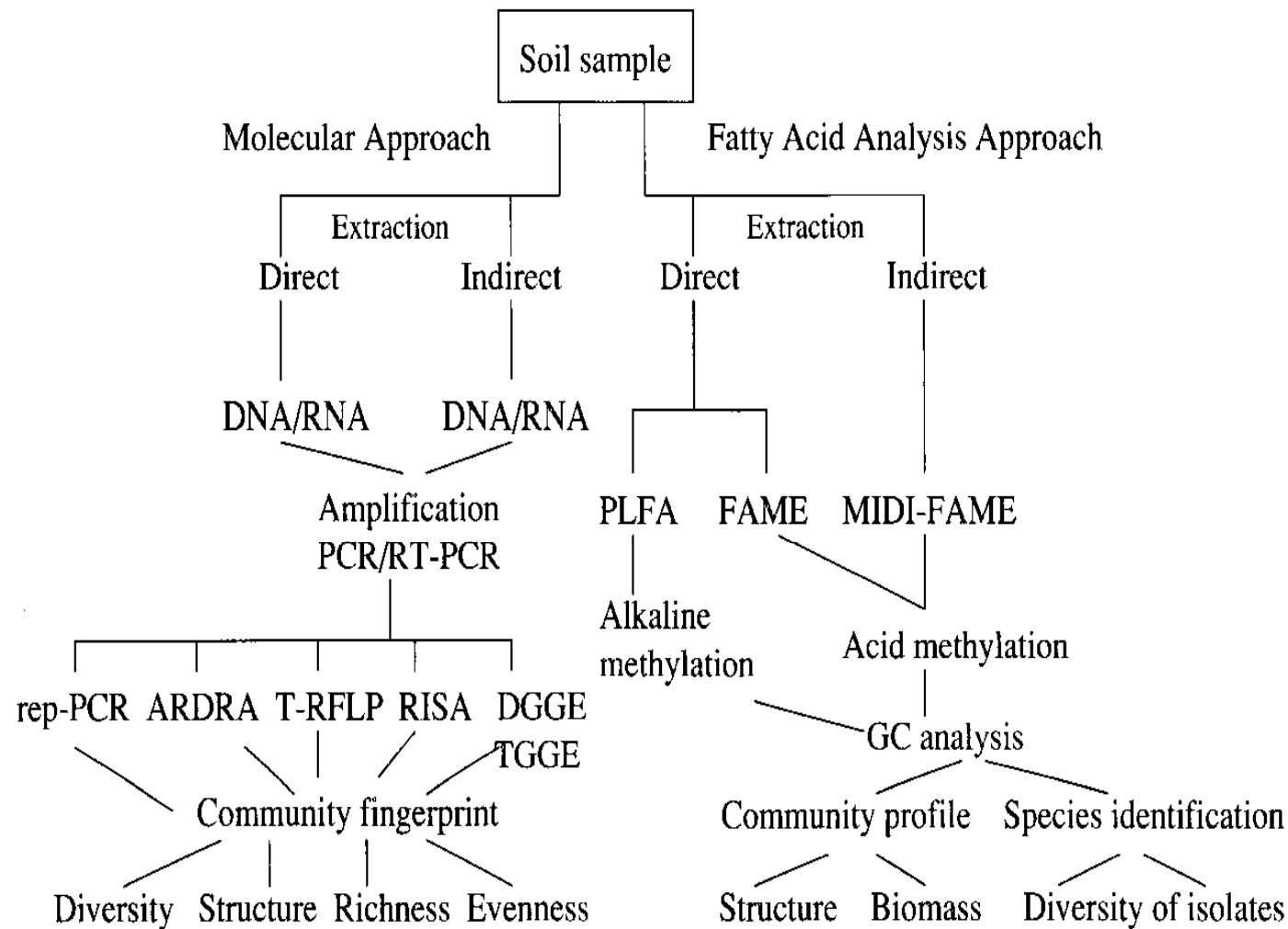


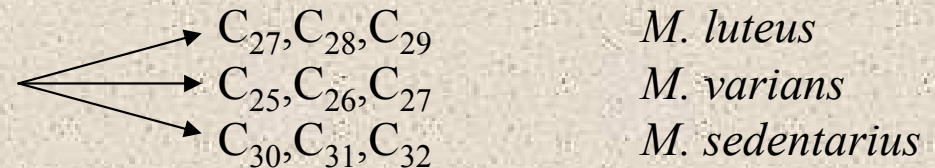
Fig. 1. Current approaches available for microbial community fingerprinting in soil perturbed with chemicals. The plot presents techniques that are discussed in this review.

Analýzy 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
- každý mikroorganismus má charakteristický "pattern" složení lipidů, který může být užít jako diagnostický parametr

Příklady:

rod *Micrococcus* dle větvených nenasycených FA:



Analýzy lipidů: PLFA - phospholipide fatty acids

- 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**)

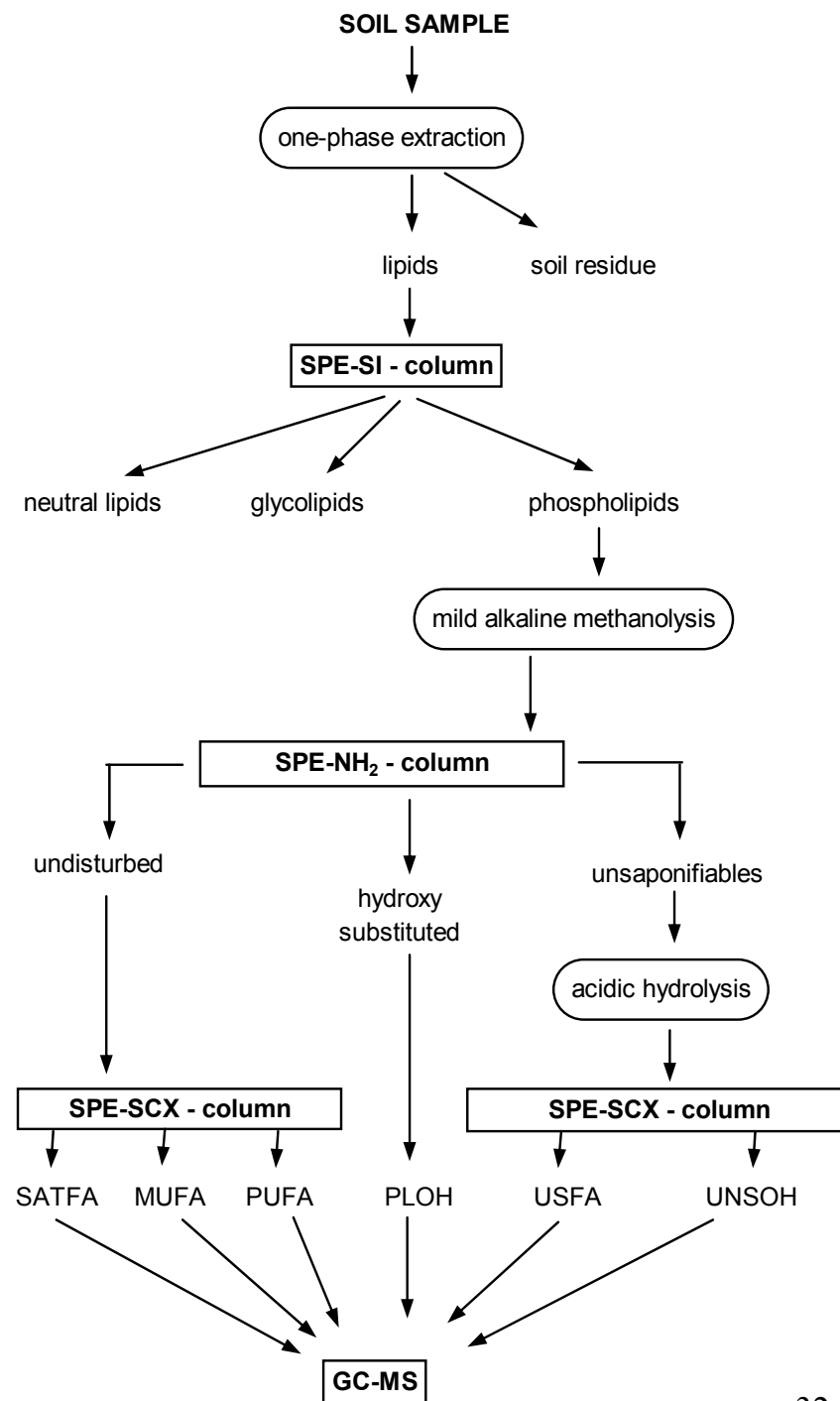
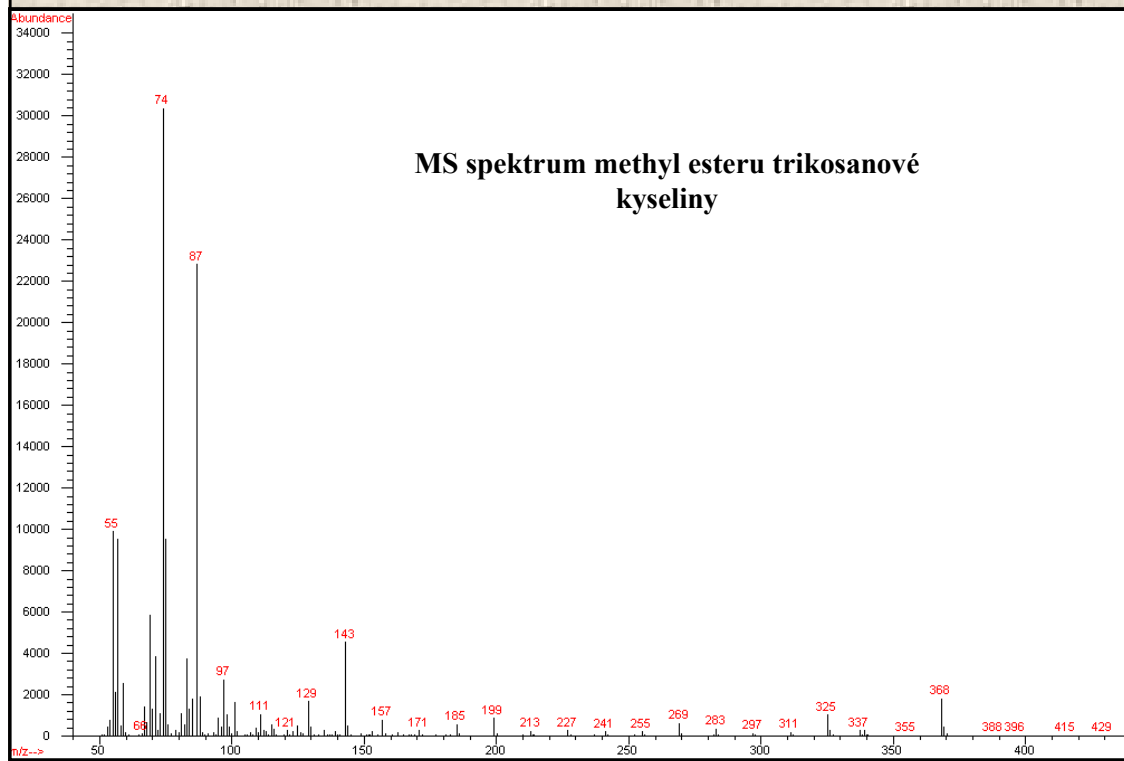
Konkrétní sloučeniny mastných kyselin jsou stanovovány stejné v obou frakcích, tedy EL-PLFA i NEL-PLFA. Liší se tedy pouze způsobem navázání v molekule fosfolipidu. UNSFA tedy zahrnují stejné molekuly jako SATFA+MUFA+PUFA, pouze místo karboxylového konce, mají jiné zakončení pocházející z hydrolýzy neesterové 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

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



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	indikace stresu
poměr nasycených / nenasyčených	
poměr cyklopropyl FA / jejich monoenoic prekursorů	
poměr iso 15:0 / anteiso 15:0 a iso 17:0 / anteiso 17:0	

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) Olsson and Persson (1999) Haack et al. (1994)
<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	Olsson and Persson (1999) Haack et al. (1994)
<i>Arthrobacter</i> Fungi	FAs with even number of C a15:0 and a17:0 (high proportions) 16:1w5c (in arbuscular fungi) 1 8:2w6,9c 18:1w9c, 20:4 23:0, 25:0, 21:0	Olsson (1999) Frostegård et al. (1993, 1996) Lindahl et al. (1997) Zelles (1999b)
Eukaryotic algae and <i>Protozoa</i>	Polyunsaturated FAs (e.g. 16:1w4, 16:3, 18:4w3, 20:4, 20:5, 22:6)	Findlay (1996), Frostegård et al. (1997)

Analýzy lipidů - PLFA jako biomarkery

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 (12:2w3)	* 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]	

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	$15:0\ 3OH + 16:1\ 2OH + 16:0\ 2OH + 18:0\ 2OH$

Příklad:

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)

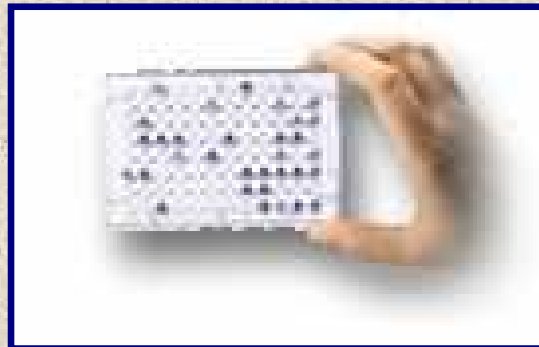
lipopolysacharidový lipid A mastné kyseliny a kyselina teichoová - G- a G+ (GC/MS)

hydroxy FA, plasmalogeny a sfingolipidy - anaerobní populace bakterií

C. Funkční diverzita - systém BIOLOG

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")



Systém BIOLOG pro identifikaci mikroorganismů

- 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 prohlídač 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

System BIOLOG pro identifikaci mikroorganismů

Postup:



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



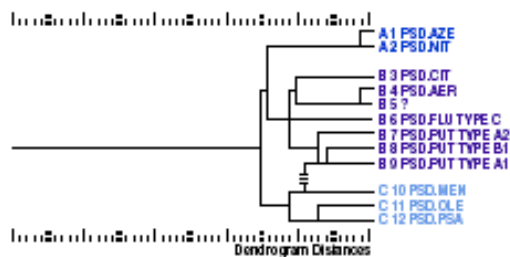
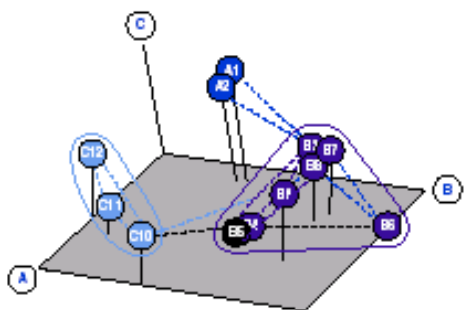
2. KROK: Příprava inokula o požadované hustotě.



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



4. KROK: Identifikace "fingerprintu" na mikrodestičce pomocí softwaru a datbází BIOLOG.



System BIOLOG pro identifikaci mikroorganismů

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-Melaxiose	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- Psicose	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 Turannose	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

Systém BIOLOG - 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

- 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

System BIOLOG - funkční diverzita mikrobiálních společenstev

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 Phenylethylamine	G1 D-Cellobiose	G2 Glucose-1-Phosphate	G3 α-Ketobutyric Acid	G4 Phenylethylamine	G1 D-Cellobiose	G2 Glucose-1-Phosphate	G3 α-Ketobutyric Acid	G4 Phenylethylamine
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

System BIOLOG - funkční diverzita mikrobiálních společenstev - ECO Plates

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
D-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.

Systém BIOLOG - hodnocení

Hodnocení:

Sledování AWCD (average well colour development) či integrace plochy pod křivkami (CI)

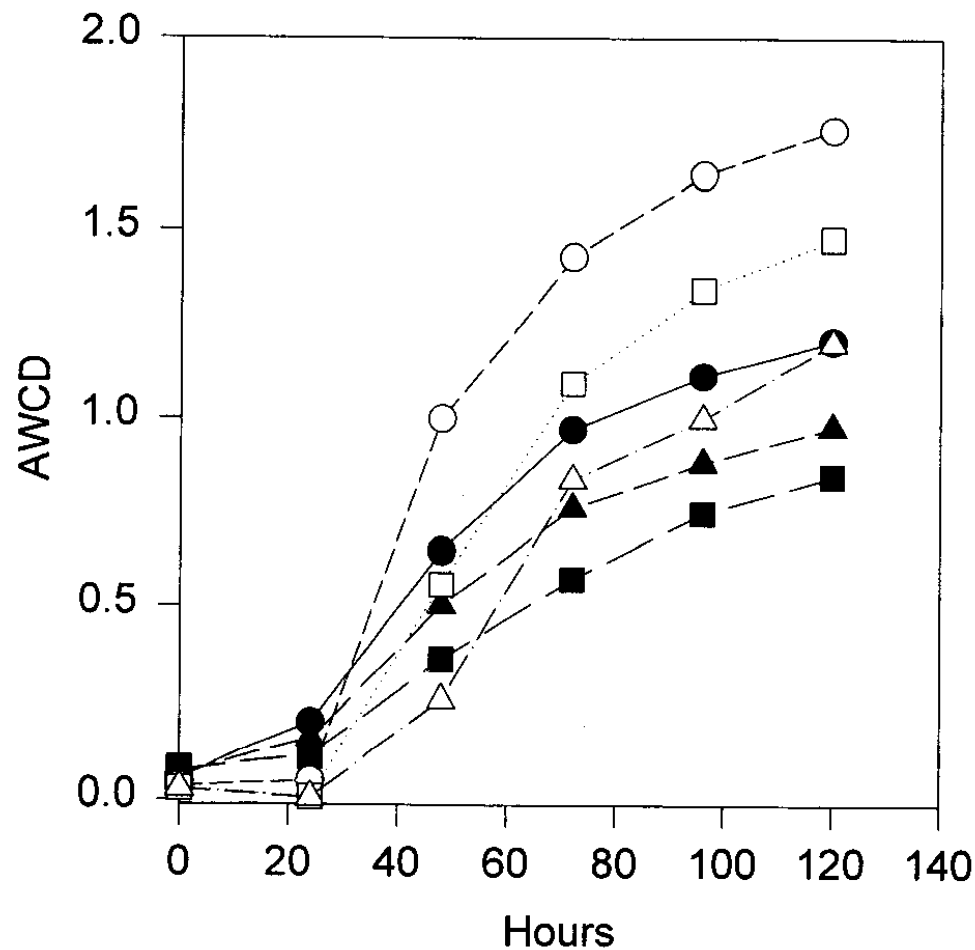
Získané parametry:

- 1) AWCD pro celou destičku či AWCI pro celou destičku
- 2) (C-R), kde C produkce barvy (např. po 120 h) v jamce substrátu, R produkce barvy v jamce A1
- 3) (C-R)/AWCD - standardizováno (např. pro PCA)
- 4) CI pro každý substrát
- 5) CI/AWCI

System BIOLOG - hodnocení

AWCD (average well color development)

GN plates



ECO plates

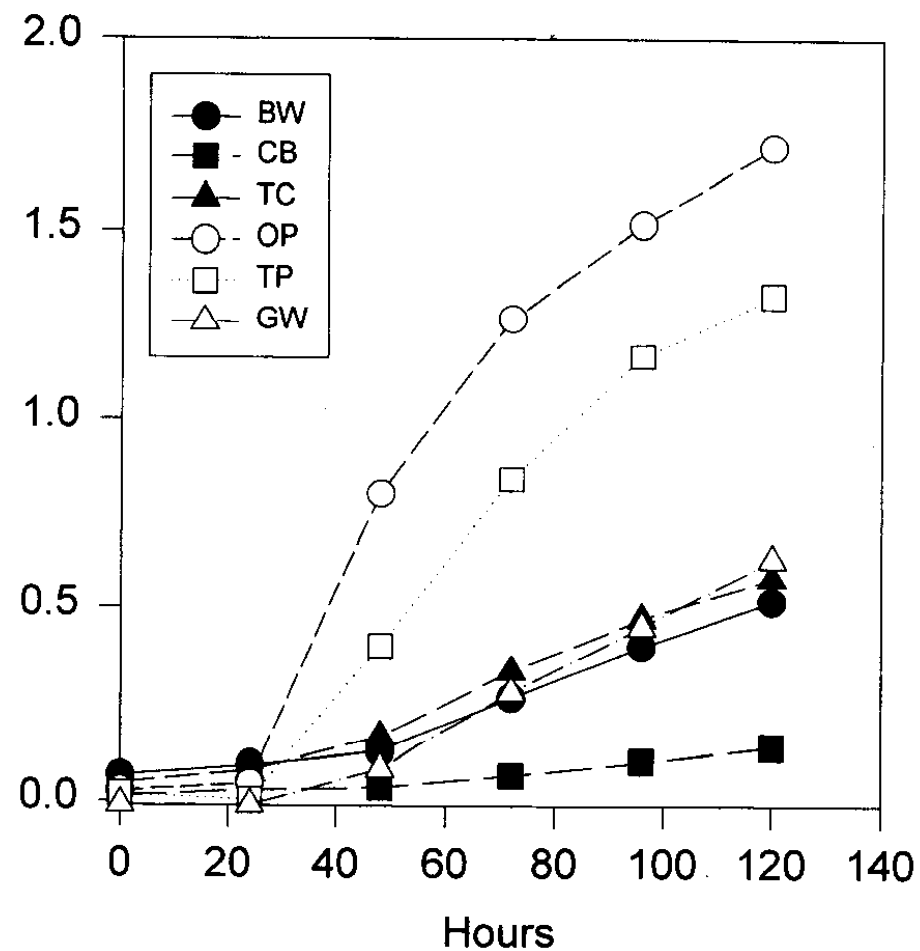


Fig. 1. Variation in average well color development (AWCD) over time in Biolog's GN and ECO plates (BW=Ballast water, CB=Chesapeake Bay, TC=Tidal creek, OP=Oceanography Pond, TP=Tony's Pond, GW=Groundwater; open symbols indicate freshwater environments, filled symbols indicate saltwater environments). 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.

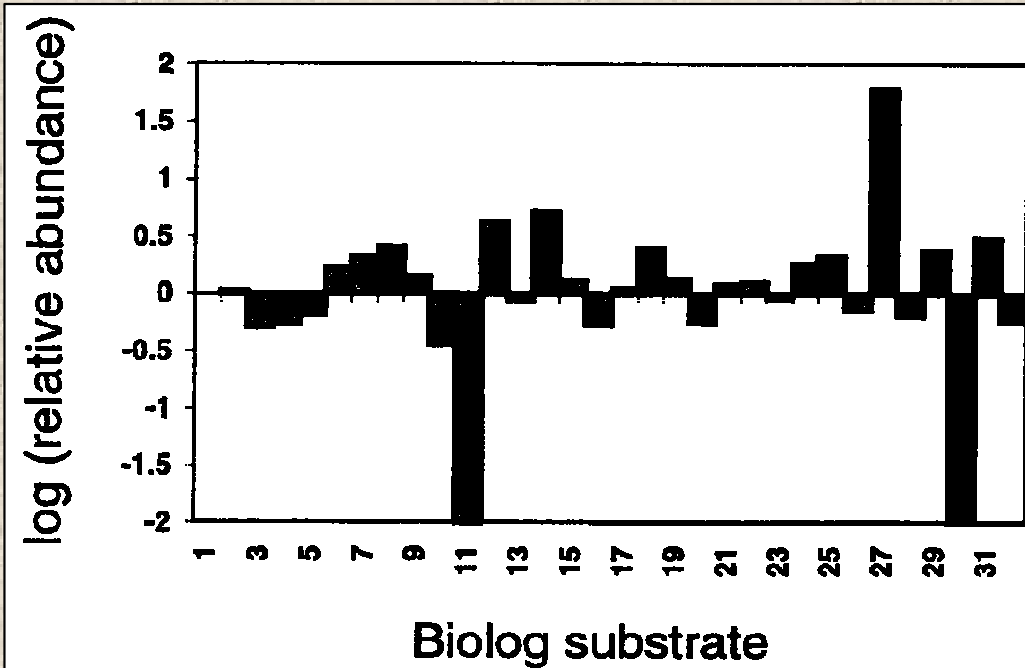
Systém BIOLOG - hodnocení

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.

System BIOLOG - ekotoxikologický systém

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

- jednoduchý kolorimetrický výstup
- možnost vynesení křivek dávka odpověď

Příklad:

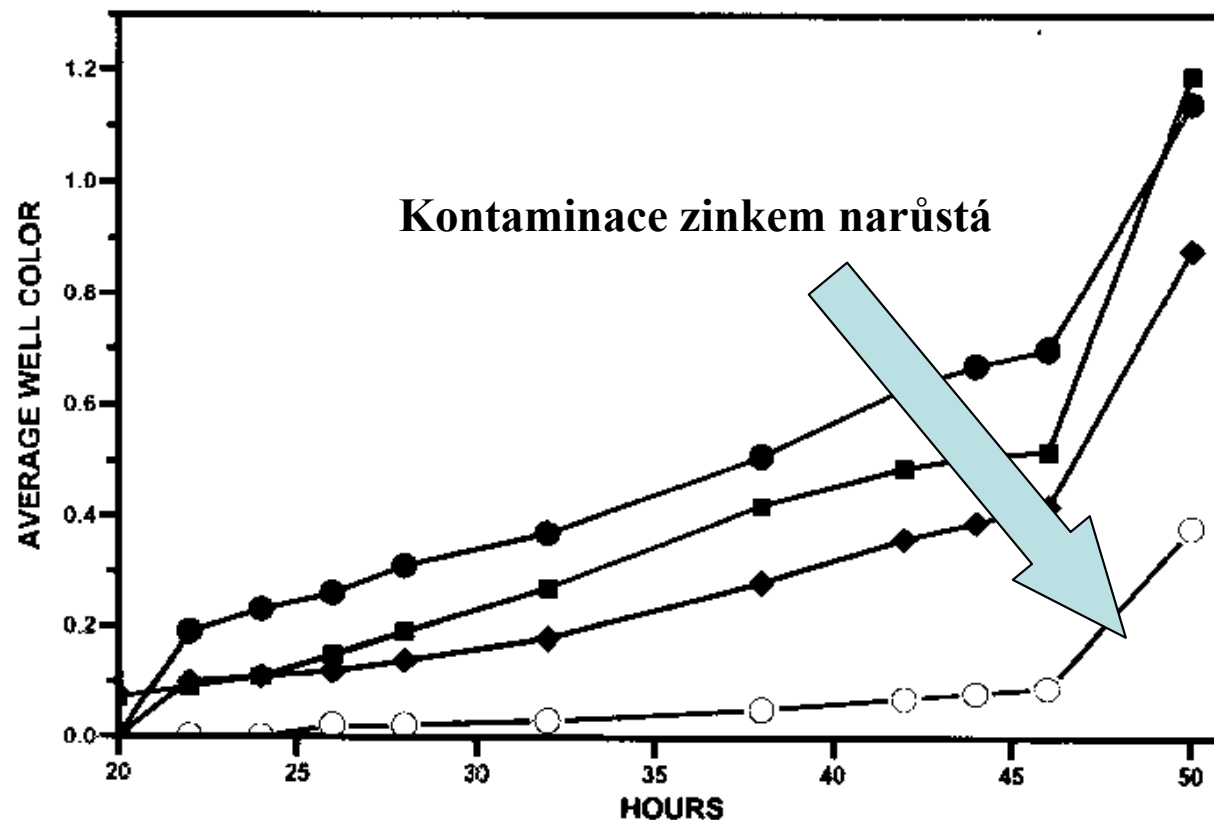


Fig. 1. Comparison of rate of color development on BIOLOG plates for soil samples collected in the Fall of 1995 from four sites in the vicinity of a Zn smelter. Average well color is the mean of the net optical density for all 95 substrate wells on a plate. Each data point represents the mean AWCD value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

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.

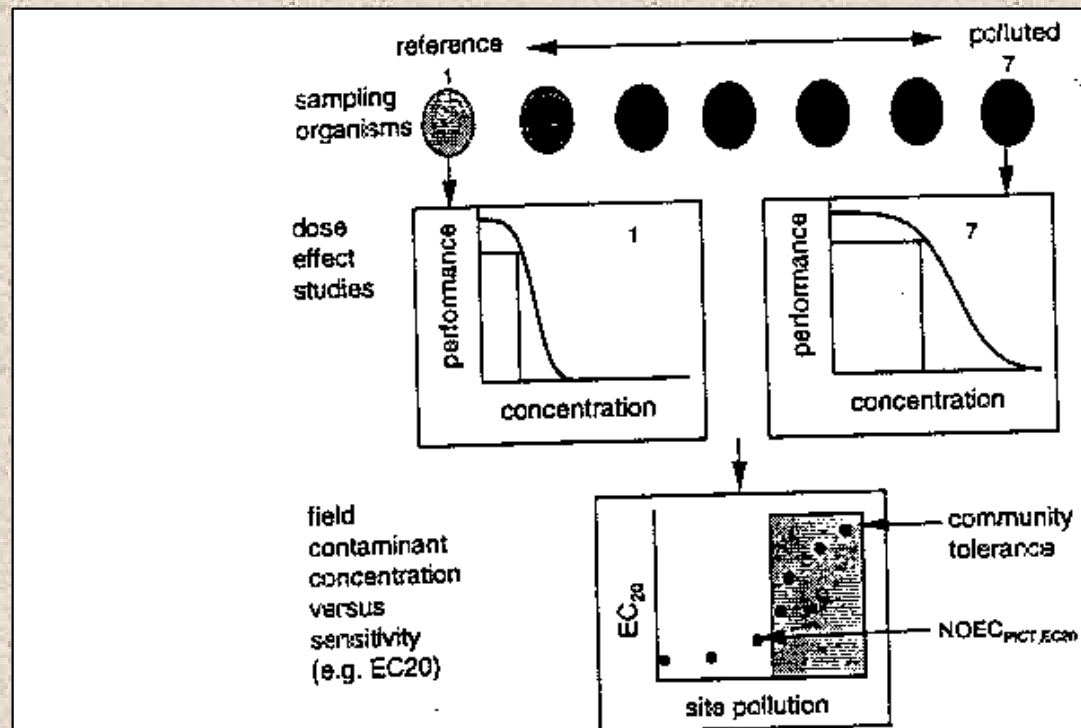


Figure 1. Schematic representation of the experiment for determination of pollution-induced community tolerance (PICT) (redrawn from Posthuma 1997).

Systém BIOLOG - hodnocení PICT (Pollution induced community tolerance)

Příklad:

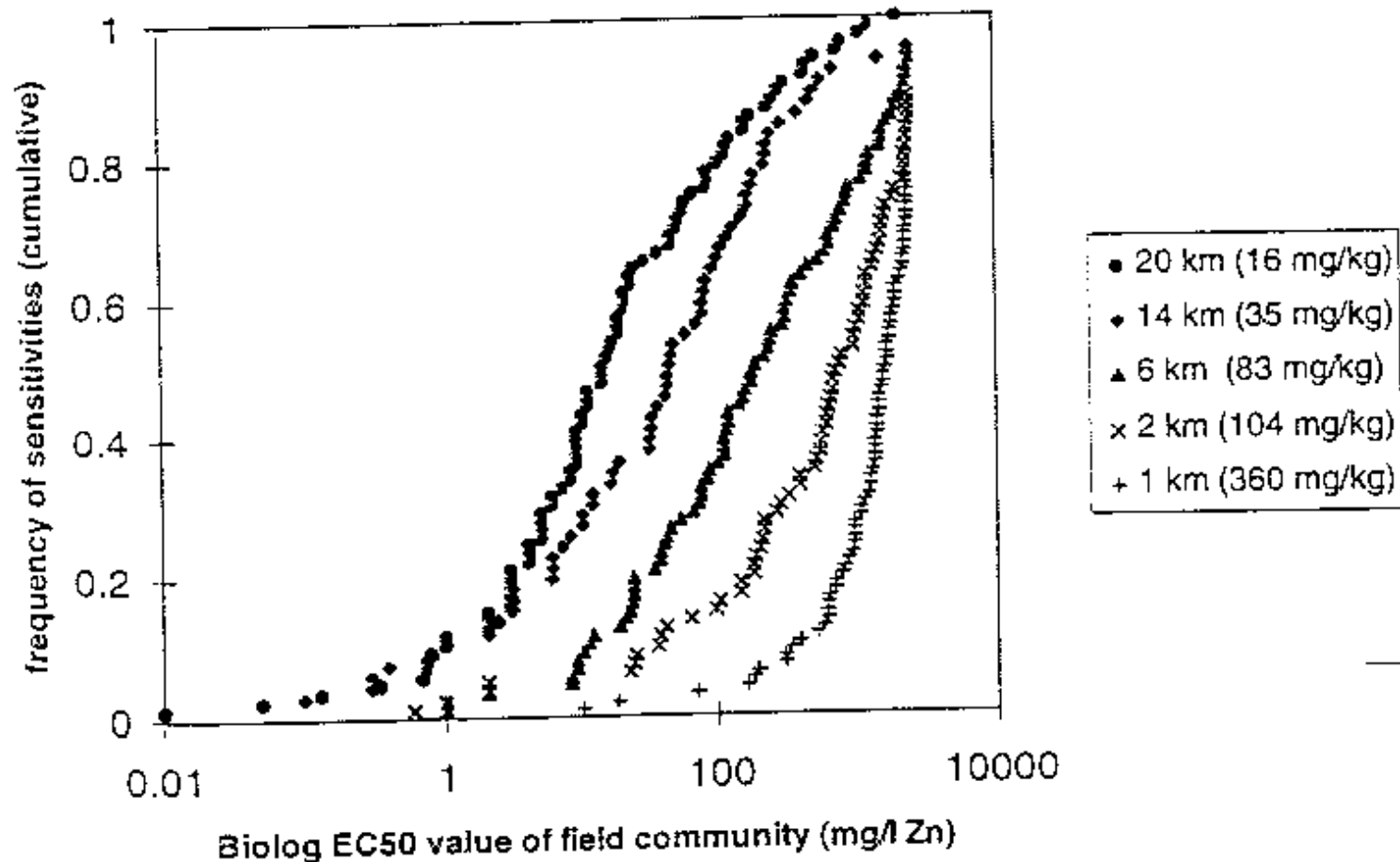


Figure 3. Cumulative frequency of EC_{50}^{BIOLOG} of microbial activities around a zinc smelter near Budel. The figure shows EC_{50}^{BIOLOG} values for each positive Biolog substrate (78 - 89) and 5 different field communities (●,◆,▲,×,+) with various levels of exposure. The distance to the zinc smelter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

Diskutovaným tématem je způsob hodnocení diverzity mikroorganismů. Klasické indexy abundance, rozložení a diverzity nejsou vhodné.

Biodiverzita mikrobiálních společenstev: v 99% případů je vyhodnocení pomocí vícerozměrných statistických metod

Zjednodušený princip - I:

- máme 1,2,3 n objektů (vzorků vody, lokalit půd, mikrobiálních kultur, variant laboratorního experimentu apod.) a označujeme je x
- máme 1,2,3 y parametrů (proměnných, např. koncentrací jednotlivých mastných kyselin, četnost pozitivních reakcí na substrát v ECO mikrodestičce apod.) a označujeme je p
- maticová podoba vícerozměrných dat:

parametry

objekty

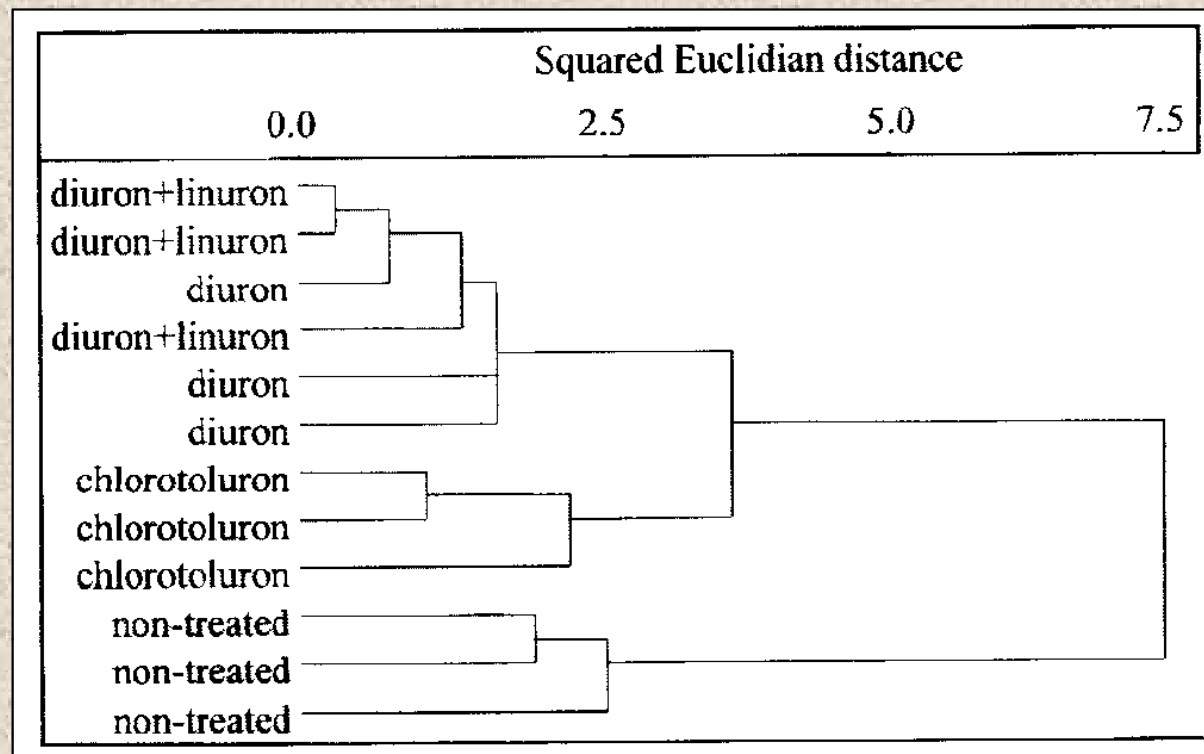
Vzorek č.	Cbio	BR	PR	EX-C	qCO2	As	Cd	Cr	pH(H2O)	Ntot	Corg	Jíl	Benzo(a)pyren	Suma PAHs	Suma PCB	Suma DDT	HCB
229	928,5	2,5	19,2	86,5	2,7	9,1	0,2	28,9	6,3	0,2	2,3	19,9	35,4	419,2	5,187	5,402	0,544
230	844,9	3,6	9,2	258,7	4,2	10,8	0,5	13,5	4,5	0,3	5,0	18,2	13,5	229,3	8,398	8,041	0,823
231	1452,2	2,8	22,7	68,4	2,0	19,4	0,4	37,2	6,3	0,3	3,6	26,7	199,3	2734,4	6,462	5,216	0,87
232	340,9	1,0	7,6	74,0	3,0	16,4	1,9	29,1	7,3	0,2	1,8	12,7	75,8	853,9	7,841	57,887	10,797
233	365,5	0,7	5,6	61,2	1,8	18,0	0,4	31,2	7,8	0,2	1,7	33,5	32,9	513	5,202	216,801	11,696
234	436,8	1,4	7,0	105,7	3,1	11,2	2,0	26,9	7,9	0,1	1,5	13,5	33,3	471,4	6,867	25,975	5,924
235	385,1	0,7	5,2	81,3	1,9	11,8	1,3	24,0	8,1	0,2	1,6	21,8	62,4	839,4	5,843	131,471	10295,12
236	388,0	1,3	5,6	62,7	3,4	9,7	0,3	94,0	7,3	0,1	1,5	31,8	6,6	139,4	4,543	3,951	9,582
237	1285,0	2,6	15,6	104,8	2,0	9,1	0,5	70,8	7,0	0,3	3,1	15,6	27,6	546	4,362	2,188	2,542
238	787,5	3,6	12,5	195,4	4,6	18,6	0,7	92,7	7,2	0,3	3,8	20,4	37,7	566,3	7,752	6,339	1,883
239	964,0	1,9	17,8	110,7	2,0	10,5	0,8	58,4	7,7	0,3	3,6	10,0	704,2	6778,4	29,21	24,531	6,282
240	671,6	1,9	6,3	202,7	2,9	15,3	1,1	61,7	7,9	0,2	5,7	6,9	41,1	704,4	8,731	14,696	3,402
241	621,4	2,0	6,0	113,8	3,3	12,3	0,5	40,6	7,8	0,2	1,6	15,3	13,4	234,7	5,529	3,559	4,619
242	529,6	1,1	7,2	85,0	2,2	11,5	0,8	27,7	7,9	0,2	1,9	12,6	56,8	694,6	8,846	13,133	1,017
243	1048,4	4,3	20,4	181,4	4,1	11,0	0,5	10,1	6,0	0,3	4,7	5,7	21,6	400,2	9,69	13,289	1,793
244	1052,3	2,3	14,8	114,4	2,2	8,0	0,4	15,9	6,4	0,3	4,1	11,5	17,9	371,2	5,484	2,538	0,593
245	527,0	2,0	9,1	127,6	3,8	7,4	0,4	10,6	6,4	0,2	2,8	9,5	17,9	371,2	14,282	2,585	1,11
246	1240,3	4,1	15,9	208,9	3,3	11,4	0,6	85,5	6,9	0,3	4,3	19,6	10,5	289,6	7,737	8,316	1,264
247	1077,6	1,5	15,0	130,0	1,4	14,3	0,6	53,7	7,4	0,3	2,9	5,7	61	782,2	6,559	22,4	1,313
248	396,4	1,1	6,0	110,5	2,7	9,6	0,8	45,0	7,7	0,2	1,8	15,6	94,5	1061,9	11,498	117,746	5,287
249	1908,1	2,4	17,6	194,0	1,3	13,7	0,8	46,6	7,5	0,5	6,1	23,4	22,5	523,9	7,597	8,497	1,302
250	1148,4	2,4	14,8	161,2	2,1	11,1	0,5	33,7	7,7	0,3	3,3	18,7	7,1	123,1	5,907	8,799	6,085
251	642,8	1,4	7,9	99,4	2,2	10,5	0,5	39,9	8,0	0,2	1,9	23,4	25,3	394,5	6,886	94,754	13,645
252	1148,0	3,0	14,4	162,6	2,6	10,8	0,6	21,6	7,5	0,5	4,7	9,7	39,6	700,5	6,052	9,339	3,553
253	1315,5	3,1	17,2	186,5	2,4	13,9	0,5	16,1	7,5	0,4	4,2	10,0	38	623,3	5,737	3,148	1,021

Zjednodušený princip - II:

- chceme vědět, jak jsou si objekty podobné
- chceme vědět, zda mají některé parametry podobný průběh mezi objekty
- ve dvourozměrném prostoru by tyto věci řešily korelace, regrese apod.
- ve vícerozměrném prostoru se použijí speciální algoritmy, většinou jde o:
 - 1) shluková analýza (cluster analysis - CA)
 - 2) analýza hlavních komponent (principal component analysis - PCA)
- téměř vždy se pracuje se standardizovanými daty (odečet průměru a vydělení S.D.)

1) Shluková analýza - dendrogram

Spojuje "nejpodobnější" objekty a udává "vzdálenost" na níž jsou spojeny, která je mírou této podobnosti.



Zjednodušený princip - III:

2) PCA

Složitější algoritmus. V podstatě jde o přerovnění rozptylu (přičemž filosofie je taková, že rozptyl = informace) na nové osy tak, aby maximum bylo na první ose (PC 1), maximum ze zbývajících rozptylu na druhé ose (PC 2) a tak dále. Vzniká tedy nový souřadný kříž. Získáme tedy stejný počet PCs jako bylo původních proměnných, ale rozdílem je, že pomocí pouze např. prvních tří vidíme např. 90% informace. V základu se matematicky jedná o lineární kombinace. Existují ovšem další komplikované postupy - různé rotace kříže, křivení prostoru apod.

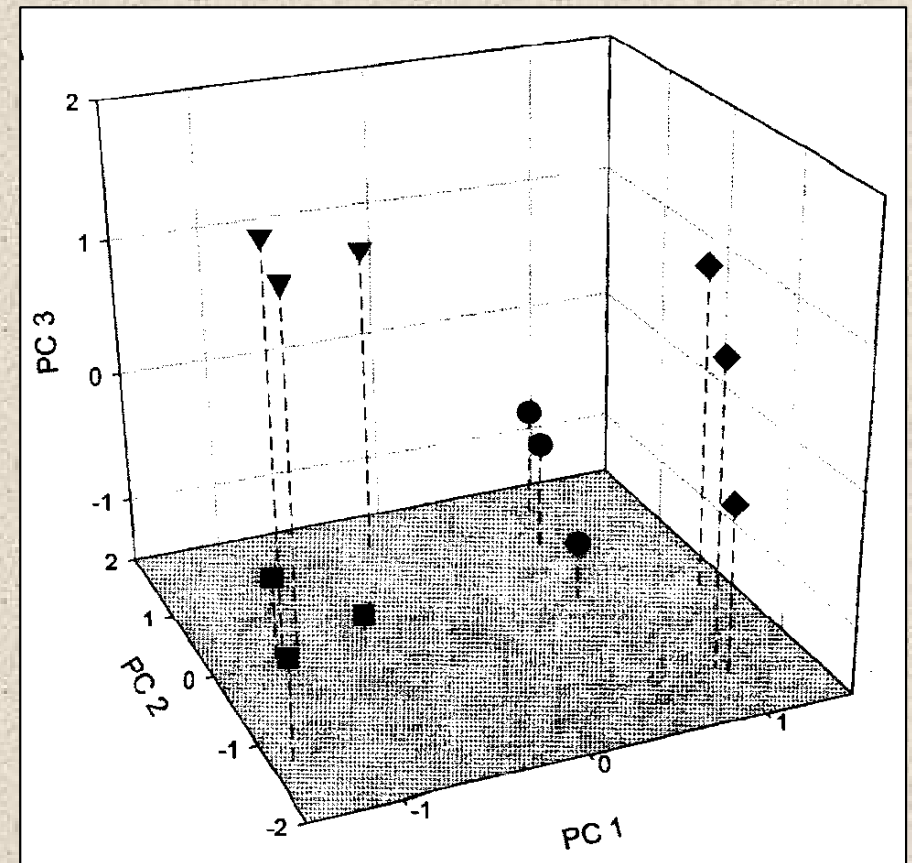
Dva typy grafů:

a) Scores plot

- nové hodnoty pro objekty na nových osách vypočítané z lineárních kombinací původních proměnných
- **zobrazuje tedy objekty**
- umožňuje vidět podobnost objektů

b) Loadings plot

- vynáší koeficienty pro jednotlivé proměnné do nového kříže
- **zobrazuje tedy proměnné**
- umožňuje srovnat podobnost proměnných a také jejich "zodpovědnost" za jednotlivé PCs, tj. jejich "zodpovědnost" na celkové informaci (podobnosti, odlišnosti apod.) objektů



Příklad:

- Jako vstupní data použity hodnoty (C-R)/AWCD
- Blízkost objektů (vzorků) určuje jejich podobnost

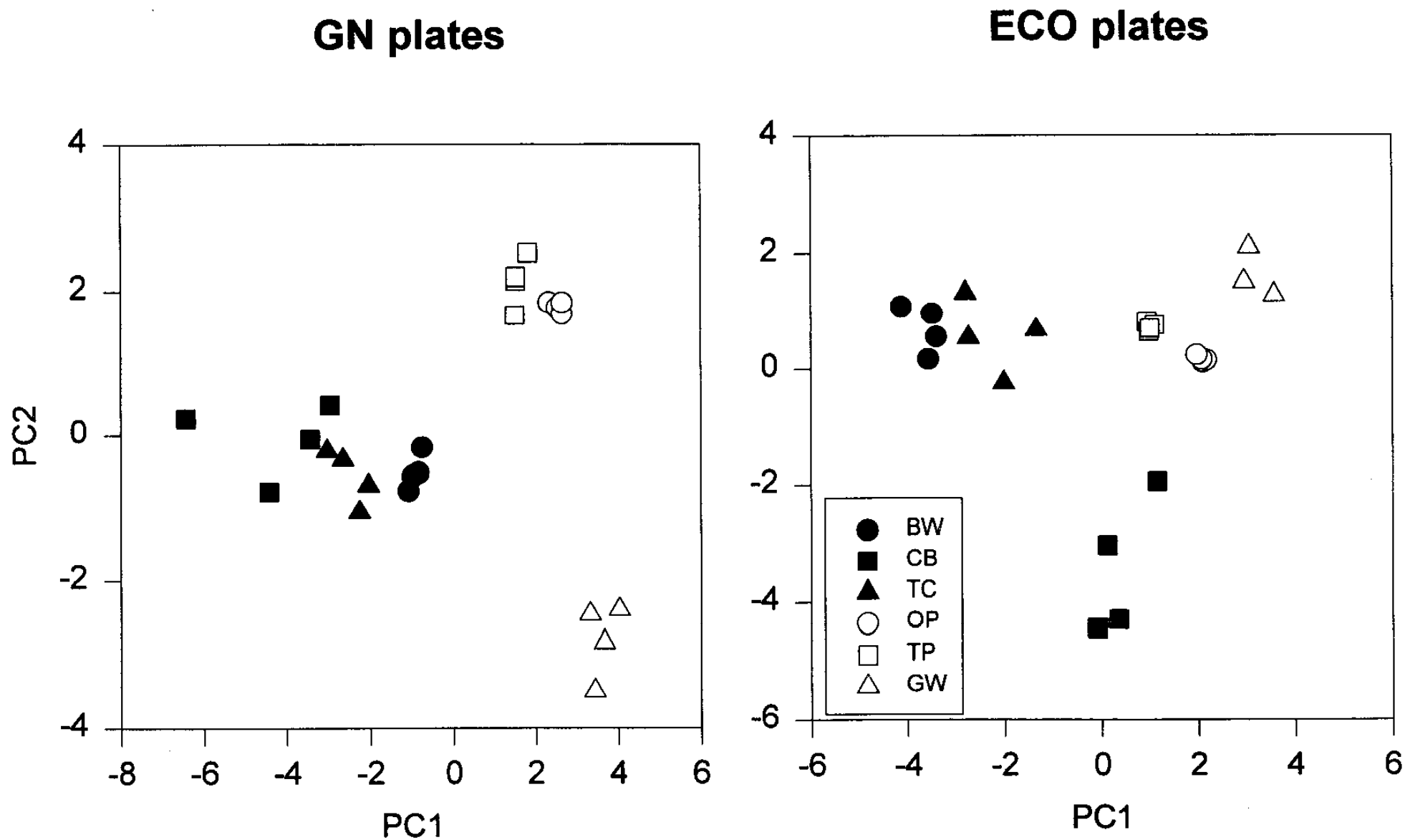


Fig. 2. Multivariate classification of six aquatic heterotrophic communities, based on carbon substrate utilization in Biolog's GN and ECO plates. Analyses represent principal component analysis of average well color development at 120 h. See explanation of symbols in Fig. 1.

Příklad:

- Jako vstupní data použity hodnoty (C-R)/AWCD
- Blízkost objektů (vzorků) určuje jejich podobnost

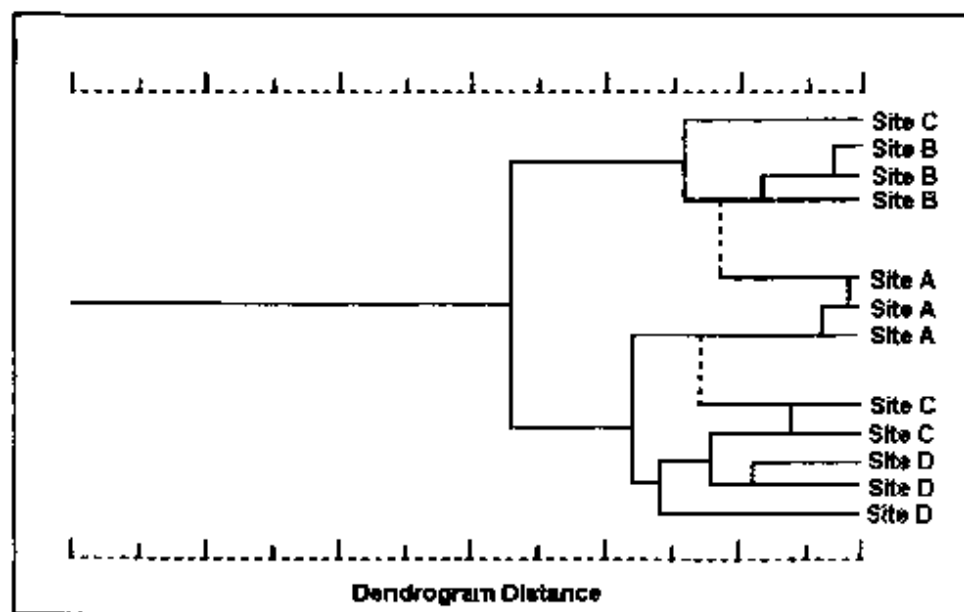


Fig. 2. Cluster analysis of BIOLOG readings for soil samples collected in the Fall of 1995 from four sites in the vicinity of a Zn smelter. Three BIOLOG extractions were conducted per site. Each data point is an average of triplicate plates from each BIOLOG extraction. Sets of triplicate plates with AWCD values closest to 0.25 were compared in this analysis. Each unit of distance on the dendrogram is equivalent to a difference of 100% on a single substrate well.

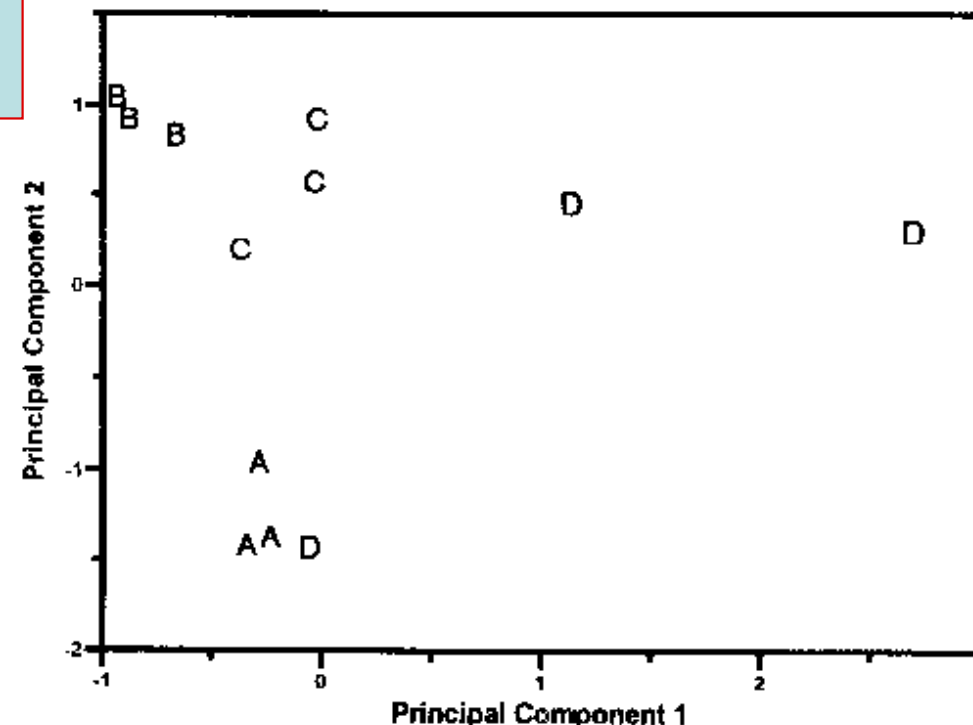


Fig. 3. Principal component analysis of BIOLOG readings for soil samples collected in the Fall of 1995 from four sites in the vicinity of a Zn smelter. Three BIOLOG extractions were conducted per site. Each data point is an average of triplicate plates from each BIOLOG extraction. Sets of triplicate plates with AWCD values closest to 0.25 were compared in this analysis. PC 1 accounted for 31.0% of the variance in the data, and PC 2 accounted for 26.5% of the variance in the data.

Příklad:

Impact of Carbon and Flooding on Soil Microbial Communities: Phospholipid Fatty Acid Profiles and Substrate Utilization Patterns

- Phospholipid fatty acid (PLFA) profiles provide a robust measure that can be used to fingerprint the structure of soil microbial communities, and measure their biomass.
- A replicated field trial, with gradients in substrate and O₂ availability created by straw incorporation and flooding was used to test the ability of PLFA to discriminate soil microbial communities in different management regimes.
- Another objective was to test the usefulness, on a large scale, of some of the proposed interpretations of PLFA biomarkers.
- Using a direct gradient statistical analysis method, PLFA profiles were found to be very sensitive to flooding and straw treatments.

Table 4. Effect of flooding and straw treatments on common PLFA biomarkers

PLFA biomarker	Interpretation	Effect of experimental treatments
18:2 ω 6c	Fungal indicator	Decreased 15% ^a with flooding ($P < 0.01$) ^b Increased 19% with straw incorporation ($P < 0.01$)
Monounsaturates	Aerobic indicator	Decreased 10% with flooding ($P < 0.01$)
Branched (i, a, Me)	High substrate indicator Gram-positive	Increased 8% with straw incorporation ($P < 0.01$) Increased 5% with flooding ($P < 0.01$) Decreased 6% with straw incorporation ($P < 0.01$)
Cyclopropyl 17 & 19	Stress indicator	Did not respond to flooding
<i>trans/cis</i> 18 & 16	Associated with slow growth Stress indicator, associated with starvation	Decreased 9% with straw incorporation ($P < 0.01$) No effect of flooding or straw treatments, Detection limits hinder use
18:1 ω 8c	Type II methanotrophs	Not detected in any plots
10Me18:0	Actinomycetes	No effect of flooding Decreased 10% with straw incorporation ($P < 0.01$)
17:1 ω 6, 17:1 ω 8, i17:1 ω 7	Sulfate reducers	Not detected in any plots

^a Flood comparison based on 8 flooded and 8 non-flooded treatment plots from the 4 sample dates for which the effects of flooding were significant, for a total of 32 samples per treatment. Straw comparison based on 16 straw added and 16 straw removed and burned treatment plots from the two sample dates in 1995 when effects of straw were significant, for a total of 32 samples per treatment

^b Mean comparisons based on a t-test

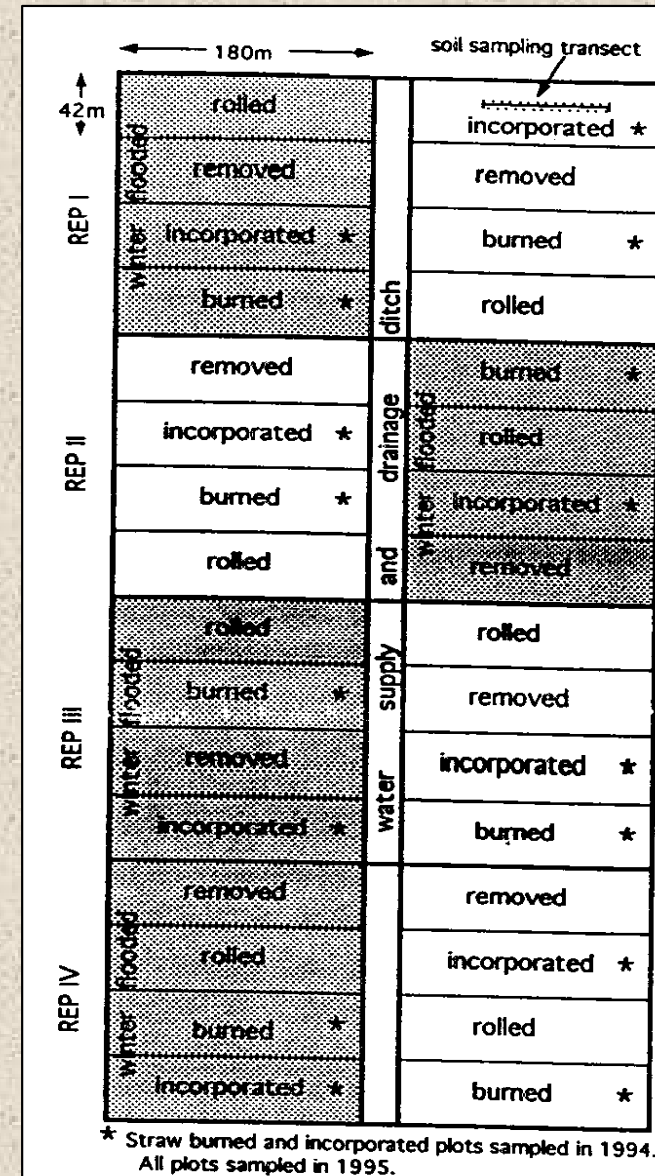


Fig. 1. Field experiment design and sampling pattern.

Příklad - pokračování:

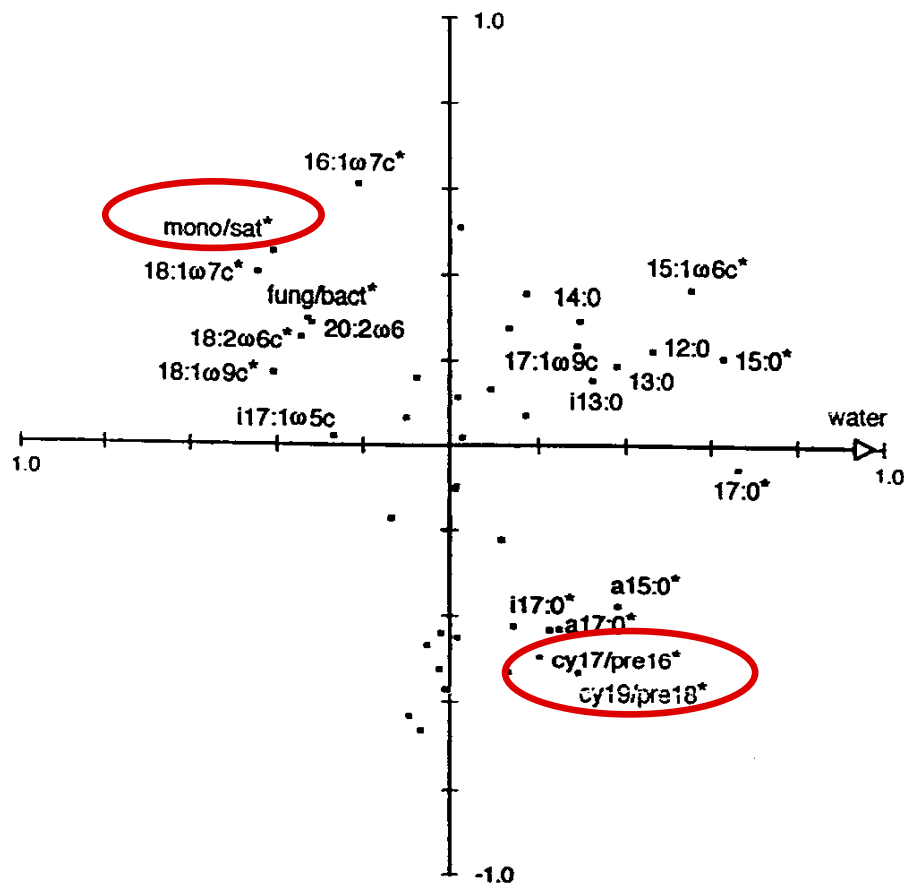


Fig. 3. Redundancy analysis ordination biplot of PLFA and soil water axis for January 3, February 2, and March 7, 1994 samples combined. Fatty acids, which are important in separating treatment plots based on soil water content (correlations of ≥ 0.20), are labeled. *Fatty acids, which responded in the same way to winter flooding in 1995, based on a separate RDA of the February 27 PLFA data.

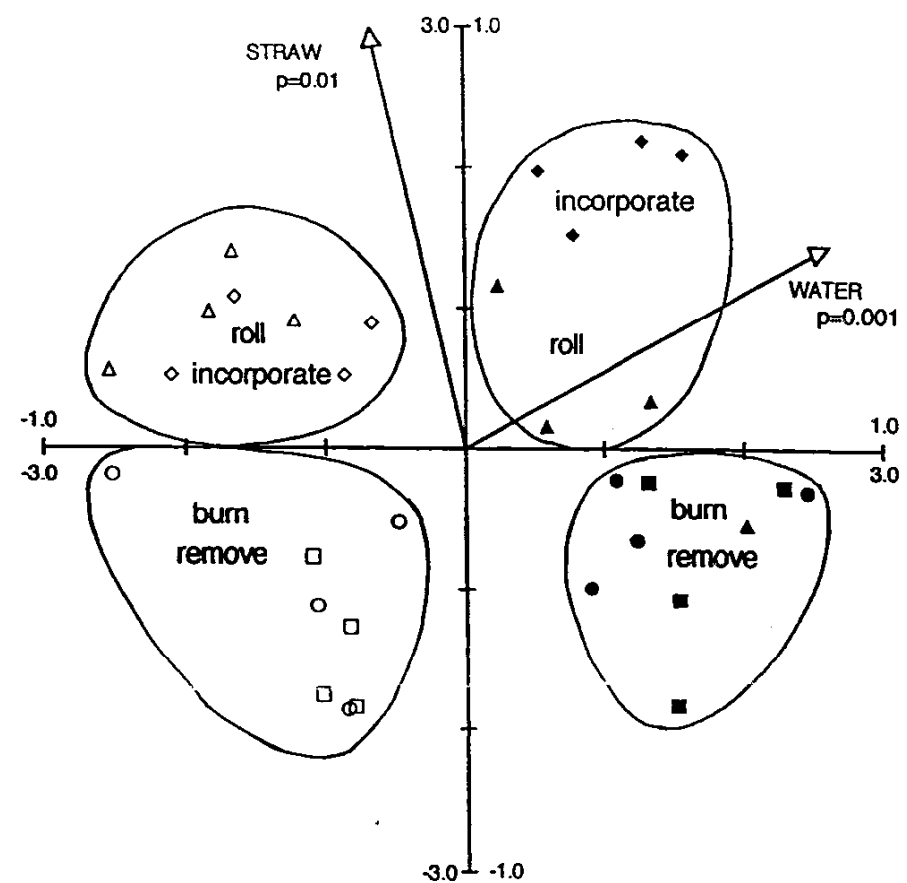


Fig. 4. Redundancy analysis ordination biplot of PLFA profiles and significant environmental variables from February 27, 1995. Flooded treatment plots have symbols: straw burned (■); straw removed (●); straw rolled (▲); and straw incorporated (◆); non-flooded treatment plots are represented by the corresponding open symbols. The 1.0 scale refers to the environmental variables, and the 3.0 scale refers to treatment plot scores. Significance levels (P values), for environmental variables explaining variation in the PLFA profile data, are included on the biplot.

Příklad - pokračování:

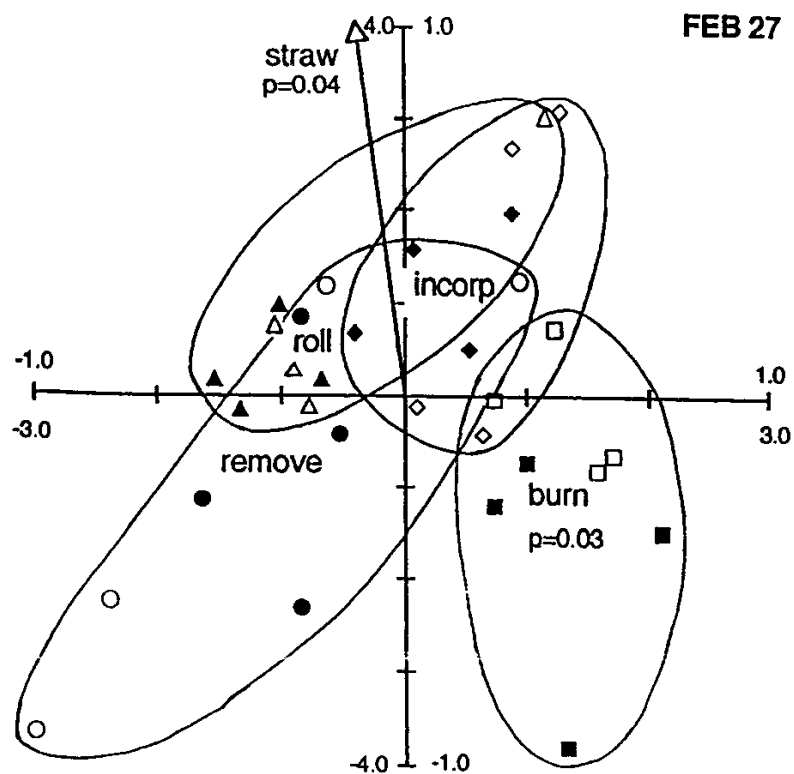


Fig. 7. Redundancy analysis ordination biplot of substrate utilization patterns for February 27, 1995 samples. Flooded treatment plots have symbols: ■ = straw burned; ● = straw removed; ▲ = straw rolled; and ◆ = straw incorporated; non-flooded treatment plots are represented by the corresponding open symbols. Straw management treatment labels are placed on their centroid position on the biplots. The 1.0 scale refers to the environmental variables, and the 3.0 scale refers to treatment plot scores. Significant levels (P values) for environmental variables explaining variation in the PLFA profile data, are included on the biplots.

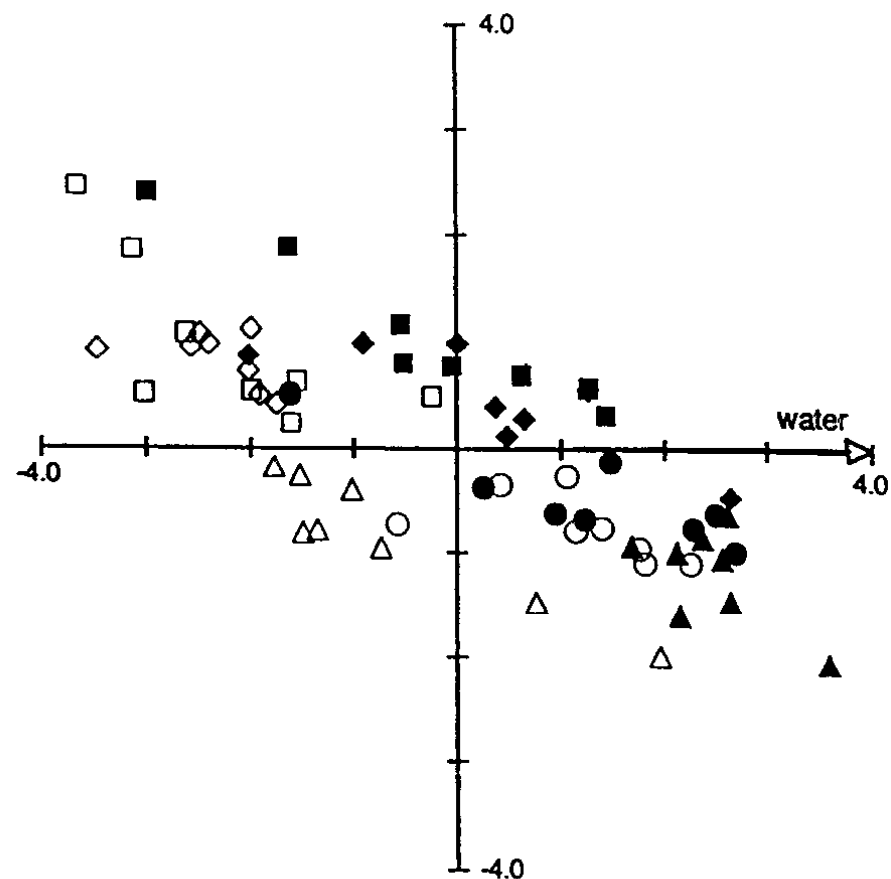


Fig. 8. Redundancy analysis ordination biplot of substrate utilization patterns for all sample dates during the winter flooded period, 1994 and 1995. Flooded treatment plots have symbols: ■ = January 1994; ◆ = February 1994; ▲ = March 1994; ● = February 1995; non-flooded treatment plots are represented by the corresponding open symbols.

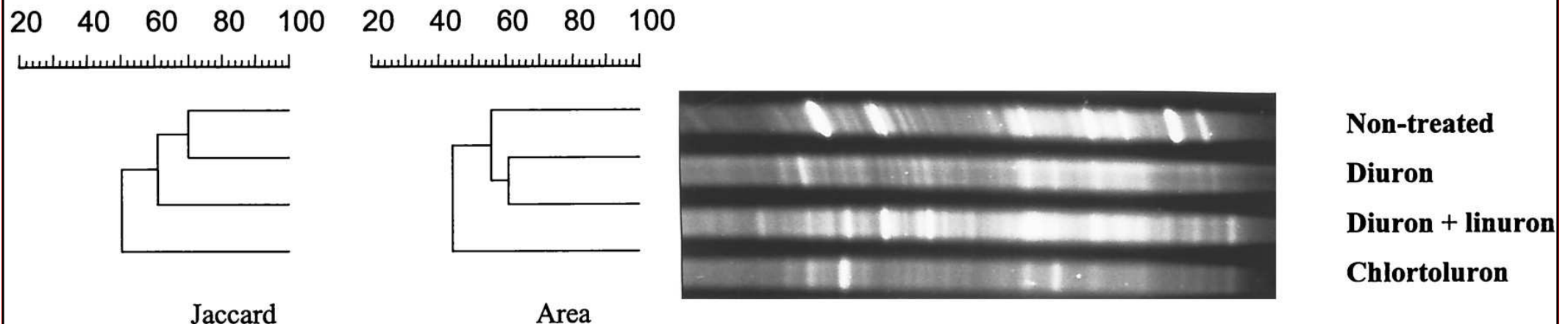
Příklad - pokračování:

- Relative abundances of monounsaturated fatty acids were reduced with flooding and increased with added carbon, consistent with their proposed interpretations as indicators of aerobic conditions and high substrate availability.
- The cyclopropyl fatty acids were not useful as taxonomic indicators of respiratory type, although their responses were consistent with their proposed use as growth condition indicators.
- Branched fatty acids decreased, as a group, in response to high substrate conditions.
- A specific biomarker for Type II methanotrophs was not found in this rice soil, even under high carbon, low O₂ conditions, which resulted in methane exposure in the soil.
- Direct comparison of PLFA and substrate utilization patterns indicated that BIOLOG patterns are highly selective, and do not reflect compositional changes in soil communities.

Příklad: Effect of Phenylurea Herbicides on Soil Microbial Communities Estimated by Analysis of 16S rRNA Gene Fingerprints and Community-Level Physiological Profiles

- The effect of three phenyl urea herbicides (diuron, linuron, and chlorotoluron) on soil microbial communities was studied by using soil samples with a 10-year history of treatment.
- Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) was used for the analysis of 16S rRNA genes (16S rDNA). The degree of similarity between the 16S rDNA profiles of the communities was quantified by numerically analysing the DGGE band patterns.
- Similarity dendrograms showed that the microbial community structures of the herbicide-treated and nontreated soils were significantly different. Moreover, the bacterial diversity seemed to decrease in soils treated with urea herbicides, and sequence determination of several DGGE fragments showed that the most affected species in the soils treated with diuron and linuron belonged to an uncultivated bacterial group.

FIG. 3. DGGE analysis of 16S rDNA fragments of different soil samples treated or not treated with urea herbicides. The 16S rDNA genes were amplified with the primer set P338f plus P518r. For the dendrograms of community relatedness, the percent similarity was calculated on the basis of two band-based coefficients, the Jaccard and area-sensitive coefficients.



- As well as the 16S rDNA fingerprints, the substrate utilization patterns of the microbial communities were compared.
- Principal-component analysis performed on BIOLOG data showed that the functional abilities of the soil microbial communities were altered by the application of the herbicides.
- In conclusion, this study showed that both the structure and metabolic potential of soil microbial communities were clearly affected by a long-term application of urea herbicides.

Příklad: Structure and function of the soil microbial community in microhabitats of a heavy metal polluted soil

- Particle-size fractionation of a heavy metal polluted soil was performed to study the influence of environmental pollution on microbial community structure, microbial biomass, microbial residues and enzyme activities in microhabitats of a Calcaric Phaeocem.
- In 1987, the soil was experimentally contaminated with four heavy metal loads: (1) uncontaminated controls; (2) light (300 ppm Zn, 100 ppm Cu, 50 ppm Ni, 50 ppm V and 3 ppm Cd); (3) medium; and (4) heavy pollution (two- and threefold the light load, respectively).
- The phospholipid fatty acid analyses (PLFA) and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) separation of 16S rRNA gene fragments revealed that the microbial biomass within the clay fraction was predominantly due to soil bacteria. In contrast, a high percentage of fungal-derived PLFA 18:2 v6 was found in the coarse sand fraction. Bacterial residues such as muramic acid accumulated in the finer fractions in relation to fungal residues.
- Heavy metal pollution did not markedly change the similarity pattern of the DGGE profiles and amino sugar concentrations. Therefore, microbial biomass and enzyme activities seem to be more sensitive than 16S rRNA gene fragments and microbial amino-sugar-N to heavy metal treatment.

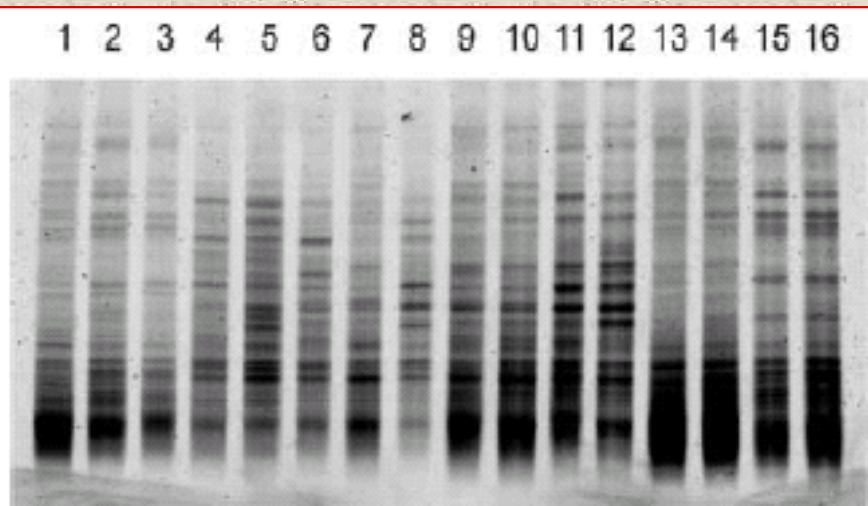


Fig. 2 The DGGE profiles of 16S rRNA gene fragments amplified from DNA extracted from different particle-size fractions of the control and medium polluted soil. Lane 1 Bulk soil, control. Lanes 2 and 3 Bulk soil, pollution. Lane 4 Coarse sand control. Lane 5 Coarse sand pollution. Lanes 6 and 7 Fine sand, control. Lane 8 Fine sand, pollution. Lanes 9 and 10 Silt, control. Lanes 11 and 12 Silt, pollution. Lanes 13 and 14 Clay, control. Lanes 15 and 16 Clay, pollution. PCR products stained using SYBR green 1 and scanned using Storm 860

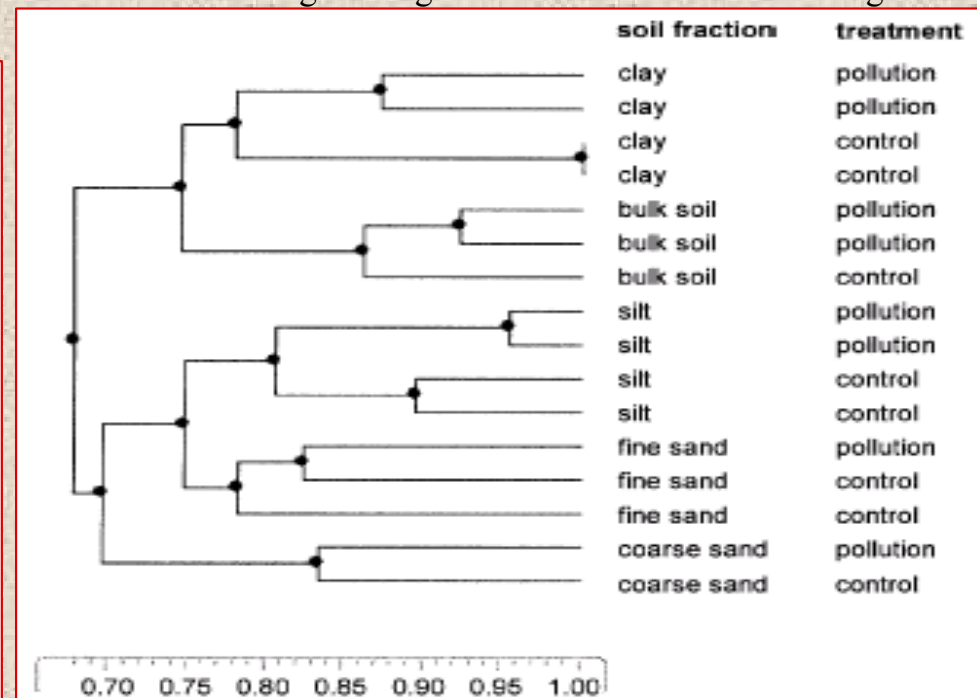


Fig. 3 The UPGMA dendrogram generated from gel image data using DGGE profiles of 16S rRNA gene fragments amplified from DNA extracted from different particle-size fractions of the control and medium polluted soil. These banding patterns were matched with the data analysed directly using Phoretix software. Scale indicates the similarity level (scale 0–1)

Hodnocení biodiverzity mikroorganismů - výhody a nevýhody jednotlivých 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

Hodnocení biodiverzity mikroorganismů - výhody a nevýhody jednotlivých 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