

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie



Jiří Zahradník

**Izolace a purifikace environmentální DNA z horizontu stavební skrývky:
stratifikační studie**

Isolation and purification of the environmental DNA from the horizon of the capping: stratification study

Bakalářská práce

Školitel: doc. RNDr. Miroslav Šulc, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Pavel Kyslík, CSc

Praha, 2011

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením školitele Doc. RNDr. Miroslava Šulce, Ph.D. a konzultanta RNDr. Pavla Kyslíka, CSc. a všechny použité prameny jsem řádně citoval.

V Praze dne 31. května 2011

.....

Jiří Zahradník

Na tomto místě bych rád poděkoval svému školiteli doc. RNDr. Miroslavu Šulcovi Ph.D. za jeho trpělivost a ochotu při vedení mé práce.

Za cenné rady a připomínky děkuji vedoucímu Laboratoře enzymových technologií RNDr. Pavlu Kyslíkovi, CSc. a pracovníkům RNDr. Václavu Štěpánkovi, CSc. a RNDr. Renátě Valešové, PhD. Děkuji za umožnění vypracovávat práci v Laboratoři enzymových technologií MBÚ AV ČR, v.v.i.

Za pomoc s charakterizací vzorků a jejich geologickým hodnocením děkuji doc. RNDr. Michalu Merglovi, CSc.

Obsah

Seznam použitých zkratk	5
1 Abstrakt	7
2 Studium půdních mikroorganismů	9
2.1 Půdní metagenomická DNA	10
2.2 Přímé metody	13
2.3 Nepřímé metody	13
2.4 Izolační kroky půdní metagenomické DNA	14
2.4.1 Lyze buněk	14
2.4.2 Odstranění proteinů ze vzorku	16
2.4.3 Precipitace DNA	16
2.4.4 Analýza a charakterizace získané DNA	17
2.4.4.1 Spektrofotometrické stanovení	18
2.4.4.2 Fluorimetrické stanovení	18
2.4.4.3 Stanovení pomocí HPLC	19
2.4.5 Odstranění kontaminací	20
2.4.6 Aplikace izolované DNA	22
2.4.6.1 Analýza délkového polymorfismu restrikčních fragmentů	22
2.4.6.2 Sekvenování DNA, sekvenční analýza	23
2.4.6.3 Fylogenetické analýza	23
2.4.6.4 Ostatní techniky studia diverzity	24
3 Cíl práce	26
4 Metodická část	26
4.1 Materiál	26
4.1.1 Biologické materiály (vzorky půdy)	26
4.1.2 Chemické materiály	27
4.1.2.1 Chemikálie	27
4.1.2.2 Pufry	27
4.1.2.3 Enzymy	28
4.1.2.4 Primery	28
4.1.2.5 Ostatní	29

4.1.3	Přístrojové vybavení	29
4.2	Metody	30
4.2.1	Izolace metagenomické DNA	30
4.2.2	Kvantitativní a kvalitativní analýza DNA	31
4.2.3	Mikroskopie, stanovení počtu mikroorganismů	33
4.2.4	Klonování DNA v E.coli	34
4.2.5	RFLP analýza, sekvenování, fylogenetická analýza DNA	35
5	Výsledky	36
5.1	Odběr vzorků	37
5.2	Izolace, kvantitativní a kvalitativní analýza DNA	38
5.3	Mikroskopie	44
5.4	Klonování v E.coli	45
6	Diskuze	48
7	Závěr	53
8	Seznam použité literatury	54
9	Přílohy	61

Seznam použitých zkratek

AcN = acetonitril

AE-HPLC = iontově výměnná HPLC (z angl. „anion exchange“)

ARDRA = restrikční analýza PCR amplifikovaných 16S rDNA (z angl. „amplified ribosomal DNA restriction analysis“)

CTAB = hexadecyltrimethylammonium bromid

DGGE = denaturačně gradientová elektroforéza (z angl. „denaturing gradient gel electrophoresis“)

dNTP = deoxyribonukleotid trifosfáty

ds DNA = dvouvláknová DNA

EEM = typ fluorescenční spektroskopie (z angl. „excitation-emission matrix“)

EDTA = kyselina ethylendiamintetraoctová

EtBr = ethidium bromid

EtOH = ethanol

G+ = gram pozitivní

HPLC = vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z angl. „high performance liquid chromatography“)

IP-RP-HPLC = iontově párová vysokoúčinná kapalinová chromatografie s obrácenou fází (z angl. „ion pair“)

IPTG = isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid

LB = lyzogenní polévka (z angl. „lysogen broth“)

MOPS = 3-(N-morpholino)propansulfonová

NaAc = octan sodný

NaPy = pyrofosforečnan sodný

OTU = organizační taxonomická jednotka (z angl. „organisation taxonomic unit“)

PAC = prachově aktivní uhlí (z angl. „powdered activated charcoal“)

PCR = polymerázová řetězová reakce (z angl. „polymerase chain reaction“)

PEG = polyethylenglykol

PFGE = pulzní gelová elektroforéza (z angl. „pulsed field gel electrophoresis“)

PIT = inhibiční práh PCR (z angl. „PCR inhibition treshold“)

PVPP = polyvinyl polypyrolidon

16S rDNA = lokus pro 16S ribosomální RNA na DNA

18S rDNA = lokus pro 18S (Eukaryotní) ribosomální RNA na DNA

RFLP = polymorfismus délek fragmentů po restriční štěpení (z angl. „restriction fragment length polymorphism“)

SDS = dodecylsulfát sodný

SIP = značení stabilními isotopy (z angl. „stable isotope probing“)

TGGE = teplotně gradientová elektroforéza (z angl. „temperature gradient gel electrophoresis“)

TEA = triethylamin (**TEAA** = triethylamin acetát)

T-RFLP = polymorfismus délek terminálních fragmentů po restriční štěpení (z angl. „terminal restriction fragment length polymorphism“)

Tris = trishydroxymethylmethan

X-gal = 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid

1 Abstract

According to our contemporary knowledge soil is the most abundant source of microbial biomass. Unfortunately, only one percent of the microorganism species is available by classical cultivation techniques. Soil metagenomic DNA is a collection of the whole DNA including also uncultivated microorganism in the soil sample and provides information to study molecular aspects of microorganism and their DNA sequences inaccessible by other techniques.

This work is focused on characterization and isolation of soil metagenomic DNA from deep horizon of capping. Evaluation in term of the isolation and techniques of recombination of DNA and stratification study are included in this work.

Obtained collection of samples was preliminary characterized with the view of quality – content of clay, humic compounds and crude number of microorganism. The purified soil metagenomic DNA was quantitatively and qualitatively characterized for each sample. The quantification method and DNA quality determined the next applications and procedures of DNA techniques. Also the soil quality was discussed from this point of view.

According to the results of DNA analysis, the three selected DNA samples were processed to DNA library with 16S rRNA DNA loci and after DNA sequencing analysis the phylogenetic study was performed. This study was discussed with respect to the changes of microbial diversity depending on the depth of soil capping.

(In Czech)

Abstrakt

Podle současných poznatků je půda nejbohatším zdrojem mikrobiální biomasy. Klasickými kultivačními metodami je dostupné pouze necelé jedno procento druhů. Půdní metagenomická DNA je souborem veškeré DNA obsažené ve vzorku půdy, včetně DNA z jinak nekultivovatelných mikroorganismů a umožňuje nám zkoumat molekulární aspekty nekultivovatelných mikroorganismů a tedy jinak nedostupných sekvencí nukleových kyselin.

Tato práce je zaměřena na charakterizaci a izolaci půdní metagenomické DNA z hlubokého horizontu skrývky, její zhodnocení z hlediska izolace a technik rekombinantní DNA s následnou stratifikační studií.

Získané vzorky půdy byly předběžně charakterizovány z hlediska kvality – obsah jílovitých součástí, huminových látek a hrubý počet mikroorganismů. Následně byla izolována půdní metagenomická DNA, která byla kvantitativní a kvalitativní analýzou charakterizována. Byla vyhodnocena použitá metodika, vhodnost izolátu pro další použití a vliv kvalit půdy na proceduru jako takovou.

Podle výsledků analýzy byly vybrány DNA izolované ze tří vzorků a zpracovány na knihovnu fragmentů lokusů 16S rRNA na DNA. Vybrané fragmenty byly sekvenovány a zpracovány na fylogenetickou studii, u které byl dán zřetel na měnící se diverzitu mikroorganismů v závislosti na hloubce (stratifikační studie).

2 Studium půdních mikroorganismů

Půdní horizont je velmi heterogenní prostředí, jehož fyzikální a chemické vlastnosti jsou proměnlivé. V každém místě je možné najít jiné koncentrace důležitých živin, jiné pH, jiná je i dostupnost vody pro organismy, atd. Všechny tyto abiotické faktory jsou důvodem vzniku a růstu různých bakteriálních komunit nejen na různých lokalitách ale i v různých hloubkách na téže lokalitě ¹. Cíle snahy mnohých mikrobiologů bylo poznání těchto bakteriálních společenstev v zemině. Klasické metody studia byly založené na vytváření výluhů z půd a následná kultivace takto dostupných mikroorganismů s využitím známého spektra mikrobiologických kultivačních půd. Celá tato snaha vyústila časem ve vyčerpání možností klasických postupů, takže bylo v roce 1931 S. A. Waksmanem zveřejněno, že máme dostatečné množství poznatků na to, abychom si udělali přehled o půdních mikroorganismech ². V této době nikdo neměl představu o molekulárních základech dědičnosti, molekulárně-biologických a metagenomických technikách, tudíž se nepředpokládala existence mikroorganismů, které by svými nutričními požadavky nebyly pro kultivační techniky dostupné.

Postupem času s rozvojem znalostí o DNA vznikla snaha známé půdní mikroorganismy dále charakterizovat a nalézt jejich evoluční vztahy. V 70. letech byla C. Woese vyvinuta metoda fylogenetické analýzy na základě studia genů pro malou ribosomální podjednotku, tedy přesněji lokusu pro 16S rRNA na DNA (16S rDNA) ³. Ve stejné době již bylo známé, že mikroskopicky determinované množství morfologicky odlišných mikroorganismů v půdě je vyšší než množství přístupné kultivačními metodami. Bylo zapotřebí vyvinout metody, které by zpřístupnily DNA půdních mikroorganismů, bez nutnosti kultivace tj. postupy metagenomických technik. Název pochází z označení metagenom, což je souhrnná DNA daného objektu zájmu. Například společenství všech mikroorganismů ve vzorku půdy. Po zpřístupnění DNA nekultivovatelných mikroorganismů se naše představy o mikrobiální půdní diverzitě počaly zásadně měnit.

Již v roce 1985 bylo pomocí studia 16S rDNA zjištěno, že je diverzita půdních mikroorganismů výrazně bohatší, než se předpokládalo ⁴. Jak bylo později zjištěno, v absolutním počtu jednotlivých sekvencí 16S rDNA s sebou nese prvenství půdní metagenomická DNA. Podle současných poznatků, veškerá půda na planetě obsahuje 4 – 5x10³⁰ mikrobiálních buněk, což je desetkrát více než druhý nejrozsáhlejší zdroj

mikrobiální biomasy, kterým jsou oceány⁵. Zjistilo se, že z celkového množství druhů je za klasických podmínek laboratorní kultivace přístupné méně než jedno procento mikroorganismů^{5,6}. Podle odhadů může gram suché půdy obsahovat 1000 až 10 000 druhů neznámých prokaryot⁷. Celková hmotnost biomasy prokaryot v půdě je srovnatelná s celkovou hmotností rostlinné biomasy⁸.

Metagenomické techniky se staly tedy významným předmětem zájmu mnoha vědců. Získaná DNA nám otevírá cestu nejen k 16S rDNA, ale také k obrovskému spektru dalších možných aplikací. Od studií cílených na vyhledání specifických enzymů, přes práce zaměřené na nové biosyntetické reakce a dráhy umožňující likvidaci nebo utilizaci toxických látek, xenobiotik, až po celkové stratifikační analýzy mikrobiálních populací, analýzy populační dynamiky anebo kompletace celých genomů nekultivovatelných mikroorganismů⁹.

V současné době je zatím úplný metagenom nedostupný, protože nejsme schopni izolovat z půdy 100 % obsažené DNA. Použití každé metody je zatíženo chybou a preferuje určitou charakteristickou skupinu mikroorganismů. Výsledky diverzity se tedy mezi jednotlivými metodami a přístupy částečně liší¹⁰. Důležitou podmínkou předurčující úspěšnost pozdějších aplikací je právě výběr správné metody izolace. Jejich porovnávání a optimalizace je předmětem mnohých výzkumů, jejichž výsledky však leckdy neuvažují samotné kvality a vlastnosti použité půdy a jejich možný dopad na zvolenou metodiku.

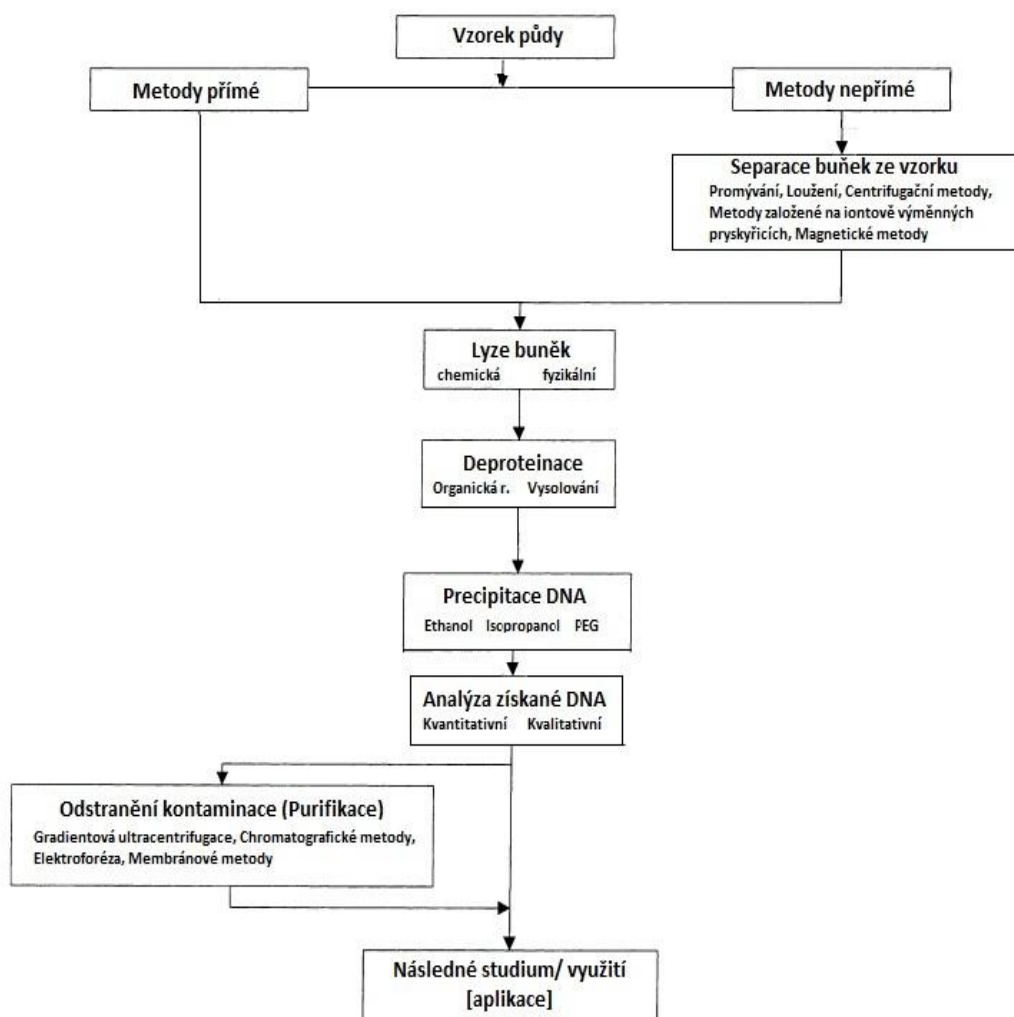
2.1 Půdní metagenomická DNA

Jakákoli práce směřující k využití půdní metagenomické DNA vychází z kroků, které jsou přehledně zobrazeny ve schématu na obrázku 1 (str. 12). Prvním je samotné získání vzorku a jeho předběžná charakterizace. Ačkoli se jeví tento krok jako banální, jeho podcenění může vést ke zkreslení výsledků anebo dokonce až k jejich znehodnocení. Při získávání vzorků je nutné zajistit co nejmenší možnou kontaminaci a to jak biologickou, tak chemickou. Předběžná charakterizace a hrubý odhad obsahu, nás může předem připravit na úskalí, která s sebou nese izolace DNA z problematických typů půd. Ač to většina autorů prací zabývajících se vzájemným porovnáváním metod izolace DNA nebere zřetel, je zásadně nutné zvažovat efektivitu metody vzhledem ke kvalitám vzorku. Za

zásadní z pohledu izolace DNA lze považovat kationtovou a aniontovou výměnnou kapacitu půdy, přítomnost hlinitokřemičitanů (jílovitých sorpčních součástí), a velké množství organických látek, hlavně huminových kyselin a dalších fenolických látek¹¹. Jak již bylo řečeno, půda je prostředí heterogenní a tudíž i vzorky reprezentující půdní horizont mohou být zásadně odlišné. Nehledě na to, že většina současného výzkumu je zaměřena na studium půdních mikroorganismů a konsorcií charakteristických pro extrémní stanoviště, jako jsou kontaminované sedimenty¹², prostředí hlubokých afrických dolů na zlato¹³, extrémně kyselé důlní drenáže¹⁴, nebo se zabývá pouze povrchovou vrstvou. Práci, které se zabývají půdním profilem a jeho charakterizací je již méně, což vede k tomu, že naše znalosti o hlubších vrstvách půdy jsou z mikrobiologického hlediska malé¹⁵. Důvodů současného stavu je velmi mnoho. Na prvním místě je třeba uvést ztíženou dostupnost hlubších vrstev a hlavně velmi komplikovanou izolaci a charakterizaci DNA spojenou se snižujícím se obsahem mikroorganismů a značnou heterogenitou půdy¹⁶.

Existuje velmi mnoho metod izolace půdní metagenomické DNA. Tyto metody můžeme podle základního principu rozdělit na metody přímé a nepřímé. Přímé metody, popsané v literatuře při zpracování sedimentů¹⁷, jsou charakteristické přímou lyzí buněk ve vzorku a následnou izolací DNA. Nepřímé metody založené na separaci buněk z půdního vzorku a až poté následující lyzí a izolací DNA, byly popsané později než metody přímé¹⁸.

Lýze buněk je chemická či fyzikální dezintegrace buněčných membrán a stěn, která tím zpřístupní obsah buňky. Lýze buněk je kritický krok izolace půdní metagenomické DNA¹⁹, která určuje výslednou efektivitu izolace DNA. Zůstane-li DNA obsažená ve zbytcích buněk, pak bude tato odstraněna s membránovou frakcí. Dalšími následujícími kroky (deproteinace a precipitace) se snažíme zvýšit obsah DNA ve vzniklé směsi a získat ji v co nejčistější formě. Výsledný preparát je charakterizován kvantitativně (svědčí o efektivitě izolace) i kvalitativně (determinuje následné kroky požadovaných aplikací, především takové, které nám umožňují odstranit kontaminaci našeho vzorku, někdy také označované jako purifikace).



Obrázek č. 1 – Schéma postupu jednotlivých kroků práce vedoucí k aplikacím půdní metagenomické DNA

Řada následných využití izolované DNA (aplikací), je založena na vytváření knihoven DNA a jejich efektivní analýze. Je značný rozdíl, hledáme-li poměrně krátké úseky ribosomální 16S rDNA²⁰ nebo dlouhé úseky postihující celé operony. Podle této podmínky musíme cíleně vybírat izolační metodiku a to zároveň také předurčuje typ použitého vektoru (podle požadované délky vkládané DNA můžeme využít plasmidů, kosmidů nebo fosmidů). Vybraným vektorem klonujeme do zvoleného mikroorganismu určené fragmenty DNA (16S rDNA) tak, aby vznikla množina klonů bakterií se začleněným vektorem, které dohromady nesou všechny požadované fragmenty DNA ze vzorku. Snahou je tedy získat kompletní soubor klonů, tj. knihovnu, která nám umožní vybírat pouze jednotlivé fragmenty ze souhrnného vzorku metagenomické DNA. Chyby izolace

vedou k tomu, že konstrukce kompletních knihoven a jejich prohledávání je v případě půdní metagenomické DNA velmi obtížná ²¹.

V této práci je izolovaná DNA využita pro taxonomickou charakterizaci půdních mikroorganismů v závislosti na měnící se hloubce. Jejich následná fylogenetická analýza, vychází z výběru určitých klonů knihovny. Následuje izolace vektoru - plazmidu a studie vloženého segmentu DNA, kterou může být polymorfismus délek fragmentů po restričním štěpení (RFLP, z angl. „restriction fragment length polymorphism“) nebo přímo sekvenování DNA. Samotná funkční a taxonomická charakterizace půdních mikroorganismů bohužel nestačí k pochopení vztahů mezi jednotlivými populacemi půdních bakterií. V případě takovéto studie potřebujeme techniky, které nám umožní zjistit informace o tom, v jakém fyziologickém stavu se buňky nalézají, což již není předmětem této práce ²².

2.2 Přímé metody

Přímé metody můžeme rozdělit na jemné (z angl. „soft“) a tvrdé (z angl. „harsh“). Rozdíl je ve způsobu lyze buněk. Jak již bylo řečeno, při přímých metodách probíhá lyze přímo ve vzorku půdy. Samotná separace půdních částeczek probíhá centrifugací. Zbytek postupu izolace je společný pro přímé i nepřímé metody.

Přímé metody poskytují větší výtěžky izolované DNA. Jejich společnou nevýhodou je ale velké znečištění takto získané DNA ²³. Na druhou stranu jsou výsledky přímých metod reprodukovatelnější a jejich typickým rysem je neselektivita a proto se zastoupení izolované eubakteriální, archebakteriální a prokaryotické DNA blíží poměrům ve vzorku ²⁴. Pro přímé metody jsou také vyvinuty postupy na zpracování malého množství vzorku ²⁵.

2.3 Nepřímé metody

Využití nepřímé metody bylo zvoleno jako vhodné pro účely této práce. Při použití těchto postupů je kladen důraz na co největší množství buněk, separovaných ze vzorku půdy.

Tohoto kroku lze dosáhnout řadou způsobů (viz obr.1). Nejběžnějším z nich je promývání a loužení půdního vzorku různými typy extrakčních pufrů^{26,27,28,29,30}.

Další typ nepřímých metod je odvozen od protokolu Jacobsena a Rasmusena³¹. Principem je použití iontově výměnných pryskyřic²⁷. Pryskeřice je přidána ke vzorku, který je mixován a poté centrifugován. Supernatant obsahuje buňky, které se díky iontové výměně odpoutávají od částeczek půdy³¹.

Magnetické metody izolace patří mezi moderní přístupy pro oddělení buněk z hrubých extraktů³², využívanými některými komerčními kity a separačními moduly³³. Jsou vhodné spíše pro operace ve velkém měřítku, kdy neklademe nároky na minimální spotřebu vzorku³⁴.

Využívány jsou také metody založené na centrifugaci v gradientu chloridu cesného, i když jejich pracnost je činí nepříliš oblíbenými.

Nepřímé metody můžeme podobně jako metody přímé opět rozdělit na jemné a tvrdé podle způsobu lyze buněk. Výhodou nepřímých metod je vysoká čistota získané DNA, většinou bez nutnosti dalších kroků odstraňující kontaminaci. Dalším kladem je možnost použití selektivních izolací například pro prokaryotní organismy.

Ukazuje se však, že nepřímé metody trpí některými nedostatky, které mohou silně zkreslit podíly izolované DNA od různých skupin mikroorganismů^{24,35,36}. Vzhledem k tomu, že většina protokolů a studií je v současné době založena na nepřímých metodách, pak možnost takto získaných chybných výsledků je velká²³. Neboť nepřímými metodami bývá izolováno nejvýše 50% bakteriálních buněk³⁷. Oproti těmto tvrzením stojí práce Gabor a kol. (2003)²⁷ a Stacha a kol. (2001)³⁸, kteří poukazují, že nejsou podstatné rozdíly mezi přímými a nepřímými metodami v získané diverzitě ale významnou roli hraje naopak vliv použité půdy a její kvalita.

2.4 Izolační kroky půdní metagenomické DNA

2.4.1 Lyze buněk

Půdní vzorek obsahuje velké množství eubakteriálních, archebakteriálních a eukaryotických buněk. Chceme-li získat metagenomickou DNA, zajímá nás souhrnná DNA

obsažená ve všech organismech a všech typech buněk ve vzorku. Je tedy samozřejmé, že před sebou máme obrovskou škálu jednotlivých buněčných stěn a membrán, které jsou ještě navíc ovlivněny fyziologickým stavem daného organismu⁹. Ačkoli bylo vyvinuto mnoho metod, není možné dosáhnout kompletní lyze všech buněk²⁸. Podle povahy jsme schopni rozlišit metody fyzikální (tvrdé) a chemické (jemné). V současné době se objevují práce, které vyhodnocují jednotlivé způsoby lyze buněk a jejich vhodnost pro danou skupinu mikroorganismů¹⁰.

Prostředí, ve kterém lyze probíhá, vždy obsahuje pufr ke stabilizaci pH, různé typy detergentů, často chelatační činidla a kosmotropní činidla zvyšující hydrofobní efekt.

Jemné metody (chemické) – využívají k lyzi speciálního pufru s obsahem enzymu, který dezintegruje buněčnou stěnu. Čistě chemické metody jako použití 10% H₂SO₄ nelze používat kvůli silné hydrolýze DNA.

Někdy jsou do pufru přidávány i nejrůznější proteolytické enzymy, jako proteasa K²⁷. Samozřejmá je dlouhodobá inkubace po dobu až několika hodin. Existují modifikace chemické lyze, využívající inkubaci při vysoké teplotě³⁹. Složení lytických pufrů cílené na buněčnou stěnu prokaryot bohužel není vhodné pro zvláštní typy buněk, jejichž DNA nejsme takto schopni izolovat¹⁹. Obecně lze o jemných metodách lyze buněk říci, že jsou šetrnější a získaná DNA je méně poškozená (fragmentovaná), než je tomu v případě metod tvrdých. Komplexnost izolovaného spektra mikroorganismů je ale bohužel menší.

Metody tvrdé (fyzikální) – využívají drcení, mletí, mletí se skleněnými kuličkami, teplotní šok, rozrušení mikrovlnným ohřevem či použitím ultrazvuku^{40,41}. Obvyklé jsou také kombinace jednotlivých metod a metodických kroků. Mechanické rozrušení je efektivnější a méně selektivní než jemné metody.

Nevýhodou různých způsobů mletí a drcení je fragmentace izolované DNA a vysoký podíl nečistot, závislé na době trvání celé operace^{42,43}. Extrémem v tomto fyzikálním způsobu lyze jsou protokoly, které popisují mletí vzorku v kapalném dusíku⁴⁴.

Metoda teplotního šoku je založena na opakovaném zmrazení a prudkém zahřátí vzorku, přičemž jednotlivé cykly se různě opakují⁴⁵. Teplotní šok je ale nejjemnějším mechanickým způsobem lyze buněk⁴⁶. Zahřívání pomocí mikrovln je pouze variací předchozí metody a je využíváno k lyze spor a G+ buněk⁴⁷.

Použití ultrazvuku, efektivně uvolňuje bakterie vytvářející agregáty s částicemi půdy a je tedy vhodná pro půdy poskytující špatné výtěžky klasickými metodami. Nevýhodou může být velmi časté lámání řetězců DNA na malé fragmenty při příliš dlouhém trvání nebo při vyšší energii sonikace. Metoda tedy vyžaduje optimalizaci. Dosti často bývá používána ve spojení s teplotním šokem ⁴⁸.

Efektivitu lyze buněk lze stanovit počítáním buněk ve vzorku před a po provedení lyze ¹⁹. Je možné konstatovat, že rozdíly ve velikosti buněk a obsahu DNA nehrají vzhledem k jejich počtu roli a je tedy možné poměrně snadno vypočítat předpokládané množství DNA ve vzorku. Průměrná živá bakterie váží asi 10^{-12} g a DNA tvoří 1% přibližně její hmotnosti ⁴⁹.

2.4.2 Odstranění proteinů ze vzorku

Po degradaci stěn buněk lyzí je třeba oddělit vlastní DNA z lyzované směsi. Ze vzorku je nezbytné odstranit zbytky půdy, membrán lyzovaných buněk, jejich částí a proteinů, jakož i samotný extrakční pufr. Na rozdíl od proteinů se zbytků půdy a membrán snadno zbavíme centrifugací.

Z počátku se používala deproteinizace pomocí organických rozpouštědel jako jsou fenol, chloroform a isoamylalkohol v různých směsích ^{25,50,27}. Nevýhodou tohoto způsobu je použití toxických organických rozpouštědel.

Často se také používají metody vysolování pomocí koncentrovaných roztoků chloridu sodného, octanu draselného, sodného či amonného ⁵¹. Proteiny jsou postupně vysolovány a centrifugací (do 1000g) vzniklý precipitát sedimentuje, zatímco DNA zůstává v roztoku.

2.4.3 Precipitace DNA

Po deproteinizaci následuje samotná precipitace DNA. Je to druhý problematický krok po lyzi buněk, který prudce ovlivňuje množství a kvalitu získané metagenomické DNA. Při tomto kroku dochází jak k odstranění většiny kontaminací, tak k odstranění extrakčního

pufru a zkoncentrování izolované DNA. Samotná precipitace se provádí ethanolem, isopropanolem nebo polyethylenglykolem (PEG)^{17,51,52}, přičemž množství přidané látky nutné pro precipitaci DNA ze stejného vzorku se snižuje v řadě: ethanol, isopropanol, PEG.

Použití ethanolu zvyšuje množství koprecipitovaných huminových kyselin⁵³ a má nižší výtěžky⁵⁴. Použití PEG a isopropanolu až čtyřikrát snižuje koextrakci huminových látek⁵⁵. Hlavní nevýhodou použití PEG je nutnost jeho odstranění ze vzorku fenolovou extrakcí, neboť vysoké koncentrace negativně ovlivňují průběh PCR. Proto většina autorů používá k precipitaci DNA isopropanol, avšak bylo zjištěno, že 5% koncentrace PEG ještě neovlivňuje negativně průběh PCR, ale již dochází k výraznému snížení koprecipitace huminových kyselin⁵⁶.

2.4.4 Analýza a charakterizace získané DNA

Kvantitativní a kvalitativní analýza izolované metagenomické DNA z půdního vzorku je téměř nezbytným krokem před jakoukoli další operací. Největší problémy při analýze DNA tvoří kontaminace huminovými kyselinami. Tyto vznikají jako přirozená součást humusu. Můžeme je rozdělit na 3 hlavní skupiny: huminové kyseliny, kyseliny fulvonové a tzv. humin jako nerozpustnou složku⁵⁷. Někteří autoři rozdělují dále huminové kyseliny podle jejich spektroskopických vlastností na šedé a hnědé⁵⁸.

V půdě běžně obsahující do 2 % uhlíku deponovaného v organických látkách, tvoří obsah extrahovatelných huminových kyselin až polovinu tohoto množství⁵⁹. Tyto kyseliny se svými fyzikálněchemickými vlastnostmi blízce podobají DNA⁶⁰. Fenolové skupiny huminových kyselin se váží na amidy a jejich deriváty, které jsou přítomné jak v samotných bázích DNA, tak i v enzymech⁶¹. Přítomnost huminových kyselin tedy inhibuje restriční enzymy⁶², také PCR proces, transformaci bakterií, atd.⁵⁹. Úspěšný průběh PCR je považován za indikaci dobré čistoty izolované DNA.

2.4.4.1 Spektrofotometrické stanovení

Nukleové kyseliny mají absorpční maximum při vlnové délce 260 nm. Hodnota A_{260} je tedy nejčastěji používanou veličinou pro zjištění koncentrace DNA. Hodnota A_{280} se používá pro rychlé orientační stanovení proteinové kontaminace vzorku, přičemž poměr A_{260}/A_{280} větší než 1,7 značí kontaminaci proteiny²⁴.

Jelikož však některé z huminových látek mají velmi výraznou absorpci při vlnové délce 260 nm, stejně jako nukleové kyseliny, není toto stanovení vhodné pro půdní DNA⁶³. Naopak je možné z této interferenční absorpce oproti absorpci čisté DNA získat kvantitativní představu o předchozím znečištění izolátu.

Přítomnost huminových látek se snadno stanovuje spektrofotometricky při A_{230} ⁶⁴ nebo A_{320} ⁶⁵. Popsány byly i metody fluorimetrické (viz 2.4.4.2). Přesné stanovení kontaminace huminovými kyselinami je ovšem velmi problematické kvůli již zmíněné heterogenitě.

V současné době jsou běžně dostupné přístroje používající optických vláken nebo cel, které umožňují měření jednotlivých vzorků v mikroměřítku⁶⁶, což umožňuje povrchové napětí kapky vzorku, která je roztahována mezi dvěma sloupci s optickými vlákny⁶⁷.

2.4.4.2 Fluorimetrické stanovení

Molekula DNA má slabé fluorescenční vlastnosti značně závislé na pH roztoku, v kterém probíhá měření⁶⁸. Je nutno použít sondy tj. fluorescenční barviva vážící se na povrch DNA či interkalující mezi řetězce DNA.

Huminové kyseliny mají různě silné fluorescenční vlastnosti, které mohou interferovat se stanovením nukleových kyselin a není možné jejich fluorescenci klasickými metodami odlišit. Toto omezení řeší jedna z nejmodernějších technik, EEM fluorescenční spektroskopie (zkratka z angl. „Excitation-emission matrix“), která umožňuje kvantifikaci látek inhibující PCR⁶⁹.

Příklady některých fluorescenčních barviv (sond) pro stanovení DNA:

Nejstarší a stále používaný je **ethidium bromid (EtBr)**. Ethidium bromid se interkaluje do dvouklánové DNA (dsDNA) a jeho fluorescence se tak zvýší cca 20 krát. Jeho obrovskou

nevýhodou je jeho toxicita a nutnost excitace UV zářením, přičemž dochází k poškozování DNA. Výhodou EtBr je naopak možnost přidat jej přímo do agarosového gelu, takže je možné opakovaně během elektroforézy kontrolovat dělenou DNA.

PicoGreen (Invitrogen) je velmi dobrou sondou, která se váže speciálně k dvouvláknové DNA. Umožňuje zjišťovat koncentrace v rozsahu 25 pg/ml až 1 µg/ml. Obsah huminových látek vyšší než 100 ng/ml ale interferuje s jeho fluorescencí. Vysoká citlivost a fakt, že se PicoGreen váže na dsDNA umožňuje v některých případech jeho použití i na znečištěnou DNA s vysokou přesností stanovení⁷⁰.

SYBR Green (Qiagen) je jedna z nejcitlivějších sond detekujících DNA, určená pro použití hlavně v elektroforéze. Intenzita fluorescence je až 25 krát vyšší než u EtBr a u oligonukleotidů až 100 krát vyšší. SYBR Green má excitační maximum při 497 nm⁷¹.

Za zmínku stojí také sonda **Hoechst 33258** (Hoechst). Ačkoli její nevýhodou je nutnost použití UV-fluorimetru, má tato sonda vysokou specifitu a je možné jí použít i v hrubých extraktech⁷².

Další možností jak měřit fluorescenci DNA, je zvýšení její vlastní fluorescence, čehož lze dosáhnout kovovými mikročásticemi (např. stříbrné částice menší než vlnová délka použitého záření⁷³).

2.4.4.3 Stanovení pomocí HPLC

HPLC, tedy vysokoúčinná kapalinová chromatografie není metodou přímého stanovení. Na separační koloně dojde k oddělení jednotlivých fragmentů DNA nebo bází a ty jsou poté nejčastěji stanovovány spektrofotometricky detektorem přístroje. HPLC může být využita jak k samotnému stanovení koncentrace DNA kalibrační metodou, tak k separaci jednotlivých fragmentů DNA ve vzorku. Ačkoli je většina preparací DNA prováděna elektroforetickými metodami (pro jejich jednoduchost, rychlost a finanční nenáročnost⁷⁴), výhody HPLC jsou v možnosti automatizace, naprosto přesné separace a charakterizace⁷⁵. Jako příklad možné automatizace lze uvést set „Capillary array“ HPLC⁷⁶.

Klasickou HPLC není možné DNA separovat pro její hydrofilní povahu. Proto je nutné využít RP-HPLC, tedy obrácenou fázi, či nejčastěji iontově výměnnou HPLC tzv. AE-HPLC (z angl. „anion exchange“). Tato chromatografie je založená na interakci záporně nabitých

fosfátových skupin s kationovým iontoměničím⁷⁷. Alternativou je použití standardních RP-HPLC kolon. Pro lepší rozdělení je používán v mobilní fázi eluční pufr mající opačný náboj než dělená látka a vytvářející s ní společně iontový pár. Dojde tak k velkému zvýšení retence na koloně. Příkladem takového pufru je triethylaminoacetátový pufr (TEAA). Tento typ HPLC je označován jako iontově párová IP-RP-HPLC (z angl. „ion pair“).

Při stanovení celkové koncentrace DNA ve vzorku se využívá principu, kdy je analyzovaná DNA absolutně naštěpena na jednotlivé nukleotidy pomocí nukleázy⁷⁸. Tohoto lze využít také pro analýzu zastoupení jednotlivých bází ve vzorku⁷⁹, včetně 5-methylcytosinu⁸⁰. Ke kalibraci je použito přesně definované množství rozštěpené DNA. Jiným přístupem může být analýza jednotlivých oligomerů DNA, kdy nejlepších výsledků je dosahováno při velikosti fragmentů 10-12 bp⁸¹.

Další možností, k níž je HPLC možné využít je analýza kontaminací a huminových kyselin⁸² jak bylo použito i v této práci.

2.4.5 Odstranění kontaminací

Výsledky kvantitativní i kvalitativní analýzy DNA nám poskytují důležitou informaci, zda můžeme přistoupit přímo k zpracování izolátu, či bude nutné zařadit další purifikační kroky. Nevýhodou odstraňování kontaminací je, že každý takový krok vede ke ztrátám a může zkreslit získané výsledky. Nejvhodnějším přístupem by mělo být podle charakteru půdy navržení vhodných preprocesních kroků podle charakteru půdy, které by vyloučily nutnost čištění. Jak dokázali Braid a kol., je nezbytně nutné používat různé přístupy pro různé typy půdy⁸³.

Jednou v současnosti nejčastěji používanou metodou, využitou v této práci, je **snížení kontaminace zředěním** (až 1000 násobné zředění izolované DNA)⁸⁴. Nutnost ředění je vyjadřována jako hodnota tzv. PCR inhibiční prahu (PIT, z angl. „PCR Inhibition Threshold“), která vyjadřuje, jaký maximální podíl z PCR reakční směsi může tvořit vzorek DNA (%), aby reakce proběhla.

Gradientová ultracentrifugace je založena na různé rychlosti migrace jednotlivých látek v gradientu chloridu cesného. Tato technika je velmi efektivní pro odstranění

kontaminace včetně huminových kyselin^{18,85}. Metoda bohužel nedovoluje zpracování velkého množství vzorků a je instrumentálně i časově náročná (48h, 150 000 g¹⁷). Zároveň při neopatrném zpracování a manipulaci může dojít k opětovné kontaminaci vzorků a k velké ztrátě izolované DNA²⁴.

Chromatografické metody jsou nejčastějším způsobem odstranění nečistot půdní metagenomické DNA. U **gelové permeační chromatografie** je používáno velké množství nejrůznějších náplní kolon (nosičů) jako například Sephadex^{86,41}, Sepharosa⁶³, Sephacryl²⁸, Bio-Gel²⁵, Toyopearl⁸⁷ a jiné. Zároveň je popisováno obtížné či dokonce nemožné odstranění určitých kontaminant s výrazným absorpčním maximem při 230 nm⁸⁴. **Iontoměničová chromatografie** je využívána také, avšak značnou nevýhodou těchto metod byly až 30% ztráty DNA⁵⁹. Zároveň někteří autoři popisovali poměrně nízkou efektivitu, kdy bylo nutno opakovat tento purifikační krok¹⁷. Současná kvalita iontoměničů se neustále zvyšuje a protokoly je již popisují jako jednu z ideálních metod pro čištění DNA za použití nejrůznějších typů iontově výměnných pryskyřic^{88,59,89} s následným minimem eluovaných huminových kyselin⁹⁰. **Adsorpční chromatografie** využívající interakce s polárním sorbentem se také používá pro odstranění kontaminace. Hydroxyapatit může na svém povrchu vázat DNA a ta může být zbavena například proteinů. Ztráty však mohou dosahovat až 90%²⁴. Dalším používaným sorbentem je silikagel⁹¹, který může být zabudován v purifikačním čipu⁹¹. Jiným možným adsorbentem může být prachově aktivní uhlí PAC (z angl. „powdered activated charcoal“)⁹³.

Elektromigrační metody

Při standardní elektroforéze migrují huminové kyseliny společně s nukleovými kyselinami. Příklad polyvinylpyrrolidonu (PVPP) do agarosového gelu výrazně snižuje společnou migraci DNA a huminových kyselin a je možné tímto přístupem velmi dobře purifikovat DNA, bohužel za cenu snížení výtěžků⁹⁴. Proto se používá agarosa s nízkým bodem tání⁶⁰. Tato je přímo použitelná pro PCR⁵⁰ s dobrými výsledky, pokud koncentrace agarosy nepřekročí hodnotu 0,3% v PCR směsi⁹⁵. Pulzní gelová elektroforéza (PFGE) je také vhodnou metodou pro purifikaci DNA. Elektroeluce je alternativní metodou pro purifikaci půdní metagenomické DNA ke klasické elektroforéze, pokud je nutné se vyhnout barvení⁹⁶.

Membránové metody

Dialyzační metody se k purifikaci půdní metagenomické DNA využívají poměrně vzácně⁹⁷. Častěji jsou tyto metody používány pro purifikaci DNA extraktů z jiných zdrojů např. z kostí⁸², nebo jiných tkání, jejichž kontaminace se zásadně liší od kontaminací získaných izolací z půdy. Většina možných dialyzačních procedur byla nahrazena ultrafiltrací a komerčně dostupnými minikolonkami s membránou⁵³.

2.4.6 Aplikace izolované DNA

Potenciálních využití knihoven metagenomické DNA je nepřehledné množství. Od studií cílených na vyhledání specifických enzymů, přes práce zaměřené na nové biosyntetické reakce a biosyntetické dráhy umožňující likvidaci nebo utilizaci toxických látek, xenobiotik atd. Na druhém konci spektra jsou stratifikační analýzy mikrobiálních populací, analýzy populační dynamiky anebo kompletnosti celých genomů nekultivovatelných mikroorganismů⁹.

Vzhledem k zaměření této práce se kapitola o aplikacích metagenomické DNA omezí pouze na metody, které jsou používány při studiu bakteriální diverzity a mikrobiálních populací v půdě, se zřetelem na metody fylogenetické analýzy a metody RFLP.

2.4.6.1 Analýza délkového polymorfismu restrikčních fragmentů

Zjišťování délkového polymorfismu restrikčních fragmentů byla první metodou, zavedenou pro srovnávací studie genů. Je založena na potenciálních rozdílech v přítomnosti míst pro restrikční štěpení. Většinou je využíváno současně hned několik rozdílných restrikčních enzymů. Používaná kombinace těchto enzymů je například *EcoRI* a *PstI*⁴³, nebo jsou využívány enzymy s vyšší četností restrikce jako je *Sau3A*. Po štěpení jsou jednotlivé fragmenty rozděleny pomocí agarosové elektroforézy a je vyhodnocována jejich distribuce.

RFLP analýza umožnila jednoduché posouzení složení izolované DNA a byla důkazem, že se získaná spektra mikroorganismů liší⁴³. RFLP se v případě studia diverzity používá jako prvotní krok pro nalezení rozdílu v konkrétních sekvencích DNA, která může upozornit na různé skupiny mikroorganismů.

Technika RFLP byla v dnešní době modifikována na velké množství metod, využívající restričního štěpení jako jsou ARDRA (z angl. „Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis“) a T-RFLP (z angl. „Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism“). Tyto umožňují blíže strukturovat mikrobiální komunity nebo detekovat velikost⁹⁹ a množství daného restričního fragmentu¹⁰⁰.

2.4.6.2 Sekvenování DNA, sekvenční analýza

Sekvenční analýza je nejspolehlivějším a nejpřesnějším nástrojem pro studium bakteriálních taxonů ze získané DNA. Samotné sekvenování může být zaměřeno na nejrozličnější oblasti genomu i na genomy celé. Pro fylogenetické účely (viz níže) se omezujeme na studium konkrétního genu nebo oblasti nesoucí 16S rDNA.

Současné metody a dostupnost sekvenování umožňují analyzovat obrovské množství vzorků a dělat velmi podrobné rozbory mikrobiálních taxonů a jejich vzájemných interakcí¹⁰¹. Na druhou stranu v takto rozsáhlém souboru je celková analýza náročná záležitost. Z tohoto důvodu je většinou sekvenční analýza zaměřena až na vzorky, které jsou determinovány za použití jiných metod například již zmíněného RFLP.

2.4.6.3 Fylogenetická analýza

Fylogenetická analýza následuje po analýze diverzity mikroorganismů v půdě a dává informaci o evolučních vztazích. Vychází z dat získaných sekvenováním a určuje jejich sekvenční příbuznost.

Pro účely fylogenetických studií mikroorganismů se používají nejrozličnější specifické geny. Jejich podobnosti mohou velmi přesně determinovat fylogenezi určité skupiny

mikroorganismů, pro které je daný gen charakteristický. Pro celkovou fylogenetickou analýzu se nejčastěji užívají geny kódující 16S rRNA, která je specifická pro eubakterie a archebakterie. Ačkoli je podobnost 16S rRNA pro eubakterie a archebakterie téměř absolutní v sekundární struktuře, v primární struktuře se ovšem značně liší. Pro eukaryota slouží ke stejnému fylogenetickému účelu 18S rDNA¹⁰². Metoda fylogenetické analýzy na základě studia genů pro malou ribosomální podjednotku byla vyvinuta C. Woese v 70. letech³, tedy ještě před rozvojem metagenomických technik a je v určitých obměnách používána dodnes⁵⁴.

Výsledkem fylogenetické analýzy je „genealogický strom“ nazývaný také dendrogram. Tento graf pracuje s operační taxonomickou jednotkou (OTU z angl. „Operational Taxonomic Unit“), která představuje zpravidla biologické druhy či jinak taxonomicky specifikované populace organismů. Tyto propojuje pomocí větví a uzlů do možných vývojových vztahů tak, že každý uzel reprezentuje hypotetického společného předka. Evoluční vzdálenost uzlů odráží délka větví a můžeme si ji představit jako možný počet mutací mezi dvěma uzly grafu. Délka větví může odrážet čas uplynulý od oddělení taxonu.

2.4.6.4 Ostatní techniky studia diverzity

Příkladem další metody ke studiu mikrobiální diverzity jsou: analýza pomocí denaturační gradientové elektroforézy (DGGE, z angl. „Denaturing Gradient Gel Electrophoresis“), analýza pomocí reasociační kinetiky, značení stabilními isotopy (SIP, z angl. „Stable isotope probing“), použití genových čipů (microarrays) nebo využití RNA ke studiu aktivní diverzity.

DGGE analýza PCR ampliconů nesoucích 16S rDNA je založena na zpomalování migrace DNA v polyakrylamidovém gelu poté, co DNA začne denaturovat („tát“) vlivem gradientu denaturačního činidla (močoviny nebo formamidu). Denaturačním činidlem může být také gradient teploty, pak mluvíme o teplotně gradientové elektroforéze (TGGE)¹⁰³. Techniky jsou ideální ke studiu dynamiky zastoupených populací¹⁰⁴, konkrétních taxonů¹⁰⁵ a jejich kvantifikace¹⁰⁶. Analýza pomocí reasociační kinetiky nám dává informaci o zastoupení G+C párů¹⁰⁷ a jedinečných a opakovaných sekvencí struktury DNA bez sekvenování³⁰. Metoda značení stabilními isotopy (SIP) je využívána hlavně ke zjišťování dynamiky

populací, aktivity a hlavně biodegradabilních schopností ¹⁰⁸, v kombinaci s jinými metodami (microarrays) při fylogenetických studiích ¹⁰⁹. Metoda je založena na metabolizování isotopicky značeného substrátu ¹¹⁰ a následnou separaci metabolitů ¹¹¹. Technologie microarrays neboli použití genových DNA čipů umožňuje rychle sledovat hledané geny nebo jejich fragmenty ¹¹², dynamiku populací ¹¹³, aktivní diverzitu ¹¹⁴ a výskyt specifických mikroorganismů. Nevýhodou je řádově nižší citlivost než použití PCR ¹¹⁵, což limituje využití metody pro půdní metagenomickou DNA. Využití izolátu RNA nám umožňuje nahlédnout do aktivity jednotlivých taxonů ve vzorku tedy studium funkční ¹¹⁶. Komplikací je nutnost spolehlivě izolovat a rozdělit DNA a RNA bez zkreslujících vlivů, které by negativně ovlivnily získaný poměr nukleových kyselin ⁸⁸.

3 Cíl práce

Cílem této práce je izolace půdní metagenomické DNA z hlubokého horizontu skrývky (zasahující až do hloubky 4,5 m) pomocí nepřímé metody, zvolené tak aby byla dosažena co nejvyšší diverzita mikroorganismů s důrazem na prokaryontní typy buněk.

Získanou DNA charakterizovat z hlediska kvantitativního i kvalitativního, zhodnotit použití zvolené metodiky pro dané vzorky a vybrat nejlepší izoláty pro druhou část práce. Zároveň posoudit vliv kvality půdy na celkovou izolační proceduru a její efektivitu v kontextu měnících se podmínek půdního horizontu a rozhodnout, zda se nejedná o rozhodující faktor ovlivňující množství izolované DNA.

Druhou částí této práce je provést amplifikaci 16S rDNA pomocí PCR techniky u vybraných vzorků a klonovat amplifikované fragmenty DNA do plasmidu. Provést částečnou RFLP analýzu a pomocí ní zvolit vzorky na sekvenování DNA. Získaná sekvenční data vyhodnotit a provést fylogenetickou analýzu s ohledem na příbuznost mikroorganismů v konkrétním vzorku a půdním horizontu.

4 Metodická část

4.1 Materiál

4.1.1 Biologické materiály (vzorky půdy)

Vzorky půdy byly odebírány sterilním náčiním z hloubky cca 30 cm v horizontálním směru od hrany skrývky v odkrytém půdním horizontu od povrchu až do hloubky 4,5m ve vertikálním směru. Svrchní vrstva, která byla v kontaktu s okolním prostředím, byla jiným nástrojem odstraněna. Odebrané vzorky byly zmrazeny nejprve na -20°C, při této teplotě byly transportovány do laboratoře a definitivně byly uskladněny při -70°C. Odebírány byly na sobě nezávislé 2 půdní horizonty. Horizont použitý v této práci obsahuje 11 vzorků (povrch – 0 m až 4,5 m).

4.1.2 Chemické materiály

4.1.2.1 Chemikálie

Acetonitril (AcN), pro HPLC, Lach:ner, ČR
Agarosa, LE Agarose (SeaKem, Lonza USA)
5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid (X-gal)
Deoxyribonukleotid trifosfáty (dNTP)
Dodecylsulfát sodný (SDS), 99% Serva
Ethanol (EtOH)
Hexadecyltrimethylammonium bromid (CTAB), 96,0% Fluka
isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid (IPTG)
Kyselina ethylendiamintetra octrová (EDTA), p.a. Fluka
Kyselina octová, ledová, p.a. LACH:NER s.r.o.
Octan sodný (NaAc)
3-(N-morpholino)propansulfonová kyselina (MOPS), Serva a.
Pyrofosforečnan sodný (NaPy), p.a. Lachema
Tris-hydroxymethylmethan (Tris), p.a. Lachema
Triethylamin (TEA), p.a. Fluka

4.1.2.2 Pufry

Pufry pro izolaci DNA:

Promývací pufr: 100 mM Tris-HCl, 100mM EDTA, 0,1 % SDS, 1% CTAB, pH 8,0
Chrombachův pufr: 0,33 M Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8,0
Pufr na lyzu buněk: 100 mM Tris-HCl, 100 mM EDTA, 1,5M NaCl, 1% CTAB, pH 8,0
+ (v/v) 1,6% lysozymu, 0,2% proteinasy K, 0,5% ribonukleasy A

Pufry pro IP-RP-HPLC:

Pufr A: 0,1 M triethylaminacetát (TEAA), pH 7,0
Pufr B: 0,1 M TEAA, 25% AcN, pH 6,4

Pufry, roztoky pro minipreparace:

P1 (QIAGEN) + 1,5% lysozym: 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 100µg/ml ribonukleasa A, 1,5% lysozym, pH 8,0

P2 (QIAGEN): 200 mM NaOH

P3 (QIAGEN): 3,0 M KAc, pH 5,5

Ostatní:

Tris-HCl pufr: 10 mM Tris-HCl, pH 8,5

TBE pufr: 45 mM H₃BO₃, 45 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8,0

TE pufr: 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 8,5

Acetát-MOPS pufr: 100 mM NaAc, 50 mM MOPS, pH 8,0

4.1.2.3 Enzymy

Ligasa: T4 DNA ligase, 5 U/µl (Fermentas, USA)

Lysozym: 50 mg/ml, v roztoku Glu-CDTA-Tris, 100 000 U/mg (Serva, D)

Nukleasa: DNasa I, ENO525, 1 U/ µl (Fermentas, USA)

Polymerasa: Herculase Hot Start DNA polymerase, 5 U/ µl (Stratagene, USA)

Taq polymerase, 5 U/ µl (QIAGEN)

Proteinasa: Proteinase K, 2ml > 600 mAU/ml (QIAGEN)

Restrikční enzymy: *Eco*RI, *Pst*I, 20 U/ µl (Roche, USA)

Ribonukleasa A: 10 µg/ml (Sigma-Aldrich)

Standardy velikosti fragmentů DNA: λ_{DNA} (Fermentas, USA), p AM 33 (3,7 kb), p KAGE 14 (4,2 kb), 0,300 mg/ml

4.1.2.4 Primery

Byly použity univerzální primery navržené k amplifikaci lokusu 16S rRNA na DNA (16S rDNA)

Fwd_27 (délka 20 b) sekvence: AGAGTTTGATCMTGGCTCAG (Metabion, D)

Rev_1492 (délka 22b) sekvence: TACGGYTACCTTGTTACGACTT (Metabion, D)

Zásobní roztoky primerů byly o koncentraci 100 μM v TE pufru, koncentrace použitá pro PCR reakce byla 10 μM (ředěno Tris-HCl puftrem)

4.1.2.5 Ostatní

Ultrafiltr, Millipore, PYREX, USA

Kolona pro HPLC, Luna 5u Phenyl-Hexyl 250x4,60mm 5 micron (Phenomenex, USA)

Plasmidový vektor, **pGEM[®]-T** Easy Vector System I, 3,018 kbp, Amp^R (Promega, USA)

Escherichia coli TOP10: F⁻, mcrA, Δ (mrr-hsdRMS-mcr-BC), ϕ 80 lacZ Δ M 1,5 deoR

Kultivační medium LB ¹¹⁷ + Amp: Trypton 1%, Kvasinkový extrak 0,5%, NaCl 1%, agar 1,5% + ampicilin 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$

4.1.3 Přístrojové vybavení

Analytická HPLC sestava: Shimadzu UFLC, degasser DGU-20A₅, liquid chromatograph LC-20AD, auto sampler SIL-20A HT, Column oven CTO-10AS VP, UV/VIS detector SPD-20A (Shimadzu, Japonsko)

Analytické váhy, Mettler AE 200 (Mettler, Švýcarsko)

Automatické pipety (Gilson, Francie)

Centrifugy: Eppendorf Centrifuge 5403, Eppendorf mini Spin (Eppendorf, Německo)

Elektroforetická sestava, EC 570-90 (Jordan Scientific, USA)

HPLC sestava: Dionex, P580 pump, ASI-100 Automated Sample Injector, PDA-100 Photodiode Array Detector (Dionex, USA)

Iluminátor: Gel logic 200, Imaging systém (KODAK, UK)

Laboratorní míchačka, MS1 Minishaker, IKA

Laboratorní plotýnkový vaříč, MM 2a (Laboratorní přístroje Praha, ČR)

Laboratorní třepačka, Vortex

Magnetická míchačka (Laboratorní přístroje Praha, ČR)

pH metr, inoLab (WTW, ČR)

Předvážkové váhy, Mettler PJ 600 (Mettler, Švýcarsko)

Spektrofotometry: Shimadzu UV-1601 (Shimadzu, Japonsko), SAFIRE² (Schoeller instruments, Německo)

Soustava na amplifikaci DNA – PCR reakce: Gradient cycler, PTC-200 (MJ Research, USA)

Třepačka - kultivační, Orbital Incubator (Gallenkamp, UK)

Termostat, Biological Thermostat BT 120 (Laboratorní přístroje Praha, ČR)

Termostatovaný blok, 17600 Dri-Bath (Thermolyne, USA)

4.2 Metody

4.2.1 Izolace metagenomické DNA

Pro izolační proceduru byla zvolena metoda nepřímá dle Ester M. Gabor a kol.²⁷. U této metody byla pomocí DGGE dokázána vysoká diverzita mikroorganismů s důrazem na prokaryontní typy buněk.

Vzorky hluboce zamražené na -70°C byly ponechány 30 minut při laboratorní teplotě. Z každého vzorku bylo sterilní laboratorní lžičkou odebráno a odváženo 50 g. Takto připravený vzorek byl přenesen do mixéru (sterilizován ajatinem + omyt sterilní destilovanou vodou) a rozmíchán ve 100 ml promývacího pufru. Vzorek byl třikrát jednu minutu mixován s 1 minutovou přestávkou. Po centrifugaci (Eppendorf Centrifuge 5403, 500 g, 10 min, 10 °C) byla pomocí sterilní skleněné tyčinky proražena vrchní vrstva lehkých částic a supernatant byl převeden do sterilní baňky. Zbýlý obsah centrifugační kvety byl resuspendován ve 100 ml promývacího pufru a celá procedura byla zopakována ještě dvakrát. Takto bylo získáno cca 300 ml supernatantu, který byl filtrován přes sterilní gázu od hrubých nečistot.

Spojené supernatanty byly centrifugovány (11 000g, 30 min, 4°C). Supernatant byl odstraněn a sediment byl resuspendován ve 150 ml 0,1% pyrofosfátu sodného a opět centrifugován za stejných podmínek. Tato promývací procedura byla zopakována ještě jednou za použití 100 ml Chrombachova pufru. Získaný sediment byl resuspendován v 10 ml pufru na lýzu buněk a 30 min. inkubován při 37°C. Po této době byl roztok s přídavkem 1 ml 20 % SDS dále inkubován po dobu 2 hodin při 65°C na laboratorní třepačce (200

rpm). Dalším krokem byla extrakce s 10 ml chloroformu, následně byla vodná fáze smíšena s 6 ml isopropanolu a inkubována cca 12 hod při 4°C. Po inkubaci byl roztok centrifugován (13 500g, 30 min, 4°C), precipitát resuspendován v 1 ml 70% EtOH a opět centrifugován (13 500g, 4 min, 4°C). V posledním kroku byl získaný pelet resuspendován v 100 µl TE pufru a uskladněn zmražením při -20°C.

4.2.2 Kvantitativní a kvalitativní analýza DNA

Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA při vlnové délce 260 nm

Metoda spektrofotometrie v UV oblasti byla zvolena jako metoda předběžně určující obsah DNA ve vzorcích. Výstupy ze spektrofotometrické analýzy byly použity pro odhad koncentrací, pro další stanovení.

Zmražené vzorky izolované DNA byly rozmrazeny a centrifugovány (60s, 13 400 rpm, mini spin). U každého 10 krát ředěného vzorku bylo získáno UV- VIS spektrum pomocí spektrofotometru Shimadzu UV – 1601 ve spektru 230 – 500 nm (střední citlivost) a ve spektru 250 – 290 nm (vysoká citlivost).

Kalibrační křivka byla sestrojena ze standardu velikostí fragmetů DNA λ_{DNA} (Fermentas), která má stanovenou koncentraci dle výrobce 0,300 mg/ml. Kalibrace se sestávala z roztoků vzniklých ředěním standardu o koncentraci: 100, 75, 50, 40, 30, 20, 10, 5 ng.µl⁻¹.

Fluorimetrické stanovení koncentrace DNA

Fluorimetrie byla zvolena kvůli vysoké specifitě fluorescenčních barev pro DNA a tedy minimálnímu zkreslení výsledků interferencí. Tato metoda má také vyšší citlivost a je tedy možné stanovovat DNA při menší spotřebě vzorku přesněji.

Fluorimetrie byla použita na kvantitativní stanovení DNA, přesnější než klasickou UV spektrofotometrií. Použit byl standardní protokol SYBR Green I nucleic acid gel stain, Invitrogen 2006, MP 07567. Proměřovaný roztok byl vytvořen 10 000 krát zředěnou SYBR Green I společně s 1% (v/v), 1,5% a nebo 3% vzorkem pipetovanou do 96-ti jamkové černé destičky (96-well black plate, Greiner). Excitační vlnová délka 485 nm, emisní vlnová délka 535 nm.

Kalibrační křivka byla sestrojena pomocí standardu λ_{DNA} (Fermentas) postupem stejným jako vzorky v těchto koncentracích 10 ; 5; 2,5; 2,3; 1,5; 1,25; 0,75; 0,625; 0,3125; 0,156; 0,078; 0,026; 0,008; 0,004; 0,002 ng. μl^{-1} .

Iontově párová vysokoúčinná kapalinová chromatografie s reverzní fází

Tato chromatografie (IP-RP-HPLC) byla použita k přesné kvantifikaci DNA a k hrubé kvantifikaci nečistot. Pro toto stanovení byla použita metodika popsaná Karlem H. Heckerem a kol. 2000¹¹⁸ optimalizovaná pro kolonku fenyl-hexyl. Metoda byla upravována na použití gradientu pufru A a B. Pufr B byl použit při hledání optimálního složení, dále byl nahrazen přímým směřováním AcN v HPLC.

Optimalizované podmínky chromatografie:

Gradient: t=0 min, 5% AcN, dále lineární nárůst jeho koncentrace až do t=10 min, 50% AcN, do t=13 min 50% AcN, poté 13-17 min 5% AcN.

Teplota na kolonce 62 °C, teplota detektoru 45°C

Průtok 1,3 ml/min, tlak 80 – 90 bar (max. 95)

Detekce spektrofotometricky při 260, 280 nm a 320 nm

Kalibrační křivka λ_{DNA} (Fermentas): 5; 2,5; 1,5; 0,75; 0,3125; 0,156; 0,078; 0,046; 0,023; 0,0125 ng. μl^{-1} připravena jako vzorky.

Příprava vzorků pro chromatografickou analýzu DNA (IP-RP-HPLC):

Bylo odpipetováno požadované množství vzorku (10, 5, 2 nebo 1 μl vzorku). Toto množství bylo zředěno v poměru 1:8 v Tris-HCl pufru (pH 7,5; 25°C) a jako další 1 díl směsi byl přidán reakční pufr (10X, 25mM MgCl_2). Jako poslední byla přidána nukleasa DNase I a to 1 μl (1U) na 1 μg DNA. Vzorky byly promíchány a inkubovány 2 hodiny při 37°C. Po inkubaci byly vzorky naředěny Tris-HCl puforem (pH 7,5) na objem 200 μl a byla provedena chloroformová extrakce (200 μl chloroformu).

PCR analýza, elektroforetická analýza

Metoda PCR byla zvolena pro amplifikaci lokusů 16S rDNA. Následně byla provedena kontrola reakce pomocí agarosové elektroforesy. Analýza potenciální využitelnosti DNA a obsahu kontaminací byl zjišťován postupným zředěním vzorků použitých pro PCR reakce⁸⁴. Do reakcí bylo používáno vždy 0,5 μl vzorku DNA a to neředěného, a dále se

zředěním 10, 100 a 1000 krát. Amplifikace byla provedena na cycleru PTC-200. PCR směs obsahovala vzorek; pufr Hot start 2,5 µl; dNTP 0,5 µl; Hot start Herculasa 0,2 µl; primery Fwd_27 0,5 µl a Rev_1492 0,5 µl, DMSO 1 µl. Příprava byla provedena jako celková směs. PCR program byl zvolen na start 2 min 95°C; 35 cyklů: 95°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 105s; konec 10 min 72°C.

Hodnota PCP inhibition treshold (PIT) byla vypočítána z maximálního objemu koncentrované DNA v celkové PCR směsi (koncentrace), kdy přítomnost PCR produktů byla zřetelně prokázána přítomností pruhu hledané délky (1kbp) na agarosové elektroforéze.

Agarosová elektroforéza

Elektroforéza byla použita k vizualizaci samotných vzorků, PCR produktů a ke kontrolám provedení jednotlivých operací jako např. ligace. Metoda byla zvolena kvůli její rychlosti a minimální pracnosti.

Agarosové gely (9x7,5cm - 30 ml, či 9x10 cm - 40 ml) byly připraveny použitím 1-1,5% agarosy v 0,5 x TBE pufru, zahřáním k varu. Při chladnutí byly do gelu přidány 0,5% EtBr.

Vzorky pro elektroforézu byly připraveny jako směs 1 µl vzorku, 8 µl sterilní vody a 1 µl nanášecího roztoku (EtBr 0,05 µg/ml, dH₂O). Jako standard velikosti fragmentů DNA byly používány: λ_{DNA}, pAM 33, p KAGE 14. Elektroforéza byla prováděna na sestavě EC 570-90 a gely byly vyhodnocovány na systému Gel logic 200 s přidruženým softwarem Kodak MI.

4.2.3 Mikroskopie, stanovení počtu mikroorganismů

Pro počítání mikroorganismů v půdě byla zvolena klasická metoda přímého počítání buněk nenáročná na přístrojové vybavení. Přesnost zvoleného postupu je pouze řádová, ale požadavkům této práce postačuje.

Do sterilních uzavíratelných zkumavek (Grainer, 25 ml) bylo sterilní kopistkou přeneseno cca 20 g půdy zbavené hrubých nečistot, tak aby byl vzorek půdy reprezentativní. Z každého vzorku bylo odebráno cca 100 µg půdy a bylo rozpuštěno v 1 ml sterilní H₂O. Roztok byl velmi silně 3 minuty třepán (Vortex). Zředěné vzorky (100 krát a 10 000 krát) byly počítány použitím podložního skla Bürker 0,100 mm 0,0025 mm². Za použití

mikroskopu (viz 4.1.3) s objektivem Olympus PlanCN 40x/0,65 Ph2 /0,17/FN 22, 400 násobné celkové zvětšení preparátu. Preparát byl mikroskopován s použitím fázového kontrastu. Přímé stanovení bakterií bylo provedeno imerzním objektivem Olympus PlanCN 100x Ol.im s celkovým zvětšením 1000 krát.

4.2.4 Klonování DNA v E.coli

Metoda klonování byla použita na vytvoření DNA knihovny umožňující výběr konkrétních fragmentů a jejich amplifikaci. Tyto byly následně izolovány z bakteriální kolonie jako plasmidy.

PCR amplifikované lokusy 16S rDNA byly purifikovány pomocí High Pure PCR Produkt Purification Kit (Roche) s výsledným objemem 35 μ l. Pomocí cycleru (PTC-200, 72°C) byly na 3' konce přidány adeniny (*Taq* polymerasa 2%, 9% destilované vody, 70% DNA, 8% 25 mM MgCl₂, 1% dNTP, 10% Taq++ buffer 10X, 30 min). Získaný produkt byl ligován do vektoru pGEM-T easy T4 ligasou (0,3 μ l vektoru, 4,7 μ l vzorku, 1 μ l T4 lig.pufuru, 4 μ l destilované vody, 1 μ l T4 ligasy). Směs byla inkubována 2 hod v 37°C. Po ligaci byla směs využita k transformaci kompetentních buněk.

Transformace teplotním šokem

Teplotní šok je jednoduchá a spolehlivá metoda k transformaci kompetentních bakterií plasmidem s vneseným lokusem 16S rDNA.

Ihned po vyjmutí buněk z -70°C bylo přidáno 10 μ l ligované směsi. Na půl hodiny byla zkumavka s bakteriálním kmenem *E.coli* TOP 10 umístěna do ledové lázně. Po 90 vteřinové inkubaci ve vyhřívaném bločku (17600 Dri-Bath) při teplotě 40,5 – 42,5 °C byla mikrozukavka umístěna zpět na led na 90 vteřin. Po této době byl přidán do mikrozukavky čtyřnásobek objemu LB media a zkumavka byla poté inkubována 1 hodinu v laboratorní třepačce (37°C, Orbital incubator, 200 rpm).

Příprava půd, kultivace

Kultivační půda byla zvolena tak, aby bylo možné selektovat úspěšně transformované klony a snadno je přeočkovat tak, pro získání čistých kolonií.

Na každou kultivační půdu bylo použito 200 ml LB media s 0,2% X-gal, 125 µg/ml ampicilinu, 0,02 % vzorku a 0,5 mM IPTG. Na připravenou ztuhlou půdu bylo rozetřeno 160 µl očkovacího media s transformovanými bakteriemi. Zaočkované půdy byly kultivovány cca 16 hod, 37°C. Jednotlivé narostlé bílé kolonie byly opatrně přeočkovány do zkumavky s 2 ml LB+amp media. Zkumavky byly inkubovány v laboratorní třepačce přes noc (37°C, Orbital Incubator, 200 rpm).

Mini preparace plasmidu

Izolace plasmidu z buněk byla provedena dle upraveného protokolu Birnboima ¹¹⁹. Obsahy zkumavek z kultivace byly přeneseny do 2 ml zkumavky Eppendorf a centrifugovány (11 000 rpm, 1 min, mini Spin). Supernatanty byly odsány vývěvou. Pelety byly důkladně rozpuštěny v 200 µl P1 pufru a třepány (vortex, 1400 rpm). Poté byly mikrozkušavky umístěny na 15 min do 37°C a následně na 5 min 0°C. Dále bylo přidáno 400 µl pufru P2 a vzorky byly několika otočeními dnem vzhůru jemně promíchány. Po tomto promíchání bylo přidáno 300 µl pufru P3, vzorky byly opět jemně promíchány a umístěny na 15 min do 0°C. Následně byly vzorky centrifugovány (15 000 rpm, 2 min, 5°C, mini Spin), automatickou pipetou bylo odebráno dvakrát 600 µl do dalších mikrozkušavek a bylo přidáno 1500 µl ledového EtOH. Vzorky byly umístěny na 15 min do -20°C. Po vyjmutí z lednice byly vzorky centrifugovány (15 000 rpm, 3 min, 5 °C, mini Spin), vývěvou byl odebrán supernatant a následně bylo přidáno 100 µl acetát-MOPS, v kterém byl rozpuštěn pelet. Po rozpuštění bylo přidáno 200 µl ledového EtOH a zkumavky byly opět umístěny do -20°C. Po 15 minutách byly vzorky centrifugovány (15 000 rpm, 2 min, 5°C, mini Spin), vývěvou byl odstraněn supernatant a zbylý sediment byl rozpuštěn v 50 µl Tris-HCl pufru.

4.2.5 RFLP analýza, sekvenování, fylogenetická analýza DNA

Polymorfismu fragmentů po restrikcím štěpení bylo využito k výběru jednoznačně rozdílných vzorků, které byly sekvenovány za účelem zjištění nukleotidové sekvence vloženého fragmentu v izolovaném plasmidu. Ze získané sekvence bylo možné dále vzorek taxonomicky určit a zpracovat fylogenetickou analýzu.

Částečná RFLP analýza byla provedena agarosovou elektroforézou popsanou v kapitole 4.2.2. Vzorky byly připraveny restrikcí pomocí *EcoR1* (na vektoru jsou 2 místa): 7 μ l dH₂O, 1 μ l pufr 10x, 1,5 μ l DNA, 1 μ l *EcoR1*. Vzorky byly umístěny k inkubaci do laboratorního termostatu (37°C, 1,5 hod, BT 120).

Sekvenování

Sekvenování vybraných purifikovaných plasmidů bylo komerčně objednáno (Centrum Sekvenování, MBÚ AV ČR). Procedura byla prováděna na systému BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied biosystems) a vyhodnocena analyzátozem ABI PRISM 3130x1.

Fylogenetická analýza

Ze získaných sekvencí byla provedena fylogenetická analýza pomocí komplexního počítačového softwaru DNASTAR (Laser gene), který obsahuje všechny níže zmíněné programy. V programu EditSeq byly odstraněny sekvenované části vektoru. Takto upravené sekvence byly zpracovány programem MegAlign, mnohočetně přiřazeny algoritmem Clustal Method a zpracovány do fylogenetického stromu. Jednotlivé taxony bakterií byly vyhledány v databázi MedLine pomocí nástroje Nukleotide blast, který je součástí databáze (nastavení: procedura megablast – highly similar seq., align 1, max target seq 100, automatické přizp. pro krátké sekvence, expect treshold 10, Match/Mismatch Scores 1,-2; Gap Costs linear; datum vyhledávání 25.5. 2011).

5 Výsledky

5.1 Odběr vzorků

Dne 12. 9. 2010 byly odebrány vzorky na skrývce svahu provedené těžkou technikou přibližně týden před odběrem vzorků, na pravé straně železničního tunelu Osek, směr Hořovice, 150 m od Stroupínského potoka (obrázkyv příloze, str. 61-62). Původní ekosystém byl suchý slunný bor vzniklý cílenou lesnickou výsadbou. Sledovaný úsek lesa byl s minimem podrostu.

GPS souřadnice: 49°49'39.194"N, 13°51'4.637"E

Popis vzorků:

Vzorek 0 m: Povrchový vzorek je typickou půdou slunných borů bez podrostu. Jedná se o světlehnědou půdu horizontu A (svrchní horizont) s větším množstvím jemných minerálních částic a ochuzenou o humusový podíl, který zde reprezentuje malý podíl šedých huminových kyselin.

Vzorek 0,25 m: Vzorek odebraný 25 cm pod povrchem je charakteristický půdou z horizontu A₁ (humusový mydát), obsahuje jemné minerální částice s menším podílem humusových částic

Vzorek 0,5 m: Tento vzorek byl odebrán z okraje slabě vytvořeného eluviálního horizontu A₂, což prozrazuje světlé zbarvení této půdy s výrazným podílem jílovitých částic a výrazným ochuzením o humusový podíl. Horizont A_E není tímto vzorkem přímo zastoupen.

Vzorek 1,0 m a 1,5 m: Vzorky charakteristické pro horizont B₁ (iluviální, obohacený), obohacený vymýváním vyšších vrstev což prozrazuje tmavé okrové zbarvení a obsah humusových látek.

Vzorek 2 m a 2,5 m: Tyto vzorky byly odebrány z širokého horizontu B₂ jsou charakteristicky hnědavě až černě zbarvené sloučeninami železa.

Vzorek 3,0 m: Vzorek je prvním vzorkem horizontu B₃, jedná se o světlý pískový substrát s velkým podílem jílu a písku.

Vzorek 3,5 m: Jílovitý substrát silně zbarvený do okrové barvy sloučeninami železa.

Vzorek 4,0 m: Tvořený šedým jílem s drtí matečné horniny.

Vzorek 4,5 m: Tento vzorek je součástí horizontu C a je tvořen uhelným substrátem.

Z šířky jednotlivých půdních horizontů je zřejmé, že před vznikem skrývky byla na místě terénní nerovnost, která způsobila jejich značné rozšíření.

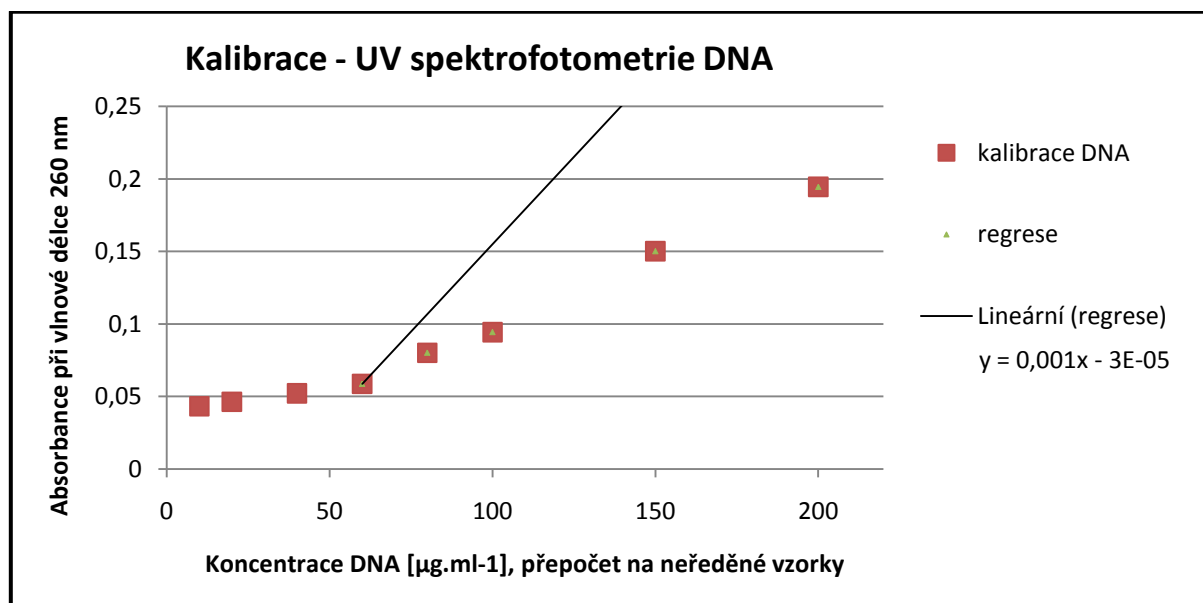
Jako přílohy k této práci jsou přidány snímky lokality a skrývky viz kapitola 9, str. 61, 62

5.2 Izolace, kvantitativní a kvalitativní analýza DNA

Prvním krokem byla izolace DNA popsanou metodou (4.2.1, str. 30). Pro naplnění cíle práce bylo dále nutné DNA co nejpřesněji analyzovat a to jak z hlediska kvantitativního, tak z hlediska kvalitativního. Jako první byla získaná metagenomická DNA podrobena UV spektrofotometrické charakterizaci.

Vynesením bodů kalibrační křivky pro spektrofotometrické stanovení (4.2.2, str. 31) byla definována oblast lineárního průběhu absorbance. Vzhledem k citlivosti použitého spektrofotometru a nízké koncentraci získané DNA však bylo možné spolehlivě stanovit absorbanci DNA při 260 nm pouze u vzorků z povrchu ($A=0,1669$), 0,25 m ($A=0,1863$), 0,5 m ($A=0,0601$) a 1,5 m ($A=0,0914$). Výsledky kalibrační křivky jsou shrnuty do grafu č. 1:

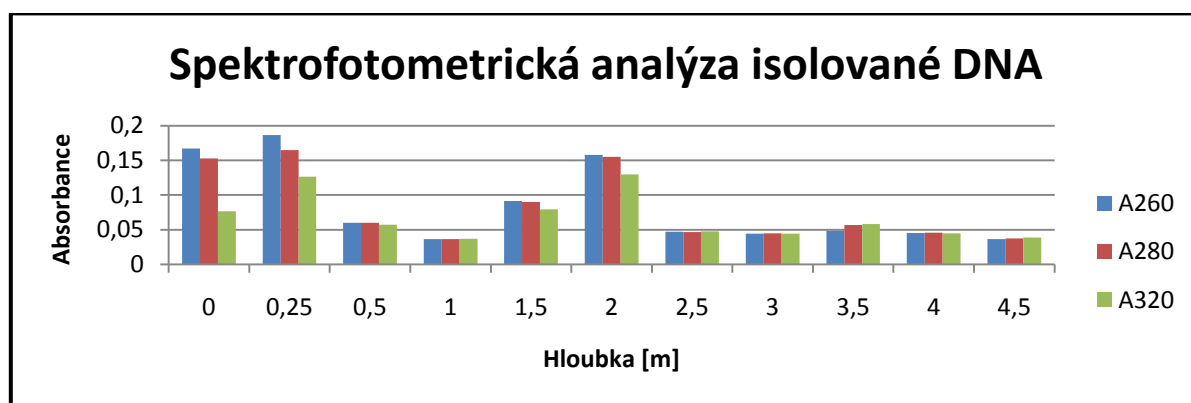
Graf č.1 – kalibrační křivka pro UV spektrofotometrii DNA



Hodnoty koncentrace získané z kalibrační křivky jsou z tohoto důvodu pouze orientační a ukazují nám, které vzorky mají nejvyšší obsah DNA. Stanovení A_{260}/A_{280} a A_{260}/A_{320} za těchto podmínek nemá vypovídací hodnotu.

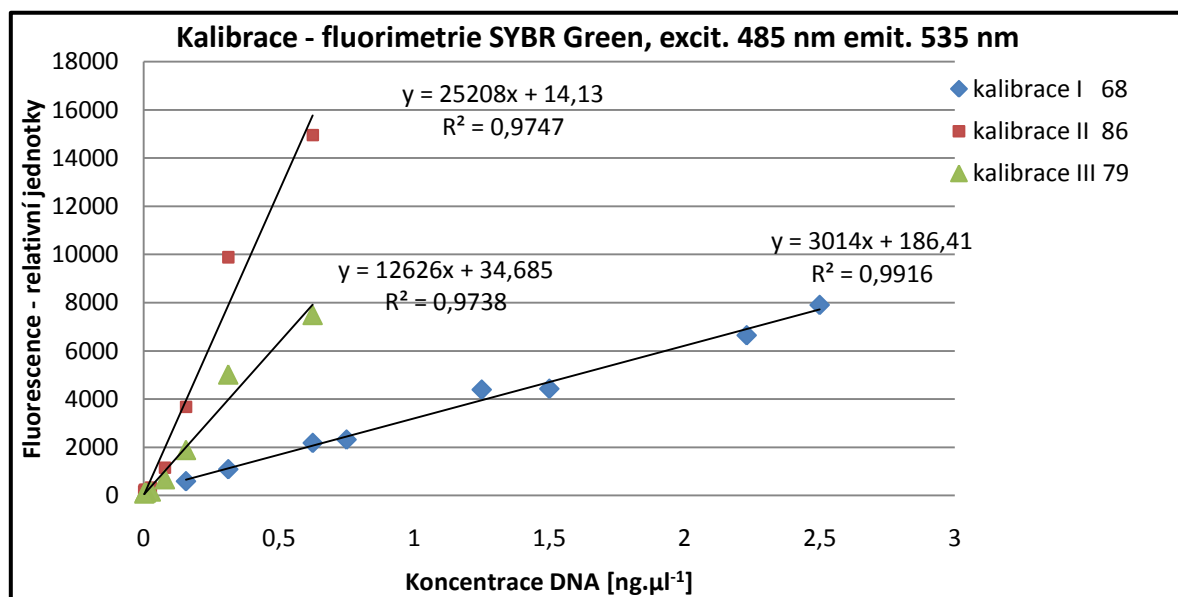
Vzorky, které v této tabulce nejsou, jsou svými absorbancemi v oblasti kolem hodnoty 0,0500, tedy blízko samotné detekční meze přístroje a jsou tedy zatížené vysokou chybou. Vzhledem k tomu, že zmíněná chyba je však pro každé měření stejná, je tedy možné vzorky mezi sebou porovnávat, nikoli kvantifikovat. Pro toto porovnání jsou všechny získané výsledky zaneseny do grafu 2. Uvedená hodnota je medián tří měření.

Graf č. 2 – výsledky spektrofotometrického stanovení při vlnové délce 260 nm



Z výše popsaných důvodů bylo přikročeno k fluorimetrickému stanovení za použití fluoroforu SYBR Green. Toto stanovení bylo potřeba kvantitativně optimalizovat, tedy zvolit určitou citlivost přístroje SAFIRE², protože automaticky nastavované hodnoty citlivosti nevykazovali dobré výsledky pro celé spektrum vzorků. Přístroj tuto hodnotu nastavuje v automatickém režimu podle maximální naměřené fluorescence. Jakmile relativní jednotky fluorescence dosáhli hodnot v rozsahu 20 000 – 25 000, začal se rozptyl měřených bodů od kalibrační závislosti zvyšovat. Pravděpodobně při těchto hodnotách má vzorek na danou citlivost přístroje příliš intenzivní vyzařování. Proto byla citlivost nastavována tak, aby nejkonzentrovější roztok nepřesáhl svojí fluorescencí hodnotu 15 000 rel. jednotek. Jako optimální byly zvoleny tyto hodnoty citlivosti fluorescence: 2,5 – 0,625 [ng. μl^{-1}] pro citlivost 68; 0,625 – 0,156 [ng. μl^{-1}] citlivost 79; 0,078 – 0,002 [ng. μl^{-1}] citlivost 86. Optimální kalibrační závislosti jsou zobrazeny na grafu č. 3 (str. 40):

Graf č. 3 – kalibrační křivky pro fluorimetrii DNA



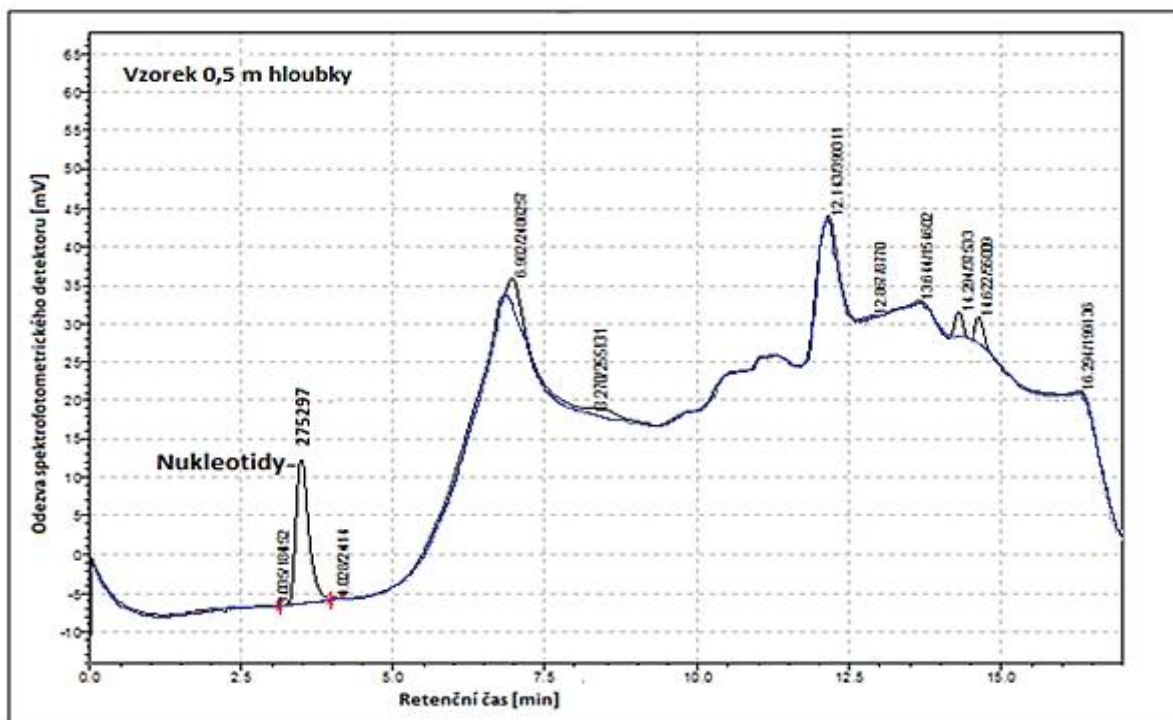
- Hodnoty za legendou kalibrace označují nastavenou citlivost

Dalším krokem byla analýza pomocí HPLC. Metoda byla také postupně optimalizována tak, aby naštěpené nukleotidy vytvářeli dobře rozlišený vrchol chromatogramu. Jako vhodný standard byl používán štěpený marker λ_{DNA} , z tohoto markeru byla vytvořena i kalibrační křivka. Jak bylo při optimalizaci zjištěno, pyrofosforečnan sodný se dá použít jako vhodný kalibrant pro předběžné zjištění retenčního času a dobrého rozlišení. Při použité metodě IP-RP-HPLC se totiž chová velmi podobně jako naštěpená DNA – nukleotidy, pouze jeho retenční čas je pozdější (3,75 min, oproti 3,5 min nukleotidů). Každý vzorek byl porovnáván s chromatogramem základní nulové hodnoty, kterou představoval vzorek bez DNA. Výsledná kvantifikace byla provedena pomocí programu LC Solution (Shimadzu) integrací obsahu píků, a jejich porovnáním s hodnotami základní nulové linie. Integrace vrcholu chromatogramu a vyhodnocená plocha je ukázána na grafu č. 4 (str. 41).

Jedinou známou látkou vytvářející charakteristický pík v chromatogramu byla DNA (viz graf č. 4, str. 41) a nebylo tedy možné jednoznačně určit množství a druh kontaminace vytvářející ostatní vrcholy. Z tohoto důvodu ani detekční schopnost určitých látek nebyla vysoká, detektor byl nastaven na diskrétní vlnové délky. Určení kontaminace pomocí této HPLC metody je tedy velmi hrubé a je možné vyčíslit ji pouze jako procentuální zastoupení (odezvu) jiných látek. Získaný chromatogram vzorku v dané vlnové délce byl porovnán se základní linií a byla vyhodnocena plocha nad touto linií. Plocha byla porovnávána

s plochou píku DNA, která byla považována za 100%. Výsledné hodnoty jsem shrnul do tří kategorií: čistý vzorek má do 5 % kontaminujících látek, znečištěný má kontaminaci do 15 % a silně znečištěný nad 15 % kontaminujících látek.

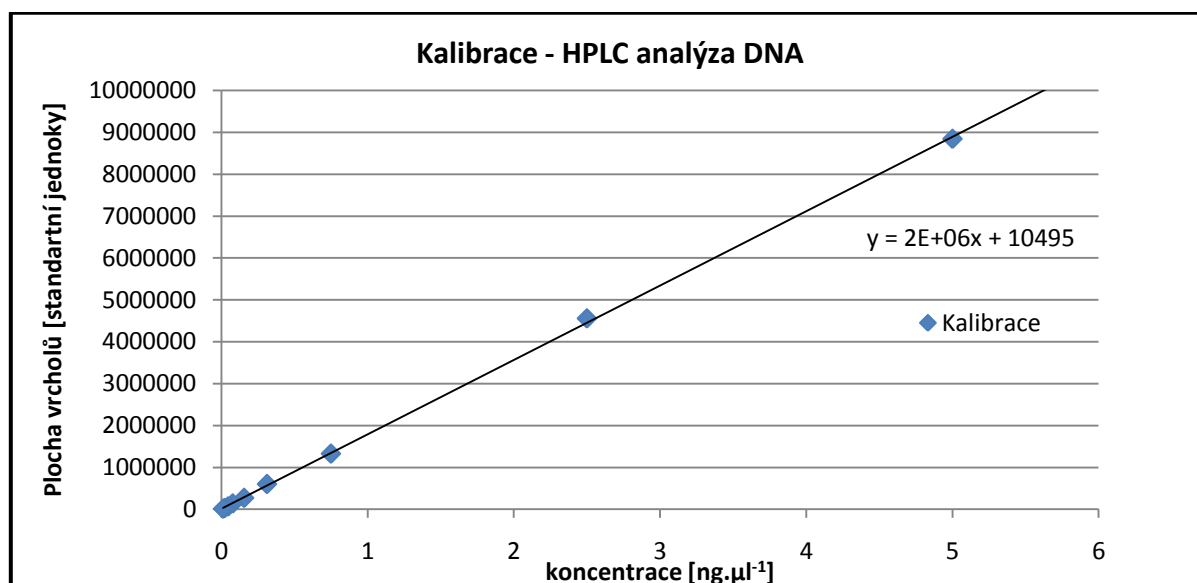
Graf č. 4 – integrace plochy vrcholů a odečtení od nulové linie



- odečtení plochy píků pomocí počítačového programu LC Solution (detektor 260 nm) červeně. Čísla udávaná nad píky jsou retenční čas lomený čtvercem plochy píku ve standardních jednotkách (rozměr udávaný programem). U píku pro nukleotidy je zvýrazněné číslo pouze pro plochu.
- Modře je vyznačena základní linie

Pro možnost přesného stanovení obsahu DNA bylo nutné vytvořit kalibrační křivku. Tato křivka byla vytvořena stejně jako pro fluorimetrii z λ_{DNA} (Fermentas) viz 4.2.2 (str. 31), její průběh je vyobrazen na grafu č. 5 (str. 42). Přesnost rozštěpení DNA na nukleotidy byla ověřena pomocí fluorimetrie. Plocha vrcholů byla přepočítána ze získaných hodnot na stejné relativní jednotky, kvůli změně citlivosti detektoru.

Graf č. 5 – Kalibrační závislost pro obsah plochy vrcholu DNA v HPLC chromatogramu



Kompletní výsledky analýzy DNA (UV-spektrofotometrie, Fluorimetrie, IP-RP-HPLC) jsou zpracovány do tabulky č. 1:

Tabulka č.1 – Shrnutí výsledků analýzy DNA

Vzorek - hl.[m]	0	0,25	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5
Spektrofotometrická analýza											
A ₂₆₀	0,1669	0,1863	0,0601	-	0,0914	-	-	-	-	-	-
c [µg.ml ⁻¹]	168	185	60	-	92	-	-	-	-	-	-
Fluorimetrická analýza											
Fluorescence	5910	8139	9481	11254	9943	18165	15391	12583	13122	14131	12497
c [µg.ml ⁻¹]	117	161	45	35,6	47,2	14,4	12,2	39,8	10,4	11,2	39,6
citlivost	68	68	79	79	79	86	86	79	86	86	79
IP-RP-HPLC analýza											
Plocha vrcholů	1100489	1310504	322497	444615	438831	150745	128185	278513	112226	114639	184392
c [µg.ml ⁻¹]	109	130	31,2	43,4	42,8	14	11,8	26,8	10,2	10,4	17,4
Kontaminace A ₂₆₀ %	●●	●●●	●●	●	●●	●	●	●●●	●	●	●●●
Kont. A ₂₈₀ %	●●	●●	●●	●	●	●	●	●	●	●	●
Kont. A ₃₂₀ %	●●●	●●●	●●●	●	●●	●●	●●	●●	●	●	●●●

- pomlčkou jsou označeny vzorky, u kterých nebylo možné danou metodou kvantitativně stanovit DNA
- výsledky HPLC analýzy, množství kontaminace při dané absorpci je vyjádřeno: ● čistý, ●● znečištěný, ●●● silně znečištěný vzorek

Z výsledků analýzy získaných pro izolované vzorky půdy jsou patrné značné rozdíly ve způsobu stanovení. Nejvyšší získané hodnoty koncentrace poskytuje UV-spektrofotometrie. Pravděpodobně je to způsobené vysokou interferencí látek přítomných ve vzorku. Výrazně citlivější metodou fluorimetrií jsou získané výsledky nižší.

Pro vzorky, u kterých je možné porovnat s UV-spektrofotometrickým stanovením jsou patrné zřetelné rozdíly ve stanovené koncentraci. Zajímavé výsledky vykazují také vzorky ze 3 m a 4,5 m, které fluorescenčním stanovením vykazují koncentraci DNA vyšší než lze předpokládat z grafu č. 2 (str. 39), a jsou tedy v rozporu s předchozí metodou využívající UV-spektrofotometrii. Ostatní výsledky kopírují obsah zjištěný UV-spektrofotometrií, přestože jejich hodnota je nižší.

Ze vzorku 0,5 m bylo izolováno daleko méně DNA, než bylo předpokládáno. Tento vzorek z okraje eluviálního horizontu je charakteristický výrazným podílem jílovitých součástí a ochuzením o humusovou složku. Když se zaměříme na srovnání metod, je zde vidět nižší rozptyl hodnot než u podobných vzorků což odpovídá malému množství huminových látek, které by interferovali se stanovením. Z HPLC analýzy kontaminace tohoto vzorku však vyplývá, že byl silně znečištěný látkami absorbující při vlnové délce 320 nm, bohužel není možné říci, proč se tato kontaminace projevila pouze na stanovení spektrofotometrickém. Zajímavý kontrast předpokládaného množství kontaminací je také u vzorků z 1 a 1,5 m, kdy by oba vzorky měli být obohacené o huminové látky vymývané ze svrchních vrstev, jak je patrné z grafu č. 6 (str. 50), ale není tomu tak.

Nejpřesnější hodnota koncentrace DNA by měla být získána ze stanovení pomocí chromatografie, protože naštěpené nukleotidy jsou odděleny od kontaminací na koloně a detekovány jako čistá frakce. Na druhou stranu je nutné říci, že samotné nukleotidy mají výrazně nižší absorbanci nežli je tomu v podobě ds DNA, což může způsobit problémy vzhledem k citlivosti spektrofotometru. Dalším problémem je chyba, kterou může způsobit nedokonalé štěpení DNA na nukleotidy. Tento problém byl snížen na minimum fluorescenčním ověřováním přítomnosti DNA ve vzorku, vzorky byly štěpeny do ustálení fluorescence na minimální hodnotě.

Výsledky analýzy DNA samy o sobě nevyovídají o dopadu na průběh technik rekombinantní DNA. Aby bylo možné tento dopad zjistit, je nutné průběh technik vyzkoušet a porovnat získané výsledky s výsledky kvantitativní a kvalitativní analýzy. Z tohoto důvodu byla na izolovaných vzorcích přímo zkoušena elektroforéza, restrikce izolované DNA pomocí enzymů *Pst* I a *Bsp*143 I (*Sau* 3A) (stejný postup jako při RFLP viz 4.2.5, str. 35) a stanovení PCR inhibition threshold (PIT). Výsledky těchto zkoušek jsou shrnuty v tabulce č. 2 (str. 44). PCR inhibition threshold je hodnota v procentech, která

ukazuje, jaký maximální podíl z obsahu PCR reakční směsi může být vzorek DNA, aby úspěšně proběhla. Pro půdní metagenomickou DNA je hlavním faktorem ovlivňujícím tuto hodnotu obsah PCR inhibujících kontaminant. Jak je patrné z tabulky č. 4, tato hodnota je silně ovlivněna i samotným obsahem DNA ve vzorku.

Tabulka č.2 – izolovaná DNA a její použitelnost na techniky rekombinantní DNA

Vzorek-hl.[m]	0	0,5	0,25	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5
Opt.ředění	1000	0	1000	1000	10	100	100	0	100	100	100
PIT	0,009	8,772	0,009	0,009	0,877	0,088	0,088	8,772	0,088	0,088	0,088
Elfo	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+
Rest <i>Pst</i> I	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+
<i>Bsp</i> 143 I	+		+		+						

– výsledky zhodnocení izolace z hlediska využitelnosti pro techniky rekombinantní DNA: + značí, že s vzorkem je možné přímo provést danou operaci, - značí, že se vzorkem daná operace neprobíhá, * jako výchozí koncentrace izolované DNA jsou použity hodnoty získané HPLC analýzou, prázdná pole znamenají, že procedura nebyla provedena

Zásadní pro další použitelnost izolované DNA v této práci byl průběh PCR a hodnota PIT. Jak je patrné z předchozí tabulky, u všech vzorků bylo možné stanovit hodnotu PIT a tudíž dosáhnout úspěšného průběhu PCR. Z tohoto důvodu bylo možné tvrdit, že získaná DNA nemá tolik kontaminací, aby nebyla bez dalších čistících operací využitelná. Proto nebylo přistoupeno k žádným dalším purifikačním krokům.

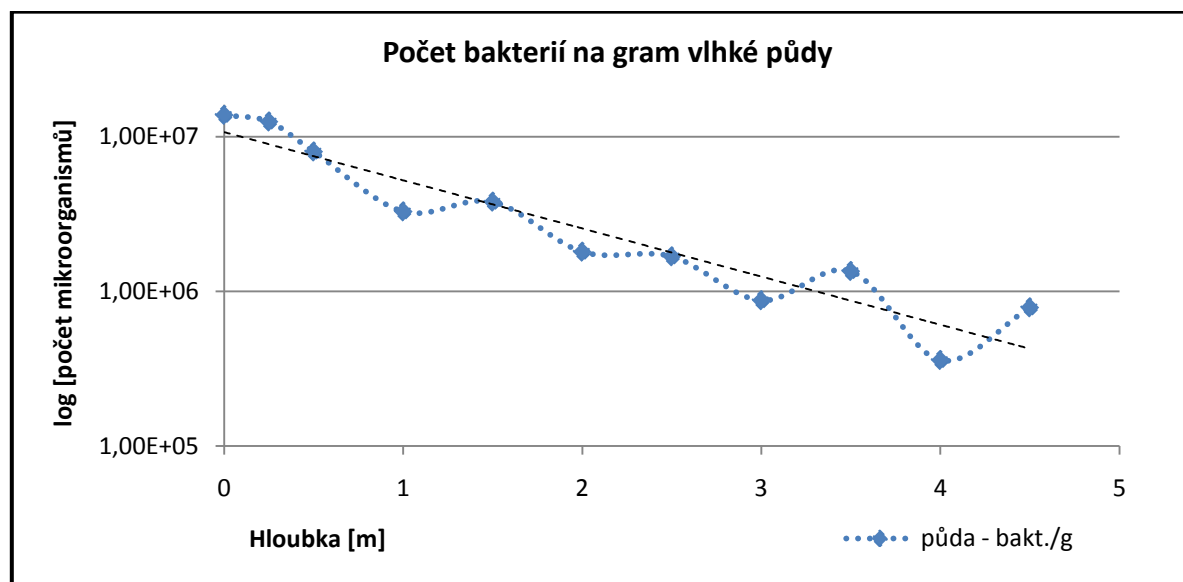
Jak je patrné z výsledků komplexní analýzy, největší obsah DNA mají vzorky 0m, 0,25m a překvapivě 1,5m a jsou vhodné pro další zpracování technikami rekombinantní DNA. Vzhledem k náročnosti prováděných operací bylo dále pracováno pouze s těmito vzorky za účelem odhalení části mikrobiální diverzity a její fylogenetickou studii. Pro získání těchto informací byla provedena analýza polymorfismu délek restrikčních fragmentů (RFLP) a následný výběr vzorků vhodných pro DNA sekvenaci. Získané sekvence byly použity na fylogenetickou studii.

5.3 Mikroskopie

Po celkové analýze izolované DNA bylo přikročeno k mikroskopickému zjištění obsahu mikroorganismů ve vzorcích půdy, aby bylo možné zhodnotit vliv měnících se podmínek a jejich počtu na průběh izolační procedury.

Postupem popsaným v kapitole 4.2.3 (str. 33) byly počítány buňky pomocí dvou počítacích experimentálních přístupů. Metoda je založena na rozdílu zobrazení při fázovém kontrastu pro částečně průsvitné objekty – buňky a pro neprůsvitné objekty – částičky hlíny. Z tohoto vyplývá, že je metoda citlivější k velkým buňkám v dobrém fyziologickém stavu, zatímco malé buňky či buňky stresované pak nejsou detekovány. Celkově je tento použitý postup nesmírně hrubý a přináší pouze orientační výsledky, nicméně na vytvoření představy o řádovém obsahu mikroorganismů je postačující. Na získání přesných výsledků by bylo vhodné použít fluorescenčních metod například za použití DAPI barvení. Získané výsledky pro obsah mikroorganismů ve vlhké půdě přepočtené na jeden gram jsou zaznamenány na grafu č.5:

Graf č. 5 – vliv klesající hloubky na počet mikroorganismů



Z grafu je patrné, že úbytek množství mikroorganismů v půdě má téměř lineární průběh v logaritmickejší výnosu (v normální stupnici tedy hyperbolický). Větší výkyvy počtu vykazují vzorky v hloubce 3 až 4,5 m, kdy je celkový počet mikroorganismů výrazně nižší a tedy menší změny počtu mají větší dopad.

5.4 Klonování v E.coli

Klonováním 16S rDNA (viz 4.2.4, str. 34), konstrukcí DNA knihovny a následnou izolací plasmidu bylo získáno celkem 36 různých plasmidových vzorků. Vzorky 1 – 12 byly získány

s použitím izolátu DNA povrchové půdy, vzorky 13 – 24 použitím izolátu z hloubky 25 cm a 25 – 36 z 1,5 m hloubky. V další části práce bude používáno tohoto značení čísel pro jednotlivé izolované plasmidy.

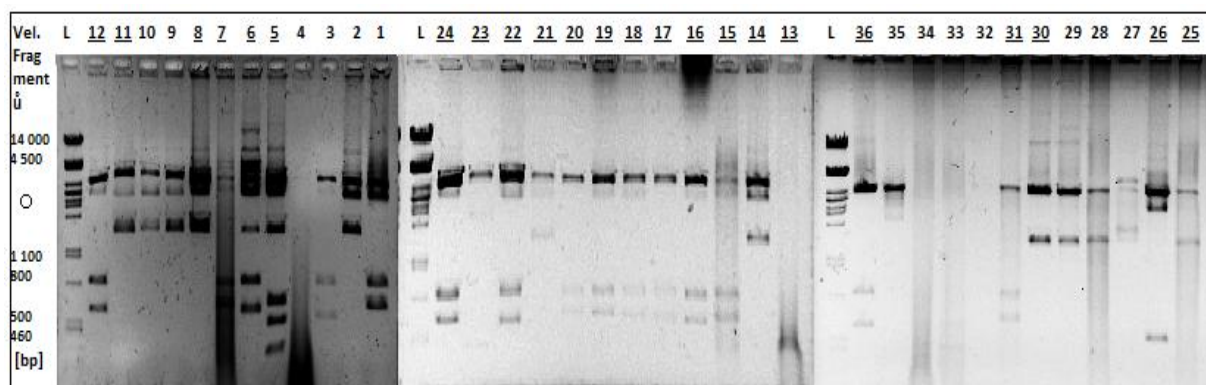
5.5 Polymorfismus fragmentů po restričním štěpení, fylogenetická analýza

RFLP bylo provedeno za použití restričního enzymu *EcoR*I. Většinou jsou používány enzymy s větším počtem štěpení nebo celé sady enzymů, které dávají velké množství fragmentů. Vzhledem k tomu, že vybrané vzorky byly dále sekvenovány, byl použit pouze tento jeden enzym. Restriční enzym *EcoR*I má na samotném vektoru pGEM-T easy dvě restriční místa a tedy vznikají minimálně dva fragmenty. Na obrázku č. 1 jsou prezentovány agarosové gely RFLP s přidanými popisky.

Jak je patrné na zmíněném obrázku, zachycený restriční profil vzorků z povrchu má 8 různých typů (vzorky 1, 2, 3, 5, 6, 8, 11, 12) a je tedy nejbohatší, protože vzorek z 0,25 m má 4 různé typy (vzorky 14, 15, 19, 24) a vzorek z 1,5 m má 6 typů (vzorky 25, 26, 27, 29, 31, 36), přičemž profily získané z hloubky 0,25 m a 1,5 m se v případě 3 typů shodují a je tedy možné říct, že jsou si podobné.

U vzorků 4, 13, 32, 33 pravděpodobně došlo při restrikci k rozpadu plasmidu. Vzorek č. 13 byl přesto úspěšně sekvenován.

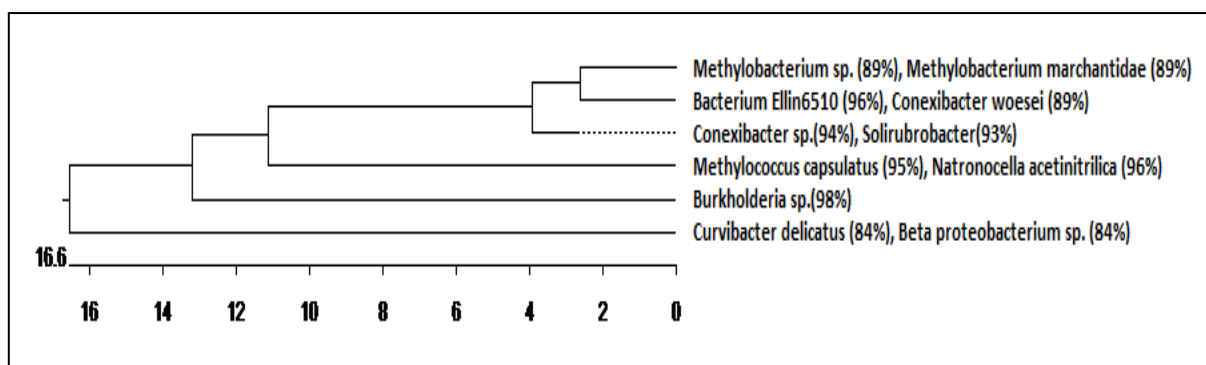
Obrázek č. 1 – RFLP pomocí *EcoR*I, plasmidy s vloženým lokusem 16S rDNA



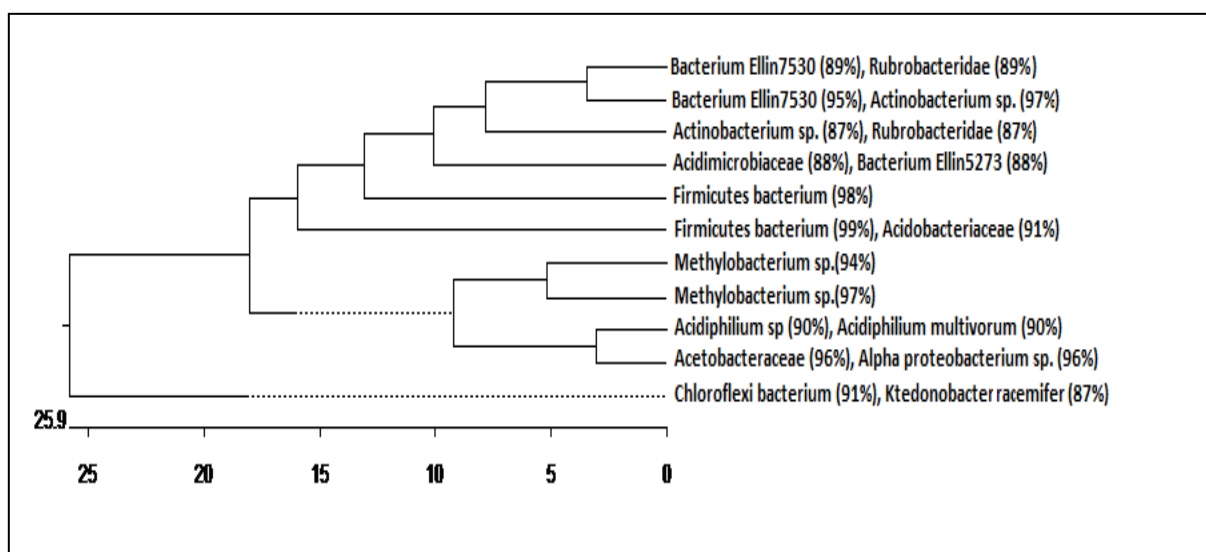
- Vzorky 1-12 jsou získané z izolátu 0 m; 13-24 jsou ze vzorku 0,25 m; 25-36 jsou ze vzorku 1,5 m
- U podtržených vzorků byla provedena následná sekvenace plasmidové DNA vzorků pro fylogenetickou analýzu
- Velikost fragmentů DNA (λ) v místě označení kroužkem je sestupně: 2 860, 2 400, 2 100, 2 000, 1 700 [bp]

Získané sekvence DNA byly upraveny a vyhodnoceny (viz 2.4.5, str. 35), taxonomické výsledky jsou zpracovány do fylogenetických stromů, pro každou hloubku zvlášť. Dendrogramy pro každý vzorek - obrázky č. 2, 3 a 4. Byl vytvořen také celkový dendrogram všech určených taxonů, který je diskutován v kapitole 6 (obrázek č. 5, str.52).

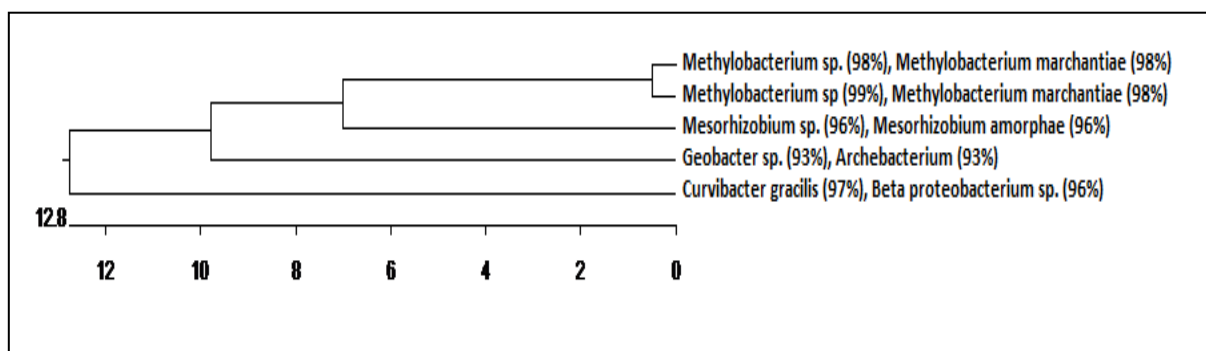
Obrázek č. 2 – Dendrogram pro povrchový vzorek



Obrázek č. 3 – Dendrogram pro vzorek z hloubky 0,25 m



Obrázek č. 4 – Dendrogram pro vzorek z hloubky 1,5 m



- Procenta uvedená v závorce vyjadřují maximální shodnost taxonu (z angl. max ident)
- Spodní osa označuje evoluční vzdálenost uzlů (lze si jej představit jako počet mutací odlišující uzly propojené spojnici)

Z evoluční vzdálenosti jednotlivých taxonů v daném vzorku je možné odhadnout diverzitu bakteriální komunity. Vhodnou kontrolou získaných výsledků a průběhů izolačních operací je biologie nalezených taxonů, přičemž je důležité se zaměřit na výskyt taxonů, které nejsou primárně půdní a nebo je přímo zřejmé, že jsou „kontaminací“ vzorku. Tento fakt musíme zařadit i do námi vytvořených dendrogramů. Z nalezených taxonů jsou tímto způsobem problematické dva taxony:

Curvibacter jehož klasickou doménou je vodní prostředí a mohl by po deštích osídlit svrchní vrstvy půdy. Jeho přítomnost v 1,5 m pod povrchem je za normálních okolností nepravděpodobná a je tedy nasnadě možná kontaminace povrchovou vodou po odkrytí svahu skrývky.

Dalším problematickým vzorkem je **Chloroflexi bakterium**, čili fotoheterotrofní bakterie. Její přítomnost ve vzorku 0,25 m pod povrchem je velmi nepravděpodobná a byla bohužel způsobena kontaminací odběrového náčiní.

Za podmínky, že vyřadíme z dendrogramů tyto problematické vzorky, získáme hrubý přehled o evoluční příbuznosti taxonů přítomných v daném vzorku, z které můžeme odhadnout jejich diverzitu. Ve vzorku, který obsahuje velké množství vzdálených taxonů je zřejmé, že jeho biotické a abiotické faktory umožňují přežít širokému spektru mikroorganismů a tedy jeho diverzita je pravděpodobně vysoká. Opakem je přítomnost pouze úzce příbuzných taxonů a tedy nízká diverzita. Pro naše vzorky je evoluční vzdálenost nejvyšší u vzorku z povrchu a nejnižší v 1,5 m hloubka, což potvrzuje předpokládá.

6 Diskuze

Metodika počítání mikroorganismů ve vzorku nebyla příliš vhodná, přesto je možné podle získaných údajů závislosti počtu mikroorganismů na hloubce vzorku (graf č. 5, str. 45) brát lineární průběh počtu jako určující, při zvoleném log měřítku na ose y. Izolační procedury a různé způsoby analýzy byly vždy stejné. Za těchto předpokladů je možné nalézt významné odchylky množství izolované DNA z půdního vzorku oproti

předpokládané hodnotě, která je odhadována z počtu mikroorganismů. Přehledně jsou diskutované výsledky z analýzy DNA shrnuty do grafu č. 6 (str. 50).

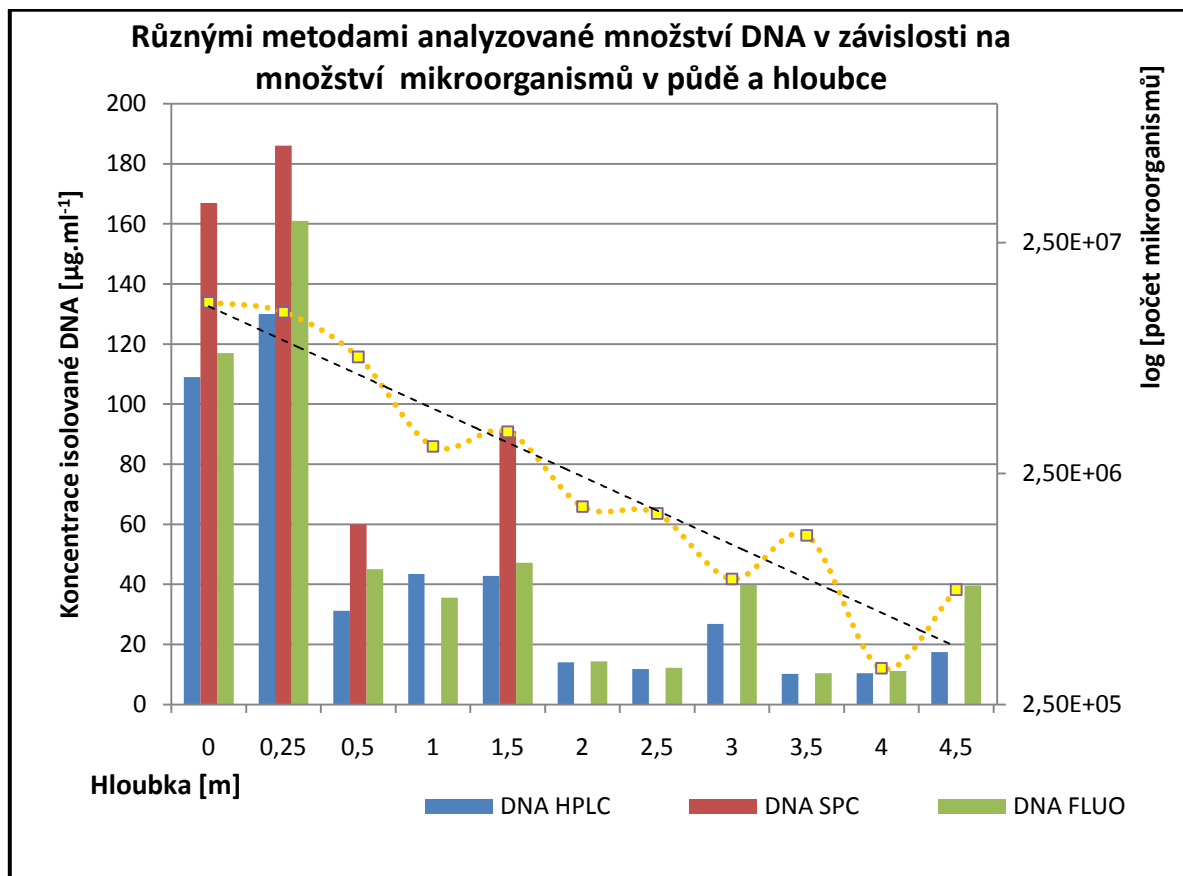
Z tohoto grafu vyplývá, že u vzorku z hloubky 0,5 m a 1,0 m je získané množství DNA nižší než by se dalo předpokládat podle podobných vzorků 0,25 m a 1,5 m a u vzorků 3 m a 4 m je získané množství DNA mnohem vyšší než odhadované pomocí porovnání s vzorky z 2 m, 2,5 m a 3,5 m hloubky. Pro první zmíněný fakt se nabízí odpověď v kvalitě použité půdy, kdy vzorek z 0,5 m má výrazný podíl jílovitých součástí a tedy sorpčních částic a je také z tzv. eluviálního horizontu, čili horizontu typického vymýváním do hlubších vrstev. Oproti tomu vzorek z hloubky 1,0 m je již pod touto vrstvou a měl by být z horizontu iluviálního a tedy obohaceného vymýváním z vyšších vrstev, což se ale neprojevilo vyšší koncentrací kontaminací (viz tabulka č. 1, str. 42), za nižší izolovaný obsah DNA tedy může jiný faktor, například opět přítomnost jílovitých sorpčních součástí. Druhý vzorek z iluviálního horizontu (1,5 m) hloubky je již citelně obohacený o huminové látky vyplavené z vyšších vrstev, což vysvětluje i vysokou hodnotu naměřené A_{260} .

Jak bylo řečeno, u vzorků z hloubky 3 m a 4 m je izolované množství DNA výrazně vyšší než je předpokládaná hodnota z obsahu mikroorganismů ve vzorku. V tomto případě je velmi nepravděpodobné tvrdit, že by kvalita půdy přispěla k lepší izolovatelnosti DNA. Pravděpodobnou příčinou této anomálie by mohla být rychlá kolonizace vzorku mikrobiálními taxony, kterou umožnila existence skrývky před vzorkováním, tedy biologická kontaminace. Při hodnocení tabulky č. 2 (str. 44) je možné si povšimnout taxonu *Curvibacterium*, který je typický pro silně zavedené prostředí a ačkoli nebyla zjišťována diverzita mikroorganismů ve zmíněných vzorcích, je možné se domnívat, že došlo ke kontaminaci vzorku dešťovou vodou. Kontaminace vzorků vodou v laboratoři je vyloučena, protože by se projevila ve všech vzorcích. Taxony kontaminující hluboké vzorky se mohou nalézat v dobrém fyziologickém stavu, a proto může být množství izolované DNA vysoké. Další nalezenou kontaminací je přítomnost *Chloroflexi* bakterie ve vzorku 0,25 m. Jelikož se jedná o fotosyntetizující bakterii, nemůže být za normálních okolností přítomna v hloubce 0,25 m. Nabízí se vysvětlení podobné jako u *Curvibacteria*, že došlo k průsaku dešťové vody a stržení mikroorganismu do této hloubky, či vysvětlení související s kontaminací při odběru půdy.

Z výsledků v grafu č.6 (str. 50) a jejich diskuse je tedy patrná korelace odchylek od předpokládaného obsahu DNA a výskytu jílovitých částic v půdě, výskytu huminových

látek nebo biologických kontaminací půdy. Tudíž je možné předpokládat, že kvalita půdy je určující a silně ovlivňuje izolační proceduru nehledě na celkový obsah mikroorganismů.

Graf č. 6 - vliv hloubky a klesajícího počtu mikroorganismů na koncentraci izolované DNA



- SPC – spektrofotometrická metoda stanovení (pouze tam kde bylo stanoveno, 260 nm), FLUO – fluorimetrické stanovení SYBR Green, HPLC – stanovení pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie

K analýze DNA pomocí IP-RP-HPLC byla použita i druhá sestava HPLC s detektorem schopným v každém okamžiku stanovit celé spektrum pro lepší kvantifikaci případných kontaminací. Množství získaných údajů a jejich interpretace byla však natolik obtížná nebyla nakonec použita.

Samotné stanovení pomocí HPLC je nejpřesnější ze zvolených metod kvantitativní analýzy půdní metagenomické DNA, protože vliv interferujících huminových látek je minimalizován separací na koloně. Z porovnání rozdílů kvantitativního stanovení pomocí různých metod je také možné odhadnout množství kontaminací. Je zřejmé, že v případě velkých rozdílů mezi stanoveními bude přítomné i velké množství látek, které interferují s fluorimetrickým, či spektrofotometrickým stanovením.

Při fluorimetrickém stanovení byly vzorky proměřeny na spektrofotometru SAFIRE² (Scheller instruments) s použitím alternativní excitační (497 nm) a emisní (520 nm) vlnové délky, která by měla poskytnout výsledky s nižším podílem interferencí¹²⁰. Bohužel při takto zvoleném experimentálním nastavení přístroje dochází k výraznému snížení citlivosti stanovení, a proto nebyly tyto vlnové délky použity pro stanovení.

Z kvalitativního vyhodnocení izolované DNA plyne, že použitá metodika pro vzorky půdního horizontu byla vhodná. Hlavním určujícím krokem jsou získané hodnoty PIT (tab. č. 2, str. 44), které byly srovnávány s údaji dostupnými pro izoláty půdní DNA přečištěné gelově-permeační chromatografií viz tabulka č. 3:

Tabulka č. 3 – media pro purifikaci půdní metagenomické DNA pomocí gelové permeační chromatografie a jejich efektivita

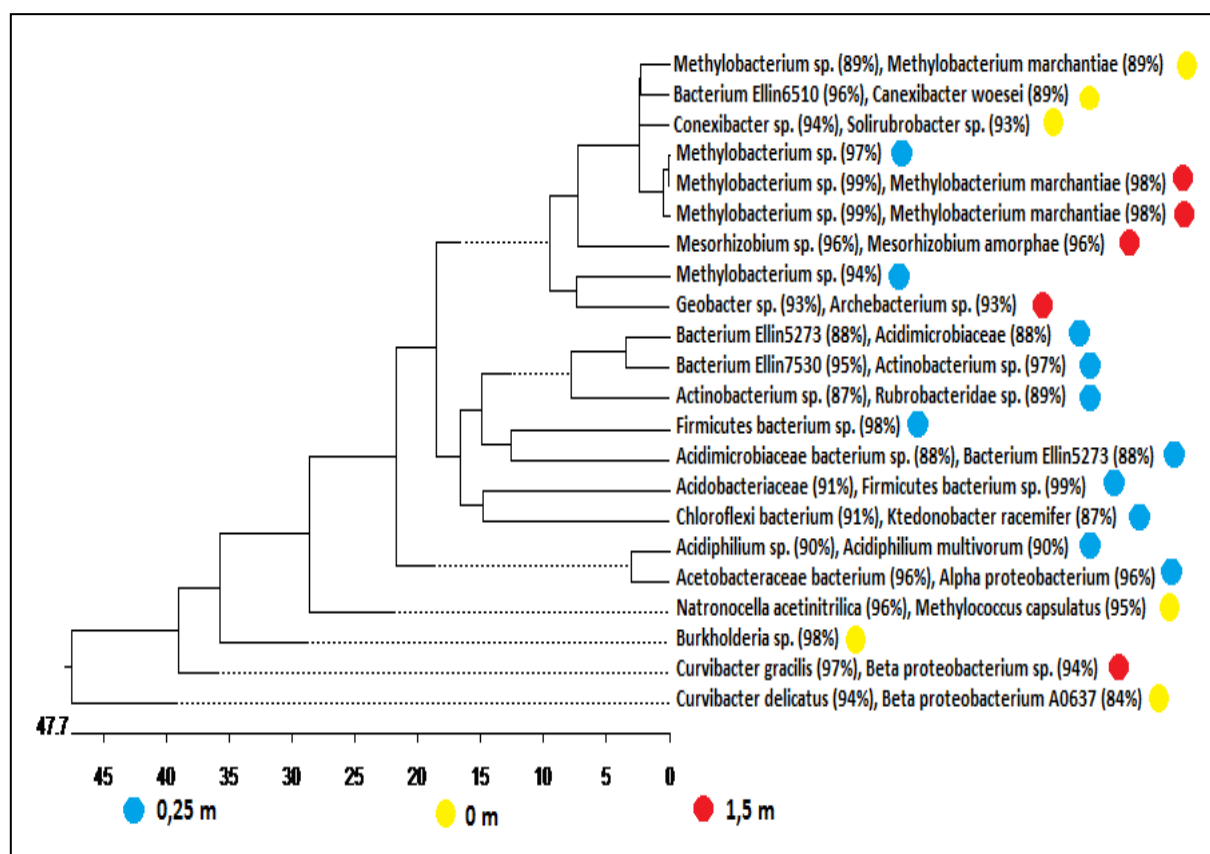
matrice	efektivita	Dělicí rozsah, kDa
Bio-Gel P-100, P-200	[0.500][0.250]	5 - 100, 30 - 200
Sephadex G-150, G-200	Ztráty 5- 15%[0.250][0.500]	(4) - 360, 5 - 600
Sepharose 6B, 4B, 2B	2B-0,04% h.kys. [4.000][8.000][16.000]	10 - 4000, 60 - 20000, 70 – 40000
Toyopearl HW 55, HW 65, HW 75	[0.250][8.000][1.000]	1 - 700, 40 - 5000, 500 – 50000

- v hranatých závorkách je hodnota PIT, hodnota vyjadřuje maximální množství příspěvku purifikované DNA v % objemu reakční směsi, hodnoty jsou převzaty dle Millera, T.⁸⁷.

Jak je patrné získané hodnoty PIT se pohybují ve stejných řádech jako hodnoty v tabulce č. 3, s výjimkou vzorků 0 m, 0,5 m a 1 m, u kterých je hodnota výrazně nižší. Přesto i u těchto vzorků bylo možné uskutečnit úspěšnou PCR. Fungování restričních enzymů, které jsou citlivé na kontaminaci, dále potvrdilo dostatečnou čistotu izolované DNA. Nebylo tedy nutné přistoupit k dalším čistícím procedurám, které by mohly do práce vnést nepřesnost. Metoda dle Ester M. Gaborové z tohoto pohledu poskytuje izoláty přímo vhodné pro další zpracování technikami rekombinantní DNA.

Ester M. Gaborová pomocí DGGE dokázala, že její nepřímá izolační metoda poskytuje větší spektrum diverzity půdních mikroorganismů než přímé metody a tento fakt je jedním z důvodů, proč byla nepřímá izolační procedura použita. Izolováním co nejširšího spektra mikroorganismů by mělo být zajištěno získání co nejobektivnějších výsledků pro studium jejich diverzity.

Obrázek č.5 – celkový dendrogram



- Procenta uvedená v závorce vyjadřují maximální shodnost taxonu (z angl. max ident)
- Spodní osa označuje evoluční vzdálenost uzlů (lze si jej představit jako počet mutací odlišující uzly propojené spojnici)

Celkový dendrogram všech nalezených mikroorganismů – obrázek č. 5 dobře shrnuje výsledky fylogenetické studie pro vybrané vzorky. Jak bylo ve výsledcích napsáno, je potřeba tyto výsledky hodnotit bez pravděpodobných kontaminací, jmenovitě *Curvibacter g.* ve vzorku z 1,5 m a *Chloroflexi b.* z vzorku 0,25 m.

Jak je zřejmé a dá se předpokládat, s rostoucí hloubkou se šířka diverzity bakteriální komunity snižuje. V 1,5 m je již poměrně úzké spektrum taxonů s převahou methylotrfních bakterií s evoluční vzdáleností pod deset jednotek, zatímco evoluční

vzdálenost nejvzdálenějších taxonů v povrchovém vzorku (0 m) je cca 45 jednotek, tedy téměř pětkrát větší. Pro vzorek odebraný z 0,25 m je to již pouze cca 22 jednotek a tedy téměř polovina.

Zajímavým zjištěním je přítomnost acidofilních bakterií (v tomto kontextu míněné jakožto kyselomilný, žijící v kyselém prostředí) ve vzorku z hloubky 0,25 m. Lesní půda má kyselou reakci, typickou pro humusový horizont. Námi použitá půda měla tento horizont minimálně vyvinutý, a proto snadno docházelo k jejímu vymývání a okyselování nižších vrstev. Nejvíce by měl být tímto procesem postižen iluviální horizont, jak ale prozrazují výsledky pro vzorek z hloubky 1,5 m, je pravděpodobné, že i přes kyselé prostředí není již v takovéto hloubce pro acidofilní bakterie vhodné prostředí.

Závěry fylogenetické analýzy potvrzují hypotézu, že při izolacích DNA z hlubokých půdních horizontů panují v hlubších vrstvách podmínky selektující pouze omezenou šířku taxonů (diverzitu). Dostupnost DNA určitých taxonů může zásadně ovlivnit úspěch izolační procedury, pokud tyto ve vzorku převažují. Ve vzorcích s omezenou diverzitou (vzorky z velké hloubky) je tedy pravděpodobnost ovlivnění izolace výrazně větší. Ve vzorcích s širokou diverzitou mikroorganismů se špatná dostupnost DNA určitého taxonu téměř neprojeví v konečném izolovaném množství DNA. Tento fakt také potvrzuje hypotézu, že kvalita půdy je určující pro izolační proceduru jako takovou a je třeba na ni brát zřetel.

7 Závěr

- Ze závěrů analýzy obsahu DNA ve vzorcích, přítomnosti kontaminací a počítání bakteriálních buněk ve vzorku bylo prokázáno, že existuje možná korelace mezi kvalitami půdy (obsah kontaminací, výskytem jílovitých součástí) a odchylkami od předpokládaného obsahu DNA. Je tedy možné předpokládat, že kvalita půdy je určující pro průběh izolační procedury.
- Jako nejlepší metoda kvantitativního stanovení DNA byla určena metoda HPLC analýzy.
- Použitá metoda byla vhodná pro izolaci půdní metagenomické DNA a její získaná čistota byla dostatečná pro techniky rekombinantní DNA.

- Fylogenetická analýza potvrdila hypotézu, že s rostoucí hloubkou v půdním horizontu se snižuje diverzita přítomných mikroorganismů, což může mít také velký vliv na izolační proceduru jako takovou.

8 Seznam použité literatury

- 1) Hansel, C.M., Fendorf, S., Jardine, P.M., Francis, C.A.: *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 1620-1633 (2008)
- 2) Waksman, S. A., Starkey, R. L.: *Soil Sci.* 32, 406 (1931)
- 3) Woese, C.R.: *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 51, 221-271 (1987)
- 4) Stahl, D. A., Lane, D. J., Olsen, G. J., Pace, N. R: *Appl. Environ. Microbiol.* 49, 1379-1384 (1985)
- 5) Singh, B. K., Campbell, C. D., Sorenson, S. J., Zhou, J.: *Nat. Rev. Microbiol.* 252, 756-757 (2009)
- 6) Torsvik, V., Ovreas, L.: *Curr. Opin. Microbiol.* 5, 240-245 (2002)
- 7) Handelsmani, J., Rondon, M.R., Brady, S.F., Clardy, J., Goodman, R.M.: *Chem. Biol.* 5, 245-249 (1998)
- 8) Whitman, W. B, Coleman, D. C., Wiebe, W. J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 6578-6583 (1998)
- 9) Kotrba, P., Uhlík, O., Ječná, K., Macková, M., Macek, T.: *Chem. Listy* 102, 960-968 (2008)
- 10) Delmont, T.O., Robe, P., Cecillon, S., Clark, I.M., Constancias, F., Simonet, P., Hirsch, P.R., Vogel, T.M.: *Appl. Environ. Microbio.* 77, 1315-1324 (2011)
- 11) Paul, E.A., Clark, F.E.: *Soil Microbiology and Biochemistry*, Academic Press, New York (1989)
- 12) Abulencia, C.B., Wyborski, D.L., Garcia, G.A., Podar, M., Chen, W., Chang, S.H.: *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 3291–301 (2006)
- 13) MacLean, L. C. W., Pray, T. J., Onstott, T. C., Brodie, E. L., Hazen, T. C., Southam, G.: *Geomicrobiol. J.* 24, 491-504 (2007)
- 14) Baker, B. J., Hugenholtz, P., Dawson, S. C., Banfield, J. F.: *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 5512-5518 (2003)

- 15) Fierer, N., Schimel, J.P., Holden, P.A.: *Soil Biol. Biochem.* 35, 167-176 (2003)
- 16) Boivin-Jahns, V., Ruimy, R., Bianchi, A., Daumas, S., Christen, R.: *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 3405-3412 (1996)
- 17) Ogram, A., Saylor, G.S., Barkay, T.: *J Microbiol. Meth.* 7, 57-66 (1987)
- 18) Holben, W.E., Jansson, J.K., Chelm, B.K., Tiedje, J.M.: *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 703-711 (1988)
- 19) Rajendhran, J., Gunasekaran, P.: *Biotechnol. Adv.* 26, 576-590 (2008)
- 20) Venter, J. C., Remington, K., Heidelberg, J. F., Halpern, A. L., Rusch, D., Eisen, J. A., Wu, D., Paulsen, I., Nelson, K. E., Nelson, W., Fouts, D. E., Levy, S., Knap, A. H., Lomas, M. W., Nealson, K., White, O., Peterson, J., Hoffman, J., Parsons, R., Baden-Tillson, H., Pfannkoch, C., Rogers, Y. H., Smith, H. O.: *Science* 304, 66 (2004)
- 21) Daniel, R.: *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 470-478 (2005)
- 22) Nannipieri, P., Ascher, J.E., Ceccherini, M.T., Landi, L., Pietramellara, G., Renella, G.: *Eur. J. Soil Sci.* 54, 655-672 (2003)
- 23) Miller, D. N., Bryant, J. E., Madsen, E. L., Ghiorse, W. C.: *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 4715-4724 (1999)
- 24) Steffan, R. J., J. Goksoyr, A. K. Bej, Atlas R. M.: *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 2908–2915 (1988)
- 25) Tsai, Y., Olson, B.H.: *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 1070-1074 (1991)
- 26) Purohit, M.K., Singh, S.P.: *Appl. Microbiol.* 49, 338-344 (2009)
- 27) Gabor, M.E., Vries, J.E., Janssen, B.D.: *FEMS Microbiol. Ecol.* 44, 153-163 (2003)
- 28) Frostegard, A., Courtois, S., Ramisse, V., Clerc, S., Bernillon, D., Le Gall, F., Jeannin, P., Nesme, X., Simonet, P.: *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 5409-5420 (1999).
- 29) Crombach, W. H. J.: *J. Microbiol.* 38, 105-120 (1972)
- 30) Torsvik, V., Goksoyr, J., Daae, F.L.: *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 782-787 (1990)
- 31) Jacobsen, C.S., Rasmusen, O.F.: *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 2458-2462 (1992)
- 32) Šafařík, I., Šafaříková, M.: *J. Chromatography B*, 722, 33-53 (1999)
- 33) Beresmeier, S.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 73, 495-504 (2006)
- 34) Franzreb, M., Siemann-Herzberg, M.M, Hopley, T.J., Thomas, O.R.T.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 70, 505-516 (2006)
- 35) Leff, L. G., Dana, J. R., McArthur, J. V., Shimkets, L. J.: *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1141–1143 (1995)

- 36) Courtois, S., Frostegard, A., Goransson, P., Depret, G., Jeannin, P., Simonet, P.: Environ. Microbiol. 3, 431-439 (2001)
- 37) Bakken, L.R., Lindahl, V.: Recovery of bacterial cells from soil, v knize: Nucleic Acids in the Environment: Methods and Applications, (Van Elsas J.D., Trevors J.T.) Springer-Verlag, Heidelberg, Germany, str. 9–27. (1995)
- 38) Stach, J.E.M., Bathe, S., Clapp, J.P., Burns, R.G.: FEMS Microbiol. Ecol. 36, 139-151 (2001)
- 39) Smith, G. B., Tiedje, J. M.: Appl. Environ. Microbiol. 58, 376–384 (1992)
- 40) Liesack, W., Stackebrandt, E.: J. Bacteriol. 174, 5072-5078 (1992)
- 41) Kuske, C. R., Banton, K. L., Adorada, D. L., Stark, P. C., Hill, K. K., Jackson, P. J.: Appl. Environ. Microbiol. 64, 2463-2472 (1998)
- 42) Van Elsas, J.D., Mäntynen, V., Wolters, A.C.: Biol. Fertil. Soils 24, 188–195 (1997)
- 43) Burgmann, H., Pesaro, M., Widmer, F., Zeyer, J.: J. Microbiol. Met. 45, 7-20 (2001)
- 44) Valossionk, T., Robb, T., E. J., Nazar, R. N. Appl. Environ. Microbiol. 61, 3972-3976 (1995)
- 45) Clegg, C.D., Ritz, K., Griffiths, B.S.: Lett. Appl. Microbiol. 25, 30-33 (1997)
- 46) Cullen, D.W., Hirsch, P.R.: Soil. Biol. Biochem. 30, 983-993 (1998)
- 47) Orsini, M., Romano-Spica, V.: Lett. Appl. Microbiol. 33, 17–20 (2001)
- 48) Picard, C, Ponsonnet, C, Paget, E, Nesme, X, Simonet, P.: App. Environ. Microbiol. 58, 2717-2722 (1992)
- 49) Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, Keith, R., Walter, P.: Buňka, v knize Základy buněčné biologie/ úvod do molekulární biologie buňky, Espero Publishing, Ústí nad Labem, str. 18-32 (1998)
- 50) Lee, S., Bollinger, J., Bezdicek, D., Ogram, A.: Appl. Environ. Microbiol. 62, 3787-3793 (1996)
- 51) Xia, X., Bollinger, J., Ogram, A.: Mol. Ecol. 4, 17-28 (1995)
- 52) Knaebel, D.B., Crawford, R.L., Mol. Ecol. 4, 579-591 (1995)
- 53) Porteous, L.A., Seidler, R.J., Watrud, L.S.: Mol. Ecol. 6, 787–791 (1997)
- 54) Woese, C.R, Fox, G.E.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74, 5088-5090 (1977)
- 55) La Montagne, M.G., Michel, Jr F.C., Holden, P.A., Reddy, C.A.: J. Microbiol. Meth. 49, 255-264 (2002)
- 56) Arbeli, Z., Fuentes, C.L.: FEMS Microbiol. Lett. 272, 269–75 (2007)

- 57) Senesi, N., Loffredo, E.: Soil humic substances, v knize Biopolymers. Lignin, humic substances and coal, (Hofrichter M., Steinbuchel A.) John Willey and sons, New York, str. 247-299 (2001)
- 58) Baigorri, R., Fuentes, M., Gonzalez-Gaitano, G., Garcia-Mina, J.M., Almendros, G., González-Vila, F.J.: J. Agric. Food Chem. 57, 3266-3272 (2009)
- 59) Tebbe, C.C., Vahjen, W.: Appl. Environ. Microbiol. 59, 2657-2665 (1993)
- 60) Harry, M., Gambier, B., Bourezgui, Y., Garnier-Sillam, E.: Analysis 27, 439-442 (1999)
- 61) Whitehouse, C.A., Hottel, H.E.: Mol. Cell Probes 21, 92-96 (2007)
- 62) Porteous, L.A., Armstrong, J.L.: Curr. Microbiol 22, 345-348 (1991)
- 63) Jackson, C.R., Harper, J.P., Willoughby, D., Roden, E.E., Churchill, P.F.: Appl Environ Microbiol 63, 4993-4995 (1997)
- 64) Roose-Amsaleg, C.L., Garnier-Sillam, E., Harry, M., Soil Ecol 18, 47-60 (2001)
- 65) Howeler, M., Ghiorse, W.C., Walker, L.P.: J. Microbiol. Methods 54, 37-45 (2003)
- 66) Gallagher, S.R., Desjardins, P.R.: Current Protocols in Molecular Biology, John Willey and sons, New York (2001)
- 67) NanoDrop 1000 UV-Vis Spectrophotometer From NanoDrop Technologies, BioCompare (2007): obchodní sdělení
- 68) Pisarevskii, A. N., Cherenkevich, S. N., Andrianov, V. T.: J. Appl. Spectroscopy 5, 452-454 (1966)
- 69) Rock, C., Allum, A., Abbaszadegan, M.: Appl. Environ. Microbiol. 76, 8102-8109 (2010)
- 70) Sandaa, R.A., Enger, O., Torsvik, V.: Soil Biol. Biochem. 30, 265-268 (1998)
- 71) SYBR Green protokol, Molecular probes, Invitrogen detection technologies (2006), Invitrogen
- 72) Labarca, C., Paigen, K.: Anal. Biochem. 102, 344-352 (1980)
- 73) Lakowicz, J.R., Shen, B., Gryczynski, Z., D'Auria, S., Gryczynski, I.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 286, 875-879 (2001)
- 74) Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T.: Molecular Cloning — A Laboratory Manual: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring, Harbor, New York (1989)
- 75) Hecker, K.H. , Green, S.M., Kobayashi, K.: J. Biochem. Biophys. Methods 46, 83-93 (2000)
- 76) Premstaller, A., Oefner, P.J., Oberacher, H., Huber, C.G.: Anal. Chem. 74, 4688-4693 (2002)

- 77) Katz, E. D., Haff, L.A., Eksteen, R.: *J. Chromatogr. A* 512, 433-444 (1990)
- 78) Kuo, K.C., McCune, R.A., Gehrke, C.W.: *Nucl. Acid Res.* 8, 4763-4776 (1980)
- 79) Eick, D., Fritz, H.J., Doerfler, W.: *Anal. Biochem.* 135, 165-171 (1983)
- 80) El-Maarri, O.: *Methods Mol. Biol.* 287, 195-205 (2004)
- 81) Gilar, M., Bouvier, E.S.P.: *J. Chromatography A* 890, 167-177 (2000)
- 82) Van Stempvoort, D.R., Lasage, S., Novakowski, K.S., Millar, K., Brown, S., Lawrence, J.R.: *J. Contaminant Hydrol.* 54, 249-276 (2002)
- 83) Braid, M.D., Daniels, L.M., Kitts, C.L.: *J. Microbiol. Methods* 52, 389-393 (2003)
- 84) Erb, R.W., Wagnerdobler, I.: *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 4065-4073 (1993)
- 85) Tien, C.C., Chao, C.C., Chao, W.L.: *J. Appl. Microbiol.* 86, 937-943 (1999)
- 86) Dijkmans, R., Jagers, A., Kreps, S., Collard, J.M., Mergeay, M.: *Microb. Releases* 2, 29-34 (1993)
- 87) Miller, D.N.: *J. Microbiol. Methods* 44, 49-58 (2001)
- 88) Hurt, R.A., Qiu, X., Wu, L., Roh, Y., Palumbo, A.V., Tiedje, J.M., Zhou, J.: *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4495-4503 (2001)
- 89) Schneegurt, M.A., Dore, S., Kulpa, Jr C.F.: *Curr. Issues Mol. Biol.* 5, 1-8 (2003)
- 90) Maciel, B.M., Dias J.C., Dos Santos A.C., Filho R.C.: *Can. J. Microbiol.* 53, 937-943 (2007)
- 91) Cady, C., Stelick, S., Batt, A.: *Biosens. Bioelectronics* 19, 59-66 (2003)
- 92) Hindson, B.J., Gutierrez, D.M., Ness, K.D., Makarewicz, A.J., Metz, T.R., Setlur, U.S., Bennett, W.B., Loge, J.M., Colston, B.W., Francis, Jr. P.S., Barnett, N.W., Dzenitis, J.M.: *Analyst* 133, 248-255 (2008)
- 93) Desai, C., Madamwar, D.: *Biores. Technol.* 98, 761-768 (2007)
- 94) Young, C.C., Burghoff, R.L., Keim L.G., Minak-Bernero, V., Lute, J.R., Hinton, S.M.: *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 1972-1974 (1993)
- 95) Moreira, D.: *Nucl. Acid Res.* 26, 3309-3310 (1998)
- 96) Chandler, D.P., Schreckhise, R.W., Smith, J.L., Bolton, H.: *J. Microbiol. Methods* 28, 11-19 (1997)
- 97) Romanowski, G., Lorenz, M.G., Wackernagel, W.: *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 3438-3446 (1993)
- 98) Kiesslich J., Radacher M., Neuhuber F., Meyer H.J., Zeller K.W.: On the Use of Nitrocellulose Membranes for Dialysis-mediated Purification of Ancient DNA from

Human Bone and Teeth Extracts, v knize Ancient Biomolecules, Volume 4, (Aut.)
Taylor and Francis, London, str. 79-87 (2002)

- 99) Smit, E., Leeflang, P., Wernars, K.: FEMS Microbiol. Ecol. 23, 249-261 (1997)
- 100) Lukow, T., Dunfield, P.F., Liesack, W.: FEMS Microbiol. Ecol. 32, 241-247 (2000)
- 101) Buckley, D.H., Schmidt T.M.: Environ. Microbiol. 5, 441-502 (2003)
- 102) Madigan, T.M., Martinko, M.J., Dunlap, P.V., Clark, D.P.: Microbial Evolution, v knize Brock Biology of Microorganisms,(Cummings B.) Pearson, London, str. 377 (2009)
- 103) Muyzer, G.: Curr. Opin. Microbiol. 2, 317-322 (1999)
- 104) Ferris, M.J., Ward, D.M.: Appl. Environ. Microbiol. 63, 1375-1381 (1997)
- 105) Beier, S., Witzel, K.P., Marxen, J.: Appl. Environ. Microbiol. 74, 188-199 (2008)
- 106) Niemi, R. M., Heiskanen, I., Wallenius, K., Lindstrom, K.: J. Microbiol. Methods 45, 155-165 (2001)
- 107) Griffiths, B.S, Díaz-Raviña, M., Ritz, K., McNicol, J.W., Ebbelwhite, N., Bååth, E.: FEMS Microbiol. Ecol. 24, 103-112 (1997)
- 108) Radajewski, S., Ineson, P., Parekh, N.R., Murrell, J.C. Nature 403, 646-649 (2000)
- 109) Dumont, M.G., Murrell, J.C.: Nat. Rev. Microbiol. 3, 499-504 (2005)
- 110) Stable isotope probing protokol (2011), MI Microbial insights,
<http://www.microbe.com/images/stories/pdfs/SIP.pdf>
- 111) Radajewski, S., McDonald, I.R., Murrell, J.C.: Curr. Opin. Biotechnol. 14, 296-302 (2003)
- 112) Wu, L., Thompson, D.K., Li, G., Hurt, R.A., Tiedje, J.M., Zhou, J.: Appl. Environ. Microbiol. 67, 5780-5790 (2001)
- 113) Wu, L., Thompson, D.K., Liu, X., Fields, M.V., Bugwell, C.E., Tiedje, J.M., Zhou, J.: Environ. Sci. Technol. 38, 6775-6782 (2004)
- 114) Urich, T., Lanzén, A., Qi, J., Huson, D. H., Schleper, C., Schuster, S. C.: PLoS One 3, 2527 (2008)
- 115) Zhou, J., Thompson, D.K.: Curr. Opin. Biotechnol. 13, 204-207 (2002)
- 116) Muttray, A.F., Mohn, W.W.: Wat. Sci. Tech. 37, 89-93 (1998)
- 117) Bertani, G.: J. Bacteriol. 186, 595-600 (2004)
- 118) Hecker, K.H., Green, S.M., Kobayashi, K.: J. Biochem. Biophys. Methods 46, 83 – 93 (2000)
- 119) Birnboim, H.C., Doly, J.: Nucl. Acid. Res. 7, 1513-1523 (1979)

120) Zipper, H., Buta, Ch., Lammle, K., Brunner, H., Bernhagen, J., Vitzthum, F.: Nucl. Acid Res. 31, e39 1-16 (2003)

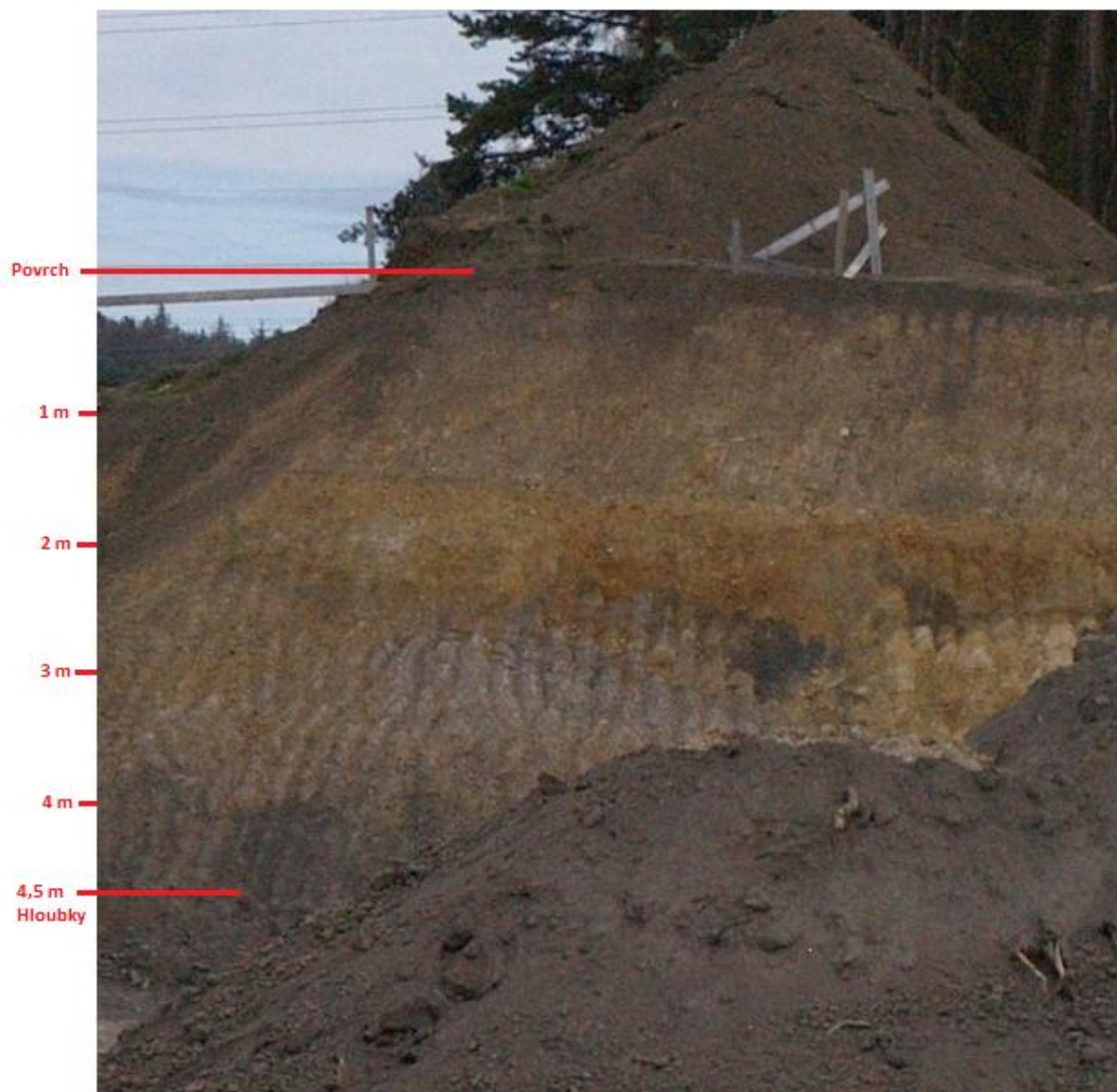
9 Přílohy

Situační fotografie stavby železničního tunelu Osek a půdního horizontu (str.62).
Přesnější popis lokality viz kapitola 4.1.1 (str. 26). Snímek byl pořízen cca 14 dní po odběru vzorků.



- Žlutým bodem je vyznačeno místo odběru vzorků

Fotografie lokality odebíraného půdního horizontu. Snímek byl pořízen 14 dní po uskutečnění odběru vzorků. Vyhodnocení kvalit odebraných vzorků a jejich charakterizace viz kapitola 5 (str. 37).



Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatелů.

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka