

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciálně chemicko-biologické obory

Obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Pavla Průchová

Mikrobiální společenstva v půdě dlouhodobě kontaminované těžkými kovy
Microbial communities of soils affected by long-term heavy metal contamination

Bakalářská práce

Školitel: Ing. Jan Kopecký

Praha, 2012

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 11.05.2012

Podpis

Poděkování:

Ráda bych poděkovala svému školiteli Ing. Janu Kopeckému za cenné rady, ochotu a trpělivost při vzniku této práce a také všem členům v laboratoři, kteří byli ochotni věnovat mi svůj čas a zkušenosti. Velké poděkování patří mojí rodině nejen za ohleduplnost, morální podporu a zázemí, ale také za cenné připomínky při psaní této práce. Děkuji.

Obsah

Prohlášení	2
Poděkování	3
Obsah	4
Abstrakt.....	6
Klíčová slova	7
Seznam zkratk	8
1. Úvod	9
2. Půdní společenstvo	9
2.1. Půdy	10
2.2. Struktura bakteriálního společenstva	12
2.3. Taxonomické zastoupení mikroorganismů	14
2.4. Faktory ovlivňující půdní společenstva	15
3. Kvalita půdy	17
3.1. Kontaminace půdy	18
3.1.1. Kontaminace těžkými kovy	18
4. Analýza mikrobiálního společenstva	19
4.1. Extrakce enviromentální DNA	19
4.2. Terminální polymorfismus délky restričních fragmentů.....	20
5. Materiál	22
5.1. Pomůcky.....	22
5.2. Chemikálie.....	22
5.3. Pufry	23
5.4. Přístroje	23
5.5. Komerční soupravy	23
5.6. Oligonukleotidy	24

6. Metody	24
6.1. Odběr a zpracování vzorků.....	24
6.2. Měření respirace	25
6.3. Izolace chromozomální DNA.....	26
6.4. Elektroforéza	27
6.5. Polymerázová řetězová reakce PCR	27
6.6. Přečištění PCR produktů.....	28
6.7. Štěpení restrikční endonukleasou	29
6.8. Fragmentační analýza	29
7. Výsledky	30
7.1. Měření respirace	30
7.1.1. Měření 1	30
7.1.2. Měření 2.....	31
7.1.3. Měření 3.....	33
7.2. Fragmentační analýza	34
8. Diskuze	35
9. Závěr	36
Použitá literatura	37

Abstrakt

Tato práce se zabývá mikrobiálními společenstvy, žijícími v půdě dlouhodobě vystavené působení těžkých kovů. Ve dvou lokalitách na Příbramsku s odlišným stupněm kontaminace byly provedeny odběry půdy. U vzorků byla změřena respirace *in vitro* po přidavku zdrojů uhlíku a za různé míry zátěže kadmiem, jedním z kovů, jimiž je lokalita kontaminována. Z půdy po inkubaci se zdroji uhlíku a z kontroly bez přidavku byly odebrány vzorky a z nich izolována environmentální DNA. Ze vzorků environmentální DNA byl amplifikován gen kódující 16S rRNA u aktinobakterií, získaný směsný ampikon byl analyzován stanovením polymorfismu délky terminálního restričního fragmentu. Získané profily byly použity ke srovnání aktinobakteriálních společenstev v obou skupinách vzorků půd a v jednotlivých ošetřeních. Analýza ukázala jasné odlišení dvou různě kontaminovaných lokalit a různě výrazné posuny ve složení společenstev po přidání substrátu.

This work is focused on microbial communities living in the soil affected by long-term exposure to heavy metals. The soil was sampled at two sites with different levels of contamination near Příbram. In the samples, respiration rate was measured *in vitro* after addition of carbon sources and at different levels of cadmium, one of the contaminating metals found in the soil. After the incubation with carbon sources, soil samples were collected for environmental DNA isolation. Gene coding for 16S rRNA in *Actinobacteria* was amplified from the environmental DNA samples and the amplicon composition was assessed by terminal restriction fragment length polymorphism analysis. The resulting profiles were used to compare actinobacterial communities in both groups of soil samples and in individual treatments. The analysis showed a clear distinction between the two sites differing in the contamination level and shifts in the community composition of various intensity depending on the added substrate.

Klíčová slova

Actinobacteria

Houby

Těžké kovy

Respirace

Diverzita

Key words

Actinobacteria

Fungi

Heavy metals

Respiration

Diversity

Seznam zkratek

BSA	hovězí sérový albumin
DMSO	dimethyl sulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxyribonukleotid trifosfát
PCR	polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)
rRNA	ribosomální ribonukleová kyselina
T-RFLP	terminal restriction fragment length polymorphism
TAE	Tris-acetát-EDTA pufr
TRF	terminal restriction fragment

1. Úvod

Kontaminace půd je poměrně závažný a často opomíjený problém. Oblasti zamořené nejen těžkými kovy bychom našli na celém světě. Těžké kovy se do půdy dostávají především působením lidské činnosti zejména z průmyslu, ale i hornickou či zemědělskou činností.

Výskyt některých kovů v určité míře je ovšem přirozený, avšak v určitých vyšších koncentracích už mají nemalý dopad na strukturu společenstva v půdě. Problém kontaminace těžkými kovy je, že nemohou být degradovány jako třeba organické znečišťující látky a představuje tak trvalé nebezpečí pro životní prostředí (Tsezos, 2009).

Cílem této práce je analýza mikrobiálního společenstva v půdě dlouhodobě vystaveného působení těžkých kovů. Měřením respirace *in vitro* bych ráda zjistila, zda se od sebe liší společenstva různě kontaminovaných půd a zda se bude lišit jejich respirační aktivita i po přidání různých zdrojů uhlíku a po přidání jednoho z kontaminujících kovů.

Na výsledky této práce bych ráda navázala ve své diplomové práci.

2. Půdní společenstvo

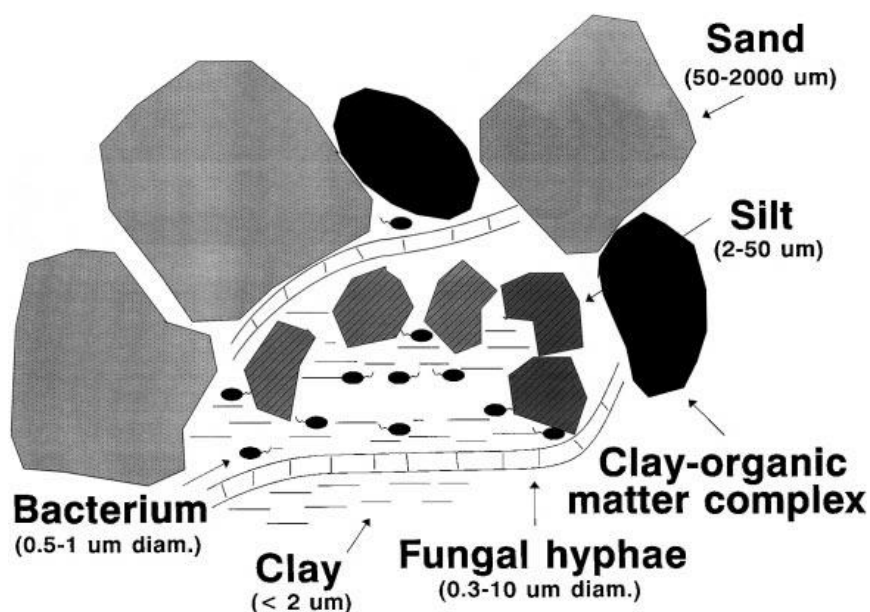
Bakteriální diverzita poskytuje informace o životních procesech a evolučních vztazích (Kennedy, 1999). Bakterie jsou zodpovědné za mnoho biochemických procesů, nezbytných pro udržení života (Price, 1988). Bakteriální rozmanitost je přitom větší než rozmanitost jakékoli jiné skupiny organismů (Kennedy, 1999).

Bakterie jsou zodpovědné za různé metabolické funkce, které mají vliv na půdu a rostliny. Koloběh živin, vznik a rozklad organické hmoty, formování struktury půdy a podpora růstu rostlin patří mezi užitečné funkce, které bakterie vykonávají. Mezi škodlivé účinky naopak patří např. šíření chorob rostlin. Činnost bakterií je důležitá pro zdraví půdy i rostlin (Kennedy, 1999).

Bakteriální společenstva zahrnují komplexní interakce mezi různými organismy. Společenstva a jejich procesy by měla být zkoumána nejen ve vztahu k jednotlivcům, kteří společenstvo tvoří, ale také s ohledem na účinek náhodných vlivů okolního prostředí na tato společenstva (Kennedy, 1999).

Bakterie hrají důležitou roli při tvorbě půdní struktury (*Lynch and Bragg, 1985 in Kennedy, 1999*). Rozkládají komplexní sloučeniny v organických zbytcích na jednodušší sloučeniny. Tento rozklad složitějších látek poskytuje substráty pro jiné mikroby. Organická hmota zlepšuje fyzikální vlastnosti půdy, stabilizuje obsah vody v půdě a dostupnost živin. Působí také jako pojivo půdních částic. Obsah organické hmoty může být udržován přítomností rostlinných zbytků, střídáním plodin a používáním živočišného a zeleného hnojení (*Kennedy, 1999*).

Bakteriální diverzita má rozhodující vliv na fungování ekosystémů, vzhledem k rozmanitosti procesů, za něž jsou bakterie odpovědné, jako například rozklad a koloběh živin, půdní agregace a patogenita. Pro lepší pochopení potřebné úrovně bakteriální diverzity je nutné zvýšit znalost biotické a funkční diverzity společenstev (*Kennedy, 1999*).



Obr. 1 - Znárodnění vztahu půdních bakterií a hub k anorganickým a organickým půdním částicím. Převzato z Kennedy, (1999).

2.1. Půdy

Půdy jsou složité systémy, které se vyvíjí dlouhou dobu prostřednictvím složitých interakcí v závislosti na topografii, podnebí a přítomnosti živých organismů, které mají na půdy nezanedbatelný vliv (*Madigan et al., 2011*).

Půdy lze rozdělit do dvou velkých skupin: Minerální půdy vznikající zvětráváním hornin a dalších anorganických materiálů a organické půdy vytvářené sedimentací

v bažinách a močálech. Na vzniku většiny půd se podílely oba uvedené mechanismy. Přestože minerální půdy převládají ve většině suchozemských prostředí, vzrůstá zájem o roli, kterou hrají organické půdy v ukládání uhlíku. Podrobné porozumění ukládání uhlíku a jeho zdrojů má velký význam pro zkoumání změn klimatu (*Madigan et al., 2011*).

Půdy se skládají minimálně ze čtyř složek. Jsou to anorganické minerální látky (tvoří obvykle 40 % půdního objemu), organická hmota (zpravidla tvoří asi 5 %), dále vzduch a voda (zhruba 50 %) a v neposlední řadě mikroorganismy a makroorganismy, které jsou zastoupeny asi 5 %. Pedologové klasifikují půdní částice na základě velikosti. Ty o průměru 0,1 - 2 mm se nazývají písek, velikost mezi 0,002 a 0,1 mm má prach a menší než 0,002 mm jsou částice jílu. Podle procentuálního zastoupení písku, prachu a jílu se půdy označují jako písčité, prachovité nebo jílovité (*Madigan et al., 2011*).

Ke vzniku půdy přispívají fyzikální, chemické a biologické procesy. Řasy, lišejníky, mechy a vyšší rostliny jsou fototrofní a produkují organickou hmotu. Ta pak podporuje růst chemoorganotrofních bakterií a hub. Složitější chemoorganotrofní společenstva, složená z bakterií, *Archaea* a eukaryot, se pak vyvíjejí přímo úměrně rozsahu společenstva primárních producentů (*Madigan et al., 2011*).

Oxid uhličitý, uvolňovaný při dýchání, se rozpustí ve vodě a vytváří se tak kyselina uhličitá (H_2CO_3), která pomalu rozpouští horniny, a to zejména ty obsahující vápenec (CaCO_3). Navíc mnoho chemoorganotrofních vylučuje organické kyseliny, které rovněž podporují rozpouštění horniny a rozpad na menší částice (*Madigan et al., 2011*).

Zmrazování, rozmrazování a další fyzikální procesy pomáhají utvářet půdu tím, že způsobují trhliny v horninách. V těchto štěrbinách se ukládají nejen částice generované v kombinaci s organickými látkami, ale také surové půdy, a vzniká tak místo potřebné pro zakořenění rostlin. Kořeny rostlin pronikají dál do štěrbin a podporují další praskání horniny. Vylučování kořenů pomáhá vývoji rhizosféry (půdy, která obklopuje kořeny rostlin a přijímá rostlinné sekrety) s vysokým obsahem mikrobiálních buněk. Když rostliny uhynou, jejich pozůstatky přidávají do půdy živiny, které jsou využity pro růst dalších mikroorganismů. Prosakováním vody skrz půdu se některé z těchto látek přenášejí hlouběji do půdního profilu (*Madigan et al., 2011*).

Jak pokračuje zvětrávání, půda se prohlubuje a je tak umožněn růst větších rostlin i malých stromů. Půdní živočichové, např. žížaly, osidlují půdu a hrají tak důležitou roli při promíchávání a provzdušňování svrchních vrstev půdy. Pohyb půdního materiálu směrem dolů vede ke vzniku vrstev půdy, tvořících tzv. půdní profil. Rychlost vzniku

typického půdního profilu závisí na klimatických a dalších faktorech, jeho utváření může trvat stovky až tisíce let (*Madigan et al., 2011*).

Nejrozsáhlejší mikrobiální růst se odehrává na povrchu půdních částic. I jediná částice půdy může obsahovat mnoho různých mikroprostředí, a může tak podpořit růst několika fyziologických typů mikroorganismů. Pro přímé pozorování mikroorganismů na půdní částici se využívá fluorescenční mikroskopie, avšak organismy musí být nejprve obarveny fluorescenčním barvivem. Chceme-li zobrazit konkrétní mikroorganismus, použijeme značenou protilátku nebo genovou sondu. Mikroorganismy mohou být také pozorovány přímo na povrchu půdní částice pomocí rastrovací elektronové mikroskopie (*Madigan et al., 2011*).

2.2. Struktura bakteriálního společenstva

Mikrobiální biomasa tvoří pouze 1 - 3 % půdního organického uhlíku a zabírá pouze 0,001 % půdního objemu (*Grundmann and Gourbiere, 1999*). Přesto, vezmeme-li v úvahu množství 10^3 až 10^4 kg mikrobiální biomasy na hektaru půdy, dojdeme ke zjištění, že půdní mikroorganismy tvoří významnou část celkového objemu biomasy na Zemi (*Fierer et al., 2007*). Složení rostlinného společenstva vyvolává změny v mikrobiální struktuře půdy a koloběhu živin (*Hobbie, 1996*).

Celkovými počty bakterie v půdě převládají nad houbami, které mají svou důležitou roli v procesech počáteční fáze rozkladu rostlinného odpadu (*Urbanova et al., 2011*). Proto houby dominují mikrobiálnímu společenstvu osidlujícímu vrstvu opadu, zatímco v organickém horizontu je množství hub a bakteriální biomasy srovnatelné (*Baldrian et al., 2012*).

Bakterie a zejména houby jsou často výrazně spojeny s konkrétním půdním horizontem. Houbová společenstva mají méně vyrovnané zastoupení jednotlivých taxonů než společenstva bakteriální a vykazují vyšší relativní hojnost dominantních druhů. Zatímco dominantní druhy bakterií jsou rozmístěny po celém sledovaném ekosystému, rozložení dominantních hub je často prostorově omezeno, protože jsou přítomny jen v některých lokalitách (*Baldrian et al., 2012*).

Většina funkcí suchozemských ekosystémů se odehrává v půdě, která poskytuje největší biodiverzitu na Zemi. Přesto pochopení toho, jak jsou funkce ekosystémů ovlivněny půdní biodiverzitou, výrazně zaostává za poznáním, jak těmito funkcím přispívají nadzemní organismy (*Bowker, Maestre and Escolar, 2010*).

Půdy jehličnatých lesních ekosystémů jsou důležité pro globální cyklus uhlíku a identifikace aktivních mikrobiálních rozkladačů je zásadní pro pochopení transformace organické hmoty v těchto ekosystémech (*Baldrian et al., 2012*).

Vývoj bakteriálního společenstva během primární sukcese je formován především vegetací, která společně s proměnou (přechodem) klíčových druhů rostlin povede k nespojitému vývoji bakteriálního společenstva. To bude odrážet místní vegetační rysy určitého stupně sukcese. Relativní význam postupného hromadění organické hmoty a změny v půdní chemii jsou pravděpodobně méně důležité (*Urbanova et al., 2011*).

Z evolučního hlediska jsou bakteriální společenstva v půdě velmi přizpůsobena a omezena selekcí, s nově se vyvíjejícími buňkami v lepším ekologickém stavu, které potlačují huře přizpůsobené konkurenty (*Giovannoni, 2004*).

Mikrobiální diverzita v půdních ekosystémech daleko přesahuje rozmanitost eukaryotických organismů. V jednom gramu půdy se může skrývat až 10 miliard mikroorganismů, patřících možná k tisícům různých druhů (*Rossello-Mora and Amann, 2001*).

Protože méně než 1 % mikroorganismů pozorovaných pod mikroskopem je kultivováno a určeno, půdní ekosystémy jsou do značné míry neprobádané. Mikrobiální diverzita popisuje složitost a variabilitu na různých úrovních biologické organizace. Konkrétně to třeba zahrnuje genetickou variabilitu uvnitř taxonů a počet a relativní četnost taxonů a funkčních skupin ve společenstvech (*Johnsen et al., 2001, Kozdroj and van Elsas, 2001*).

Bakterie jsou všudypřítomné a rozmanité jak ve svém měřítku, tak v extrémnosti podmínek, ve kterých žijí. Bakteriální diverzita je také spojována se značnou funkční rozmanitostí. Počínaje formováním struktury půdy přes koloběh živin až po degradaci vzácných substrátů a xenobiotik. Skutečnost, že dosud známe poměrně malou část půdních bakterií (pouze 1 - 10 %), vede k novým studiím této problematiky včetně posouzení vlivu škodlivých látek (*Dejonghe et al., 2000*).

K dispozici máme stále více přesvědčivých důkazů o tom, že územní organizace je zásadním faktorem ovládajícím druhovou dynamiku a biodiverzitu mnoha společenstev. Genetické rozdíly se mohou zvyšovat s geografickou vzdáleností, protože jak environmentální změny, tak s tím spojené selektivní účinky se stávají více heterogenními ve velkých vzdálenostech (*Diniz and Telles, 2000*).

Počet bakteriálních buněk nebo jejich koncentrace jsou obvykle vztahovány na gram půdy. To nám avšak neposkytuje žádnou informaci o tom, zda jsou buňky

seskupeny v koloniích na jednom místě nebo jsou-li distribuovány v celém půdním objemu. Poznatky o prostorové distribuci jsou však důležité při odhadu pravděpodobnosti setkání bakterií se substrátem (Grundmann, 2004).

2.3. Taxonomické zastoupení mikroorganismů

Na vyšší taxonomické úrovni vykazuje půda pozoruhodně stabilní struktury společenstva, v nichž naprostá většina klonů vždy patří mezi devět hlavních kmenů bakterií: *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Acidobacteria*, *Chloroflexi*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Planctomycetes*, *Verrucomicrobia* a *Gemmatimonadetes* (DeSantis et al., 2006b, DeSantis et al., 2006a).

Proteobacteria tvoří téměř polovinu z celkového počtu získaných půdních klonů. *Acidobacteria* a *Bacteroidetes* jsou také bohatě zastoupené skupiny. Zástupců kmenů *Actinobacteria* a *Firmicutes* je méně. Hlavní část půdních genotypů tvoří nezařazené druhy nebo členové menších bakteriálních skupin. To podtrhuje vysokou bakteriální diverzitu, typickou pro půdní ekosystémy. Na rozdíl od bakterií je rozmanitost *Archaea* v půdě minimální. Hlavními kmeny *Archaea* jsou *Euryarchaeota* a *Crenarchaeota* (Madigan et al., 2011).

Studie, prováděná v uhlovodíky znečištěné oblasti ukázala, že taxonomické zastoupení ve znečištěné půdě je podobné. *Proteobacteria* tvoří největší frakci v obou typech půd, následuje významné zastoupení kmenů *Acidobacteria*, *Bacteroidetes* a *Actinobacteria* a *Firmicutes*. Nicméně významný je posun v podílu zastoupení těchto taxonů. Znečištěné půdy jsou obohaceny o *Actinobacteria* a *Euryarchaeota*, ale zmenšil se v nich podíl *Bacteroidetes*, *Acidobacteria* a nezařazených skupin bakterií. Pozoruhodné je, že *Crenarchaeota* nebyla v uhlovodíky znečištěných půdách nalezena, což naznačuje, že znečišťující látky tuto skupinu eliminovaly (Madigan et al., 2011).

Vliv znečištění uhlovodíky byl více patrný u nižších taxonomických skupin. Znečištěné půdy obsahovaly větší podíl *Gammaproteobacteria* a jen jeden dominantní genotyp *Bacteroidetes*. Naproti tomu neznečištěná půda obsahovala několik fylogentypů *Bacteroidetes*. Také rozmanitost *Acidobacteria* je významně nižší ve znečištěných půdách. I když funkční význam pozorovaného rozdílu v diverzitě mikrobiálního společenstva v znečištěných půdách proti neznečištěným je zatím neznámý, bylo

zjištěno, že znečištěné lokality se pravděpodobně liší při procesu zpracování uhlíku a dusíku a při zpracování živin (*Madigan et al., 2011*).

Různé studie půd zaměřené na zkoumání genu pro 16S rRNA se shodovaly ve dvou bodech: 1) Nenarušené neznečištěné půdy podporují velmi vysokou rozmanitost prokaryot. 2) Odchytky v půdě způsobují měřitelné posuny ve složení společenstva - pravděpodobně směrem k druhům, které jsou konkurenceschopnější v narušeném půdním prostředí – a celkovou redukcí diverzity prokaryot (*Madigan et al., 2011*).

Aktinobakterie tvoří vlákna, která propojují půdní částice. Rovněž extracelulární polysacharidy tvořené bakteriemi vážou půdní částice a pomáhají tak budovat půdní strukturu. Huminové látky akumulované v půdě tvoří rekalitrantní organickou hmotu a pomáhají tak agregovat půdu. Tento proces snižuje erozi půdy, umožňuje dostatečné pronikání vody a udržuje půdu provzdušněnou. Agregace půdy může být zvýšena přidáním rostlinných zbytků, což vede ke zvýšení bakteriální aktivity (*Gilmour, Allen and Truog, 1948 in Kennedy, 1999*).

Aktinobakterie jsou známy jako producenti různých antibiotik, která lze použít k léčbě lidských i zvířecích nemocí (*Nolan and Cross, 1988 in Kennedy, 1999*). Také produkují chemické látky, které mohou buď podporovat, nebo omezovat růst jiných organismů, jako například thiamin, riboflavin, vitamín B12, různé porfyriny a železo obsahující sloučeniny (*Santos et al., 1976 in Kennedy, 1999*).

Bylo zjištěno, že distribuce a relativní četnost actinobacterií je spojena s pH půdy a s nedostatkem vlhkosti (*Lauber et al., 2009*). Jejich zastoupení (počet) se zvyšuje s obsahem půdního dusíku (*Ramirez et al., 2010*). V důsledku toho by mohlo actinobacterialní společenstvo odrážet místně specifické vlastnosti vztahující se k lokálně se vyskytujícím rozkladným drahám (*Anderson and Parkin 2007, Sagova-Mareckova et al., 2011*).

Funkční diverzita zahrnuje velikost a kapacitu půdních společenstev, která jsou zapojena v klíčových rolích, jako jsou cykly živin, rozklad různých sloučenin a další transformace (*Zak et al., 1994 Kennedy, 1999*).

2.4. Faktory ovlivňující půdní společenstva

Pro mikroorganismy v půdě jsou nezbytné živiny a další minerální látky. Některé látky jsou rozpuštěny ve vodě. V dobře odvodněné půdě vzduch rychle proniká do půdy

a koncentrace kyslíku v půdním roztoku mohou být vysoké, podobně jako na povrchu půdy. V podmáčených půdách, kde je však jediný přítomný kyslík rozpuštěný ve vodě, tyto zásoby mohou být rychle spotřebovány mikroflórou. Půdy se pak stávají anoxické a vykazují hluboké změny v jejich biologické aktivitě (*Madigan et al., 2011*).

Dalším významným faktorem, který ovlivňuje mikrobiální aktivity, je rozsah zdrojů přítomných v půdě. Největší mikrobiální aktivita je ve vrstvách bohatých na organické látky, a to zejména v rhizosféře. Počet a aktivita mikroorganismů závisí do značné míry na druhu a množství přítomných živin. Limitujícími živinami v půdě jsou anorganické látky, jako třeba fosfor, dusík. Za klíčové komponenty je považováno i několik tříd makromolekul (*Madigan et al., 2011*).

Chemické vlastnosti rostlinných vstupů ovlivňují struktury mikrobiálního společenstva, protože určité typy opadu mohou selektovat jednotlivé skupiny mikroorganismů, které disponují příslušnými katabolickými drahami pro jejich rozklad (*Paterson et al., 2008*).

Stabilita půdy může být řízena přidáváním různých doplňků, které mají stimulovat bakteriální aktivitu (*Jordahl and Karlen, 1993*).

Mikrobiální společenstvo reaguje nejen na přidaný rostlinný substrát, ale také na chemické podmínky půdy změnou své struktury a rychlosti obratu biomasy (*Kogel-Knabner, 2002*).

Bakterie jsou citlivé na rušivé vlivy, které tam jsou zaváděny díky zemědělství, znečištění a dalšími stresory (*Elliott and Lynch, 1994*). Porozumění vlivu narušitelů půdní bakteriální rozmanitosti a jejich fungování může výrazně přispět k porozumění kvalitě půdy a udržitelnému rozvoji agrosystémů (*Thomas and Kevan, 1993*).

Také pH půdy může sloužit jako integrující proměnná v procesech v půdě (*Lauber et al. 2009*). Změny pH v půdě a obsahu živin mohou ovlivnit rozklad omezením růstu nebo aktivity mikrobiálních rozkladačů (*Berg, 2000*), ale také může ovlivnit strukturu rostlinných společenstev, která naopak určuje charakter organické hmoty (*Bardgett, 2005*).

Bakteriální společenstvo a jeho funkce v ekosystému je ovlivněno kořenovým systémem a půdním prostředím, včetně minerálních vod a organického materiálu. Rhizosféra je objem zeminy pod přímým vlivem kořenů (*Curl and Truelove, 1986 in Kennedy, 1999*). V této oblasti je stimulována činnost bakterií, protože kořeny a klíčící osivo poskytují živiny (*Rouatt and Katznelsona, 1961 in Kennedy, 1999*). Rozpadající se kořenové systémy také mohou fungovat jako zdroj živin pro okolní

mikroorganismy (*Swinnen et al., 1995*). Organismy reagující na zdroj těchto živin budou dominovat v rhizosféře (*Christensen, 1989*). Četnost bakterií se snižuje se vzdáleností od kořenů (*Yeates and Darrah, 1991*).

Bakterie jsou metabolicky velmi různorodé, používají mnoho různých druhů zdrojů energie a uhlíku. Tradičně jsou řazeny do širokých kategorií na základě jejich způsobu získávání uhlíku a energie. Podle způsobu získávání energie to jsou fototrofové a chemotrofové a podle způsobu získávání uhlíku je dělíme na autotrofní, heterotrofní a litotrofní. Bakterie také byly charakterizovány podle médií, ve kterých rostou (*Walker, 1992*). Některé půdní mikrobiologické vlastnosti, jako je enzymatická aktivita nebo respirační činnost či obsah mikrobiální biomasy se používají jako bio-indikátory kvality a zdraví půdy v oblasti monitoringu půdního prostředí (*Roger and Li, 1985 in Kizilkaya et al., 2004*).

Bazální půdní respirace půdní mikroflóry poskytuje užitečné informace o fyziologickém stavu půdního ekosystému, i když je to otázkou diskuze. Tato respirační aktivita bere v úvahu využívání energie ze strany mikroflóry a vyjadřuje účinnost odbourávání organického uhlíku u půdních *mikroorganismů* (*Wardle a Ghani, 1995*).

Krajina má vliv na distribuci a rozmanitost výběru bakterií (*Turco and Bezdicek, 1987 in Kennedy, 1999*). Bakteriální společenstvo a jeho aktivita klesají s hloubkou v půdním profilu. Metabolicky aktivní a různorodá společenstva byla nalezena i ve velkých hloubkách, i přes limitaci nedostatkem uhlíku (*Fredrickson et al., 1991*).

3. Kvalita půdy

Aktuální zájem o hodnocení kvality půdy byl způsoben zvýšením povědomí o půdě jako součásti zemské biosféry. Půda hraje roli nejen při výrobě potravin a vlákniny, ale také v udržování kvality životního prostředí (*Beiderbeck et al., 1987*).

Kvalita půdy je definována jako schopnost půdy fungovat v rámci ekosystému pro zachování biologické hranice produktivity, zachování kvality životního prostředí a podpoření zdravých rostlin a živočichů (*Doran et al., 1994*). Společenstva půdních organismů jsou významnou složkou kvality půdy, mikroorganismy hrají zásadní roli v úrodnosti půdy a primární produkci prostřednictvím rozkladu organické hmoty a koloběhu živin (*Alexander, 1977 in Kizilkaya et al., 2004*).

Jednotlivé fyzikálně-chemické faktory (např. pH, obsah organického uhlíku, obsah jílu a struktura, celková stabilita), biologické faktory (např. společenstva, pozitivní a negativní interakce mezi organismy) a znečišťující látky (např. těžké kovy, xenobiotika) mohou ovlivnit chování mikroorganismů v půdě (*Visser and Parkinson, 1992*). Současné měření činnosti mnoha enzymů v půdě může být vhodnější pro odhad celkové mikrobiální aktivity a jeho reakce na šíření znečištění a životní prostředí napětí, než je stanovení aktivity jednoho enzymu (*Nannipieri et al., 1990*).

Hodnocení kvality půdy je často založeno na fyzikálně-chemických parametrech, a to především z údajů o znečištění půdy, bez ekotoxikologických a mikrobiologických vyšetření (*Plaza et al., 2010*).

Je velmi obtížné stanovit vztah mezi rozsahem negativních vlivů na půdní vlastnosti a obsahem znečišťujících látek. Fyzikálně-chemické rozborů samy o sobě neposkytují informace o dopadu na ekosystém, ale jsou velmi užitečné pro odhad nebezpečí představovaného znečišťujícími látkami (*Plaza et al., 2010*).

3.1. Kontaminace

Anorganické a organické polutanty mají významný dopad na mikrobiální struktury společenstva a funkční rozmanitost (*Liao and Xie, 2007*).

Studie prováděné na třech kontaminovaných lokalitách v Polsku, kde byla prokázána přítomnost vysokého počtu životaschopných heterotrofních mikroorganismů, svědčily o přizpůsobení mikroorganismů kontaminujícím látkám (*Plaza et al., 2010*).

Ionty kovů se přirozeně vyskytují v horninách, půdě, vodě i atmosféře, nicméně některé z těchto kovů jsou toxické, nejen rtuť, olovo, arsen a kadmium, ale například i selen (*Madigan et al., 2011*).

3.1.1. Kontaminace těžkými kovy

Kontaminace půdy těžkými kovy je často výsledkem antropogenní činnosti. Na rozdíl od organických znečišťujících látek, těžké kovy nemohou být degradovány a mohou tak představovat přetrvávající nebezpečí pro životní prostředí. Z dlouhodobého působení těžkých kovů na půdní mikroorganismy plynou nepříznivé účinky na mikrobiální činnost a hojnost a změny mikrobiálních společenstev (*Tsezos, 2009*).

V posledních desetiletích má lidská činnost vliv na stále se zvyšující množství těžkých kovů v oběhu v životním prostředí (*Ma and Rao, 1997*). Kontaminace půd těžkými kovy je největším problémem vzhledem k jejich toxicitě. Na půdách kontaminovaných těžkými kovy, kde zdrojem kontaminace byly produkty lidské činnosti, jako jsou průmyslové odpady, automobilové emise, hornická činnost či zemědělské postupy (např. čistírenské kaly, hnojiva a pesticidy), bylo provedeno mnoho studií (*Dudka and Adriano, 1997*).

Četné laboratorní studie prokázaly účinky těžkých kovů na mikrobiologické vlastnosti půdních ekosystémů. Půdní mikrobiální aktivita a její produkty, jako například enzymy, ukazují značné rozdíly způsobené jejich citlivostí k toxicitě těžkých kovů (*Giller et al., 1998, Baath 1989*). S rostoucím obsahem těžkých kovů klesá bazální půdní respirace (*Kizilkaya et al., 2004*).

4. Analýza mikrobiálního společenstva

Hlavními technikami používanými pro analýzu mikrobiálních společenstev jsou polymerázová řetězová reakce (PCR), analýza DNA fragmentů pomocí gelové elektroforézy (DGGE, T-RFLP, Arisa) nebo molekulární klonování a sekvenování DNA. Při PCR reakci můžeme z jedné kopie genu vyrobit až několik milionů kopií (*Madigan et al., 2011*).

Rychlá analýza rozmanitosti v komplexních mikrobiálních společenstev zůstává nepolapitelným, ale zároveň důležitým cílem v mikrobiální ekologii (*Dunbar et al., 2000*). Nedostatky metod, které závisejí na kultivaci, jsou dobře známy. Přímá amplifikace bakteriálních genů kódujících 16S rRNA z izolované půdní DNA poskytuje nejkompexnější a flexibilní způsob vzorkování bakteriálního společenstva, ale navazující metody, které jsou účinné v analýze společenství, jsou stále velmi omezeny v počtu a rozsahu (*Dunbar et al., 2001*).

4.1. Extrakce environmentální DNA

V typických experimentech analýzy společenstev je izolována celková DNA z mikrobiálního společenstva. Komerčně jsou k dispozici soupravy, jejichž výtěžkem je vysoce čistá DNA z půdy a dalších komplexních vzorků (*Madigan et al., 2011*).

Extrakce DNA je zásadním krokem při přípravě vzorků. Bylo prokázáno, že nedostačující extrakční postup může změnit výtěžek environmentální DNA a vést tak k nereprezentativním T-RFLP profilům (*Kopecky et al., 2009*).

Na čistotu a celkové výtěžky izolované DNA má vliv použitá metoda extrakce a také typ půdy, ze které je DNA izolována, zejména obsah jílu, který výtěžek snižuje. S tím souvisí i pH půdy, především nízké pH má vliv na výtěžnost metod. Dále mohou mít vliv na výtěžky DNA různé vlastnosti půdy nebo například vegetační pokryv či obsah vody (*Sagova-Mareckova et al., 2008*). Další úpravy a přečištění (purifikace) zlepšují kvalitu izolované DNA (*Sagova-Mareckova et al., 2008*).

DNA purifikace je kritickým krokem při izolaci půdní DNA, po vyřešení problému s lyzí (*Roose-Amsaleg, Garnier-Sillam and Harry, 2001*).

Další úhel pohledu, jak vysvětlit různé výtěžky DNA, může být spojen s citlivostí jednotlivých metod při posuzování mikrobiálních společenstev. Různé metody mohou postihovat různé části bakteriálních společenstev, DNA z různých taxonů může být uvolňována v různé míře a tudíž výtěžek a reprezentativnost vzorku mohou být ovlivněny specifitou metody (*Kauffmann, Schmitt and Schmid, 2004*).

Rozdíly ve výtěžcích DNA lze vysvětlit i přítomností jiných organismů než bakterií a opět různou citlivostí příslušných metod při izolaci DNA (*Sagova-Mareckova et al., 2008*). Pokles výtěžků DNA může být způsoben vazbami DNA na částice. Částičky jílu, ale také humusu, jsou záporně nabitě a váží a vyměňují nejen kationty, ale i řadu dalších látek (*Buscot, 2005*).

4.2. Terminální polymorfismus délky restrikčních fragmentů

Terminální polymorfismus délky restrikčních fragmentů, zkráceně T-RFLP, je popisován jako ceněná metoda pro porovnávání komplexních společenstev, když je požadována vysoká výkonnost a citlivost bez nutnosti přímé informací o sekvenci (*Nocker, Burr and Camper, 2007*).

Je to metoda založená na změně v pozici restrikčních míst mezi sekvencemi v důsledku mutací a stanovení délky fluorescenčně označených terminálních restrikčních fragmentů (TRFs) s vysokým rozlišením gelové elektroforézy na automatizovaných DNA sekvenátorech (*Avanissaghajani et al., 1994, Liu et al., 1997*).

T-RFLP nabízí možnost porovnat získané údaje s daty uloženými v sekvenčních databázích, nebo s údaji z jiných studií (*Kopecky et al., 2009*).

Analýza jednotlivých 16S rRNA genových klonů v mnoha knihovnách je drahý a neefektivní přístup při studiu bakteriálních společenstev. Takže metody, jako je tepelná nebo denaturační gradientová gelová elektroforéza (TGGE, DGGE), heteroduplexní analýza nebo T-RFLP analýza jsou používány v hodnocení rozmanitosti 16S rRNA, protože jsou mnohem rychlejší, a tudíž přístupnější pro experimenty v polním měřítku, ve kterých je replikace důležitá (*Dunbar et al., 2000*).

Profil společenstva vychází ze selektovaného genu buď kódujícího 16S (18S) rRNA pro taxonomické profilování nebo z genu kódujícího protein, aby sledoval specifickou funkci dosaženou společenstvím, např. asimilaci dusíku, humifikaci a mineralizaci, nebo produkci sekundárních metabolitů a rezistenci (*Cermak et al., 2008*).

Výsledky této metody jsou ovlivněny počáteční PCR amplifikací, která mění původní zastoupení forem vybraného genového markeru a může vést ke ztrátě genových typů o nízké frekvenci výskytu. Nicméně totéž platí pro většinu metod s výjimkou metagenomických knihoven a metody Geochip (*He et al., 2007*), protože pouze tyto metody používají přímo vzorek celkové environmentální DNA bez amplifikace, a tedy v reálném poměru. Přesto jejich provedení je velmi časově náročné a nákladné, a také jejich detekční limity jsou podstatně vyšší. TRF profily neposkytují spolehlivé informace popisující relativní četnost a rovnoměrnost zastoupení genotypů (*Dunbar et al., 2000*).

Měření délky TRF v sekvenátoru poskytuje kontinuální data, zatímco délka sekvence DNA je diskrétní proměnnou, takže transformace vede k chybám v identifikaci některých délek fragmentů (*Marsh, 1999*). Vzhledem k náhodnému charakteru výskytu restrikčního místa v sekvenci data nenásledují v žádné hierarchii, tj. velikost TRF představuje jeden izolovaný prvek a podobnost velikosti TRF nenaznačuje jakýkoliv stupeň sekvenční homologie. Nicméně, T-RFLP analýza má také řadu výhod v porovnání s jinými postupy analýzy DNA (*Marsh, 1999*).

Metoda TRF by měla být především pro rychlou analýzu opakovaných vzorků u studií v polním měřítku (*Dunbar et al., 2000*).

5. Materiál

5.1. Pomůcky

umělohmotné trubky - 4 centimetry

síto – otvory asi 2 mm

5.2. Chemikálie

Tab. 5.1. - Přehled použitých chemikálií

název chemikálie	výrobce/dodavatel	zkratka
fenol	MP Biomedicals	
chloroform	Lach:ner	
isoamylalkohol	PENTA	
chlorid sodný	Sigma	
hexadecyl-trimethyl-ammonium bromid	Sigma	
octan sodný	Sigma	
isopropylalkohol	PENTA	
etanol	PENTA	
chlorid vápenatý	Sigma	
Hepes	Sigma	
Agarosa for routine use	Sigma	
SYBR Safe DNA gel stain	Invitrogen	
PCR vkládací pufr Yellow load	Top-Bio	
GeneRuler 1 kB plus DNA ladder	Fermentas	
dimethyl sulfoxid	Top-Bio	DMSO
Purified BSA 100× (10mg/ml)	BioLabs	BSA
10× DreamTaq Buffer	Fermentas	
dATP	Promega	
dTTP	Promega	
dCTP	Promega	
dGTP	Promega	
DreamTaq DNA Polymerase	Fermentas	
primer FAM16Seu27f	Eurogemtec	
primer 16sact1114r	Sigma	
Tris (hydroxymetyl) aminometan	SERVA	Tris
restrikční endonukleasa <i>AluI</i>	BioLabs	
NEBuffer2	BioLabs	
hydroxid sodný	Sigma	NaOH
glukosa	Sigma	

celobiosa	Sigma
sláma	
celulosa	Sigma
hexahydrát dusičnanu kademnatého	Sigma

5.3. Pufry

Tab. 5.2. - Složení použitých pufřů

název pufru	složení (výrobce)	pH
Müllerův	50mM NaH ₂ PO ₄	8
extrakční pufr	50mM NaCl	
	500mM Tris-HCl	8
Tris-acetát-	40 mM Tris/Tris-CH ₃ COOH	8
EDTA pufr	(Sigma)	
(TAE)	1mM EDTA (Sigma)	

5.4. Přístroje

Měřicí hlavice - System OxiTop® Control

běžné laboratorní váhy

Homogenizátor – Bead Beater (BioSpec Products, Bartlesville, OK)

Centrifuga 5418 (Eppendorf)

Centrifuga 5415R (Eppendorf)

Speed Vac – centri vap

Termocykler – C1000 Thermal Cycler (BIORAD)

UV lampa a fotoaparát – Syngene InGenius (PC software dodaný taktěž firmou Syngene)

5.5. Komerční soupravy

Přechišťení izolované DNA - GENE CLEAN® Turbo Kit (MP Biomedicals, Solon, USA)

Přechišťení PCR produktů - QIAquick® PCR purification kit (QUIAGEN, Hilden, Germany)

Odsolení směsi fragmentů DNA po štěpení - SigmaSpin Post-Reaction Clean-Up Columns (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

5.6. Oligonukleotidy

primer	Sekvence (5'→3')	výrobce
FAM16Seu27f	AGAGTTTGATCMTGGCKCAG	Eurogemtec
16sact1114r	GAGTTGACCCCGGCRGT	Sigma

6. Metody

6.1. Odběr a zpracování vzorků

Lokalita, kde byly odebírány vzorky, se nachází v těsné blízkosti města Příbram. V závislosti na vzdálenosti místa odběru od pozemku společnosti Kovohutě Příbram byly vybrány 2 lokality s různým stupněm zamoření. Lokalita č. 1 (L1) se nachází na louce těsně vedle pozemků společnosti v obci Nové Podlesí a tudíž je zde podíl těžkých kovů větší než v lokalitě č. 4 (L4), která leží na louce nedaleko obce Obecnice. Přesné souřadnice všech odběrových lokalit jsou uvedeny v tab. 6.1., mapa odběrových míst je znázorněna na obrázku 6.1.

Tab. 6.1. – Souřadnice odběrových míst

lokalita	souřadnice
Louka1	N49 42.327 E13 58.516
Louka2	N49 42.361 E13 58.430
Louka3	N49 42.403 E13 58.280
Louka4	N49 42.243 E13 56.371

Obr. 6.1. – Mapa odběrových míst



Odběr byl proveden ve vybraných lokalitách č. 1 a č. 4 pomocí umělohmotných trubek, které byly zaraženy zhruba 20 centimetrů do země a následně vytaženy. Byl tak odebrán vzorek organického horizontu bez svrchní vrstvy odpadu.

Půdní profil byl v laboratoři vyjmut z trubek. Byla odstraněna horní vrstva s kořínky a jinými zbytky rostlin. Půda byla přesáta přes síto, aby byly odstraněny kamínky a jiné větší částice přítomné v půdě.

6.2. Měření respirace

Půda byla odvážena do skleněných 250 ml lahví, do každé lahve zhruba 50 g půdy. Do odvážených vzorků byly přidány různé substráty, případně různé koncentrace kadmia, pro každou sérii vzorků byly použity jiné substráty (přehled substrátů je vždy uveden u každého konkrétního měření). Poté byly na lahve nasazeny měřící hlavice OxiTop®-C. Měření probíhalo v termostatu při teplotě 12 °C po dobu 14 dnů. Po uplynutí 14 dnů byly odečteny výsledky a následně zpracovány v tabulkovém editoru Microsoft Office Excel.

Celkem byla provedena tři různá měření respirace. V každém běhu reakce byly použity jiné přidání substráty a zároveň stejný substrát byl použit v několika opakováních, aby byly eliminovány chyby vzniklé při zpracování vzorků.

6.3. Izolace chromozomální DNA

Do 1,5 ml zkumavek bylo naváženo 0,25 g skleněných kuliček o průměru 0,1 mm a 0,25 g o průměru 0,5 mm. Zkumavky byly vysterilizovány v autoklávu při 121 °C po dobu 20 minut. Do zkumavek s kuličkami bylo přidáno 0,5 g vzorků půdy. Následně bylo do směsi ve zkumavkách přidáno 600 μl Müllerova extrakčního pufru a 300 μl směsi Fenol/Chloroform/Isoamylalkohol v poměru 25:24:1. Vzorky byly homogenizovány 90 sekund při 2500 rpm. Poté byly vzorky centrifugovány 2 minuty při 12000 rpm. Do čistých zkumavek byl odebrán supernatant. Do původních zkumavek bylo přidáno 300 μl Müllerova extrakčního pufru a vzorky byly opět homogenizovány, ale tentokrát pouze 30 sekund při 2500 rpm. Následně byl obsah zkumavek stočen v centrifuze po dobu 2 minut při 12000 rpm a oddělený supernatant byl přidán k již získanému supernatantu.

K supernatantu byl přidán jedenkrát takový objem, jako byl objem vzorku ve zkumavce, směsi fenol/chloroform (1:1). Zkumavky byly důkladně promíchány a centrifugovány 5 minut při 6000 rpm. Byl odebrán supernatant, ke kterému byl přidán jedenkrát takový objem chloroformu. Opět byly vzorky pečlivě promíchány a centrifugovány 5 minut při 6000 rpm. Znovu byl odebrán supernatant, který byl zahřát na teplotu 65 °C. Následně byl přidán 5M NaCl do výsledné koncentrace 1,5 M a 10% CTAB do výsledné koncentrace 1%. Směs byla inkubována 30 minut při 65 °C a následně ochlazená na ledu zhruba na 20 °C. V dalším kroku byl přidán jedenkrát takový objem chloroformu, vzorky byly promíchány a centrifugovány 15 minut při 4500 rpm a byla odebrána vodná fáze. Poté k ní byla přidána 1/10 objemu 3M octanu sodného (pH=5) a 0,6 objemu isopropylalkoholu, vzorky byly promíchány a ponechány 30 minut při laboratorní teplotě. Po inkubaci byly stočeny v centrifuze vychlazené na 4 °C 20 minut při 10000 rpm. Byl slit supernatant, ve zkumavce zbyla pouze peleta DNA, která byla převrstvena 50 μl vychlazeného 80% ethanolu, aby se promyla. Znovu byly vzorky centrifugovány při 4 °C po dobu 5 minut a při 10000 rpm. Byl slit etanol, peleta byla vysušena při 40 °C ve Speed Vacu (vakuový vysoušeč) a rozpuštěna v 50 μl destilované vody. Vzorky byly inkubovány 60 minut v teplotě 65 °C. Byl přidán jedenkrát takový objem roztoku 1M CaCl₂ v 1M Hepes a vzorky byly inkubovány 30 minut při laboratorní teplotě.

Po inkubaci byla izolovaná DNA přečištěna pomocí GENE CLEAN Turbo kit a uchována při teplotě -20 °C.

6.4. Elektroforéza

Elektroforéza byla použita několikrát během celé praktické části. Nejprve ke zjištění, zda byla vůbec chromozomální DNA izolována a k odhadu množství DNA pro PCR reakci, dále po PCR reakci ke zjištění správného průběhu reakce a také po purifikaci k odhadu množství pro štěpení restriční endonukleázou.

Vždy byl připraven 1% agarový gel – agaróza byla v mikrovlnné troubě roztavena v TAE pufru. Do gelu bylo přidáno barvivo SYBER Green (v DMSO v poměru 1:9). Gel byl nalit do vaničky a ponechán asi 30 minut, dokud neztuhl. Poté byl vložen do elektroforézové aparatury s TAE pufrům. Do jamek byly nanесeny vzorky DNA smíchané s PCR vkládacím Yellow load pufrům (1 μ l DNA + 0,7 μ l pufru). Jako marker byl použit GeneRuler 1 kB plus DNA ladder. Aparatura byla připojena ke zdroji tak, aby byl gel orientován od záporné elektrody ke kladné – 95V a 95 mA. Elektroforéza probíhala, dokud oranžová barva pufru nedoputovala téměř na konec gelu. Následně byl gel prohlédnut pod UV zářením a byly pořízeny snímky.

6.5. Polymerázová řetězová reakce PCR

Pro všechny vzorky najednou byla připravena směs pro reakci PCR. Z připravené směsi (tab. 6.2.) bylo do mikrozkuvek odebráno 49 μ l a těsně před spuštěním reakce byla přidána izolovaná DNA. Množství DNA bylo odhadnuto z elektroforézového gelu tak, aby bylo přibližně 100 ng v každé reakci. Poté byly mikrozkuvky vloženy do termocycleru – program T-RFLP (tab. 6.3.)

Tab. 6.2. - Reakční směs pro PCR reakci

chemikálie	objem	ředění
dH ₂ O (sterilní)	31,5 μ l	
DreamTaq buffer	5 μ l	
BSA	3 μ l	
DMSO	2,5 μ l	
dNTP	2 μ l	10x ředění ve vodě
Primer F: FAM16Seu27f	2 μ l	10x ředění ve vodě
Primer R: 16Sact1114r	2 μ l	10x ředění ve vodě
DreamTaq polymerasa	1 μ l	

Tab. 6.3. - Protokol termocycleru pro program TRFLP

teplota	čas	počet opakování
94 °C	5 minut	1×
94 °C	1 minuta	
57 °C	50 sekund	35×
	1,5	
72 °C	minuty	
72 °C	5 minut	1×

6.6. Přečištění PCR produktů

Přečištění bylo provedeno podle protokolu komerční soupravy QIAquick PCR Purification Kit – PCR Purification Spin protokol.

K produktu PCR byl přidán 5× takový objem PB pufru s pH indikátorem. Indikátor je v pufru obsažen pro kontrolu pH, které by mělo být neutrální. Obsah zkumavek byl promíchán a jejich obsah přenesen na speciální kolonky. Poté byly vzorky centrifugovány 1 minutu při 14 000 rpm. Byl vylit obsah sběrných zkumavek a do kolonek bylo přidáno 750 μ l PE pufru. Vzorky byly stočeny v centrifuze po dobu 1 minuty při 14 000 rpm. Byl vylit obsah sběrných zkumavek a ještě jednou byly vzorky stočeny za stejných podmínek, aby se odstranil veškerý zbylý pufr. Poté byly kolonky přendány do čistých zkumavek a na filtr kolonky bylo nanášeno 50 μ l Tris/HCl

pH 8. Vzorčky byly ponechány zhruba 5 minut při laboratorní teplotě a následně centrifugovány 1 minutu při 14 000 rpm. Přečištěné vzorčky pak byly uloženy při teplotě - 20 °C.

6.7. Štěpení restriční endonukleasou

Po přečištění vzorků, byla provedena elektroforéza, podle intenzity vzorku v gelu bylo odhadnuto množství DNA v 1 µl vzorku. Pro štěpení restriční endonukleasou pak bylo použito takové množství vzorku, rovnající se přibližně 200 ng DNA. Toto množství DNA bylo odpipetováno do čisté mikrozkušavky, byly přidány 2 µl pufru NEBuffer2, pak bylo přidáno 0,5 µl restričního enzymu *AluI*, který byl naředěný v 1,5 µl NEBuffer2 pufru. Vzorek byl doplněn destilovanou sterilní vodou do 50 µl. Vzorčky byly inkubovány 120 minut při 37 °C. Poté bylo přidáno dalších 0,5 µl restričního enzymu *AluI*, opět naředěného v 1,5 µl NEBuffer2 pufru. Vzorčky byly znovu inkubovány při 37 °C dalších 120 minut. Reakce byla zastavena zvýšením teploty na 65 °C po dobu 20 minut. Následně byly všechny vzorčky odsoleny na kolonkách komerční sady SigmaSpin Post-Reaction Clean-Up Columns.

6.8. Fragmentační analýza

Fragmentační analýza byla provedena firmou Genomac International, s.r.o. (Praha, ČR) na kapilárním sekvenátoru (Applied Biosystems, Foster City, CA). Data byla zpracována v tabulkovém editoru MS Excel a vyexportována jako matice délek frangmetů ve formátu CSV. Výpočet matice vzdáleností a finální zobrazení Sammonovou projekcí byly provedeny v prostředí R s využitím knihovny MASS.

7. Výsledky

7.1. Měření respirace

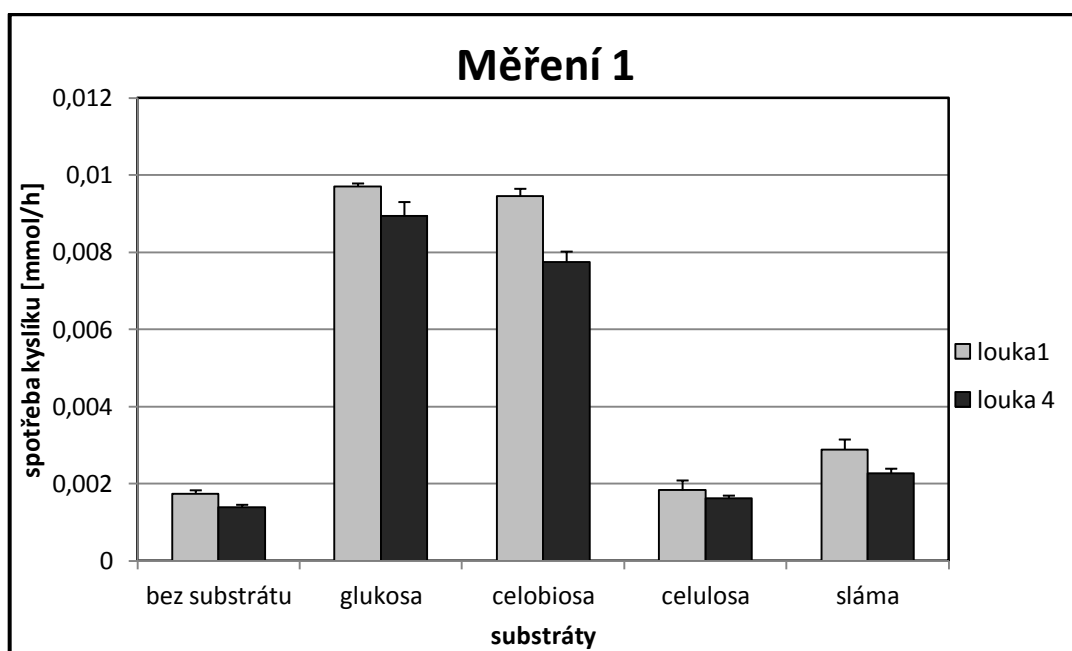
7.1.1. Měření 1

V prvním měření byly jako přídatné substráty použity jednoduché i složité sacharidy a sláma. Měření byla aplikována na vzorky půdy z obou odběrových lokalit. Přehled substrátů je uveden v tab. 7.1., výsledky respirace pak v grafu 7.1.

Tab. 7.1. – Přehled substrátů v jednotlivých vzorcích

lokalita	číslo vzorku	substrát	množství substrátu	přídavek vody
louka 1	1,2,3,4,5,6	bez substrátu		1 ml
louka 1	7,8,9,10,11,12	glukosa	0,3 g v 1 ml vody	
louka 1	13,14,15,16,17,18	celobiosa	3 g	1 ml
louka 1	19,20,21,22,23,24	celulosa	0,3 g	1 ml
louka 1	25,26,27,28,29,30	sláma	0,3 g	1 ml
louka 4	31,32,33,34,35,36	bez substrátu		1 ml
louka 4	37,38,39,40,41,42	glukosa	0,3 g v 1 ml vody	
louka 4	43,44,45,46,47,48	celobiosa	3 g	1 ml
louka 4	49,50,51,52,53,54	celulosa	0,3 g	1 ml
louka 4	55,56,57,58,59,60	sláma	0,3 g	1 ml

Graf 7.1. – Výsledky měření respirace s cukry



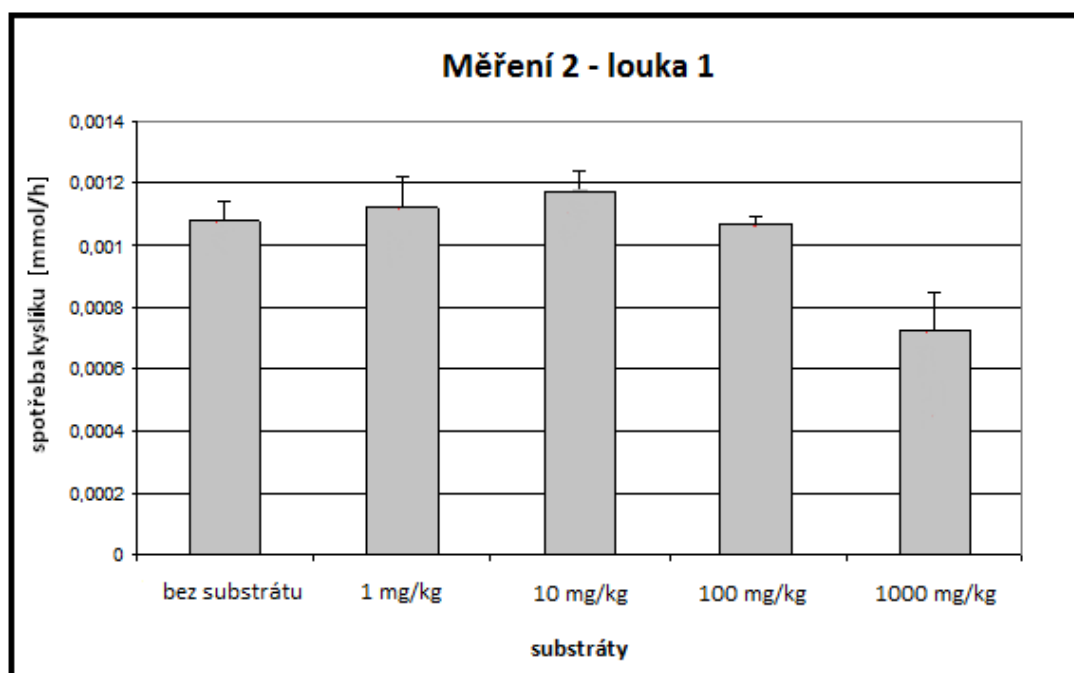
7.1.2. Měření 2

Při druhém běhu měření bylo do vzorků dodáváno kadmium. Jako zdroj kadmia byl použit tetrahydrát dusičnanu kademnatého, do vzorků byl přidán ve vzrůstající koncentraci, množství kadmia je uvedeno v tab. 7.2. Výsledky jsou pak uvedeny v grafech 7.2. a 7.3.

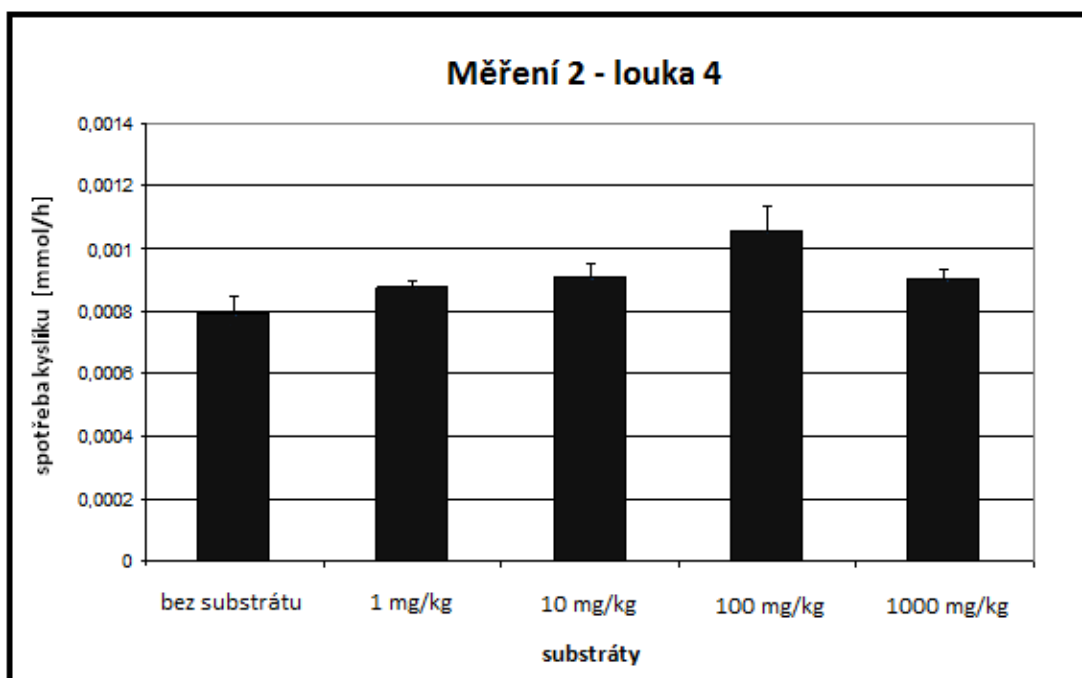
Tab. 7.2. – Množství kadmia ve vzorcích

lokalita	číslo vzorku	přidaný kov	množství
louka 1	1,2,3,4,5,6	bez přídavku	
louka 1	7,8,9,10,11,12	kadmium	1 mg/kg
louka 1	13,14,15,16,17,18	kadmium	10 mg/kg
louka 1	19,20,21,22,23,24	kadmium	100 mg/kg
louka 1	25,26,27,28,29,30	kadmium	1000 mg/kg
louka 4	31,32,33,34,35,36	bez přídavku	
louka 4	37,38,39,40,41,42	kadmium	1 mg/kg
louka 4	43,44,45,46,47,48	kadmium	10 mg/kg
louka 4	49,50,51,52,53,54	kadmium	100 mg/kg
louka 4	55,56,57,58,59,60	kadmium	1000 mg/kg

Graf 7.2. – Měření respirace s kadmiem – louka 1



Graf 7.3. – Měření respirace s kadmiem – louka 4



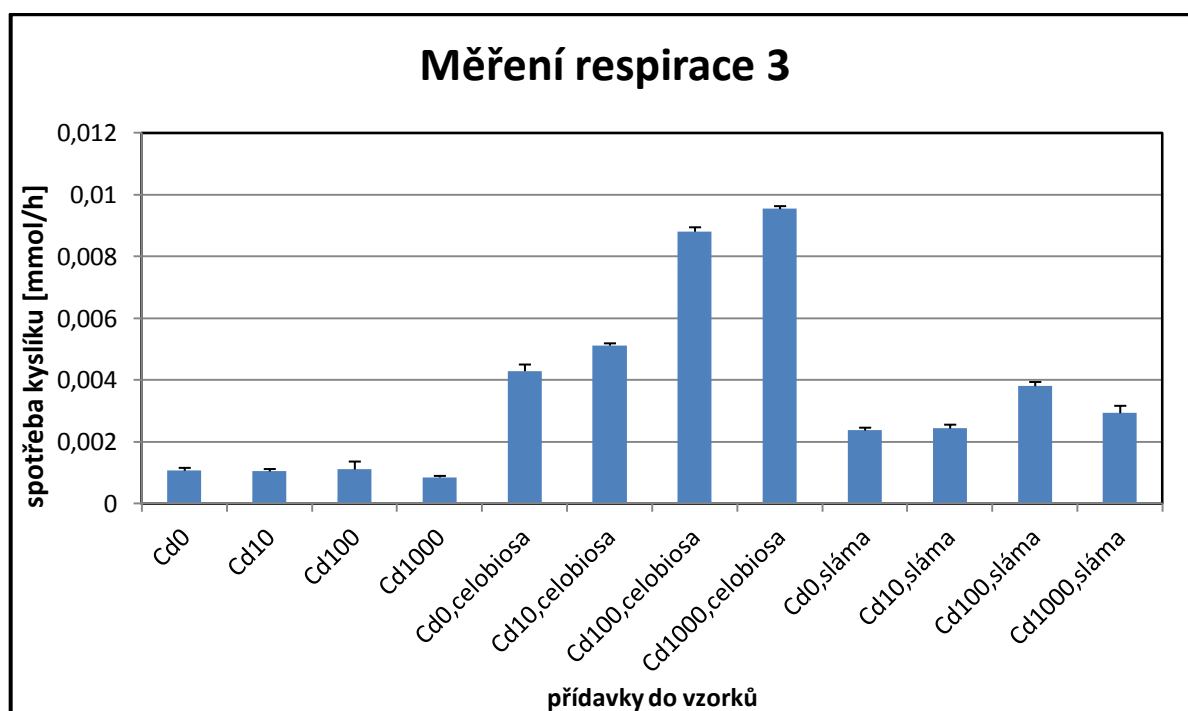
7.1.3. Měření 3

Při třetím měření byly použity pouze vzorky půdy z louky č. 1. Tentokrát byly jako substráty použity sacharidy a sláma v kombinaci se zdrojem kadmia. Přehled substrátů v jednotlivých vzorcích je uveden v tab. 7.3. Výsledky jsou zpracovány do grafu 7.4.

Tab. 7.3. – Přehled přísad do vzorků

lokality	číslo vzorku	substrát	přidaný kov	množství kadmia
louka 1	1,2,3,4,5	bez substrátu	bez přísady	
louka 1	6,7,8,9,10	bez substrátu	kadmium	10 mg/kg
louka 1	11,12,13,14,15	bez substrátu	kadmium	100 mg/kg
louka 1	16,17,18,19,20	bez substrátu	kadmium	1000 mg/kg
louka 1	21,22,23,24,25	celobiosa	bez přísady	
louka 1	26,27,28,29,30	celobiosa	kadmium	10 mg/kg
louka 1	31,32,33,34,35	celobiosa	kadmium	100 mg/kg
louka 1	36,37,38,39,40	celobiosa	kadmium	1000 mg/kg
louka 1	41,42,43,44,45	sláma	bez přísady	
louka 1	46,47,48,49,50	sláma	kadmium	10 mg/kg
louka 1	51,52,53,54,55	sláma	kadmium	100 mg/kg
louka 1	56,57,58,59,60	sláma	kadmium	1000 mg/kg

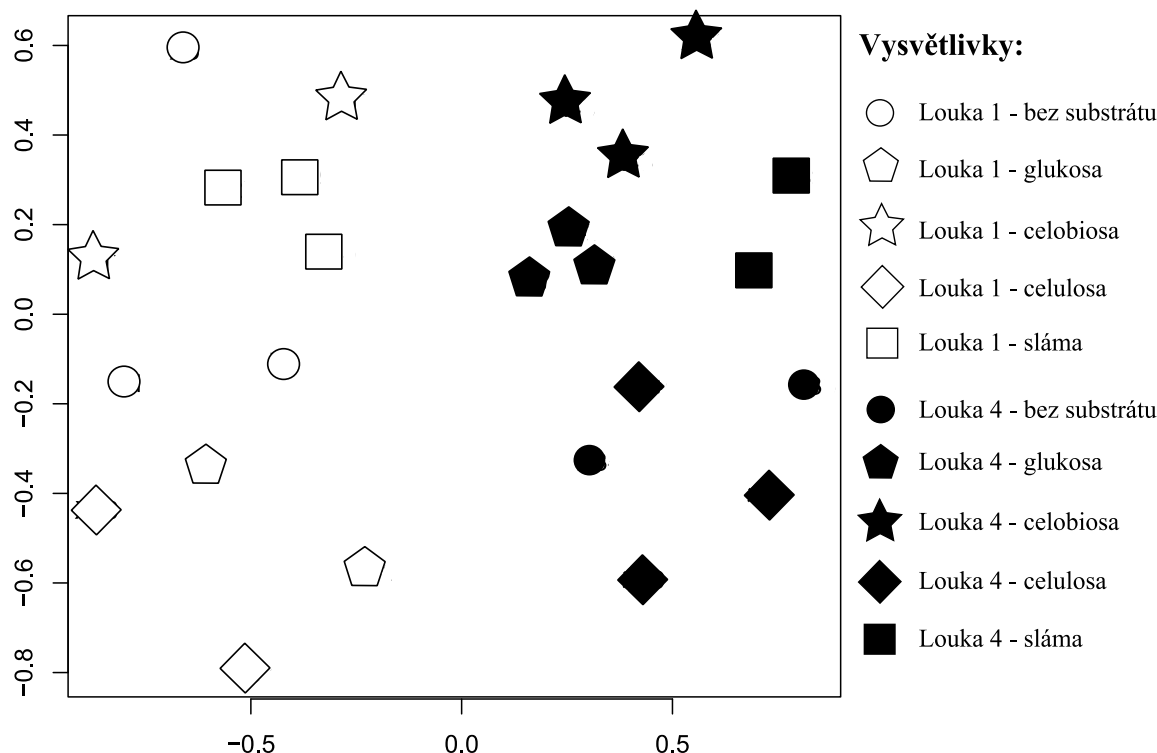
Graf 7.4. – Výsledky měření respirace 3



7.2. Fragmentační analýza

Z respiračního pokusu 1, kde byl sledován vliv přidavku glukosy, celobiosy, celulosy a slámy, byly odebrány vzorky a požitý pro analýzu T-RFLP změn společenstva aktinobakterií. U získaných T-RFLP profilů byly vypočteny matice vzdáleností a zobrazeny Sammonovou projekcí. Výsledky analýzy jsou znázorněny v následujícím diagramu (obr. 7.1.)

Obr. 7.1. – Výsledky fragmentační analýzy



8. Diskuze

Z naměřených hodnot respirace v měření 1 a 2 vyplývá, že bakteriální společenstvo, žijící v půdě s vyšším obsahem těžkým kovů, vykazuje vyšší respirační aktivitu *in vitro*. Z grafu 7.1. je jasně vidět, že substráty glukosa a celobiosa významně zvyšují respiraci v půdě, protože jsou nejsnáze využitelné. Naopak celulosa neměla měřitelný vliv na respiraci a sláma absolutní hodnotu zvýšila mírně, ale zvýšila rozdíl mezi oběma lokalitami. Nejvíce rozdíl aktivity mezi oběma lokalitami zvýraznil přidavek celobiosy. Vyšší respirační aktivita půdy s vyšší úrovní kontaminace byla popsána po aplikaci čistírenského kalu (*Fließbach et al., 1994*) nebo v pokusu s přidavky jednoduchého a komplexního substrátu (*Chander a Brookes, 1991*). Podle jiných studií se vliv kontaminace na respirační aktivitu půdního společenstva může odlišovat v závislosti na dalších faktorech, např. typu půdy (*Khan a Scullion, 2000*).

Při druhém pokusu bylo do vzorků přidáváno v různé koncentraci kadmium. Ve více zamořené oblasti byl se zvyšující se koncentrací kadmia pozorován mírný nárůst respirace až do hodnoty 10 mg.kg^{-1} , pak následoval pokles hodnoty, a při koncentraci kadmia 1000 mg.kg^{-1} respirace dosahovala 65 % kontrolního vzorku bez přidavku. U půdy z méně kontaminované oblasti hodnota respirace mírně stoupala, překvapivě až

do koncentrace kadmia 100 mg.kg^{-1} , pokles byl pozorován až při koncentraci 1000 mg.kg^{-1} , avšak stále byla o necelých 15 % vyšší než hodnota kontroly.

V posledním pokusu, kdy byly do vzorků přidávány současně substráty a kov, respirace oproti kontrole nejvíce stoupala s přidavkem celobiosy a se zvyšující se koncentrací kovu. Nárůst hodnot respirace byl patrný i u přidavku slámy s kovem. Hodnoty respirace u vzorků s kadmii do koncentrace 100 mg.kg^{-1} byly vyrovnané, mírný pokles nastal u koncentrace 1000 mg.kg^{-1} . Stejný průběh byl zaznamenán i u vzorků se slámou, hodnoty respirace vzrostly zhruba dvojnásobně, u koncentrace 100 mg.kg^{-1} přibližně trojnásobně a u koncentrace 1000 mg.kg^{-1} respirační aktivita klesla na 125 % kontroly bez přidavku kovu. Zajímavé výsledky byly získány přidavkem kadmia a celobiosy, při koncentraci 100 mg.kg^{-1} byla respirační aktivita dvojnásobná oproti vzorku bez kadmia a i při koncentraci 1000 mg.kg^{-1} byl zaznamenán nárůst aktivity až na 220 % kontrolního vzorku. Výsledek je poměrně překvapivý, protože v předchozích měřeních při koncentraci 1000 mg.kg^{-1} respirační aktivita klesala, takže můžeme říct, že v tomto případě vysoká koncentrace ještě více aktivovala respiraci společenstva.

Fragmentační analýza ukázala, že se půdy obou lokalit liší strukturou aktinobakteriálního společenstva. U lokality 1 se nejvíce oproti kontrole lišila společenstva po přidavku glukosy a celulosy. Naopak u lokality 4 se nejvíce lišily vzorky po přidání glukosy, celobiosy a slámy. Žádný z přidavků nenarušil primární oddělení profilů společenstev obou lokalit.

9. Závěry

- Půda s vyšší úrovní kontaminace těžkými kovy vykazovala vyšší respirační aktivitu *in vitro* ve srovnání s méně kontaminovanou půdou.
- Měření respirace s přidavky substrátu bylo zjištěno, že všechny přidané substráty zvyšovaly hodnoty respirace, avšak největší nárůst byl zaznamenán u jednodušších substrátů – glukosy a celobiosy.
- Při přidávání kadmia do půdních vzorků byl také zaznamenán nárůst respirace, překvapivě výraznější u půdy z méně kontaminované lokality.
- Po přidávání substrátů společně s kovem se respirace zvyšovala s rostoucí koncentrací kovu. Nárůst hodnot byl patrnější při použití jednoduššího substrátu –

celobiosy než u složitějšího – slámy. Přídavek celobiosy způsobil, že pokles respirace nebyl pozorován ani při nejvyšší koncentraci kadmia, naopak i zvýšení koncentrace kadmia na $1000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ respiraci dále zvyšovalo.

- Fragmentační analýza jasně prokázala odlišnost společenstev aktinobakterií dvou různě kontaminovaných lokalit.

Použitá literatura

- Alexander, M. (1977) Introduction to Soil Microbiology, second ed, JohnWiley Sons Inc, NewYork, USA.
- Anderson, I. C. & P. I. Parkin (2007) Detection of active soil fungi by RT-PCR amplification of precursor rRNA molecules. *Journal of Microbiological Methods*, 68, 248-253.
- Avanissaghajani, E., K. Jones, D. Chapman & C. Brunk (1994) A molecular technique for identification of bacteria using small-subunit ribosomal-rna sequences. *Biotechniques*, 17, 144-&.
- Baath, E. (1989) Effects of heavy-metals in soil on microbial processes and populations (a review). *Water Air and Soil Pollution*, 47, 335-379.
- Baldrian, P., M. Kolarik, M. Stursova, J. Kopecky, V. Valaskova, T. Vetrovsky, L. Zifcakova, J. Snajdr, J. Ridl, C. Vlcek & J. Voriskova (2012) Active and total microbial communities in forest soil are largely different and highly stratified during decomposition. *Isme Journal*, 6, 248-258.
- Berg, B. (2000) Litter decomposition and organic matter turnover in northern forest soils. *Forest Ecology and Management*, 133, 13-22.
- Bardgett, R. (2005) The biology of soil: a community and ecosystem approach, Oxford University Press, Oxford, United Kingdom.
- Berg, B. (2000) Litter decomposition and organic matter turnover in northern forest soils. *Forest Ecology and Management*, 133, 13-22.
- Biederbeck, V. O., C. A. Campbell & A. E. Smith (1987) Effects of long-term 2,4-d field applications on soil biochemical processes. *Journal of Environmental Quality*, 16, 257-262.
- Bowker, M. A., F. T. Maestre & C. Escolar (2010) Biological crusts as a model system for examining the biodiversity-ecosystem function relationship in soils. *Soil Biology & Biochemistry*, 42, 405-417.
- Buscot, F. (2005). What are soils?, p. 3–18. In F. Buscot and A. Varma (ed.), *Microorganisms in soils: roles in genesis and functions*. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Cermak, L., J. Kopecky, J. Novotna, M. Omelka, N. Parkhomenko, K. Plhacova & M. Sagova-Mareckova (2008) Bacterial communities of two contrasting soils reacted differently to lincomycin treatment. *Applied Soil Ecology*, 40, 348-358.
- Chander, K. & P.C. Brookes (1991) Microbial biomass dynamics during the decomposition of glucose and maize in metal-contaminated and non-contaminated soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 23, 917–925.
- Christensen, M. (1989) A view of fungal ecology. *Mycologia*, 81, 1-19.
- Curl, E., Truelove, B. (1986). *The Rhizosphere*. Springer, Berlin, 288 pp.
- Dejonghe, W., J. Goris, S. El Fantroussi, M. Hofte, P. De Vos, W. Verstraete & E. M. Top (2000) Effect of dissemination of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) degradation plasmids on 2,4-D degradation and on bacterial community structure in two different soil horizons. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 3297-3304.
- DeSantis, T. Z., P. Hugenholtz, K. Keller, E. L. Brodie, N. Larsen, Y. M. Piceno, R. Phan & G. L. Andersen (2006a) NAST: a multiple sequence alignment server for comparative analysis of 16S rRNA genes. *Nucleic Acids Research*, 34, W394-W399.

- DeSantis, T. Z., P. Hugenholtz, N. Larsen, M. Rojas, E. L. Brodie, K. Keller, T. Huber, D. Dalevi, P. Hu & G. L. Andersen (2006b) Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 5069-5072.
- Diniz, J. A. F. & M. P. D. Telles (2000) Spatial pattern and genetic diversity estimates are linked in stochastic models of population differentiation. *Genetics and Molecular Biology*, 23, 541-544.
- Doran, J.W., T.B. Parkin, Defining and assessing soil quality, in: J.W. Doran, D.C. Coleman, D.F. Bezdicek, B.A. Stewart (Eds.), *Defining Soil Quality for a Sustainable Environment*. Soil Sci. Soc. Am. Special Publication No. 35, Soil Science Society of America, Madison, USA, (1994), pp. 3–21.
- Dudka, S. & D. C. Adriano (1997) Environmental impacts of metal ore mining and processing: A review. *Journal of Environmental Quality*, 26, 590-602.
- Dunbar, J., L. O. Ticknor & C. R. Kuske (2000) Assessment of microbial diversity in four southwestern United States soils by 16S rRNA gene terminal restriction fragment analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 2943-2950.
- Dunbar, J., L. O. Ticknor & C. R. Kuske (2001) Phylogenetic specificity and reproducibility and new method for analysis of terminal restriction fragment profiles of 16S rRNA genes from bacterial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 190-197.
- Elliott, L. F. & J. M. Lynch (1994) Biodiversity and soil resilience. *Soil Resilience and Sustainable Land Use*, 353-364.
- Fierer, N., M. Breitbart, J. Nulton, P. Salamon, C. Lozupone, R. Jones, M. Robeson, R. A. Edwards, B. Felts, S. Rayhawk, R. Knight, F. Rohwer & R. B. Jackson (2007) Metagenomic and small-subunit rRNA analyses reveal the genetic diversity of bacteria, archaea, fungi, and viruses in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 7059-7066.
- Fließbach, A., R. Martens & H.H. Reber (1994) Soil microbial biomass and microbial activity in soils treated with heavy metal contaminated sewage sludge. *Soil Biology and Biochemistry*, 26, 1201–1205
- Fredrickson, J. K., D. L. Balkwill, J. M. Zachara, S. M. W. Li, F. J. Brockman & M. A. Simmons (1991) Physiological diversity and distributions of heterotrophic bacteria in deep cretaceous sediments of the atlantic coastal-plain. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 402-411.
- Giller, K. E., E. Witter & S. P. McGrath (1998) Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: A review. *Soil Biology & Biochemistry*, 30, 1389-1414.
- Gilmour, C. M., O. N. Allen & E. Truog (1948) Soil aggregation as influenced by the growth of mold species, kind of soil, and organic matter. *Soil Science Society of America Proceedings*, 13, 292-296.
- Giovannoni, S. (2004) Evolutionary biology - Oceans of bacteria. *Nature*, 430, 515-516.
- Grundmann, G. L. (2004) Spatial scales of soil bacterial diversity - the size of a clone. *Fems Microbiology Ecology*, 48, 119-127.
- Grundmann, L. G. & F. Gourbiere (1999) A micro-sampling approach to improve the inventory of bacterial diversity in soil. *Applied Soil Ecology*, 13, 123-126.
- He, Z. L., T. J. Gentry, C. W. Schadt, L. Y. Wu, J. Liebich, S. C. Chong, Z. J. Huang, W. M. Wu, B. H. Gu, P. Jardine, C. Criddle & J. Zhou (2007) GeoChip: a comprehensive microarray for investigating biogeochemical, ecological and environmental processes. *Isme Journal*, 1, 67-77.
- Hobbie, S. E. (1996) Temperature and plant species control over litter decomposition in Alaskan tundra. *Ecological Monographs*, 66, 503-522.
- Johnsen, K., C. S. Jacobsen, V. Torsvik & J. Sorensen (2001) Pesticide effects on bacterial diversity in agricultural soils - a review. *Biology and Fertility of Soils*, 33, 443-453.

- Jordahl, J.L., Karlen, D.L. (1993). Comparison of alternative farming systems III. Soil aggregate stability. *Am. J. Alt. Agricul.* 8, 27–33.
- Kauffmann, I. M., J. Schmitt & R. D. Schmid (2004) DNA isolation from soil samples for cloning in different hosts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64, 665-670.
- Kennedy, A.C. (1994). Carbon utilization and fatty acid profiles for characterization of bacteria. In: Weaver, R., Angle, J.S.(Eds.), *Methods of Soil Analysis. Part 2 Microbiological and Biochemical Properties*. Soil Science Society of America, Madison, WI, pp. 543–554.
- Kennedy, A. C. (1999) Bacterial diversity in agroecosystems. *Agriculture Ecosystems & Environment*, 74, 65-76.
- Khan, M. & J. Scullion (2000) Effect of soil on microbial responses to metal contamination. *Environmental Pollution*, 110, 115-125.
- Kizilkaya, R., T. Askin, B. Bayrakli & N. Saglam (2004) Microbiological characteristics of soils contaminated with heavy metals. *European Journal of Soil Biology*, 40, 95-102.
- Kogel-Knabner, I. (2002) The macromolecular organic composition of plant and microbial residues as inputs to soil organic matter. *Soil Biology & Biochemistry*, 34, 139-162.
- Kopecky, J., G. Novotna & M. Sagova-Mareckova (2009) Modification of the terminal restriction fragment length polymorphism analysis for assessment of a specific taxonomic group within a soil microbial community. *Plant Soil and Environment*, 55, 397-403.
- Kozdroj, J. & J. D. van Elsas (2001) Structural diversity of microorganisms in chemically perturbed soil assessed by molecular and cytochemical approaches. *Journal of Microbiological Methods*, 43, 197-212.
- Lauber, C. L., M. Hamady, R. Knight & N. Fierer (2009) Pyrosequencing-Based Assessment of Soil pH as a Predictor of Soil Bacterial Community Structure at the Continental Scale. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 5111-5120.
- Liao, M. & X. M. Xie (2007) Effect of heavy metals on substrate utilization pattern, biomass, and activity of microbial communities in a reclaimed mining wasteland of red soil area. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 66, 217-223.
- Liu, W. T., T. L. Marsh, H. Cheng & L. J. Forney (1997) Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 4516-4522.
- Lynch, J.M., Bragg, E. (1985). Microorganisms and soil aggregate stability. *Adv. Soil Sci.* 2, 133–171.
- Ma, L. Q. & G. N. Rao (1997) Chemical fractionation of cadmium, copper, nickel, and zinc in contaminated soils. *Journal of Environmental Quality*, 26, 259-264.
- Madigan, M., Martinko, J (2011) *Brock Biology of Microorganisms*, Pearson Educational, 13 ed.
- Marsh, T. L. (1999) Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP): an emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplification products. *Current Opinion in Microbiology*, 2, 323-327.
- Nannipieri, P., Greco, S., & Ceccanti, B. (1990). Ecological significance of the biological activity in soil. In G. Stotzky & J. M. Bollag (Eds.), *Soil biochemistry* (Vol. 6, pp. 233–355). New York: Marcel Dekker Inc.
- Nocker, A., M. Burr & A. K. Camper (2007) Genotypic microbial community profiling: A critical technical review. *Microbial Ecology*, 54, 276-289.

- Nolan, R.D., Cross, R. (1988). Isolation and screening of actinomycetes. In: Goodfellow, M., Williams, S.T., Mordarski, M.(Eds.), *Actinomycetes in biotechnology*. Academic Press, San Diego, CA, pp. 1–32.
- Paterson, E., G. Osler, L. A. Dawson, T. Gebbing, A. Sim & B. Ord (2008) Labile and recalcitrant plant fractions are utilised by distinct microbial communities in soil: Independent of the presence of roots and mycorrhizal fungi. *Soil Biology & Biochemistry*, 40, 1103-1113.
- Plaza, G. A., G. Nalecz-Jawecki, O. Pinyakong, P. Illmer & R. Margesin (2010) Ecotoxicological and microbiological characterization of soils from heavy-metal- and hydrocarbon-contaminated sites. *Environmental Monitoring and Assessment*, 163, 477-488.
- Price, P. W. (1988) An overview of organismal interactions in ecosystems in evolutionary and ecological time. *Agriculture Ecosystems & Environment*, 24, 369-377.
- Ramirez, K. S., C. L. Lauber, R. Knight, M. A. Bradford & N. Fierer (2010) Consistent effects of nitrogen fertilization on soil bacterial communities in contrasting systems. *Ecology*, 91, 3463-3470.
- Rogers, J.E., S.W. Li (1985) Effect of heavy metal and other inorganic ions on soil microbial activity: soil dehydrogenase assay as a simple toxicity test, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 34:858–865.
- Roose-Amsaleg, C. L., E. Garnier-Sillam & M. Harry (2001) Extraction and purification of microbial DNA from soil and sediment samples. *Applied Soil Ecology*, 18, 47-60.
- Rossello-Mora, R. & R. Amann (2001) The species concept for prokaryotes. *Fems Microbiology Reviews*, 25, 39-67.
- Rouatt, J.W., Katznelson, H., (1961). A study of the bacteria on the root surface and in the rhizosphere soil of crop plants. *J. Appl. Bacteriol.* 24, 164–171.
- Sagova-Mareckova, M., L. Cermak, J. Novotna, K. Plhacova, J. Forstova & J. Kopecky (2008) Innovative methods for soil DNA purification tested in soils with widely differing characteristics. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 2902-2907.
- Sagova-Mareckova, M., M. Omelka, L. Cermak, Z. Kamenik, J. Olsovska, E. Hackl, J. Kopecky & F. Hadacek (2011) Microbial Communities Show Parallels at Sites with Distinct Litter and Soil Characteristics. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 7560-7567.
- Santos, P.S., Abad, E.J., Paguia, A.G., Lat, B.S., (1976). Vitamin B12 and antibiotic activities of actinomycetes isolated by a selective method from soil samples. *Phillip J. Sci.* 103, 208–220.
- Swinnen, J., J. A. Vanveen & R. Merckx (1995) Root decay and turnover of rhizodeposits in field-grown winter-wheat and spring barley estimated by c-14 pulse-labeling. *Soil Biology & Biochemistry*, 27, 211-217.
- Thomas, V. G. & P. G. Kevan (1993) Basic principles of agroecology and sustainable agriculture. *Journal of Agricultural & Environmental Ethics*, 6, 1-19.
- Tsezos, M. (2009) Metal-microbes interactions: beyond environmental protection. *Biohydrometallurgy: a Meeting Point between Microbial Ecology, Metal Recovery Processes and Environmental Remediation*, 71-73, 527-532.
- Turco, R.F., Bezdicek, D.F. (1987) Diversity within two serogroups of *Rhizobium leguminosarum* native to soils in the Palouse of eastern Washington. *Ann. Appl. Biol.* 111, 103–114
- Urbanova, M., J. Kopecky, V. Valaskova, M. Sagova-Mareckova, D. Elhottova, M. Kyselkova, Y. Moenne-Loccoz & P. Baldrian (2011) Development of bacterial community during spontaneous succession on spoil heaps after brown coal mining. *Fems Microbiology Ecology*, 78, 59-69.
- Walker, B. H. (1992) Biodiversity and ecological redundancy. *Conservation Biology*, 6, 18-23.

Visser, S., D. Parkinson, Soil biological criteria as indicator of soil quality: soil microorganisms, *Am. J. Alter. Agric.* 7 (1992) 33–37.

Wardle, D.A., A. Ghani (1995) A critique of the microbial metabolit quotient (qCO_2) as a bioindicator of disturbance and ecosystem development, *Soil Biol. Biochem.* 27 1601–1610.

Yeates, G., Darrah, P.R., (1991) Bacterial changes in a model rhizosphere. *Soil Biol. Biochem.* 23, 963–971.

Zak, J.C., Willig, M.R., Moorhead, D.L., Wildman, H.G. (1994) Functional diversity of bacterial communities: a quantitative approach. *Soil Biol. Biochem.* 26, 1101–1108.